



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Hidalgo, Romina

Desarrollo de membranas difusivas para el control de metabolitos en un hígado bio-artificial



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Hidalgo, R. (2018). *Desarrollo de membranas difusivas para el control de metabolitos en un hígado bio-artificial*. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina : Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/866>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Desarrollo de membranas difusivas para el control de metabolitos en un hígado bio-artificial

TESIS DOCTORAL

Romina Hidalgo

rominahidalgo@gmail.com

Resumen

El hígado ocupa un lugar central en el metabolismo corporal manteniendo la homeostasis. La insuficiencia hepática produce una hipoglucemia y la elevación de los niveles plasmáticos de numerosas catabolitos como bilirrubina, amoníaco, lactato, ácidos grasos libres y aminoácidos aromáticos. La acumulación de estas sustancias puede originar una falla multi-orgánica que puede llegar a ser letal.

A pesar de la efectividad del trasplante hepático en la supervivencia de pacientes con falla hepática, la utilidad de esta terapia sigue siendo limitada debido a la escasa disponibilidad de órganos. Por otro lado, no existe aún un dispositivo efectivo para pacientes con falla hepática aguda que evite el trasplante hepático, a diferencia de lo que ocurre con las fallas de otros órganos, para las cuales existen terapias de soporte.

Las terapias de soporte hepático con resultados más promisorios están basadas en sistemas híbridos o bio-artificiales, formados por dos componentes: uno biológico (células del parénquima hepático), y uno sintético, que sirva de soporte físico y funcional. En este sentido, el objetivo de este plan de tesis consistió en la obtención y estudio de las propiedades difusivas de un nuevo material filtrante para su utilización como soporte sintético de un hígado bioartificial extracorpóreo (BAL) de manera de controlar el intercambio de sustancias entre la sangre y las células.

Es este trabajo se prepararon un nuevo tipo de membrana de intercambio de solutos en base a hidrogeles de poliacrilamida (poliAAM) y polimetacrilato en el interior de una membrana, mediante una técnica de polimerización iniciada por radiación ionizante. El hidrogel confinado de poliAAM 0,5% y un 1% de entrecruzamiento fue el que mostró las mejores propiedades de difusión de solutos de bajo PM, como la glucosa, y una selectividad mayor a 2,2 veces en la difusión de albumina respecto de las inmunoglobulinas, principal proteína del sistema inmunológico.

También se caracterizaron funcionalmente esferoides hepáticos porcinos como potencial componente biológico del BAL, determinándose los requerimientos de oxígeno y su capacidad de detoxificación, parámetros clave para el escalado de un prototipo funcional de BAL.

A partir de la caracterización de los dos componentes, el sintético y biológico, se prepararon dispositivos BAL conteniendo las membranas desarrolladas a escala reducida para explorar y resolver posibles inconvenientes de ensamblado y comprobar la factibilidad de su construcción.

Finalmente se obtuvo un dispositivo que reunió los requisitos mínimos planteados como son el control de transferencia de solutos, transferencia de oxígeno, y mantenimiento de la viabilidad de los esferoides hepáticos. Esto permitió estimar las dimensiones de un dispositivo BAL para su aplicación clínica y su capacidad de detoxificación máxima esperada de acuerdo a los datos experimentales obtenidos en este trabajo.

Desarrollo de membranas difusivas para el control de metabolitos en un hígado bio-artificial

Lic. Romina Hidalgo

Tesis presentada para obtener el título de
Doctora de la Universidad Nacional de Quilmes
Mención Ciencias Básicas y Aplicadas

Director: Mariano Grasselli

Co-Director: Pablo Argibay

Bernal, febrero de 2017

El trabajo de investigación que dio origen a esta tesis fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT), y la Universidad Nacional de Quilmes.

Dedicado a mi familia, y a la memoria de mamá.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de investigación que permitió concretar esta tesis fue largo y sinuoso por diferentes motivos, pero siempre encontré personas maravillosas que me acompañaron en mi crecimiento personal y profesional.

En primer lugar, agradezco a mi director Mariano Grasselli, quien además de ser un ejemplo como científico, es una excelente persona y amigo.

Agradezco también a Diego Golombek, quien ha sido mi tutor desde que soy alumna de grado, y me animó a buscar un tema de investigación que me apasionara.

Agradezco especialmente a mis amigos y colegas de la Universidad Nacional de Quilmes, Laura Carbajal, Claudia Britos, Sonia Salvatore, Silvia Soto, Flavia Quiroga, Mirna Sánchez, y especialmente a Mariana Capello y Facundo Temprana, que me han demostrado una vez más que son amigos increíbles.

Agradezco además a mis amigos y colegas del Hospital Italiano de Buenos Aires: Pablo Argibay, (codirector de esta tesis), Cynthia Castronuovo, Valeria Arnejo, Mariana Barbich, Sung Ho Hyon, Esteban Mele, Luis Sanjurjo, Marcelo Ielpi, Alicia Lorenti, Feliz Núñez, Marcos Bujas y Patricia Sorroche.

Realizar un trabajo multidisciplinario requirió de mucha ayuda a quienes estoy muy agradecida, entre ellos: a Nora Vizioli, Ángel Yone y José María Delfino del IQUIFIB UBA, Adolfo Guinle del Lab. Chamoses, Viviana Spotorno del INTA Castelar, Eduardo Smolko de CNEA, Carlos Mignone del CINDEFI, y Joaquín Rodríguez de la UNR.

Muchas personas me aconsejaron y motivaron para que no me diera por vencida, es un honor contar con consejeros como Stanley Kowalski, Edy Machado, Mariana Berenstein y Alejandra Alvaredo.

Y finalmente pero más importante, a mi compañero de vida Eduardo Holmes Brown, quien ha sido mi principal pilar para concretar esta tesis y llena de felicidad mi vida.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en:

Capítulo “El hígado bioartificial”, publicado en el libro “Medicina regenerativa: hechos y fantasías en relación con los potenciales terapéuticos de las células madre”. Pablo Argibay (compilador), Delhospital Ediciones, Buenos Aires, mayo 2012.

Hidalgo, R., N. Vizioli, E.E. Smolko, P. Argibay and M. Grasselli., Radiosynthesis of hydrogel confined to hollow-fiber membranes for the design of a bioartificial extracorporeal liver. Radiation Physics and Chemistry. Volume 76, Issue 8-9, p. 1419-1424.

ABREVIATURAS

AAm	Acrilamida
AcN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanina transaminasa
ATR	Attenuated total Reflectance – Reflexión total atenuada
BAL	Bioartificial liver (hígado bio-artificial)
BHSS [®]	Bioartificial Hepatic Support System
BLSS [®]	Bioartificial Liver Support System
BMP	Buenas prácticas de manufactura
CNEA	Comisión Nacional de Energía Atómica
DEGDMA	Dietilenglicol dimetacrilato
EC	Electroforesis capilar
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELAD [®]	Extracorporeal Liver Assist Device
FDA	Food and drug administration
FHAC	Falla hepática aguda sobre crónica
FHF	Falla hepática fulminante (o falla hepática aguda)
FT-IR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GC-ECD	Cromatografía gaseosa con captura y detección de electrones
Gr	Número de Graetz
Gy	Gray
HALSS [®]	Hybrid Artificial Support System
HBAL [®]	Hybrid Bioartificial Liver
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HEMA	Hidroxi etil metacrilato
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSA	Albúmina sérica humana
ICBME	Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental

IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
INCUCAI	Instituto Nacional Central Único de Coordinación de Ablación e Implante
IPS	Células madre pluripotenciales inducidas
IR	Infrarrojo
LDH	Lactato deshidrogenasa
LSS [®]	Liver support system
MARS [®]	Molecular Adsorbent Recirculating System
MELD	Modelo para enfermedades terminales del hígado
MELS [®]	Modular Extracorporeal liver support
MeOH	Metanol
MF	Micro filtración
MWCO	Molecular weight cut-off
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NF	Nano-filtración
NIH	National Institute of Health
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PCMV	Citomegalovirus porcino
PELD	Modelo para enfermedades terminales del hígado en pacientes pediátricos
PERV	Retrovirus endógeno porcino
PES	Poli aril etersulfona
pKa	Constante de equilibrio ácido-base
PLHV	Herpes linfotrófico porcino
PM	Peso molecular
poliHEMA	Poli (2-hidroxietil metacrilato)
PS	Polisulfona
PVP	Poli vinil pirrolidona
RFB	Radial Flow Bioreactor
RPC	Cromatografía de fase reversa
RT-PCR	Reacción de polimerasa en cadena acoplada a transcriptasa reversa
SEM	Espectroscopia electrónica de barrido

SPAD [®]	Single Pass Albumin Dialysis
TEA	Trietilamina
TECA-HALS	TECA-Hybrid Artificial Liver Support System
TGF β	Factor de crecimiento transformante
THF	Tetrahidrofurano
UF	Ultra filtración
UW	Solución de la Universidad de Wisconsin

SÍMBOLOS

C_{L_0}	Concentración de oxígeno disuelto inicial
D_{O_2}	Coeficiente de difusión del O_2
R_{O_2}	Velocidad de transferencia de oxígeno
$\tilde{S}$	Concentración de SO_3^- en estado estacionario
k'_{H_2O}	Factor de capacidad del agua
q_{O_2}	Velocidad específica de consumo de oxígeno
μ	Viscosidad
μ_e	Movilidad electroforética
a	Área específica
A	Área transversal de la membrana
B	Volumen molar de ese compuesto
C^*	Concentración crítica de O_2
C_e	Concentración del soluto en el exterior de la fibra
C_g	Concentración de O_2 en la fase gaseosa
C^{gel}	Concentración del soluto en el gel
C_i	Concentración del soluto en el interior de la fibra
C_L	Concentración de O_2 disuelto
C_{LR}	Concentración de O_2 disuelto en el reservorio
$C^{solución}$	Concentración del soluto en la solución
D_0	Coeficiente de difusión
d_e	Diámetro externo
d_{ef}	Diámetro efectivo

D_{ef}	Difusión efectiva
D^{gel}	Coeficiente de difusión en el gel
D_m	Coeficiente de difusión en la membrana
D_v	Velocidad de dilución
E	Fuerza del campo eléctrico
F	Caudal de gas
F_E	Fuerza eléctrica
F_F	Fuerza friccional
F_L	Caudal de líquido
g	Gramos
h	Altura del brazo abierto del respirómetro de Warburg
H	Constante de Henry
J_w	Flujo permeado
k	Coeficiente de transferencia de materia
K	Coeficiente de partición
k'	Factor de capacidad
k_0	Permeabilidad hidráulica de la membrana sin gel
k_h	Permeabilidad hidráulica
$k_{h, gel}$	Permeabilidad hidráulica del gel
k_L	Coeficiente de transferencia de O_2 en el líquido
k_{La}	Coeficiente de transferencia de oxígeno
k_m	Coeficiente de transferencia de O_2 en la membrana
k_T	Coeficiente de transferencia (de O_2) total
k_W	Constante del respirómetro de Warburg
L	Espesor de la membrana / Espesor de la película estanca
L_d	Longitud del capilar hasta el detector
L_f	Longitud de la fibra
M_e	Módulo elástico uniaxial
M_t	Masa total de soluto
N	Número de platos teóricos
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno
P	Permeabilidad

P'	Número de polaridad de Snyder
$P_{\text{creatinina}}$	Permeabilidad de la creatinina
P_g	Presión parcial del gas
P_{glucosa}	Permeabilidad de la glucosa
P_{IgG}	Permeabilidad de la IgG
P_v	Presión de vapor
Q	Caudal de agua que pasa a través de la membrana
q	Carga iónica
Q	Caudal de alimentación de SO_3^-
R	Constante de los gases ideales
r	Radio iónico
r_e	Radio externo de la fibra hueca
R_e	Resistencia externa
r_i	Radio interno de la fibra hueca
R_i	Resistencia interna
R_m	Resistencia de la membrana
r_p	Radio de la cadena de polímero
r_{poro}	Radio del poro
r_s	Radio de soluto
R_s	Resolución
S	Constante para cada analito
s	Selectividad
Sh	Numero de Sherwood
S_i	Fuerza de elución de cada solvente
S_R	Concentración de SO_3^- en el reservorio
S_T	Fuerza total de la fase móvil
t	Tiempo
T	Temperatura
t_0	Tiempo inicial
t_{lag}	Tiempo lag
t_m	Tiempo de migración
t_m	Tiempo de migración

v	Velocidad lineal del fluido
v_e	Velocidad electroforética
V_g	Volumen del gas en la fase gaseosa
V_L	Volumen del líquido del sistema
v_p	Volumen parcial específico del polímero
w_m	Peso de la membrana
w_{m+g}	Peso de la membrana con el gel
x	Volumen de gas intercambiado
X_E	Fracción de O_2 en la mezcla de gases de entrada
X_S	Fracción de O_2 en la mezcla de gases de salida
α	Solubilidad de un gas en un medio líquido
δ_d	Coefficiente de dispersión
ΔE_b	Energía interna de vaporización del compuesto
δ_h	Poder de formación de enlaces de hidrogeno
ΔP	Diferencia de presión
δ_p	Polaridad
δ_t	Parámetro de la solubilidad de Hildebrand
ε	Porosidad superficial de la membrana
η	Viscosidad de la solución de EC
ξ	Dimensión del retículo
τ	Tortuosidad de la membrana
τ_e	Tiempo de relajación elástica
φ	Fracción de volumen del gel
Φ	Fracción de volumen del solvente más fuerte en la mezcla que forma la fase móvil
Φ_i	Fracción de volumen del solvente i

Oda al hígado (fragmento)

Mientras
el corazón suena y atrae
la partitura de la mandolina,
allí adentro
tú filtras
y repartes,
separas
y divides,
multiplicas
y engrasas,
subes
y recoges
los hilos y los gramos
de la vida, los últimos
licores,
las íntimas esencias.

Viscera
submarina,
medidor
de la sangre,
vives
lleno de manos
y de ojos,
midiendo y trasvasando
en tu escondida
cámara
de alquimista.

Pablo Neruda, 1956

Índice general

1	<u>SISTEMAS DE SOPORTE HEPÁTICO.....</u>	1
1.1	LA IMPORTANCIA DEL HÍGADO	1
1.2	LAS COMPLICACIONES HEPÁTICAS	1
1.3	ETIOLOGÍA DE LA FALLA HEPÁTICA	2
1.4	TERAPIA ACTUAL: EL TRASPLANTE HEPÁTICO	3
1.5	TERAPIAS ALTERNATIVAS: DISPOSITIVOS DE SOPORTE HEPÁTICO.....	4
1.6	DISPOSITIVOS ARTIFICIALES.....	5
1.6.1	DISPOSITIVOS ARTIFICIALES NO ESPECÍFICOS.....	5
1.6.2	DISPOSITIVOS ARTIFICIALES ESPECÍFICOS	6
1.6.3	DISEÑOS DE DISPOSITIVOS ARTIFICIALES ESPECÍFICOS	7
1.7	SISTEMAS BIOLÓGICOS	10
1.7.1	DISPOSITIVOS BIO-ARTIFICIALES EXTRACORPÓREOS (BIOARTIFICIAL LIVER, BAL)	11
1.7.2	CÉLULAS PARA TERAPIAS CELULARES	11
1.7.3	DISEÑOS DE DISPOSITIVOS DE SOPORTE HEPÁTICO BIO-ARTIFICIALES	15
1.7.4	ASPECTOS CRÍTICOS DE DISEÑO DE UN DISPOSITIVO BAL	19
1.7.5	DISPOSITIVOS BAL EN FASE CLÍNICA	24
1.8	ENSAYOS CLÍNICOS	28
1.8.1	SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES.....	30
1.8.2	CONDICIÓN NEUROLÓGICA.....	31
1.8.3	PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.....	31
1.8.4	EVENTOS ADVERSOS OBSERVADOS	31
1.8.5	EFICACIA	32
1.9	PROYECCIONES FUTURAS.....	33
1.10	REFERENCIAS	35
2	<u>OBJETIVO</u>	45
3	<u>DISEÑO, PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MEMBRANA DIFUSIVA</u>	47
3.1	REACTOR DE MEMBRANAS	47
3.1.1	TIPO DE MEMBRANA: MATERIAL Y POROSIDAD	47
3.2	DISEÑO DE UNA NUEVA MEMBRANA.....	50
3.2.1	TIPOS DE HIDROGELES	51

3.2.2	PREPARACIÓN DE LOS HIDROGELES	52
3.2.3	CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	55
3.3	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MEMBRANAS	56
3.3.1	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	56
3.4	CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL	56
3.4.1	PERMEABILIDAD HIDRÁULICA.....	56
3.4.2	DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA PERMEABILIDAD DE MACROMOLÉCULAS	62
3.4.3	CORRELACIÓN CON MODELOS	65
3.4.4	TRANSFERENCIA OXÍGENO.....	69
3.5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	76
3.5.1	SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES CONFINADOS EN LAS MEMBRANAS.....	76
3.5.2	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	77
3.5.3	MICROSCOPIAS.....	77
3.5.4	DETERMINACIÓN DE LA PERMEABILIDAD HIDRÁULICA.....	78
3.5.5	DETERMINACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE SOLUTOS	78
3.5.6	DISEÑO DE UN DISPOSITIVO DE MEDICIÓN	79
3.5.7	TRANSFERENCIA DE OXÍGENO	81
3.6	RESULTADOS	82
3.6.1	SELECCIÓN DE HIDROGELES	82
3.6.2	SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES CONFINADOS EN LAS MEMBRANAS.....	83
3.6.3	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	86
3.6.4	CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	88
3.6.5	CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL.....	89
3.6.6	PERMEABILIDAD HIDRÁULICA.....	90
3.6.7	PERMEABILIDAD HIDRÁULICA: COMPARACIÓN CON MODELOS	91
3.6.8	TRANSPORTE DE SOLUTOS	94
3.6.9	TRANSPORTE DE SOLUTOS: COMPARACIÓN CON MODELOS.....	97
3.6.10	DETERMINACIÓN DE LA SELECTIVIDAD.....	102
3.6.11	SELECTIVIDAD: COMPARACIÓN CON MODELOS DE LITERATURA.....	103
3.6.12	TRANSFERENCIA DE PLASMA SANGUÍNEO.....	104
3.6.13	TRANSFERENCIA DE OXÍGENO	105
3.6.14	MÉTODO DE OXIDACIÓN DE SULFITO Y BALANCE GASEOSO	105
3.6.15	MÉTODO DINÁMICO (GASSING IN)	106
3.7	CONCLUSIONES	108
3.8	REFERENCIAS.....	110
4	<u>PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL COMPONENTE BIOLÓGICO</u>	<u>115</u>

4.1.1	ESTADO FISIOLÓGICO DE LOS HEPATOCITOS	116
4.1.2	CONSUMO DE OXÍGENO	116
4.1.3	ANÁLISIS METABÓLICO DE LOS ESFEROIDES.....	123
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	124
4.2.1	ABLACIÓN HEPÁTICA.....	124
4.2.2	AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS.....	125
4.2.3	VIABILIDAD Y FUNCIONALIDAD	129
4.2.4	CULTIVO DE ESFEROIDES	129
4.2.5	CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA.....	131
4.2.6	METABOLISMO Y DETERMINACIÓN DEL ION AMONIO.....	134
4.2.7	METABOLISMO Y DETERMINACIÓN DE DIAZEPAM	134
4.3	RESULTADOS	135
4.3.1	AISLAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LOS ESFEROIDES.....	135
4.3.2	CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA.....	138
4.3.3	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y ADN TOTAL	139
4.3.4	ESTADO FISIOLÓGICO DE LAS CÉLULAS	140
4.3.5	EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO.....	141
4.3.6	EVALUACIÓN METABOLISMO AMONIO Y DIAZEPAM	141
4.4	CONCLUSIONES	146
4.5	REFERENCIAS.....	147
5	<u>DISEÑO DE UN BIORREACTOR.....</u>	<u>151</u>
5.1	INTRODUCCIÓN.....	151
5.1.1	ASPECTOS CRÍTICOS DEL DISEÑO	151
5.1.2	ELECCIÓN DE LA MEMBRANA	154
5.1.3	DISEÑO DE UN BIORREACTOR DE FIBRA HUECA	155
5.1.4	ESQUEMA DE UN REACTOR DE FIBRAS HUECAS.....	156
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	157
5.2.1	PROTOTIPOS CONSTRUIDOS.....	157
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	160
5.3.1	PROTOTIPOS DESARROLLADOS	161
5.3.2	EVALUACIÓN DEL PROTOTIPO QUE CONTIENE EL COMPONENTE BIOLÓGICO	169
5.4	CONCLUSIONES	169
5.5	REFERENCIAS.....	170
6	<u>DISCUSIÓN</u>	<u>173</u>

6.1	CONSIDERACIONES	173
6.1.1	CANTIDAD DE CÉLULAS Y SUS REQUERIMIENTOS	173
6.1.2	TRATAMIENTO	174
6.2	CÁLCULO DEL ESCALADO	174
6.3	REFERENCIAS.....	177
7	<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>179</u>
8	<u>ANEXOS.....</u>	<u>181</u>
8.1	ANEXO 1: METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE DIAZEPAM Y SUS METABOLITOS	181
8.1.1	ANÁLISIS CUALITATIVO / CUANTITATIVO.....	181
8.1.2	FUNDAMENTOS DE LA SEPARACIÓN	182
8.1.3	PROCEDIMIENTO PRÁCTICO	186
8.2	MATERIALES Y REACTIVOS	187
8.3	RESULTADOS	188
8.3.1	OPTIMIZACIÓN DE LA FASE MÓVIL.....	189

1 SISTEMAS DE SOPORTE HEPÁTICO

1.1 LA IMPORTANCIA DEL HÍGADO

Desde hace siglos se conoce de la complejidad biológica del hígado. Si bien muchos procesos específicos que lleva a cabo aún no son entendidos, es claro que el hígado ocupa un lugar central en el metabolismo corporal manteniendo la homeostasis.

Su diversidad de funciones abarca los procesos de síntesis, depósito y biotransformación de biomoléculas como proteínas, glúcidos y lípidos, entre otras. Entre las proteínas que sintetiza, la albúmina es la más abundante, otras son el fibrinógeno y los factores de coagulación II, V, VIII, IX y X. Es un depósito de glucógeno, que se transforma en glucosa por medio de la glucogenólisis para proveer energía de manera inmediata. Una de las funciones más cruciales es la detoxificación, el hígado transforma metabolitos potencialmente peligrosos, toxinas y exceso de hormonas en compuestos hidrosolubles menos peligrosos por su fácil eliminación. Uno de estos compuestos es la urea, formada a partir del amoníaco, sustancia tóxica que proviene de la desaminación de aminoácidos. Entre otros ejemplos se puede citar el metabolismo del colesterol y triglicéridos, y de xenobióticos, como medicamentos y toxinas.

Todas estas funciones hepáticas mencionadas son llevadas a cabo por diferentes tipos celulares, aunque el principal son los hepatocitos. Un hígado adulto sano tiene una masa aproximada de 1.500 g y contiene alrededor de 100×10^6 hepatocitos, que representan 2/3 de la población celular hepática (Gautier and Legallais 2009). El tercio restante lo constituyen células endoteliales, las células de Kupffer (macrófagos especializados), y las células de Ito (repositorio de lípidos y vitamina A, entre otras funciones). Estos dos últimos grupos celulares representan cada uno alrededor del 2 % de la masa hepática.

1.2 LAS COMPLICACIONES HEPÁTICAS

La falla hepática es un síndrome causado por una necrosis hepática masiva, por lo que el hígado ya no puede cumplir sus funciones normales. La misma puede clasificarse en dos grandes categorías:

- *Falla hepática fulminante (FHF)*, también denominada falla hepática aguda que se define como el desarrollo rápido de daño hepático (sin una enfermedad hepática existente)

- *Falla hepática aguda sobre crónica (FHLAC)*, que ocurre como consecuencia de una enfermedad hepática preexistente.

La insuficiencia hepática produce una hipoglucemia (por un desbalance de gluconeogénesis y glucogenólisis) y la elevación de los niveles plasmáticos de numerosas sustancias como bilirrubina, amoníaco (el ciclo de la urea no se completa), lactato, ácidos grasos libres y aminoácidos aromáticos. La acumulación de estas sustancias puede originar otras complicaciones como falla renal, hipotensión severa, edema cerebral, encefalopatía hepática y susceptibilidad a infecciones, y finalmente una falla multi-orgánica (Sass and Shakil 2003). Adicionalmente el aumento de la concentración plasmática de estos metabolitos pueden dañar aún más al hígado, originando un círculo vicioso (Gautier and Legallais 2009).

Si bien la *FHF* es relativamente rara, tiene una mortalidad muy alta, llegando al 80-90 % (Lee, 2003). El trasplante hepático es la única terapia efectiva, aunque entre el 15-30 % de los casos ocurre regeneración hepática si el paciente está bajo el tratamiento médico adecuado. Además, es muy difícil de predecir la capacidad regenerativa del hígado, porque además depende fuertemente de la etiología.

La *falla hepática crónica* es la enfermedad más común, donde el daño a los hepatocitos les impide cumplir con su función de detoxificación (entre otras). Cuando ésta evoluciona negativamente el cuadro se denomina *FHLAC*, y la terapéutica médica en este caso se focaliza en controlar el avance del daño y sostener al paciente hasta que se realice el trasplante hepático (Plevris, Schina *et al.* 1998). Respecto de la capacidad de regeneración hepática, difícilmente se ha observado mejora cuando se ha diagnosticado *FHLAC* (Koniaris, McKillop *et al.* 2003) (Black, Lyman *et al.* 2004).

1.3 ETIOLOGÍA DE LA FALLA HEPÁTICA

La etiología condiciona la agudeza del daño celular, que no necesariamente está ligado al pronóstico de la falla hepática y la sobrevida. El diagnóstico preciso del origen de la enfermedad puede ser crucial para determinar el tratamiento adecuado. Las causas más comunes de la falla hepática crónica son hepatitis C, enfermedad de hígado graso (inducida y no inducida por alcohol) y hepatitis B (Kim, Brown *et al.* 2002). Otras etiologías incluyen colangitis primaria esclerosante, cirrosis biliar primaria, deficiencia de α -antitripsina, hepatitis autoinmune, hemocromatosis hereditaria y cáncer hepático. Las principales causas identificadas de falla hepática fulminante incluyen sobredosis de paracetamol, reacción idiosincrática a drogas, y hepatitis A y B. (Lee 2003). Por otro lado, la etiología varía según la región geográfica

considerada: Por ejemplo en nuestro país, es notable el virus de hepatitis A como agente causal de la encefalopatía hepática fulminante en la población pediátrica, siendo la causa del 20 % de los trasplantes hepáticos, con una supervivencia del 64 % después del año de vida.

1.4 TERAPIA ACTUAL: EL TRASPLANTE HEPÁTICO

El trasplante hepático es la única solución posible por el momento, revirtiendo la mortalidad, por lo que es la terapéutica aplicada más frecuentemente. Los pacientes con *FHF* son ingresados en la lista de espera con status 1 (según los criterios establecidos por la resolución N° 112/05 del INCUCAI¹) para ser trasplantados, como también aquellos con falla primaria del hígado o trombosis de la arteria hepática del hígado trasplantado, por la situación crítica de expectativa de vida sin trasplante.

El orden en la lista de espera se determina de acuerdo a las condiciones clínicas fijadas para evaluar el riesgo de vida. Con la finalidad de garantizar la equidad distributiva, los pacientes se categorizan (y recategorizan permanentemente) con un sistema de puntuación MELD/PELD. La calificación MELD (Modelo para Enfermedades Terminales del Hígado) se utiliza para los pacientes mayores de 16 años y está basado en resultados de laboratorio; y la calificación PELD (Modelo para Enfermedades Terminales del Hígado en Pacientes Pediátricos) para menores de dicha edad, basada en resultados de laboratorio, peso y talla.

A pesar de la efectividad del trasplante hepático en la supervivencia en corto plazo de los pacientes con *FHF*, la utilidad de esta terapia sigue siendo limitada debido a la escasa disponibilidad de órganos. Además, los pacientes con *FHAC* frecuentemente no son elegibles para trasplante.

Los hígados para trasplante provienen de donantes con muerte encefálica y fracciones hepáticas de donantes vivos y cadavéricos (Brown 2005). El trasplante hepático parcial está basado en la capacidad de regeneración del hígado en mamíferos y la habilidad del cuerpo de regular la masa hepática. Este proceso de regeneración ha sido muy estudiado, sin embargo es difícil de controlar clínicamente y se han presentado problemas biliares y vasculares (Brown 2005). Un agravante es la creciente divergencia entre el número de órganos disponibles y el número de pacientes en lista de espera, por lo que las distintas estrategias quirúrgicas no podrían satisfacer esa demanda. En la Argentina, en el año 2015, se realizaron 347² trasplantes de donante

¹ Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante.

² De los cuales 331 corresponden a trasplante hepático y 16 a trasplante hepato-renal.

cadavérico y 35 trasplantes de donante vivo. Pero se contabilizan más de 1.258³ pacientes en lista de espera, según cifras oficiales del INCUCAI.

1.5 TERAPIAS ALTERNATIVAS: DISPOSITIVOS DE SOPORTE HEPÁTICO

Así como existen opciones de soporte para pacientes con fallas en otros órganos: hemodiálisis y diálisis peritoneal para falla renal, membrana de oxigenación extracorpórea para falla respiratoria, dispositivo de asistencia ventricular para falla cardíaca, y nutrición total parenteral para falla intestinal, no existe aún un dispositivo efectivo para pacientes con falla hepática aguda que evite el trasplante hepático.

El desarrollo de este tipo de tratamientos temporales tiene como objetivo restituir las funciones hepáticas y en el mejor de los casos la regeneración del hígado, o bien como terapia puente para los pacientes que aguardan un trasplante (Gautier and Legallais 2009). Estos dispositivos también pueden ser utilizados de manera transitoria en caso de una disfunción luego de un trasplante hepático, o luego de una resección hepática, para estabilizar las condiciones clínicas del paciente. Los dispositivos de soporte hepático pueden clasificarse en dos grandes grupos (Figura 1):

- Dispositivos “artificiales”, puramente sintéticos enfocados en la función de detoxificación basada en mecanismos físicos y químicos.
- Dispositivos “bio-artificiales” que incluyen además un componente biológico, con utilización de células o tejidos para cubrir mayor cantidad de funciones hepáticas.

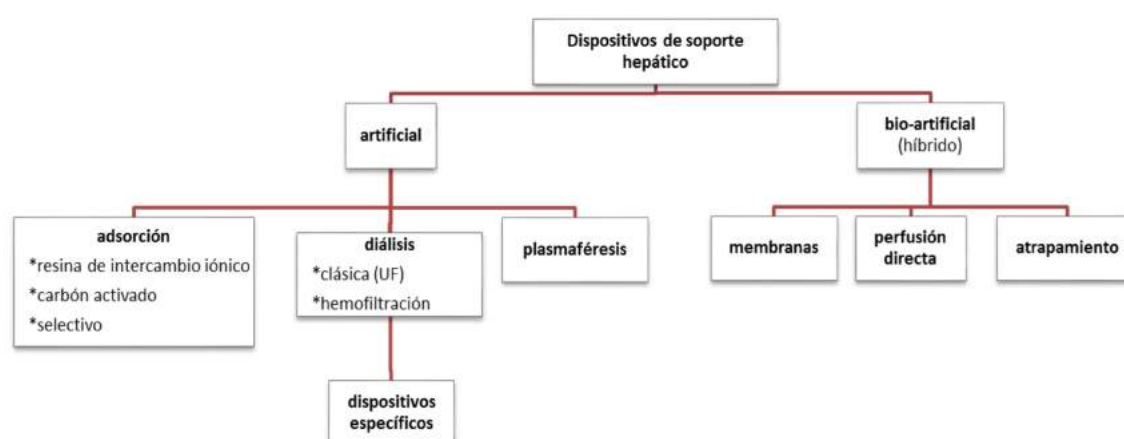


Figura 1: Clasificación de dispositivos de soporte hepático.

³ Agosto de 2016.

1.6 DISPOSITIVOS ARTIFICIALES

Por años se asumió que la mayoría de las toxinas que producían la encefalopatía asociada a la falla hepática eran pequeñas moléculas dializables, por lo que los primeros desarrollos en dispositivos de soporte hepático se basaron en la detoxificación de la sangre, con consideraciones similares al reemplazo renal. Estos sistemas se basan en principios físicos y químicos: la difusión y la convección a través de una membrana porosa denominada “semipermeable”, y la adsorción. La difusión corresponde al transporte de pasivo de solutos, sin movimiento de fluidos, por el efecto de un gradiente de concentración entre la sangre o plasma que se encuentra en un compartimento y el fluido (dializado) de otro compartimento. En cambio, durante procesos que involucran filtración, como en la ultrafiltración (UF), ocurren fenómenos convectivos con el transporte de fluidos junto a los solutos entre los compartimentos. En el caso de la UF se aplica un gradiente de presión positivo, llamado presión transmembrana, que es la fuerza impulsora del proceso.

En el caso de la adsorción uno o varios solutos del plasma son retenidos, por mecanismos físicos o químicos, en la superficie de un sólido poroso particulado.

Los dispositivos artificiales se pueden clasificar en específicos y no específicos según su selectividad de remover sustancias de la sangre y así intentar cubrir la función de detoxificación.

1.6.1 Dispositivos artificiales no específicos

1.6.1.1 *Díálisis: Hemodíálisis convencional*

La hemodíálisis fue introducida en la década de 1950 como una técnica exitosa para tratar la falla renal al remover toxinas urémicas de PM menor a 5 kDa mediante difusión molecular a través de una membrana semipermeable. Este mismo fundamento fue aplicado a pacientes con falla hepática, como un intento de remover sustancias dializables, toxinas de bajo PM como el amoníaco, supuestamente causantes de la encefalopatía. Si bien se observaron mejoras en la función neurológica por la aplicación de esta terapia, no ocurrió lo mismo en la supervivencia del paciente.

Se llegó a la conclusión que esta técnica no es eficaz en eliminar bilirrubina u otras toxinas unidas a la albúmina plasmática. Las membranas utilizadas son de material celulósico u otros polímeros biocompatibles.

1.6.1.2 Adsorción: hemoperfusión

Como la hemodiálisis remueve solo toxinas hidro-solubles, la hemoperfusión fue introducida en los años '60 para incrementar la eficiencia de la diálisis haciendo circular la sangre sobre un material adsorbente como el carbón activado, resinas sintéticas y resinas de intercambio iónico. El carbón activado remueve moléculas unidas a proteína en un rango de 0,5 a 5 kDa, pero requiere un recubrimiento con albúmina o la encapsulación en geles hidrofílicos para evitar la activación del sistema de complemento y la remoción de plaquetas y leucocitos. Las resinas sintéticas remueven moléculas lipo-solubles y unidas a proteína, mientras que las resinas de intercambio iónico remueven compuestos iónicos y orgánicos. No es un sistema selectivo, y tampoco se observó mejoría en la supervivencia de pacientes tratados con este dispositivo.

1.6.1.3 Intercambio plasmático

Propuesto como una alternativa al reemplazo hepático por Castino (Castino, Scheucher *et al.* 1976), y consiste en reemplazar el plasma del paciente (que es separado por centrifugación o filtración) por plasma fresco congelado. La técnica no es selectiva, y necesita cantidades importantes del líquido de sustitución plasmático.

1.6.2 Dispositivos artificiales específicos

Los métodos anteriores fueron desarrollados para remoción de tóxicos en sangre. Sin embargo, luego de verificarse el mejoramiento transitorio en los pacientes, se comprobó que esto no se reflejaba en una mayor supervivencia (Hughes and Williams 1993). Entre otras posibles causas de la poca eficacia de estos métodos es que no eliminan las toxinas unidas a la albúmina (transportador plasmático natural). Para cubrir esta necesidad se diseñaron dispositivos “específicos”. Muchas endotoxinas que se unen a la albúmina se acumulan en la falla hepática, entre ellas podemos nombrar a los aminoácidos aromáticos, ácidos biliares, bilirrubina, sustancias tipo digoxina, benzodiazepinas endógenas, indoles, mercaptanos, ácidos grasos de cadena corta y mediana, óxido nítrico y prostaciclina. Se postula que la eliminación de estos metabolitos podría frenar este círculo vicioso de deterioro hepático y general.

Por otro lado, muchas de las sustancias removidas no selectivamente incluyen algunas cuyo rol metabólico es importante en la evolución favorable de estos casos, como factores de coagulación, factores de crecimiento, etc. (O'Grady, Gimson *et al.* 1988; McGuire, Sielaff *et al.* 1995). A su vez, las columnas de carbón activado pueden provocar activación de leucocitos con la consecuente liberación de citoquinas ocasionando un sangrado y diseminación de coágulos (Allen, Hassanein *et al.* 2001).

Lo ideal entonces, sería generar mecanismos humorales y moleculares de regeneración hepática con reducción de niveles plasmáticos de sustancias que inhiban la regeneración, como el factor de crecimiento transformante (TGF β) (Suh, Lilja *et al.* 1999).

1.6.3 Diseños de dispositivos artificiales específicos

1.6.3.1 System Liver Dialysis Unit® (Hemocleanse, EEUU)

Basado en una combinación de la hemodiálisis y la hemoperfusión, este es un proceso en el cual la sangre pasa a través de una membrana de diálisis que está rodeada de una suspensión de partículas adsorbentes. La remoción selectiva de ciertas sustancias orgánicas es similar a la alcanzada por la hemoperfusión, pero con una mayor capacidad de unión debido a que las partículas presentan un área mucho mayor. La biocompatibilidad es similar a la hemodiálisis y mejor que la hemoperfusión directa. La limitación del sistema es que las sustancias unidas a la albúmina no atraviesan la membrana de diálisis.

1.6.3.2 Sistema de recirculación de absorbentes moleculares, MARS® (Teraklin AG, Alemania)

Combina mecanismos de difusión y adsorción. Consiste en dos circuitos de diálisis separados. El primero de ellos es un dializador con un módulo compuesto por una membrana semipermeable con poros de 50 kDa.

La membrana separa el circuito de la sangre del paciente del compartimento donde circula albúmina exógena. El segundo circuito consiste en una máquina de hemodiálisis y se emplea para limpiar la albúmina del primer circuito antes de que vuelva a circular a la membrana semipermeable en contacto con la sangre del paciente.

El Sistema MARS puede retirar una buena parte de las toxinas, como amoníaco, ácidos biliares, bilirrubina, cobre, hierro y fenoles (Figura 2).

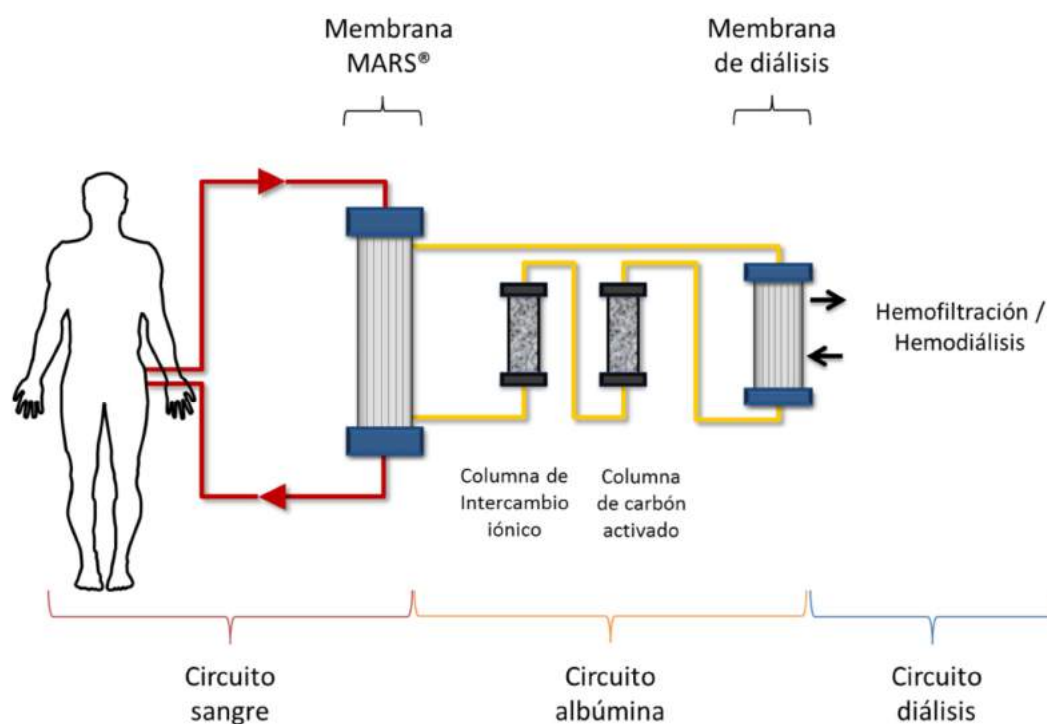


Figura 2: Sistema MARS®, en el sistema de membranas del primer circuito, las toxinas unidas a la albúmina plasmática difunden uniéndose a la membrana MARS® y luego a la albúmina exógena. Adaptado de (Jalan, Sen et al. 2004) y (Gautier & Legallais 2009).

1.6.3.3 Sistema de diálisis con albúmina de un solo paso, SPAD®

Muy similar al MARS®, con la diferencia que la albúmina no se regenera. Simplifica notablemente el equipamiento necesario, ya que se utilizan máquinas de terapia de reemplazo renal estándar. La sangre del paciente se dializa contra una solución de albúmina con flujo en dirección contraria, la cual es desechada después de pasar por el filtro, por lo que requiere una cantidad importante de albúmina (Figura 3). En una comparación *in vitro* de los sistemas SPAD® y MARS® se encontró que el primero lograba una disminución mucho mayor de amoníaco, pero no se hallaron diferencias notables en otras sustancias hidrosolubles (Peszynski, Klammt et al. 2002).

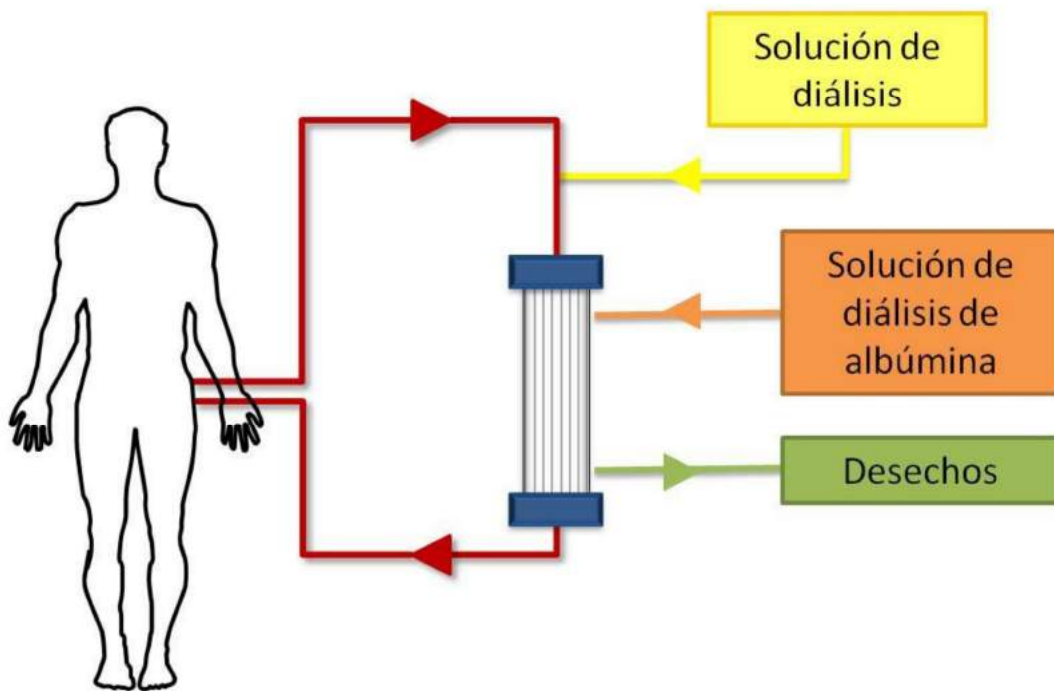


Figura 3: En el sistema SPAD® el plasma del paciente es dializado contra una solución de albúmina 4,4 % que es desechada luego de un único uso. Adaptado de (Rozga 2006)

1.6.3.4 Sistema Prometheus® (Fresenius Medical Care)

Se basa en la diálisis contra albúmina y la separación y adsorción de plasma fraccionado. Este sistema consta de dos circuitos (Figura 4). En el circuito primario se separa una fracción de plasma (con toxinas unidas a la albúmina plasmática), mediante la membrana Albuflow® de 250 kDa de tamaño de corte, valor intermedio entre los sistemas de hemodiálisis y plasmaféresis. La albúmina fraccionada pasa por dos columnas colocadas en serie, donde las toxinas unidas son retenidas por adsorción, una adsorbe sustancias lipofílicas como ácidos biliares, fenoles y aminas aromáticas, y la otra columna elimina toxinas cargadas negativamente, como la bilirrubina.

El circuito secundario dializa la albúmina contra solución fisiológica para remover sustancias hidrosolubles. La fracción de plasma purificado retorna al circuito primario. No hace falta albúmina exógena.

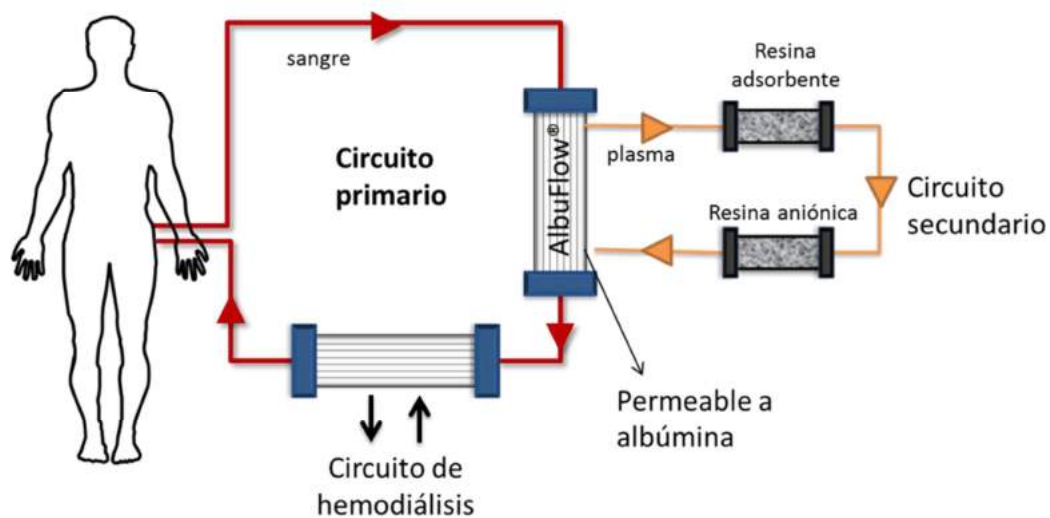


Figura 4: Esquema del sistema Prometheus. El plasma es fraccionado mediante una membrana permeable a albúmina que luego es detoxificada con dos columnas adsorbentes y retorna al plasma. La sangre reconstituida es dializada antes de ser reingresada al paciente. Adaptado de (Rozga 2006)

1.7 SISTEMAS BIOLÓGICOS

Los sistemas artificiales específicos han tenido un éxito limitado, debido a que sus funciones son sólo unas pocas de las que tiene un hígado. Como se mencionó anteriormente, el hígado presenta un complejo conjunto de más de 500 funciones, incluyendo procesos de detoxificación, síntesis y procesos metabólicos. Se sabe que el síndrome de FHF no está solo determinado por la falla en la detoxificación hepática, sino también por la falla del hígado en sus funciones de síntesis y regulación (Lee, Squires *et al.* 2008).

Para proveer todas las funciones hepáticas conocidas (y aún las no conocidas) se han propuesto desde la ingeniería de tejidos, como alternativa al trasplante y a los dispositivos no-biológicos, terapias con células. Estas terapias incluyen los dispositivos de hígado bio-artificial extracorpóreos clasificados en la Figura 1, y otras intervenciones como trasplante de células, injertos xeno-transgénicos, y construcciones hepatocelulares implantables. Para comparar estas estrategias se debe considerar la capacidad de cada uno en reemplazar las funciones del hígado consideradas clave en el desarrollo de la falla hepática:

- 1) Estabilización de la función neurológica, hemostática y hemodinámica.
- 2) Detoxificación de metabolitos endógenos y compuestos exógenos.
- 3) Biosíntesis

El trasplante de células mediante inyección en principio se trata de una metodología sencilla, pero tiene las siguientes dificultades:

- 1) La disponibilidad de cantidad suficiente de células hepáticas humanas diferenciadas
- 2) El problema aun no resuelto de inyección de una gran cantidad de células (10 % de la masa del parénquima normal) donde exista un buen suministro de sangre.
- 3) Otros inconvenientes asociados al método y lugar de inyección, y el porcentaje de anidación (Chamuleau, 2009).

Otras alternativas se basaron en perfusión de hígado entero para un sistema de perfusión extracorpóreo (Otto, Pender *et al.* 1958) y perfusión de una porción de hígado (rebanada) (Yarmush, Dunn *et al.* 1992). Si bien estos métodos han mostrado algunos beneficios son difíciles de implementar clínicamente a gran escala.

Idealmente, la solución final sería el trasplante de un hígado construido por ingeniería de tejidos que se asemeje lo más posible al original. Esto implicaría un co-cultivo polarizado y estratificado de células parenquimales y no parenquimales, en una estructura con sistema vascular y biliar. En la actualidad estos desarrollos están recién iniciándose, por lo que la segunda mejor opción al trasplante hepático es el tratamiento con los actuales hígados bio-artificiales, que se conectan de manera extracorpórea a la circulación sanguínea sistémica del paciente.

1.7.1 Dispositivos bio-artificiales extracorpóreos (Bioartificial Liver, BAL)

Los actuales sistemas híbridos o bio-artificiales están formados por dos componentes: uno biológico (células del parénquima hepático), y uno sintético, que preserve la viabilidad y función de las células, y medie el transporte de nutrientes y metabolitos entre las células y el organismo hospedador.

1.7.2 Células para terapias celulares

Para el diseño de un dispositivo bio-artificial puede considerarse diferentes fuentes celulares y tipos de cultivos:

1.7.2.1 Hepatocitos primarios

Las células pueden ser obtenidas de tejidos autólogos, homólogos o heterólogos, que son disociados y cultivados para obtener el número de células necesarias para la terapia. Si bien la fuente de primera opción sería el tejido autólogo, la expansión de hepatocitos autólogos en pacientes con falla hepática no representa ventajas por los siguientes motivos:

- 1) La enfermedad subyacente, como por ejemplo un carcinoma hepático o hepatitis, puede ser transmitida al sistema de soporte hepático.
- 2) La falla hepática es un fenómeno agudo, y crear masa hepática a partir de unos pocos gramos *in vitro* podría requerir mucho tiempo.
- 3) La remoción de tejido sano de un paciente representa una situación crítica que podría empeorar aún más el cuadro y poner en peligro la vida del paciente.

El uso de células de origen xenogénico está limitado por los problemas inmunológicos que conllevan, por lo que se debe considerar la existencia de una barrera entre las células y el paciente (ya sea mediante membranas en un reactor de fibra hueca o por encapsulamiento de las células); la modificación genética de las células para que no sean susceptibles a ser atacadas por el sistema inmunológico del hospedador (Argibay, Di Noia *et al.* 2002) o la inmunosupresión del hospedador, como se realiza en los trasplantes de órganos. En el caso de las células xenogénicas, las células porcinas son una de las primeras opciones, por su similitud anatómica con el ser humano y la disponibilidad de criaderos con las condiciones bioseguridad necesarias. Los primates no humanos también fueron considerados en el pasado como fuente potencial de tejido hepático, pero la FDA⁴ desalentó su uso. Una gran ventaja de los hepatocitos porcinos es que pueden ser criopreservados, mejorando aún más su disponibilidad, y evitando contaminaciones por cultivos de largo plazo. La criopreservación está asociada con la apoptosis iniciada por la proteína caspasa, por lo que se agregan inhibidores de la misma (ZVAD-fmk) (Yagi, Hardin *et al.* 2001). En muchos dispositivos BAL se han utilizado hepatocitos primarios porcinos, pero la utilidad de esta fuente xenogénica está restringida por su inmunogenicidad debido a la presencia del epítipo carbohidrato Gal $\alpha(1-3)$ Gal en la superficie de las células porcinas (Baquerizo, Mhoyan *et al.*, 1999; van de Kerkhove, Germans *et al.*, 2005) y el riesgo de transmisión de agentes infecciosos como el retrovirus endógeno porcino (PERV), el citomegalovirus porcino (PCMV) y el virus herpes linfotrófico porcino (PLHV). Además de los problemas inmunológicos, las proteínas porcinas no llevan a cabo exactamente las mismas funciones que sus equivalentes humanas.

⁴ Food and Drug Administration, es la agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos.

1.7.2.2 Hepatocitos inmortalizados

Otra opción posible es la utilización de líneas celulares de hepatocitos inmortalizados, como HepG2 (hepatoblastoma humano)(Liu, Pan *et al.*, 1999), HepLiu (inmortalizado con CV40) y hepatocitos fetales humanos inmortalizados (Yoon, Lee *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha sugerido que estas células carecen de la funcionalidad completa de un hepatocito adulto, y existe el riesgo de transmitir factores oncogénicos al paciente en el caso de una aplicación clínica. Por ello, se han considerado líneas inmortalizadas condicionalmente y la incorporación de genes suicidas inducibles, como medida potencial de precaución. Otra línea celular en desarrollo es la HHY41, que retiene muchas de las funciones específicas del hígado, como síntesis de proteína, gluconeogénesis y actividad del citocromo P450 y una resistencia marcada al acetaminofeno (Kono, Yang *et al.* 1995; McCloskey, Edwards *et al.* 1999; McCloskey, Tootle *et al.* 2002). Si bien las líneas celulares obtenidas tienen una capacidad proliferativa y diferenciación elevadas, tienden a perder sus funciones críticas, como el metabolismo de drogas y amonio, cuando son comparados *in vitro* con su contraparte de cultivo primario, lo que limita su utilización en dispositivos de este tipo (Cascio, 2001).

1.7.2.3 Células troncales

Las células troncales o embrionarias son células pluripotenciales. Dentro de éstas se consideran las de origen embrionario y las adultas. Las células ovales y los hepatoblastocitos fetales también son una posible fuente celular: El desarrollo hepático ocurre a través de una diferenciación de las células precursoras hepáticas, llamadas hepatoblastocitos, los cuales muestran una capacidad de diferenciación bi-potencial, definida por su habilidad de diferenciarse tanto a hepatocito como a células epiteliales del ducto biliar (colangiocitos) (Lemaigre & Zaret, 2004). Notablemente, en algunos tipos de daño celular severo y crónico, una población de células adultas, denominadas células ovales, que comparten muchas características fenotípicas y propiedades funcionales con los hepatoblastocitos fetales, median la reparación del hígado, a través de un programa de diferenciación similar (Sell, 2001).

Las células madre adultas autólogas o alogénicas o células precursoras podrían servir como una alternativa, pero es necesaria su diferenciación en células maduras funcionales en un número relevante ($\sim 1-2 \times 10^{10}$ células). No existe algún reporte hasta el momento de expansión exitosa de células troncales *ex vivo*. Factores como formulación de medios de cultivo, suplementación con factores de crecimiento, microambiente adecuado (He, Tan *et al.* 2003; Lowes, Croager *et al.* 2003; Semino, Merok *et al.* 2003; Suzuki, Iwama *et al.* 2003) son decisivos para la diferenciación de células troncales adultas en hepatocitos maduros *in vitro*, y todo ello involucra

un costo muy elevado. Los hepatocitos fetales tienen velocidades de mitosis alta, independiente de estímulos endógenos, por lo que sería una fuente ideal de células de hígado alogénicas. Recientemente Sangeeta Bhatia y su equipo identificaron una docena de compuestos que pueden mantener la función normal de los hepatocitos, promover la división celular o ambos. Dos de estos compuestos permitieron incluso la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas (IPS por su sigla en inglés) en hepatocitos (Shan *et al.*, 2013).

Tanto en las IPS como en el resto de células troncales, el desafío será dirigir y mejorar la diferenciación, particularmente en sistemas multicelulares. Como primer objetivo se contempla la estabilización de las funciones de hepatocito, con señales del microambiente como mediadores solubles, interacciones células-matriz extracelular e interacciones célula-célula. En conclusión, el riesgo de tumorigenicidad, la diferenciación incompleta y los dilemas éticos podrían limitar su aplicación en clínica.

En la Tabla 1 se resumen los orígenes celulares posibles para dispositivos de soporte hepático con los aspectos críticos inherentes a cada origen celular.

Tabla 1: Orígenes celulares posibles para dispositivos de soporte hepático

Origen celular	Aspectos críticos
Hepatocitos primarios Humanos, xenogénicos	Disponibilidad, expansión, inestabilidad fenotípica, inmunogenicidad, seguridad (xenozoonótica)
Líneas de hepatocitos inmortalizados Derivadas de tumores, SV40, telomerasa, inmortalizadas espontáneamente	Funciones, estabilidad genómica, seguridad (tumorigenicidad)
Células troncales Embrionarias, progenitores hepáticos (hepatoblastocitos, células ovas) otros linajes (progenitoras hematopoyéticas, progenitoras pluripotenciales adultas)	Disponibilidad, diferenciación eficiente, inestabilidad fenotípica, inmunogenicidad, seguridad (tumorigenicidad)

1.7.2.4 Técnicas de cultivo

Las células hepáticas son anclaje-dependientes, se cultivan sobre soportes planos o micro-portadores o bien en agregados celulares, cuyo interés ha crecido últimamente debido a su capacidad para conservar la micro estructura tisular similar a la nativa.

Los agregados celulares son cúmulos de células cuya estructura varía en función de la técnica de cultivo empleada para formarlas. Pueden ser desde un simple grupo de células apenas unidas entre sí, hasta una estructura totalmente estratificada y polarizada. En el cultivo de agregados esféricos de hepatocitos (esferoides) se observa conservación de la polaridad, la estructura tisular tridimensional e incluso canalículos biliares. Estos retienen características morfológicas del estado *in vivo*, y de ese modo mantienen la viabilidad y funciones metabólicas por mayor tiempo que los cultivos en monocapa (Tong, Sarrazin *et al.* 1994).

Para la generación de esferoides se utilizan desde soporte no adherentes, como el poli (2-hidroxietil metacrilato) (poliHEMA) hasta el auto ensamblado en frascos agitados (Sakai, Naruse *et al.* 1996). Los hetero- esferoides, compuestos por hepatocitos y células hepáticas no parenquimales, tuvieron aún mejor viabilidad y actividades de detoxificación específicas (Yamada, Kamihira *et al.* 2001).

Actualmente se utiliza cada vez más frecuentemente la técnica de cultivo en organoides, consistente en cultivo de hetero-esferoides con citoquinas, como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y la dexametasona que favorecen la formación de una arquitectura similar a la *in vivo* (Michalopoulos, Bowen *et al.* 2001). Como es de esperarse, esto mejora aún más la funcionalidad y diferenciación celular, pero debe tenerse en cuenta el tamaño del mismo, ya que si es mayor a un tamaño crítico se observa necrosis celular en el centro, por problemas de transferencia de oxígeno y nutrientes (Glicklis, Merchuk *et al.* 2004). Los esferoides hepáticos no están aislados *per se* inmunológicamente, por lo que usualmente son inmovilizados en un reactor de fibra hueca (Lorenti, Barbich *et al.* 2003; Gan, Zhou *et al.* 2005).

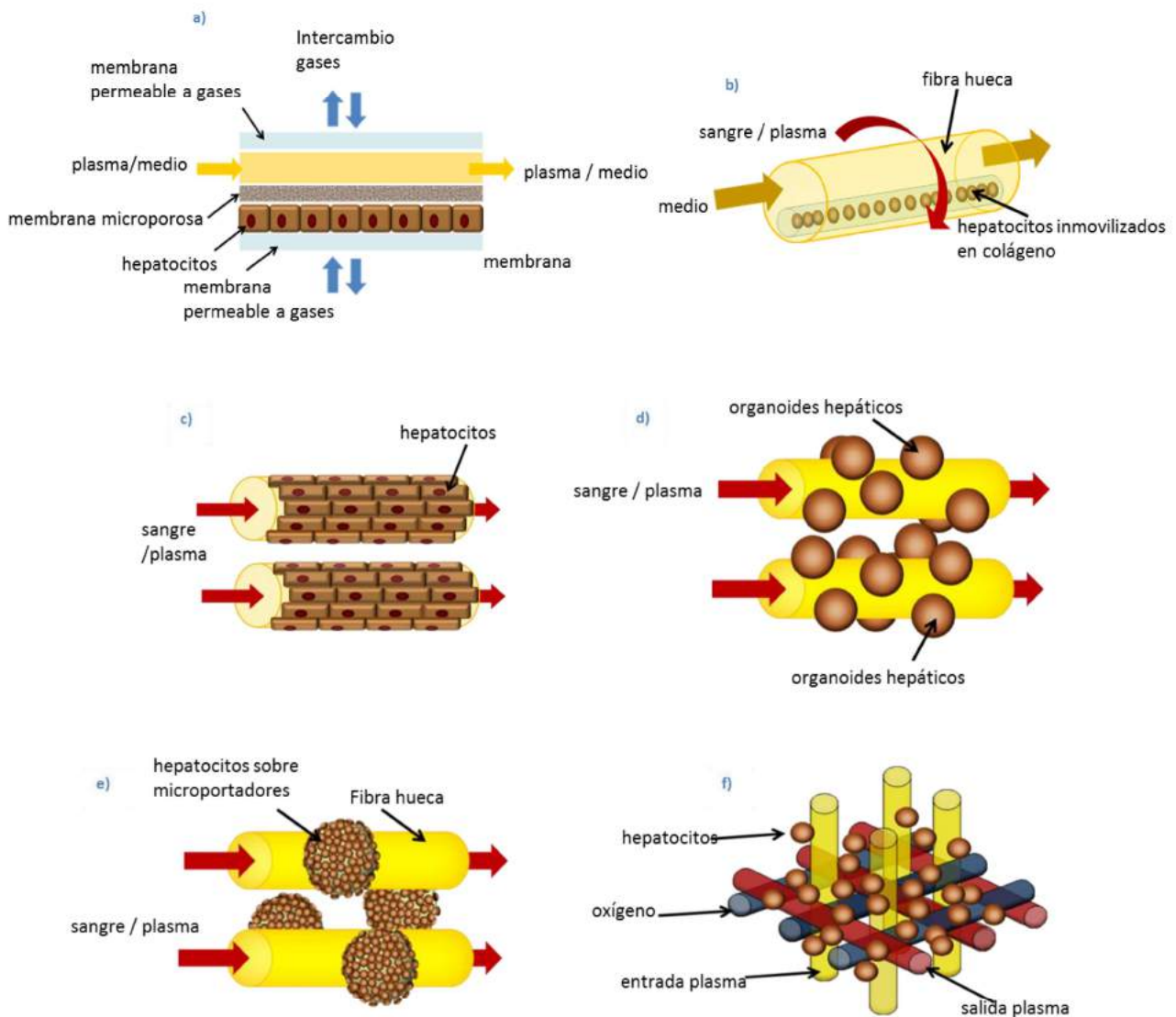
1.7.3 Diseños de dispositivos de soporte hepático bio-artificiales

Estos dispositivos son biorreactores cuyo diseño debería simular el ambiente fisiológico *in vivo*, como los parámetros bioquímicos (pH, temperatura, concentración de nutrientes y metabolitos), las velocidades de transferencia de materia, fuerza de corte y condiciones bioquímicas. Se han diseñado diferentes tipos de biorreactores para satisfacer estas necesidades, desde sistemas de fibras huecas y dializadores semipermeables hasta biorreactores más

complejos que intentan reproducir la estructura tridimensional del hígado. Sin embargo, la mayoría ha presentado limitaciones, ya sea en que ofrecen un ambiente sub-óptimo para el crecimiento celular, o porque la función celular no ha sido reproducible.

Con respecto a los diseños de BAL más implementados, como se mencionó en la Figura 1 se pueden clasificar en tres clases principales: reactores de membranas planas y fibra hueca, reactores de lecho perfundido o perfusión directa en una matriz porosa y reactores en suspensión con encapsulamiento de células.

A continuación, se hará una breve descripción con las ventajas e inconvenientes que presenta cada uno. En la Figura 5 se esquematizan los diseños más utilizados, donde predominan los diseños de membranas, y en algunos casos se combinan membranas con atrapamiento y perfusión.



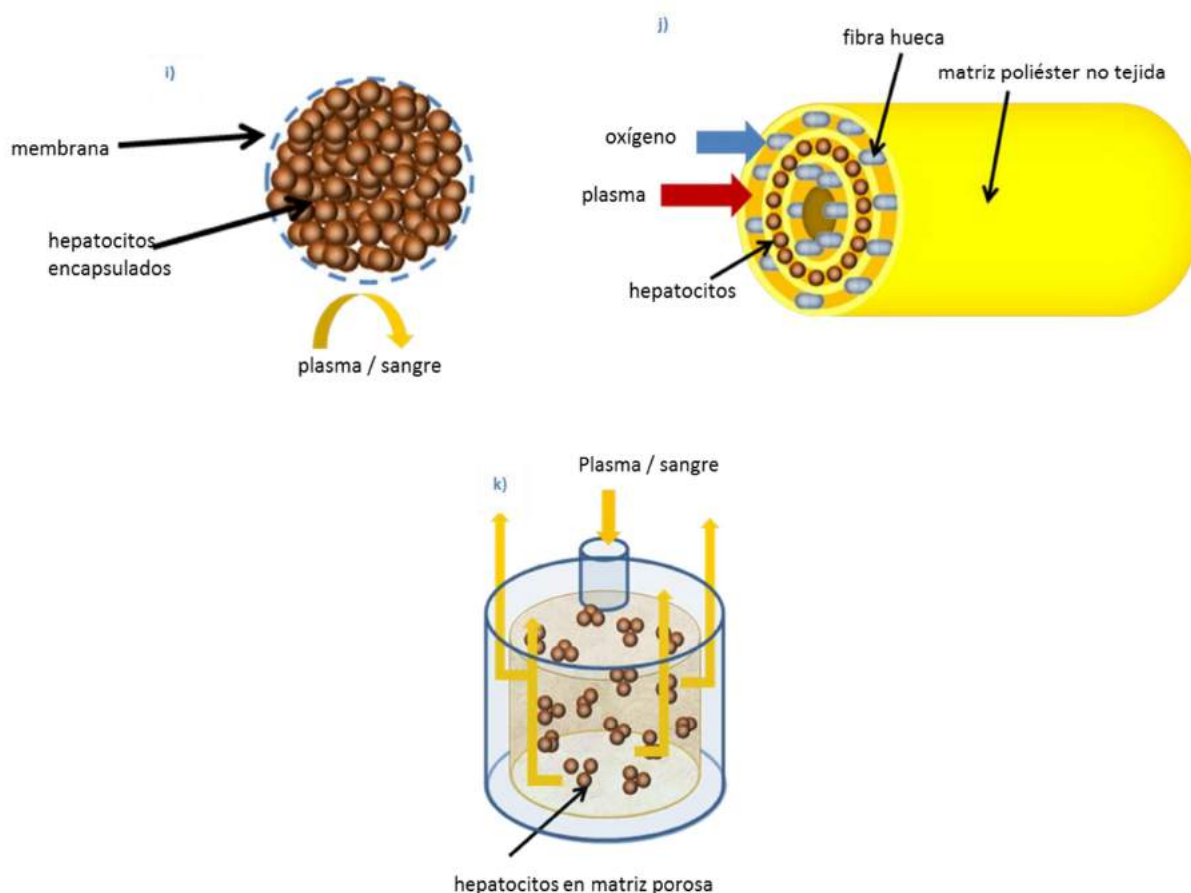


Figura 5: Esquemas de diferentes configuraciones de BAL: a) formando un sándwich entre dos membranas planas; b) células atrapadas en colágeno, en el lumen de una membrana en configuración fibra hueca; c) adheridas a la superficie externa de membranas en fibra hueca; d) en agregados o estructuras tipo esferoides; e) adheridas a microportadores; f) en un entrecruzamiento de fibras huecas, donde cada membrana cumple una función; g) en membranas Multibore® (fibra que contiene 7 capilares individuales); y h) agregados de hepatocitos y fibras de acetato de celulosa embebidos en colágeno. El intercambio de moléculas entre el plasma y los hepatocitos es a través de la membrana y el hidrogel en i) hepatocitos micro-encapsulados; j) matriz de poliéster enrollada donde se adhieren las células en contacto directo con el plasma. Se intercalan fibras huecas para la oxigenación en un k) sistema perfusivo donde los agregados de hepatocitos están inmovilizados y el plasma o sangre del paciente circula del centro a la periferia. Adaptados de (Park & Lee 2005) y (Diekmann, Bader et al. 2006).

1.7.3.1 Sistemas de membranas planas

Los cultivos en reactores de membranas planas (Figura 5.a) permiten un cultivo de alta densidad con una buena oxigenación, similar a las condiciones *in vivo*. Sin embargo, la falta de estructura tridimensional induce la pérdida de la actividad metabólica en el corto plazo por la forma de cultivo en monocapa. De Bartolo propuso un diseño donde se co-cultivaron hepatocitos porcinos y otras células no-parenquimales dentro de una matriz extracelular entre dos membranas poliméricas permeables a oxígeno. Los hepatocitos conservaron su polaridad y

función (De Bartolo & Bader, 2001). Otro ejemplo son hepatocitos de rata atrapados en un hidrogel de colágeno (formato sándwich) (Schuetz, Li *et al.*, 1988; Dunn, Yarmush *et al.*, 1989).

Los reactores con la configuración en membranas planas, considerada para un dispositivo de soporte hepático presenta la desventaja de tener un volumen muerto muy grande, baja relación área /volumen y su protección frente a virus y células xenogénicas es dependiente del tamaño de poro de la membrana. Estos modelos están siendo utilizados como modelo de metabolismo de drogas (Bader, Fruhauf *et al.* 1998).

1.7.3.2 Sistemas de membranas en tipo fibra hueca

Estos reactores consisten en un cartucho de fibras huecas que delimitan dos espacios: un espacio intracapilar y uno extracapilar. Las células están separadas de la sangre (o plasma) por la membrana porosa, localizadas en el espacio extracapilar (Figura 5. c, d, e y f) o en el espacio intracapilar (Figura b y g). La transferencia de materia por difusión o convección a través de la membrana depende del tamaño de poro y las distancias a recorrer por los solutos que se transfieran. Son más eficientes en la detoxificación debido a su alta relación área/volumen. La oxigenación puede ocurrir en un módulo separado especialmente diseñado o con fibras destinadas a ello.

La mayoría de los diseños utilizan membranas entre 50 y 150 kDa de tamaño de corte (Allen, Hassanein *et al.*, 2001; Stockmann & JN, 2002). De esta manera permiten el pasaje de toxinas y proteínas como la albúmina (PM= 60 kDa) evitando el pasaje de inmunoglobulinas (PM= 100-900 kDa), proteínas del complemento (PM >200 kDa) y virus o células. Los estudios se han hecho utilizando membranas poliméricas semipermeables de policarbonato, acetato de celulosa, etc., que permiten o no la adhesión celular (Pahernik, Thasler *et al.*, 2001; De Bartolo, Morelli *et al.*, 2002).

Dentro de las ventajas de estos sistemas se encuentran la protección inmunológica efectiva, se evita el estrés hidrodinámico y permite densidades celulares muy altas ($>10^7$ - 10^8 células·ml⁻¹), pero debe diseñarse adecuadamente para asegurar una buena transferencia de materia.

1.7.3.3 Sistemas de perfusión directa

La perfusión directa con plasma o sangre sobre un sistema de células inmovilizadas parece una idea prometedora por su simpleza y eficiencia en la transferencia de materia, sin embargo, no se tienen en cuenta la barrera inmunológica necesaria.

Se presentan dos alternativas: la primera, recreando un entorno tridimensional, las células pueden estar formando agregados o unidas a un soporte, la perfusión es suave y el transporte es

por difusión (Figura 5.k). La otra alternativa es sobre membranas semipermeables formando una monocapa. En ambos diseños se ha combinado la perfusión con la tecnología de membranas, ya sea como soporte para los hepatocitos, o para aireación.

1.7.3.4 Sistemas de atrapamiento y encapsulación

La inmovilización por atrapamiento se trata de la inclusión de los hepatocitos en una estructura polimérica semipermeable (Figura 5 b, h y k). La encapsulación es similar, pero se utiliza una membrana, por lo que la transferencia de materia es mejor (Figura 5 i). Estas técnicas permiten retener hepatocitos en micro-esferas o en fibras huecas que serán posteriormente colocados en un biorreactor. En general se utilizan células xenogénicas, y al igual que en los diseños nombrados, el biomaterial a utilizar debe ser permeable a nutrientes, oxígeno y otros solutos, pero impermeable a componentes del sistema inmunológico. Es importante analizar su biocompatibilidad, evaluar porosidad, estabilidad y grupos funcionales presentes en la superficie. Los beneficios de la técnica se basan en el aporte de un entorno tridimensional similar al *in vivo*, sumado a una buena relación área/volumen que asegura la transferencia de materia y otorgan protección frente al estrés hidrodinámico (Legallais, Dore *et al.*, 2000).

Los hepatocitos encapsulados se han utilizado en combinación con membranas, en sistemas perfusivos, e incluso como dispositivo implantable. La co-encapsulación con células no parenquimales aumenta la actividad metabólica de los hepatocitos, probablemente por la liberación de citoquinas y la producción de matriz extracelular (Stange & Mitzner, 1996) como también con la encapsulación con componentes de matriz (Babensee, De Boni *et al.*, 1992; Quek, Li *et al.*, 2004; Seo, Akaike *et al.*, 2005).

1.7.4 Aspectos críticos de diseño de un dispositivo BAL

1.7.4.1 Función y viabilidad celular

Para mejorar la viabilidad celular se han estudiado múltiples condiciones de cultivo de los hepatocitos, como por ejemplo pre-acondicionar con niveles fisiológicos de insulina e inferiores a un medio de cultivo normal. Esta modificación ha demostrado que evita la acumulación de grasa en hepatocitos expuestos al plasma (Chan, Berthiaume *et al.*, 2003). De la misma manera, la suplementación de plasma con ciertos aminoácidos ha incrementado la síntesis de albúmina y urea (Washizu, Berthiaume *et al.*, 2000).

Es conocido que los hepatocitos pierden su actividad metabólica *in vitro* en el corto plazo si se afecta su arquitectura original y su polaridad (Nyberg, Shatford *et al.*, 1992). Adicionalmente el estado de los hepatocitos puede ser modulado por factores, como las citoquinas y el contacto

celular, como también por la matriz extracelular (Isom, Secott *et al.*, 1985; Ben-Ze'ev, Robinson *et al.*, 1988). Ya que esta última es necesaria para mantener la diferenciación de los hepatocitos *in vitro*, ha sido el foco de interés en el desarrollo de sistemas tridimensionales que imiten el ambiente *in vivo*. Se sabe que la matriz extracelular modula la expresión de genes específicos del hígado, como la producción de la albúmina, citocromos P450 y transferrina (Schuetz, Li *et al.*, 1988; Saad, Schawalder *et al.*, 1993). Un estudio con hepatocitos de rata ha demostrado que la remodelación de la matriz extracelular en respuesta a citoquinas induce la proliferación celular, un parámetro importante de la regeneración hepática (Serandour, Loyer *et al.* 2005). En el proceso regenerativo *in vivo*, luego de un daño hepático o una hepatectomía las citoquinas son producidas por células hepáticas no parenquimales, (Michalopoulos, Bowen *et al.* 2001). La interacción estrecha entre los dos tipos celulares es importante para la proliferación, pero también para mantener la diferenciación y actividad (Margulis, Erukhimov *et al.*, 1989). Es por esto que los hepatocitos en co-cultivos presentan actividades metabólicas más elevadas y duraderas (Auth, Okamoto *et al.*, 1998) y en muchos sistemas se han utilizado esferoides hepáticos u otros agregados adheridos a soporte o encapsulados, con el propósito de establecer interacciones célula-célula. Por ejemplo, en el sistema HepatAssist® original, desarrollado por Circe Biomedical, es un dispositivo de fibra hueca que contenía agregados de hepatocitos porcinos adheridos a microportadores en el espacio extracapilar. Otra modificación fue la utilización de agregados espontáneos de un co-cultivo de hepatocitos con células no parenquimales, resultando en la formación de estructuras más parecidas a un tejido tipo organoide en el sistema MELS® (Gerlach 1996). En ese dispositivo se observaron canalículos biliares y ductos biliares como también matriz extracelular, ya sea con hepatocitos porcinos o humanos. Otro diseño desarrollado basándose en estas premisas fue el cultivo de hepatocitos en una configuración tipo sándwich en un hidrogel de colágeno (De Bartolo, Jarosch-Von Schweder *et al.*, 2000).

1.7.4.2 Transferencia de materia

El transporte bidireccional de materia es esencial en un desarrollo de un sistema BAL eficiente, requerido para proporcionar nutrientes vitales para las células y simultáneamente permitir la exportación de productos celulares. La configuración del dispositivo determina el transporte de materia, tanto el convectivo como el difusivo. En particular, la resistencia a la transferencia de masa por difusión es uno de los mayores problemas a resolver. Frecuentemente se utilizan membranas semipermeables para permitir un transporte selectivo en función del tamaño de los componentes que se intercambian. En general los dispositivos son diseñados con membranas con una porosidad tal que evite el transporte de componentes del sistema inmunológico y otras

sustancias xenogénicas de alto PM, y permitiendo a la vez el transporte de proteínas involucradas en el transporte de sustancias, como la albúmina. En algunos casos, para maximizar la transferencia de materia se ha eliminado la barrera inmunológica, asumiendo que el contacto breve con células xenogénicas resultaría en complicaciones inmunológicas mínimas. Por ello también se desarrollan métodos de encapsulamiento de células que sirvan de barrera inmunológica pero que repercutan lo menos posible en la transferencia de materia.

1.7.4.3 Disponibilidad de oxígeno

La alta cantidad y consumo de oxígeno de los hepatocitos hace que el oxígeno disuelto en el plasma en general sea insuficiente. Las células entonces deberían estar en contacto con sangre entera con los problemas posibles de hemólisis, coagulación y pérdida de plaquetas. Otra alternativa es el agregado al plasma de un transportador extra de oxígeno, como flurocarbano, o bien con un sistema de oxigenación local.

En el diseño de un módulo de fibras huecas una estrategia puede ser la incorporación de membranas en los dispositivos para el suministro exclusivo de oxígeno (Gerlach, Encke *et al.* 1994; Wolfe, Hsu *et al.* 2002) demostrando su efectividad en el mantenimiento de ciertas funciones de los hepatocitos. En el caso del diseño de membranas planas, se logra una perfusión homogénea del oxígeno, pero se debe tener la precaución de no producir estrés hidrodinámico, causante de efectos deletéreos y pérdida de función celular. Debido a que en estudios *in vivo* se ha relacionado al gradiente de concentración de oxígeno con la distribución heterogénea de las funciones del hepatocito a lo largo del sinusoides hepático (Holzer & Maier, 1987; Bhatia SN, 1996), la última tendencia es replicar esta situación *in vitro*, incorporando gradientes de oxígeno al igual que otros estímulos, como hormonas y factores de crecimiento. También un foco de investigación está puesto en métodos de prevención de apoptosis como resultado de la hipoxia (Nyberg, Hardin *et al.*, 2000).

1.7.4.4 Escalado

El éxito de la implementación de los dispositivos BAL dependerá de su facilidad de escalado a niveles terapéuticos efectivos, sumado a los aspectos logísticos como el almacenado y transporte, para disponer de dispositivos flexibles e independientes. (Diekmann, Bader *et al.*, 2006)

La selección del tipo celular dependerá de su eficiencia para proveer funciones hepáticas específicas, sus posibles efectos adversos y su disponibilidad. La cantidad mínima de células requeridas no se conoce, pero basándose en resecciones quirúrgicas seguras (Nagasue, Yukaya

et al., 1987), un valor aceptable sería entre 150-450 g de células (o 10^{10} hepatocitos), que suministra la actividad de un 10-30 % de la masa de un hígado normal (Morsiani, Brogli *et al.*, 2002; Strain and Neuberger, 2002; van de Kerkhove, Hoekstra *et al.*, 2004). Asumiendo que el paciente tiene una actividad hepática residual, el BAL podría contener un 15 % de masa hepática. Sin embargo, las células aisladas en el biorreactor no siempre están en condiciones óptimas de viabilidad y función, por lo que se suele usar entre 20 y 30 %.

Como se mencionó previamente, las células del parénquima hepático presentan mejor actividad en configuración tridimensional, y la actividad es mayor cuando son co-cultivadas con células no parenquimales. Por estos motivos, un BAL debería contener una mezcla de células hepáticas diferenciadas en una configuración tridimensional y que representen por lo menos el 20 % de la masa del hígado normal (200 g aproximadamente).

Según datos experimentales obtenidos con animales, se ha logrado la recuperación espontánea con menores cantidades de células, posiblemente por la eliminación de sustancias inhibitoras de la regeneración, como el TGF- β (Arkadopoulos, Lilja *et al.*, 1998).

Los dispositivos BAL ensayados clínicamente contenían aproximadamente $0,5 \times 10^9$ a 1×10^{11} hepatocitos porcinos o 4×10^{10} células C3A (van de Kerkhove, Hoekstra *et al.*, 2004). En general estos sistemas son diseñados para 1×10^{10} hepatocitos, que representan aproximadamente el 10 % del peso total del hígado. En cuanto a los dispositivos de membranas, el escalado se realiza aumentando el tamaño del cartucho, o la utilización de varios cartuchos en paralelo. Por ejemplo, el HepatAssist[®] utiliza $6-10 \times 10^9$ células, el HepatAssist2[®] puede contener $1,5 \times 10^{10}$ hepatocitos, tres veces más que su versión original. Los sistemas perfusivos o sistemas que utilizan células encapsuladas pueden escalarse más fácilmente, pero debido a su configuración suele tener mayor volumen muerto. Los diseños de placas planas apiladas serían fáciles de escalar pero pueden ocasionar heterogeneidad en la distribución del flujo (Allen, Hassanein *et al.*, 2001).

La necesidad de una gran masa celular requiere de una forma de almacenamiento para su rápida disposición. Uno de los métodos más utilizados es la crio preservación. Si bien se observa una pérdida de funcionalidad al reconstituir las células (Chesne, Guyomard *et al.*, 1993) (De Loecker, Fuller *et al.*, 1990), esta permite flexibilidad en los tiempos del tratamiento. Por lo tanto, la crio preservación de los hepatocitos es un tema de interés actual.

1.7.4.5 Regulación y seguridad

Como cualquier otro dispositivo que involucre la circulación de sangre o sus componentes, existen complicaciones potenciales asociadas con el tratamiento de la sangre en un dispositivo extracorpóreo, como anormalidades hemodinámicas, metabólicas e hipotermia, o relacionados con la cateterización y la anticoagulación (trombocitopenia y coagulopatías, susceptibilidad a infecciones y disritmias cardíacas) (Sen & Williams, 2003).

Los cuidados más importantes relacionados a la seguridad de los dispositivos BAL son similares a otras terapias que involucren células, como la liberación de células tumorigénicas, reacciones inmunológicas a antígenos extraños y xenozoosis. Para evitar el escape de células tumorigénicas, como la línea celular C3A usada en el sistema ELAD[®], se agregan filtros de retención de células antes de reingresar al paciente (Millis, Cronin *et al.*, 2002).

En relación a la utilización de hepatocitos porcinos, se ha encontrado ADN y ARN del virus PERV en el sobrenadante de cultivo (Nyberg, Hibbs *et al.* 2000), e incluso se observó transmisión a células humanas *in vitro* (Patience, Takeuchi *et al.* 1997; Martin, Kiessig *et al.* 1998; Wilson, Wong *et al.* 1998; Nyberg, Hibbs *et al.* 1999; Martin, Winkler *et al.* 2000; Nyberg, Hibbs *et al.* 2000). Adicionalmente se han encontrado evidencias de la presencia de anticuerpos contra antígenos porcinos en el suero de pacientes tratados con dispositivos BAL (Baquerizo, Mhoyan *et al.* 1997), pero la relevancia clínica de estos hallazgos no es clara debido a que no se han observado los isotipos IgM e IgG hasta 1 o 3 semanas después. Tampoco se ha demostrado la transmisión de la enfermedad en pacientes tratados con BAL (Patience, Patton *et al.* 1998; Walid, Annika *et al.* 1998; Paradis, Langford *et al.* 1999; Pitkin and Mullan 1999), ni se encontró evidencia mediante RT-PCR seis meses después del tratamiento (Samuel, Ichai *et al.* 2002). Es probable que el tamaño del poro evite el pasaje de virus, Nyberg *et al.* demostraron que un tamaño de poro de 5 nm (correspondiente a un tamaño de corte de 50-100 kDa) evita la infección de PERV en células humanas por 7 días, y los tratamientos planteados con los diferentes dispositivos duran menos de un día (Nyberg, Hibbs *et al.* 1999). Esto sugiere que la respuesta inmunológica puede no ser un problema clínico significativo en los tratamientos no repetidos con BAL. Aun así, es conveniente que los desarrollos continúen contemplando la inclusión de barreras inmunológicas, para futuros tratamientos en pacientes crónicos con episodios agudos repetidos.

Las objeciones sobre el uso de células porcinas llevaron a que estos ensayos estén prohibidos en EEUU, y bajo consideración en la mayor parte de Europa.

1.7.5 Dispositivos BAL en fase clínica

1.7.5.1 ELAD[®] (*Extracorporeal Liver Assist Device*)

El modelo Hepatix[®] ELAD[®], utiliza una línea celular proveniente de hepatoma humano C3A, colocadas en el espacio extracapilar de un cartucho de hemofiltración en configuración fibra hueca (Sussman, Chong *et al.*, 1992). Esta línea deriva de la línea celular de hepatoblastoma HepG2. La C3A fue elegida para el ELAD[®] por su potencial de tumorigenicidad reducido y su producción elevada de albúmina y α -fetoproteína.

El ELAD[®] consiste en un sistema de diálisis con dos bombas y un cartucho de fibra hueca que contiene las C3A. La sangre fluye a través del cartucho, y el plasma es ultrafiltrado con una membrana de celulosa al espacio extracapilar donde toma contacto directo con las células C3A (similar a la Figura 5.c). La membrana semipermeable que las separa tiene un corte de 70 kDa, por lo que ni inmunoglobulinas o leucocitos puede acceder a este espacio. Antes que el ultrafiltrado retorne al paciente, pasa por un filtro adicional para impedir la liberación de células o restos celulares a la sangre. Se puede utilizar un oxigenador de membrana descartable si el paciente debe ser desconectado momentáneamente del ELAD[®]. Se utiliza heparina para evitar la coagulación dentro del dispositivo.

Posteriormente el ELAD[®] fue modificado, utilizando sangre ultrafiltrada en lugar de sangre entera, con una membrana de 120 kDa tamaño de poro. Se utilizan 4 cartuchos con 100 g de células C3A por cada tratamiento. El caudal a través de un cartucho es de 500 ml·min⁻¹ en lugar de 150-200 ml·min⁻¹ utilizado en el primer diseño. La actividad metabólica de las células en los cartuchos se monitorea a través del seguimiento del consumo de oxígeno y glucosa. Los tratamientos que se realizaron en ensayos clínicos fase I duraron entre 12 y 107 horas.

1.7.5.2 HepatAssist[®]

El HepatAssist[®], desarrollado por Rozga y Demetriou (Neuzil, Rozga *et al.*, 1993; Rozga, Holzman *et al.*, 1993) consiste en un reactor de membranas de fibra hueca (tamaño de poro promedio de 0,2 μ m) que contiene como componente biológico 5 a 7 x 10⁹ hepatocitos porcinos criopreservados. Las células unidas a un microportador son inoculadas en el espacio extracapilar. Primero se separa el plasma del paciente que es inactivado en una columna de celulosa recubierta con carbón activado y por un oxigenador para luego ingresar al reactor (similar a la Figura 5.e).

1.7.5.3 TECA-HALSS® (hybrid artificial support system)

Desarrollado en Beijing, China (Xue, Zhao *et al.* 1999). Consiste en un biorreactor de fibra hueca (Figura 5.d, pero con hepatocitos en lugar de organoides) que contiene en su espacio extracapilar 20×10^9 hepatocitos porcinos en suspensión. El plasma circula por las fibras del reactor, luego a través de un filtro de carbón para finalmente reconstituirse con glóbulos rojos y reingresar al paciente. El tratamiento duro como máximo 5 horas por biorreactor.

1.7.5.4 BLSS® (Bioartificial Liver Support System)

Desarrollado en Pittsburgh (Mazariegos, Kramer *et al.* 2001), utiliza de 70-120 g de hepatocitos primarios porcinos. Las células se encuentran en el espacio extracapilar mezcladas con colágeno al 20 % (Figura 5.h). La sangre pasa por un oxigenador y luego a través de las fibras. La transferencia de materia es por difusión a través de la membrana con poros de 100 kDa.

1.7.5.5 RFB® (Radial Flow Bioreactor)

Desarrollado en la Universidad de Ferrara, Italia (Morsiani, Puviani *et al.* 2000). Es un sándwich de matriz artificial entre dos placas de poliéster con 200 g de hepatocitos primarios porcinos (similar a la Figura 5.a). Las placas de poliéster evitan que los hepatocitos salgan del biorreactor durante la perfusión. El plasma del paciente es oxigenado antes de ingresar al biorreactor. La viabilidad y función de los hepatocitos se evalúa con la medición del consumo de oxígeno dentro del reactor.

1.7.5.6 LSS® (Liver Support System) y MELs® (Modular Extracorporeal Liver Support)

El LSS® desarrollado en Berlín, Alemania (Gerlach, Kloppel *et al.*, 1993) es un biorreactor especialmente diseñado que mejora la oxigenación y transferencia de materia (Figura 5.f). El sistema consiste en manojos de fibras huecas entrecruzadas, por fuera de las cuales se encuentran los hepatocitos formando agregados. Dentro del reactor hay tres manojos de fibras huecas: dos de ellas son hidrofílicas (300 kDa de tamaño de poro) que son utilizadas para la perfusión de plasma. Cerrando un extremo de cada manojos, el plasma que ingresa al biorreactor pasa al espacio extracapilar a través de un manojos de fibras, toma contacto con los hepatocitos, y abandona el reactor por el otro manojos de fibras. El tercer paquete de fibras huecas es de membranas hidrofóbicas, y se utiliza para el intercambio de gases en el reactor. El biorreactor contiene hasta 500-600 g de hepatocitos. El sistema LSS® se ha ensayado tanto con hepatocitos primarios porcinos como con hepatocitos humanos (de órganos descartados).

MELS[®] es la combinación de diferentes unidades de terapia, en función de las necesidades del paciente. MELS[®] consiste en un sistema LSS[®] combinado con un DetoxModule[®] basado en una diálisis de un único pasaje con albúmina exógena para remover las toxinas unidas a albúmina plasmática.

1.7.5.7 AMC-BAL[®]

Desarrollado en Ámsterdam, Holanda (Calise, Mancini *et al.*, 2001). Consiste en un biorreactor de fibra hueca y un sistema de plasmaféresis. Se utilizan por lo menos 10×10^9 hepatocitos porcinos unidos a una matriz hidrofílica tridimensional de poliéster (Figura 5.l). La matriz tiene un espesor de 4 mm y una superficie total de $0,56 \text{ m}^2$, dispuesta en espiral alrededor de un centro macizo. Dentro de las capas de la matriz, se ubican longitudinalmente las fibras huecas de oxigenación. El plasma del paciente es perfundido en el biorreactor y antes de regresar al paciente se reconstituye con glóbulos rojos separados por el módulo de plasmaféresis. Lo más significativo de este diseño es que el plasma está en contacto directo con los agregados de hepatocitos, por lo que se consigue una transferencia de materia y oxigenación óptima.

1.7.5.8 BHSS[®] (Bioartificial Hepatic Support System)

Desarrollado en Udine, Italia (Corno, Donini *et al.*, 1998). Es un biorreactor de fibra hueca con membranas de $0,6 \text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro, que contiene en el espacio extracapilar 15×10^9 hepatocitos porcinos criopreservados sobre portadores de dextrano recubierto con colágeno (Similar a la Figura 5.e). El plasma del paciente antes de ingresar al biorreactor, pasa por una columna de carbón activado, un oxigenador, y un termostatizador.

1.7.5.9 HBAL[®] (Hybrid Bioartificial Liver)

Desarrollado en Nanjing, China (Ding, Qiu *et al.*, 2003). Biorreactor de fibra hueca de polisulfona (PS) con un volumen interno de 360 ml. Más de 10×10^9 hepatocitos porcinos cultivados 12 horas en suspensión en el espacio extracapilar. El plasma es perfundido a través de las fibras huecas con un tamaño de poro de 100 kDa (Similar a la Figura 5.d.). En la Tabla 2 se resumen los diseños de dispositivos BAL que han llegado han superado la fase pre-clínica en los ensayos clínicos.

Tabla 2: Diseños de dispositivos BAL en fase clínica

		ELAD	HepatAssit®	LSS® y MELS®	AMC-BAL®	BLSS®
Institución		Amphioxus Cell Technology, Houston, EEUU	Cedars-Sinai Medical Center y Circe Biomedical EEUU	Charité, Universidad de Humboldt, Alemania	Academic Medical Center, Holanda	Exc corp Medical Inc, Oackdale y Univ. Pittsburgh, EEUU
Fase clínica		II	II/III	I/II	I	I/II
componente biológico	Fuente celular	cultivo C3A	porcina, crio-preservedo	LSS®: porcina MELS®: humana; aislado fresco	porcina; aislado fresco	porcina; aislado fresco
	Células totales	2x10 ¹¹	5x10 ⁹	2,5 x10 ⁹	1x10 ¹⁰	2,2 x10 ¹⁰ - 10,7 x10 ¹⁰ ⁽⁵⁾
	Técnica cultivo	agregados	Células sobre microportador	agregados	agregados	atrapado en colágeno
componente sintético	Diseño dispositivo	fibra hueca	fibra hueca	fibra hueca multi-compartimentada	matriz de poliéster enrollada en espiral	manojos de fibras huecas
	Composición de membrana	acetato de celulosa	polisulfona	poliamida, polietersulfona, polipropileno	----	acetato de celulosa
	Filtro barrera	70 kDa	0,2 µm	LSS®: 300kDa MELS®:400kDa	filtro leucocito 0,47 µm	100 kDa
	Oxigenación	pre-biorreactor	pre-biorreactor	dentro del biorreactor	dentro del biorreactor	pre-biorreactor
	Dispositivos adicionales	no	columna previa carbón	MELS®: dializador albúmina	no	no
Tratamiento	caudal de trabajo	15-200 ml·min ⁻¹	400 ml·min ⁻¹	100-200 ml·min ⁻¹	150 ml·min ⁻¹	100-250 ml·min ⁻¹
	Tiempo de tratamiento	hasta 168h	6h	LSS®: 7-16h MELS®: 7-74h	hasta 24h	12h
	Anticoagulante	heparina	citrato	heparina	heparina	heparina
Referencias		(Millis, Cronin <i>et al.</i> 2002)	(Demetriou, Brown <i>et al.</i> 2004)	(Sauer, Kardassis <i>et al.</i> 2003)	(van de Kerkhove, Di Florio <i>et al.</i> 2002)	(Mazariegos, Kramer <i>et al.</i> 2001)

⁵ Calculado de 70-120 g.

Tabla 3: Diseños de dispositivos BAL en fase clínica (continuación)

		RFB®	TECA-HALSS®	HBAL®	LiverX®
Institución		Universidad de Ferrara, Italia	PLA General Hospital, China	Univ. Nanjing, China	Algenix Inc., Minneapolis, EEUU
Fase clínica		I/II	0	I	I/II
Componente biológico	Tipo celular	porcina	porcina	porcina	porcina
	Fuente celular	aislado fresco	aislado fresco	aislado fresco	aislado fresco
	Células totales	$6 \times 10^{10} - 7 \times 10^{10}$ ⁽⁶⁾	1×10^{10}	1×10^9	$1,2 \times 10^{10} - 2,4 \times 10^{10}$ ⁽⁷⁾
	Técnica cultivo	agregados	agregados	agregados	atrapamiento en colágeno
Componente sintético	Diseño dispositivo	biorreactor de flujo radial. Perfundido	fibra hueca	fibra hueca	fibra hueca
	Composición de la membrana	poliéster	polisulfona	polisulfona	polisulfona
	Filtro barrera	0,4 μm	100 kDa	100 kDa	100 kDa
	Oxigenación	pre-biorreactor	pre-biorreactor	no reportado	no reportado
	Dispositivos adicionales	no	columna previa carbón activado	columna previa carbón activado	no
Tratamiento	caudal biorreactor	200-350 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$	no reportado	no reportado	no reportado
	Tiempo de tratamiento	hasta 24h	hasta 5h	6h	no reportado
	Anticoagulante	heparina/citrato	heparina	no reportado	no reportado
Referencias		(Morsiani, Pazzi <i>et al.</i> 2002)	(Xue, Zhao <i>et al.</i> 2001)	(Ding, Qiu <i>et al.</i> 2003)	(Sielaff, Nyberg <i>et al.</i> 1997)

1.8 ENSAYOS CLÍNICOS

El diseño de un estudio clínico para este tipo de dispositivos es un desafío en sí mismo. Como se mencionó, la evolución de la falla hepática es altamente dependiente de su etiología y,

⁶ Calculado de 200-230 g.

⁷ Calculado de 40-80 g.

además, una de las manifestaciones de la falla hepática es la encefalopatía hepática, es difícil de cuantificar clínicamente. Por lo tanto, los pacientes deben ser clasificados según su etiología y el grado de avance de los síntomas en que se comenzó la terapia con el dispositivo de soporte hepático.

Otro dilema es la determinación del punto final de estudio, la mayoría de los ensayos clínicos utilizan como punto final los 30 días de supervivencia y 30 días de supervivencia sin trasplante, sin embargo, los ensayos a menudo son descartados ya que los pacientes de FHF son trasplantados de manera variable según la disponibilidad de órganos y los criterios de elegibilidad del centro médico. Además, la interpretación del rol de los hepatocitos vivos funcionales incorporados puede ser compleja debido a la presencia de otros procedimientos no biológicos, como la perfusión con carbón activado presente en algunos diseños. La efectividad del componente celular surgirá de una comparación directa con sistemas no biológicos, con células diferentes de hepatocitos y hepatocitos muertos, como así también mediante la investigación de la viabilidad y funcionalidad de las células durante el tratamiento con BAL, considerando el tiempo de tratamiento y de recambio de un dispositivo por otro.

De todas maneras, aun cuando los dispositivos no demuestren la eficacia esperada, toda la información obtenida es crucial para la generación de nuevos dispositivos.

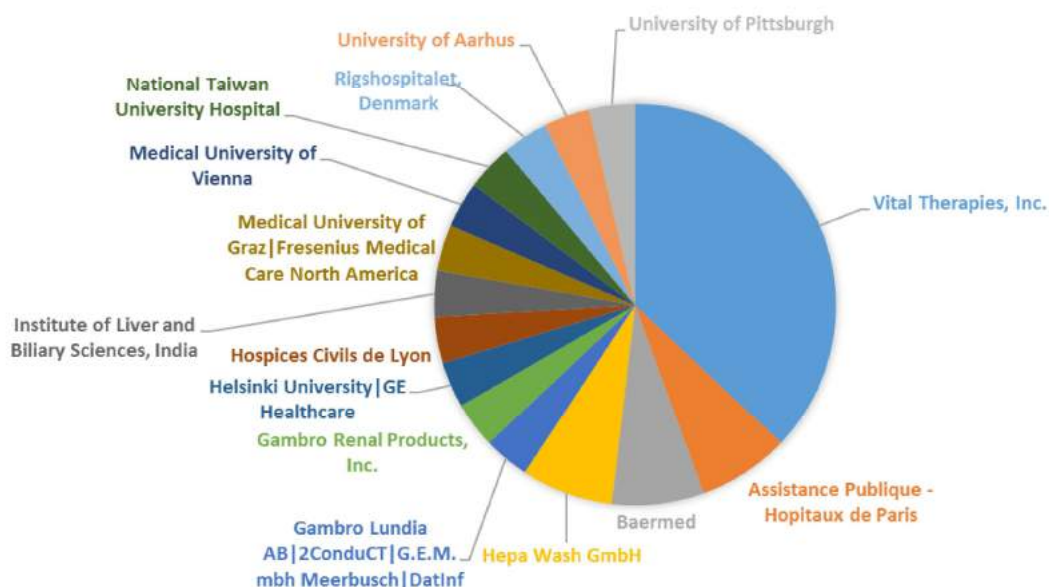


Figura 6: Colaboradores/ auspiciantes involucrados en los estudios clínicos de BAL.

Para evaluar la actividad relacionada a dispositivos de soporte hepático, se analizaron 27 estudios clínicos reportados⁸, de los cuales 12 estudios están registrados como completos. Considerando todos los estudios, se observa que Vital Therapies Inc. que desarrolla la tecnología ELAD[®] es la empresa más activa (Figura 6).

Si se considera el dispositivo o terapia utilizado, en la Figura 7 se observan los dispositivos más utilizados en estos estudios clínicos (A), y aquellos utilizados en los estudios que ya fueron completados (B):

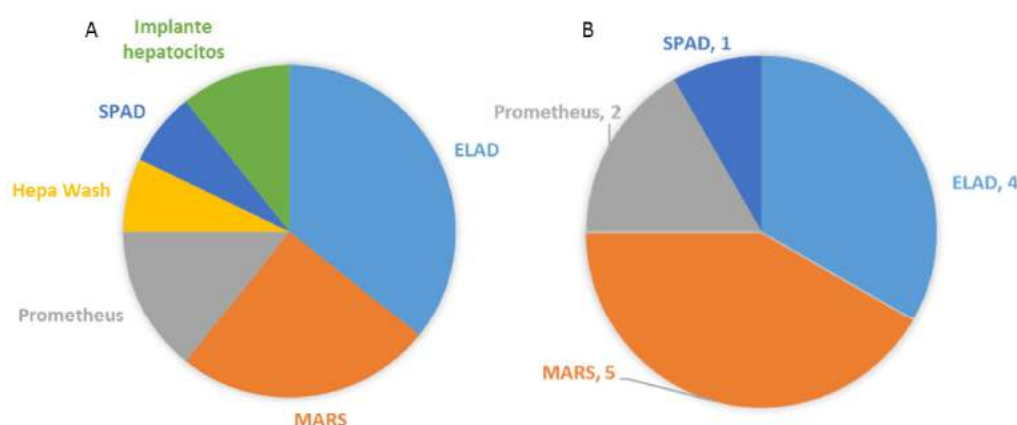


Figura 7: Dispositivo utilizado en todos los estudios clínicos analizados (A) y sólo en los estudios clínicos completos (B).

En los registros de los estudios clínicos no se encuentran los resultados, pero la mayoría de ellos (junto a otros estudios no registrados en el NIH) culminaron con publicaciones que a su vez han sido recopiladas en *reviews* que realizaron un meta análisis de los resultados.

1.8.1 Supervivencia de los pacientes

En los ensayos clínicos controlados (Margulis BAL, ELAD[®] y HepatAssist[®]) no se observó un efecto significativo en la supervivencia. En general los pacientes con FHF, aún tratados con un dispositivo BAL, van a trasplante hepático, por lo que se necesita mayor número de pacientes para evaluar el efecto del tratamiento. La mayoría de los dispositivos demostraron mejora en la supervivencia en modelos animales, pero sus datos son difíciles de comparar ya que se trata de diferentes especies (perros, cerdos, etc.) y a su vez diferentes modelos de falla hepática (falla hepática aguda inducida por galactosamina, ablación hepática, etc.).

⁸ www.clinicaltrials.gov

Un meta análisis (de 10 estudios) realizado por Guo Lin He (He *et al.*, 2015) indica que la terapia con MARS[®] puede mejorar la sobrevida de pacientes con FHF, pero en base a la evidencia no puede concluir lo mismo para la FHAC.

Por el contrario, Zhen Zheng (Zheng, Li, Li, & Ma, 2013) realizó un meta-análisis a partir de 19 estudio clínicos (un total de 937 pacientes) donde reveló que los sistemas de soporte hepático (artificiales o bioartificiales) redujeron la mortalidad de pacientes con FHAC pero sin efecto sobre pacientes con FHF.

Esta disparidad en los resultados puede deberse en parte a la diferencia de criterios para considerar a los pacientes que ingresan, y en general a la calidad metodológica del estudio clínico, medido por la escala de Jadad (Olivo *et al.*, 2008).

1.8.2 Condición neurológica

Además de la supervivencia, la eficacia de los diferentes BAL puede analizarse a partir de los efectos neurológicos y análisis clínicos generales.

En todos los casos se observó una mejora en la condición neurológica, tomando como parámetro la presión intracraneal, el electroencefalograma o ambos.

1.8.3 Parámetros bioquímicos

En la mayoría de los estudios se evaluaron la eliminación de amonio y bilirrubina. Sin embargo, los cambios en los parámetros bioquímicos no discriminan entre las funciones detoxificadora y sintética del dispositivo respecto del hígado nativo (Colletti, Johnson *et al.* 1994; Hughes and Williams 1995; Ellis, Hughes *et al.* 1996)(Ellis *et al.*, Hughes y William y Coletti *et al.*). Una alternativa podría ser el análisis del plasma a la entrada y salida del dispositivo, para evaluar la mejoría en parámetros bioquímicos del paciente y la eficiencia del dispositivo.

1.8.4 Eventos adversos observados

En cuatro sistemas (ELAD[®], HepatAssist[®], BLSS[®], AMC-BAL[®]) se ha observado hipotensión al inicio del tratamiento, posiblemente causada por una hipovolemia existente, liberación de bradiquinina como reacción a las membranas del circuito extracorpóreo o por antígenos xenogénicos. La bradiquinina parecería ser la causa más probable, también reportada en los tratamientos con diálisis renal. No se observaron reacciones inmunológicas durante los tratamientos de corto plazo con BAL preparados con hepatocitos alogénicos o xenogénicos.

1.8.5 Eficacia

Los dispositivos BAL que existen en la actualidad han tenido una eficacia limitada. Las posibles causas se enumeran a continuación:

- 1) El dispositivo no siempre fue el óptimo. Si no hay un oxigenador interno, o el mismo dispositivo no asegura la oxigenación, puede limitar la viabilidad y función celular.
- 2) No se dispone de la línea celular humana óptima para esta aplicación.
- 3) En los ensayos clínicos publicados, debido a que los pacientes son un grupo muy heterogéneo, los análisis de intención de tratamiento no dan resultados satisfactorios.
- 4) Si el BAL es utilizado en pacientes con falla hepática aguda como terapia puente al trasplante, la sobrevida depende del tratamiento con BAL como así también del trasplante.
- 5) La gran mayoría de los dispositivos utilizados son reactores de fibra hueca, que difieren en el modo de oxigenación, transporte de materia, tipo y forma de cultivo celular. Estos serían los parámetros más críticos de diseño. Otros aspectos de importancia son matriz extracelular y la composición del medio que pueden afectar notablemente la estabilidad de las funciones del hepatocito.
- 6) Los sistemas BAL carecen de sistemas biliares para la excreción de bilirrubina conjugada (van de Kerkhove, Hoekstra *et al.* 2004; Chamuleau 2009). La excreción de metabolitos en la bilis depende del remanente del hígado dañado. Los hepatocitos en el biorreactor forman ácidos y sales biliares, muchos de ellos tóxicos que se unen a proteína, y pueden aumentar la concentración en sangre. Esta concentración puede disminuir con la incorporación de un módulo de detoxificación en el sistema BAL (HepatAssist[®], TECA-HALSS[®], MELS[®] y HBAL[®]). Para el caso de la FHF este sistema puede favorecer la situación, pero debería evitarse la remoción de factores hepatotróficos, especialmente importante si se busca la regeneración hepática.

No es posible entonces obtener conclusiones definitivas, y como se detalló al principio de esta sección este tipo de tecnologías aún se encuentran en un estadio incipiente. Para continuar con el desarrollo de este tipo de dispositivos hacen falta mayor cantidad de estudios para determinar qué tipo de tratamientos son los adecuados para mejorar la sobrevida en post de un trasplante hepático (o evitar el trasplante), pero también más investigación básica sobre la fisiología hepática y el desencadenamiento de la falla hepática y su consecuente mortalidad.

Los desafíos actuales en el desarrollo de una nueva terapia de soporte hepático:

1. En un centro médico suele haber pocos pacientes con falla hepática, y aun sumando muchos centros, la etiología posible es muy variada, por lo que se dificulta la estandarización de toma de datos y el desarrollo de un protocolo de ensayo clínico adecuado.
2. No se conoce claramente la fisiopatología de la falla hepática, con la consecuente dificultad en diseñar un tratamiento terapéutico específico y racional.
3. Es difícil cuantificar la severidad del daño hepático como para determinar la eficacia de la intervención terapéutica.
4. No existe un único marcador preciso y estandarizado para evaluar la masa hepática funcional del paciente, y de esa manera determinar el porcentaje de disfunción hepática.
5. La progresión de la enfermedad es bastante rápida, con solo una “ventana de oportunidad” para iniciar el tratamiento.
6. Cada diseño de dispositivo tiene limitaciones inherentes, que se suman al modo de operación y la biocompatibilidad de materiales utilizados.
7. Cada fuente celular tiene sus limitaciones propias, donde además debe considerarse el tipo de cultivo, la disponibilidad inmediata y la posibilidad de criopreservación.
8. La falta de un adecuado procedimiento doble ciego, imposible por las características del sistema de soporte. Esto podría conducir a un aumento en el riesgo de falsos positivos.

1.9 PROYECCIONES FUTURAS

Se están realizando numerosas investigaciones en todo el mundo sobre aspectos muy diversos vinculados con la problemática de desarrollar una terapéutica de soporte hepático. Se sabe que es fundamental un abordaje multidisciplinario para contemplar desde la selección de los pacientes, el diseño del dispositivo y el tipo de tratamiento. También se consideran otras aplicaciones de estos dispositivos (modelo de metabolismo de drogas, producción de proteínas nativas y tratamientos ambulatorios) por lo que al abrir el campo de aplicación facilitaría la economía de escala y podría reducir los costos del tratamiento.

Como se observa en la Figura 8, la tendencia de los últimos 20 años muestra un crecimiento lento con una disminución en el año 2001 que se recuperó en los años siguientes. En esta figura se presentan el número de solicitudes de patentes representantes de familias publicadas por año

(barras rojas) y número de patentes representantes de familias⁹ concedidas por año (barras verdes). La proporción entre las patentes solicitadas y concedidas se encuentra dentro de lo esperado: en primer lugar, se espera una demora entre la solicitud de la patente y su concesión que puede prolongarse por varios años, en segundo lugar, algunas solicitudes no son concedidas por no reunir los requisitos legales y, en tercer lugar, los solicitantes pueden estratégicamente no continuar la tramitación de solicitudes de patente.

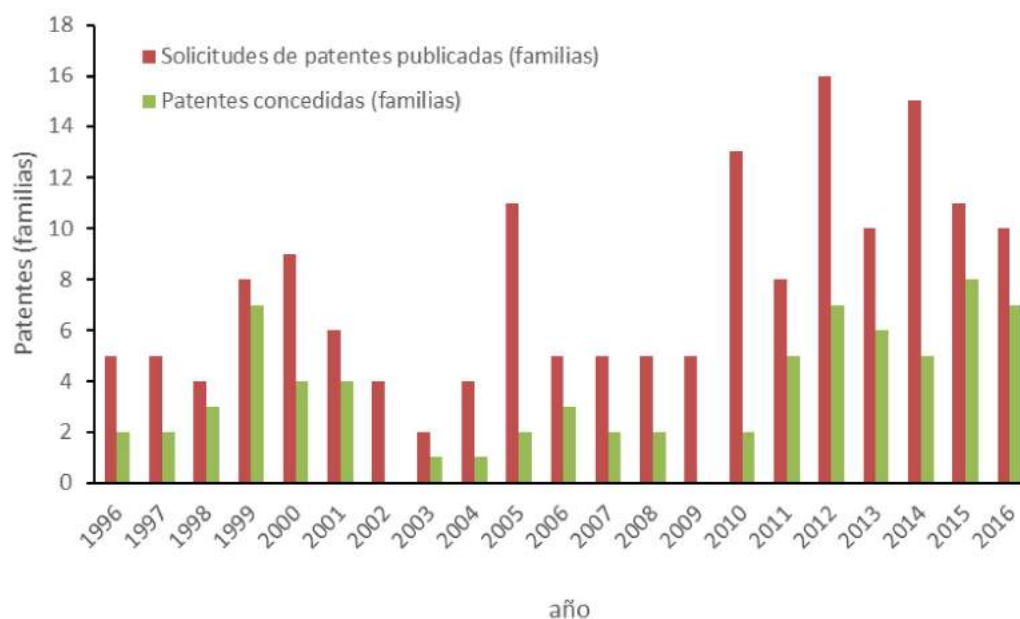


Figura 8: Solicitudes de patentes publicadas y patentes concedidas, por familia.

El desarrollo de la tecnología en el tiempo puede ser rastreado con la Figura 9, pero el ciclo de vida de una tecnología puede ser seguido mediante el estudio del tamaño de las explotaciones de patentes pertenecientes a las organizaciones solicitantes.

El solicitante que más se destaca es Gambro Lundia AB, compañía que desarrolló la tecnología MARS[®]. Se destacan además Vital Therapies Inc. (tecnología ELAD[®]) y Fresenius Medical Care GmbH (tecnología Prometheus[®])

⁹ Se denomina familia de patentes a los documentos de patente publicados en diferentes países relacionados con la misma invención. Esto permite contar cada invención una única vez, para no contar las solicitudes del mismo solicitante en diferentes países para la misma invención.



Figura 9: Solicitudes de patentes totales de sistemas BAL, según solicitante y año.

En tecnologías emergentes se ven muchos solicitantes con poca antigüedad, con pocas solicitudes de patente cada uno y un recambio alto. A medida que se desarrolla el sector, aumenta la especialización y las solicitudes se concentran en un pequeño grupo de solicitantes que desarrollan grandes portafolios de patentes a partir de su propia innovación y a través de adquisiciones. En este caso, el sector no es maduro y las tecnologías todavía se encuentran desconcentradas.

1.10 REFERENCIAS

- Allen, J. W., T. Hassanein, *et al.* (2001). Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology* 34(3): 447-455.
- Argibay, P. F., J. M. Di Noia, *et al.* (2002). *Trypanosoma cruzi* surface mucin TcMuc-e2 expressed on higher eukaryotic cells induces human T cell anergy, which is reversible. *Glycobiology* 12(1): 25-32.
- Arkadopoulos, N., H. Lilja, *et al.* (1998). Intrasplenic transplantation of allogeneic hepatocytes prolongs survival in anhepatic rats. *Hepatology* 28(5): 1365-1370.

- Auth, M. K., M. Okamoto, *et al.* (1998). Maintained function of primary human hepatocytes by cellular interactions in coculture: implications for liver support systems. *Transpl Int* 11 Suppl 1: S439-443.
- Babensee, J. E., U. De Boni, *et al.* (1992). Morphological assessment of hepatoma cells (HepG2) microencapsulated in a HEMA-MMA copolymer with and without Matrigel. *J Biomed Mater Res* 26(11): 1401-1418.
- Bader, A., N. Fruhauf, *et al.* (1998). Development of a small-scale bioreactor for drug metabolism studies maintaining hepatospecific functions. *Xenobiotica* 28(9): 815-825.
- Baquerizo, A., A. Mhoyan, *et al.* (1997). Xenoantibody response of patients with severe acute liver failure exposed to porcine antigens following treatment with a bioartificial liver. *Transplant Proc* 29(1-2): 964-965.
- Baquerizo, A., A. Mhoyan, *et al.* (1999). Characterization of human xenoreactive antibodies in liver failure patients exposed to pig hepatocytes after bioartificial liver treatment: an ex vivo model of pig to human xenotransplantation. *Transplantation* 67(1): 5-18.
- Ben-Ze'ev, A., G. S. Robinson, *et al.* (1988). Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(7): 2161-2165.
- Bhatia SN, T. M., Foy BD, Rotem A, O'Neil KM, Tompkins RG, and Yarmush ML (1996). Zonal Liver Cell Heterogeneity: Effects of Oxygen on Metabolic Functions of Hepatocytes. *Journal of Cellular Engineering* 1: 125-135.
- Black, D., S. Lyman, *et al.* (2004). Molecular and cellular features of hepatic regeneration. *J Surg Res* 117(2): 306-315.
- Brown, K. A. (2005). Liver transplantation. *Curr Opin Gastroenterol* 21(3): 331-336.
- Calise, F., A. Mancini, *et al.* (2001) Functional evaluation of the AMC-BAL to be employed in a multicentric clinical trial for acute liver failure. *Transplantation Proceedings* 33(1-2): 647-649.
- Cascio, S. M. (2001). Novel strategies for immortalization of human hepatocytes. *Artif Organs* 25(7): 529-538.
- Castino, F., K. Scheucher, *et al.* (1976). Microemboli-free blood detoxification utilizing plasma filtration. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 22: 637-645.
- Chamuleau, R. (2009). Future of bioartificial liver support. *World J Gastrointest Surg.* 30(1(1)): 21-25.
- Chan, C., F. Berthiaume, *et al.* (2003). Metabolic flux analysis of cultured hepatocytes exposed to plasma. *Biotechnol Bioeng* 81(1): 33-49.
- Chesne, C., C. Guyomard, *et al.* (1993). Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation. *Hepatology* 18(2): 406-414.
- Colletti, L. M., K. J. Johnson, *et al.* (1994). Mechanisms of hyperacute rejection in porcine liver transplantation. Antibody-mediated endothelial injury. *Transplantation* 57(9): 1357-1363.

- Corno, V., A. Donini, *et al.* (1998). Bioartificial liver based on porcine hepatocyte: *in vitro* functional assessment. *Transplant Proc* 30(5): 2469-2470.
- De Bartolo, L. and A. Bader (2001). Review of a flat membrane bioreactor as a bioartificial liver. *Ann Transplant* 6(3): 40-46.
- De Bartolo, L., G. Jarosch-Von Schweder, *et al.* (2000). A novel full-scale flat membrane bioreactor utilizing porcine hepatocytes: cell viability and tissue-specific functions. *Biotechnol Prog* 16(1): 102-108.
- De Bartolo, L., S. Morelli, *et al.* (2002). Evaluation of cell behaviour related to physico-chemical properties of polymeric membranes to be used in bioartificial organs. *Biomaterials* 23(12): 2485-2497.
- De Loecker, R., B. J. Fuller, *et al.* (1990). The effects of cryopreservation on membrane integrity, membrane transport, and protein synthesis in rat hepatocytes. *Cryobiology* 27(2): 143-152.
- Demetriou, A. A., R. S. Brown, Jr., *et al.* (2004). Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 239(5): 660-667; discussion 667-670.
- Dickmann, S., A. Bader, *et al.* (2006). Present and Future Developments in Hepatic Tissue Engineering for Liver Support Systems : State of the art and future developments of hepatic cell culture techniques for the use in liver support systems. *Cytotechnology* 50(1-3): 163-179.
- Ding, Y. T., Y. D. Qiu, *et al.* (2003). The development of a new bioartificial liver and its application in 12 acute liver failure patients. *World J Gastroenterol* 9(4): 829-832.
- Dunn, J. C., M. L. Yarmush, *et al.* (1989). Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J* 3(2): 174-177.
- Ellis, A. J., R. D. Hughes, *et al.* (1996). Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 24(6): 1446-1451.
- Gan, J. H., X. Q. Zhou, *et al.* (2005). Hybrid artificial liver support system for treatment of severe liver failure. *World J Gastroenterol* 11(6): 890-894.
- Gautier, A. and C. Legallais (2009). Les dispositifs de suppléance hépatique. *Réanimation* 18(5): 413-419.
- Gerlach, J. C. (1996). Development of a hybrid liver support system: a review. *Int J Artif Organs* 19(11): 645-654.
- Gerlach, J. C., J. Encke, *et al.* (1994). Bioreactor for a larger scale hepatocyte *in vitro* perfusion. *Transplantation* 58(9): 984-988.
- Gerlach, J. C., K. Kloppel, *et al.* (1993). Hepatocyte aggregate culture technique for bioreactors in hybrid liver support systems. *Int J Artif Organs* 16(12): 843-846.
- Glicklis, R., J. C. Merchuk, *et al.* (2004). Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. *Biotechnol Bioeng* 86(6): 672-680.

- He, G. L., Feng, L., Duan, C. Y., Hu, X., Zhou, C. J., Cheng, Y., Gao, Y. (2015). Meta-analysis of survival with the molecular adsorbent recirculating system for liver failure. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*.
- He, Z. P., W. Q. Tan, *et al.* (2003). Differentiation of putative hepatic stem cells derived from adult rats into mature hepatocytes in the presence of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor. *Differentiation* 71(4-5): 281-290.
- Holzer, C. and P. Maier (1987). Maintenance of periportal and pericentral oxygen tensions in primary rat hepatocyte cultures: influence on cellular DNA and protein content monitored by flow cytometry. *J Cell Physiol* 133(2): 297-304.
- Hughes, R. D. and R. Williams (1993). Use of sorbent columns and haemofiltration in fulminant hepatic failure. *Blood Purif* 11(3): 163-169.
- Hughes, R. D. and R. Williams (1995). Evaluation of extracorporeal bioartificial liver devices. *Liver Transpl Surg* 1(3): 200-206.
- Isom, H. C., T. Secott, *et al.* (1985). Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(10): 3252-3256.
- Jalan, R., S. Sen, *et al.* (2004). Prospects for extracorporeal liver support. *Gut* 53(6): 890-898.
- Kim, W. R., R. S. Brown, Jr., *et al.* (2002). Burden of liver disease in the United States: summary of a workshop. *Hepatology* 36(1): 227-242.
- Koniaris, L. G., I. H. McKillop, *et al.* (2003). Liver regeneration. *J Am Coll Surg* 197(4): 634-659.
- Kono, Y., S. Yang, *et al.* (1995). Establishment of a human hepatocyte line derived from primary culture in a collagen gel sandwich culture system. *Exp Cell Res* 221(2): 478-485.
- Lee, W. M. (2003). Acute liver failure in the United States. *Semin Liver Dis* 23(3): 217-226.
- Lee, W. M., R. H. Squires, Jr., *et al.* (2008). Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 47(4): 1401-1415.
- Legallais, C., E. Dore, *et al.* (2000). Design of a fluidized bed bioartificial liver. *Artif Organs* 24(7): 519-525.
- Lemaigre, F. and K. S. Zaret (2004). Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 14(5): 582-590.
- Liu, J., J. Pan, *et al.* (1999). Characterization and evaluation of detoxification functions of a nontumorigenic immortalized porcine hepatocyte cell line (HepLiu). *Cell Transplant* 8(3): 219-232.
- Lorenti, A., M. Barbich, *et al.* (2003). Ammonium detoxification performed by porcine hepatocyte spheroids in a bioartificial liver for pediatric use: preliminary report. *Artif Organs* 27(7): 665-670.
- Lowes, K. N., E. J. Croager, *et al.* (2003). Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *J Gastroenterol Hepatol* 18(1): 4-12.

- Margulis, M. S., E. A. Erukhimov, *et al.* (1989). Temporary organ substitution by hemoperfusion through suspension of active donor hepatocytes in a total complex of intensive therapy in patients with acute hepatic insufficiency. *Resuscitation* 18(1): 85-94.
- Martin, U., M. E. Winkler, *et al.* (2000). Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation* 7(2): 138-142.
- Martin, U., V. Kiessig, *et al.* (1998). Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* 352(9129): 692-694.
- Mazariegos, G. V., D. J. Kramer, *et al.* (2001). Safety observations in phase I clinical evaluation of the Excorp Medical Bioartificial Liver Support System after the first four patients. *ASAIO J* 47(5): 471-475.
- McCloskey, P., R. J. Edwards, *et al.* (1999). Resistance of three immortalized human hepatocyte cell lines to acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinoneimine toxicity. *J Hepatol* 31(5): 841-851.
- McCloskey, P., R. Tootle, *et al.* (2002). Modulation of hepatocyte function in an immortalized human hepatocyte cell line following exposure to liver-failure plasma. *Artif Organs* 26(4): 340-348.
- McGuire, B. M., T. D. Sielaff, *et al.* (1995). Review of support systems used in the management of fulminant hepatic failure. *Dig Dis* 13(6): 379-388.
- Michalopoulos, G. K., W. C. Bowen, *et al.* (2001). Histological organization in hepatocyte organoid cultures. *Am J Pathol* 159(5): 1877-1887.
- Millis, J. M., D. C. Cronin, *et al.* (2002). Initial experience with the modified extracorporeal liver-assist device for patients with fulminant hepatic failure: system modifications and clinical impact. *Transplantation* 74(12): 1735-1746.
- Morsiani, E., A. C. Puviani, *et al.* (2000). *In vitro* experimentation of a new model of radial flow bioreactor containing isolated hepatocytes. *Ann Ital Chir* 71(3): 337-345.
- Morsiani, E., M. Brogli, *et al.* (2002). Biologic liver support: optimal cell source and mass. *Int J Artif Organs* 25(10): 985-993.
- Morsiani, E., P. Pazzi, *et al.* (2002). Early experiences with a porcine hepatocyte-based bioartificial liver in acute hepatic failure patients. *Int J Artif Organs* 25(3): 192-202.
- Nagasue, N., H. Yukaya, *et al.* (1987). Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Ann Surg* 206(1): 30-39.
- Neuzil, D. F., J. Rozga, *et al.* (1993). Use of a novel bioartificial liver in a patient with acute liver insufficiency. *Surgery* 113(3): 340-343.
- Nyberg, S. L., J. A. Hardin, *et al.* (2000). Cytoprotective influence of ZVAD-fmk and glycine on gel-entrapped rat hepatocytes in a bioartificial liver. *Surgery* 127(4): 447-455.
- Nyberg, S. L., J. R. Hibbs, *et al.* (1999). Transfer of porcine endogenous retrovirus across hollow fiber membranes: significance to a bioartificial liver. *Transplantation* 67(9): 1251-1255.

- Nyberg, S. L., J. R. Hibbs, *et al.* (2000). Influence of human fulminant hepatic failure sera on endogenous retroviral expression in pig hepatocytes. *Liver Transpl* 6(1): 76-84.
- Nyberg, S. L., R. A. Shatford, *et al.* (1992). Hepatocyte culture systems for artificial liver support: implications for critical care medicine (bioartificial liver support). *Crit Care Med* 20(8): 1157-1168.
- O'Grady, J. G., A. E. Gimson, *et al.* (1988). Controlled trials of charcoal hemoperfusion and prognostic factors in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 94(5 Pt 1): 1186-1192.
- Olivo, S. A., Macedo, L. G., Gadotti, I. C., Fuentes, J., Stanton, T., & Magee, D. J. (2008). Scales to Assess the Quality of Randomized Controlled Trials: A Systematic Review. *Physical Therapy*, 88(2), 156–175.
- Otto, J. J., J. C. Pender, *et al.* (1958). The use of a donor liver in experimental animals with elevated blood ammonia. *Surgery* 43(2): 301-309.
- Pahernik, S. A., W. E. Thasler, *et al.* (2001). High density culturing of porcine hepatocytes immobilized on nonwoven polyurethane-based biomatrices. *Cells Tissues Organs* 168(3): 170-177.
- Paradis, K., G. Langford, *et al.* (1999). Search for Cross-Species Transmission of Porcine Endogenous Retrovirus in Patients Treated with Living Pig Tissue. *Science* 285(5431): 1236-1241.
- Park, J.-k. and D.-h. Lee (2005). Bioartificial liver systems: current status and future perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99(4): 311-319.
- Patience, C., G. S. Patton, *et al.* (1998). No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* 352(9129): 699-701.
- Patience, C., Y. Takeuchi, *et al.* (1997). Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 3(3): 282-286.
- Peszynski, P., S. Klammt, *et al.* (2002). Albumin dialysis: single pass vs. recirculation (MARS). *Liver* 22 Suppl 2: 40-42.
- Pitkin, Z. and C. Mullon (1999). Evidence of absence of porcine endogenous retrovirus (PERV) infection in patients treated with a bioartificial liver support system. *Artif Organs* 23(9): 829-833.
- Plevris, J. N., M. Schina, *et al.* (1998). Review article: the management of acute liver failure. *Aliment Pharmacol Ther* 12(5): 405-418.
- Quek, C. H., J. Li, *et al.* (2004). Photo-crosslinkable microcapsules formed by polyelectrolyte copolymer and modified collagen for rat hepatocyte encapsulation. *Biomaterials* 25(17): 3531-3540.
- Rozga, J. (2006). Liver support technology - an update. *Xenotransplantation* 13(5): 380-389.
- Rozga, J., M. D. Holzman, *et al.* (1993). Development of a hybrid bioartificial liver. *Ann Surg* 217(5): 502-509; discussion 509-511.

- Saad, B., H. Schawaldner, *et al.* (1993). Crude liver membrane fractions as substrate preserve liver-specific functions in long-term, serum-free rat hepatocyte cultures. *In Vitro Cell Dev Biol* 29A(1): 32-40.
- Sakai, Y., K. Naruse, *et al.* (1996). Large-scale preparation and function of porcine hepatocyte spheroids. *Int J Artif Organs* 19(5): 294-301.
- Samuel, D., P. Ichaï, *et al.* (2002). Neurological improvement during bioartificial liver sessions in patients with acute liver failure awaiting transplantation. *Transplantation* 73(2): 257-264.
- Sass, D. A. and A. O. Shakil (2003). Fulminant hepatic failure. *Gastroenterology Clinics of North America* 32(4): 1195-1211.
- Sauer, I. M., D. Kardassis, *et al.* (2003). Clinical extracorporeal hybrid liver support - phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation* 10(5): 460-469.
- Schuetz, E. G., D. Li, *et al.* (1988). Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *J Cell Physiol* 134(3): 309-323.
- Sell, S. (2001). The role of progenitor cells in repair of liver injury and in liver transplantation. *Wound Repair Regen* 9(6): 467-482.
- Semino, C. E., J. R. Merok, *et al.* (2003). Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation* 71(4-5): 262-270.
- Sen, S. and R. Williams (2003). New liver support devices in acute liver failure: a critical evaluation. *Semin Liver Dis* 23(3): 283-294.
- Seo, S. J., T. Akaike, *et al.* (2005). Alginate microcapsules prepared with xyloglucan as a synthetic extracellular matrix for hepatocyte attachment. *Biomaterials* 26(17): 3607-3615.
- Serandour, A. L., P. Loyer, *et al.* (2005). TNF α -mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology* 41(3): 478-486.
- Shan, J., Schwartz, R. E., Ross, N. T., Logan, D. J., Thomas, D., Duncan, S., Bhatia, S. N. (2013). Identification of small molecules for human hepatocyte expansion and iPS differentiation. *Nature Chemical Biology*, 9(8), 514–20.
- Sielaff, T. D., S. L. Nyberg, *et al.* (1997). Characterization of the three-compartment gel-entrapment porcine hepatocyte bioartificial liver. *Cell Biol Toxicol* 13(4-5): 357-364.
- Stange, J. and S. Mitzner (1996). Hepatocyte encapsulation--initial intentions and new aspects for its use in bioartificial liver support. *Int J Artif Organs* 19(1): 45-48.
- Stockmann, H. B. and I. J. JN (2002). Prospects for the temporary treatment of acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14(2): 195-203.
- Strain, A. J. and J. M. Neuberger (2002). A bioartificial liver--state of the art. *Science* 295(5557): 1005-1009.
- Suh, K. S., H. Lilja, *et al.* (1999). Bioartificial liver treatment in rats with fulminant hepatic failure: effect on DNA-binding activity of liver-enriched and growth-associated transcription factors. *J Surg Res* 85(2): 243-250.

- Sussman, N. L., M. G. Chong, *et al.* (1992). Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* 16(1): 60-65.
- Suzuki, A., A. Iwama, *et al.* (2003). Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 130(11): 2513-2524.
- Tong, J. Z., S. Sarrazin, *et al.* (1994). Application of spheroid culture to human hepatocytes and maintenance of their differentiation. *Biology of the Cell* 81(1): 77-81.
- van de Kerkhove, M. P., E. Di Florio, *et al.* (2002). Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs* 25(10): 950-959.
- van de Kerkhove, M. P., M. R. Germans, *et al.* (2005). Evidence for Galalpha(1-3)Gal expression on primary porcine hepatocytes: implications for bioartificial liver systems. *J Hepatol* 42(4): 541-547.
- van de Kerkhove, M. P., R. Hoekstra, *et al.* (2004). Clinical application of bioartificial liver support systems. *Ann Surg* 240(2): 216-230.
- Walid, H., T. Annika, *et al.* (1998). No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *The Lancet* 352(9129): 695-698.
- Washizu, J., F. Berthiaume, *et al.* (2000). Optimization of rat hepatocyte culture in citrated human plasma. *J Surg Res* 93(2): 237-246.
- Wilson, C. A., S. Wong, *et al.* (1998). Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol* 72(4): 3082-3087.
- Wolfe, S. P., E. Hsu, *et al.* (2002). A novel multi-coaxial hollow fiber bioreactor for adherent cell types. Part 1: hydrodynamic studies. *Biotechnol Bioeng* 77(1): 83-90.
- Xu, X., Liu, X., Ling, Q., Wei, Q., Liu, Z., Xu, X., Li, L. (2013). Artificial Liver Support System Combined with Liver Transplantation in the Treatment of Patients with Acute-on-Chronic Liver Failure. *PLoS ONE*, 8(3).
- Xue, Y. L., S. F. Zhao, *et al.* (1999). Effects of a bioartificial liver support system on acetaminophen induced acute liver failure canines. *World J Gastroenterol* 5(4): 308-311.
- Xue, Y. L., S. F. Zhao, *et al.* (2001). TECA hybrid artificial liver support system in treatment of acute liver failure. *World J Gastroenterol* 7(6): 826-829.
- Yagi, T., J. A. Hardin, *et al.* (2001). Caspase inhibition reduces apoptotic death of cryopreserved porcine hepatocytes. *Hepatology* 33(6): 1432-1440.
- Yamada, K., M. Kamihira, *et al.* (2001). Self-organization of liver constitutive cells mediated by artificial matrix and improvement of liver functions in long-term culture. *Biochemical Engineering Journal* 8(2): 135-143.
- Yarmush, M. L., J. C. Dunn, *et al.* (1992). Assessment of artificial liver support technology. *Cell Transplant* 1(5): 323-341.
- Yoon, J. H., H. V. Lee, *et al.* (1999). Development of a non-transformed human liver cell line with differentiated-hepatocyte and urea-synthetic functions: applicable for bioartificial liver. *Int J Artif Organs* 22(11): 769-777.

Zheng, Z., Li, X., Li, Z., & Ma, X. (2013). Artificial and bioartificial liver support systems for acute and acute-on-chronic hepatic failure: A meta-analysis and meta-regression. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6(4), 929–936.

2 OBJETIVO

El objetivo de este plan de tesis consistió en la obtención y estudio de las propiedades difusivas de un nuevo material filtrante para su utilización como soporte sintético de un hígado bioartificial extracorpóreo de manera de controlar el intercambio de sustancias entre la sangre y las células.

Este objetivo se enmarca en un desafío que enfrentan diversos grupos de investigación a nivel mundial: lograr una terapia puente para la espera del trasplante hepático (además de otras posibles aplicaciones relacionadas). Este desafío sigue vigente, porque el hígado tiene una bioquímica tan compleja, que el estado actual de la ciencia no conoce todas sus funciones, y de las que se conocen, muchas no fueron dilucidadas aún. La función hepática es esencial para la remoción de una gran cantidad de toxinas del torrente sanguíneo, y que una falla hepática aguda puede ser letal en unas pocas horas. El hígado además produce cientos de proteínas, cuyo rol en el organismo es poco conocido. En este escenario, intentar imitar una estructura que no se conoce es un desafío titánico, pero por su relevancia vale el esfuerzo realizar el intento.

3 DISEÑO, PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MEMBRANA DIFUSIVA

3.1 REACTOR DE MEMBRANAS

Es conocido que los tejidos provenientes de mamíferos se encuentran entre los más complejos de cultivar *in vitro* en un reactor. Esto es debido a sus requerimientos nutricionales, la sensibilidad a los desechos nitrogenados y su fragilidad frente a las fuerzas de corte (Strathmann & Gohl, 1990).

Como fue descrito en el Capítulo 1, los sistemas bio-híbridos compuestos por una estructura de soporte o contención artificial conteniendo células funcionales son estudiados en diferentes centros de investigación.

Ya sea en sistemas donde las células crecen adheridas a una membrana para lograr una asimetría espacial, o bien en micro tejidos en suspensión, los reactores deben permitir el desarrollo normal de un cultivo celular. Esto incluye la inoculación y cosecha de células, recambio de medio de cultivo y adecuada oxigenación, así como el control de pH y temperatura. En lo posible un biorreactor debe facilitar el control automático para obtener un procedimiento reproducible que pueda cumplir con las Buenas Prácticas de Manufactura (BMP) (Naughton, 2002; Ratcliffe & Niklason, 2002).

En particular, los sistemas que consisten en células crecidas sobre una estructura de fibra hueca pueden lograr un aislamiento inmunológico efectivo junto a una gran área de contacto con el medio de cultivo (Rozga, Williams, *et al.*, 1993; Sardonini & Dibiasio, 1992; Zielinski & Lysaght, 2000) (Colton, 1995; Funatsu & Nakazawa, 2002; Rozga, Holzman, *et al.*, 1993). Es por esto que los sistemas basados en fibra hueca tienen una característica importante: combinan el cultivo celular con alta densidad de células y una transferencia de materia efectiva entre estas y el medio externo.

3.1.1 Tipo de membrana: material y porosidad

Más allá del diseño de un biorreactor, diferentes sistemas de membranas poliméricas se aplican extensivamente en medicina. La mayor parte del mercado de membranas está focalizado en

hemodiálisis, liberación controlada de drogas, otros órganos artificiales (oxigenadores, páncreas) e ingeniería de tejidos.

Estas membranas deben poseer características de biocompatibilidad relacionadas con su funcionalidad: tamaño, forma, porosidad y hemocompatibilidad (minimizando la coagulación, la adhesión de plaquetas, la absorción de proteínas y la hemólisis) (Strathmann & Gohl, 1990). La estructura de la membrana es relevante para la purificación extracorpórea de sangre y debe cumplir ciertas características generales, al igual que todo dispositivo que esté en contacto con la sangre. Estas características involucran un determinado tamaño de poro, una distribución de tamaño de poro estrecha, alta porosidad, tortuosidad baja, alto coeficiente de difusión de solutos, superficie hidrofílica y lisa, y estructura asimétrica (An & Hubbell, 2000; J. L. Hill-West *et al.*, 1994; Hill-West, Chowdhury, Slepian, & Hubbell, 1994).

En cuanto a la elección de los materiales para fabricar membranas sintéticas, estos son los más utilizados:

- Copolímeros hidrofílicos o hidrofílicos (polietilenvinil alcohol, polimetilmetacrilato o poliacrilonitrilo modificado)
- Mezclas hidrofílicas elaboradas a partir de tío-polímeros (polisulfona o poliaril éter sulfona) con polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona (PVP) (Peppas, Keys, Torres-Lugo, & Lowman, 1999) o poliamidas alifáticas/aromáticas.

La polisulfona (PS) y sus derivados (como por ejemplo la polietersulfona, PES) son polímeros amorfos ampliamente utilizados para en desarrollos de membranas de aplicación en medicina, fácilmente asequibles en el mercado por la diversidad de aplicaciones y consumo masivo (representan un 60 % de las membranas de diálisis).

La PS consiste en una secuencia repetida de anillos bencénicos que le otorga al material rigidez, resistencia a esfuerzo de tracción, compresión, estrés térmico, y estabilidad estructural (Figura 10).

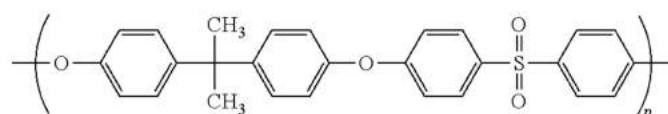


Figura 10: Estructura química de la PS.

Este polímero es muy hidrofóbico, para mejorar la hidrofiliidad se realizan diferentes tratamientos, como por ejemplo la unión química de motivos hidrofílicos al esqueleto polimérico, o la mezcla física con un polímero hidrofílico (como por ejemplo PVP).

Las membranas de PS disponibles en el mercado difieren notablemente en el espesor, densidad, porosidad, forma y distribución del tamaño de poro. Estas diferencias son consecuencia del método de fabricación e influyen directamente en la capacidad de separación y adsorción inespecífica de proteínas, por lo que debe caracterizarse cada una de ellas.

3.1.1.1 Porosidad y diámetro de poro

Los solutos disueltos en una solución permearán a través de una membrana dependiendo del tamaño y número de poros. Aquellos solutos de mayor tamaño que los poros son rechazados. La terminología general de los poros en relación a su tamaño y aplicaciones principales están resumidos en el siguiente cuadro (Perry & Green, 2007) (Koros, Ma, & Shimidzu, 1996) (Tabla 4):

Tabla 4: Clasificación de poros según tamaño

Poros	Diámetro (nm)	Aplicaciones principales
macroporo	>50	UF, MF y filtración
mesoporo	2 a 50	UF, NF
microporo	<2	NF
super microporo	0,7 a 2	RO, NF
ultramicroporo	<0,7	RO, GS, diálisis
ultraporo	<0,35	RO, GS, diálisis

UF: ultrafiltración, MF: microfiltración, NF: nanofiltración, RO: osmosis inversa (o reversa), GS: separación de gases o vapor

El tamaño del poro puede ser analizado por diferentes técnicas como el análisis de punto de burbuja, porosimetría (gas-líquido para microfiltración o líquido-líquido para ultrafiltración) o microscopía óptica y/o electrónica. Sin embargo, la medida del tamaño de poro no es absoluta, ya que los poros de la membrana están interconectados (formando una red tridimensional) y no son cilíndricos (con excepción de las membranas *track-etched*).

En el caso de dispositivos extracorpóreos para reemplazo hepático, se han utilizado membranas de PS de diferente tamaño de poro, pero siempre dentro de lo que se denomina UF. Los filtros de los sistemas MARS® y SPAD® utilizan la misma membrana con un corte de PM (en inglés

molecular weight cut-off, MWCO) de 50 kDa, no permitiendo el pasaje de la albúmina. Por el contrario, el sistema *Prometheus* emplea una membrana de PS específicamente permeable a la albúmina (MWCO de 250 kDa).

Las membranas de UF tienen normalmente una porosidad superficial de 1 al 5 %. Como resultado, bajo condiciones difusivas (sin aplicar presión transmembrana), los solutos tienen un área para difundir muy limitada, por lo que es necesaria una mayor cantidad de membrana para el mismo volumen de reactor. Además se observó una tendencia a adsorber proteínas, y una baja biocompatibilidad (Colton, 1995). Adicionalmente estas membranas, por el método de fabricación, tienen una gran dispersión de diámetro de poro, lo que hace que la selectividad sea relativamente baja si sus PM son similares. Desde el punto de vista práctico se considera que una membrana de UF puede separar de manera eficiente dos proteínas que tengan una diferencia de PM de aproximadamente 3 a 5 veces en su PM.

Dai y Barbari (Dai & Barbari, 2000b) observaron que en membranas de MF la adsorción de proteínas era mínima en relación a la proteína que difundía a través de la membrana. Esto es consistente con la menor área de específica disponible respecto de una membrana de UF. También los procesos difusivos serán más rápidos.

Como se mencionó en el Capítulo 1, para un diseño óptimo de un biorreactor de membrana, ésta debe ser permeable a sustancias esenciales para la viabilidad celular como glucosa y oxígeno. Adicionalmente debe permitir la difusión de proteínas terapéuticas (y otras sustancias) secretadas por las células, pero debe ser además barrera para los componentes del sistema inmunológico del hospedador, como las inmunoglobulinas, proteínas del complemento y células inmunológicas. Si bien hubo muchos intentos para optimizar el transporte de membranas de UF para inmunoaislamiento en base a regular el MWCO, en este trabajo se plantea otra alternativa.

3.2 DISEÑO DE UNA NUEVA MEMBRANA

Con el objetivo de lograr una nueva membrana de alta permeabilidad, pero mayor selectividad, surgió la idea de utilizar una membrana de MF, con poros de diámetro cercano al micrón y rellenar los mismos con un hidrogel con el propósito de aumentar la hidrofiliidad y controlar más adecuadamente la selectividad en el pasaje de diferentes solutos. Como además se requiere el pasaje bi-direccional, se consideró adecuado el tipo de transporte difusivo.

El confinamiento de un hidrogel en el interior de los poros de una membrana le aporta al mismo un alto grado de resistencia mecánica, incluso para espesores de hidrogel menores al milímetro. Adicionalmente los hidrogeles han sido usados en medicina por su excelente biocompatibilidad (Karoor *et al.*, 2003).

En una búsqueda bibliográfica sobre el tema se encontraron los siguientes estudios: Ding y Cussler (Ding & Cussler, 1991) desarrollaron fibras huecas con las paredes rellenas de hidrogel para la extracción de solutos y demostraron que la convección (transferencia de solvente) podría ser evitada sin disminución de la transferencia global de materia. Dai y Barbari (Dai & Barbari, 2000) impregnaron las paredes de fibras huecas de éster de celulosa y modificaron el gel para obtener una estructura asimétrica utilizando glutaraldehído. Kapur (Kapur, Charkoudian, & Anderson, 1997) sintetizó geles de poliAAM neutra dentro de poros de membranas de MF (tamaño de poro de 0,5 μm). Ellos midieron el transporte difusivo y convectivo usando soluciones de ribonucleasa A (13,5 kDa) o albúmina sérica bovina (67 kDa) como función de la cantidad de gel en el poro. Además, en relación a su difusión en agua, el gel tuvo cambios insignificantes en la difusión de KCl y glucosa.

La permeabilidad hidráulica de las membranas con gel en los poros (k_h) es principalmente dependiente del gel, particularmente de la fracción de volumen, como también la porosidad de la membrana y la tortuosidad del poro (Kapur, Charkoudian, Kessler, & Anderson, 1996).

3.2.1 Tipos de hidrogeles

Un hidrogel está compuesto de dos componentes: una estructura tridimensional polimérica y agua. La combinación de esos componentes forma un material que muestra buenas propiedades mecánica y fluidez. Otra característica interesante de los hidrogeles es que, por tratarse de un polímero, puede sintetizarse en diversos formatos, como por ejemplo bloques, partículas, membranas, recubrimientos, entre otros.

Los hidrogeles pueden clasificarse en físicos o covalentes. Un *hidrogel físico* consiste en cadenas de polímero que interactúan entre sí mediante enlaces hidrofóbicos, iónicos o de puentes de hidrógeno. Al absorber el solvente, un hidrogel físico se hincha hasta que finalmente se disuelve. Debido a esto, los hidrogeles físicos también son conocidos como “reversibles” (Campoccia *et al.*, 1998). Por el contrario, un *hidrogel covalente* (también conocidos como “permanente” o “químico”) implica uniones covalentes entre sus cadenas, por lo que, al absorber el solvente, el hidrogel se hincha hasta un punto máximo según la tensión de sus cadenas lo permitan. Esta

dilución de sus cadenas es entrópica y el gel no se disuelve. Esta estructura puede hincharse y retener concentraciones de líquido 100 veces (o más) que su peso seco si el solvente es compatible con el componente polimérico. La concentración en el equilibrio es función del grado de entrecruzamiento, la composición química, y el entorno (otros aditivos de la solución, pH, temperatura, etc.).

Los hidrogeles no suelen ser homogéneos, y su falta de homogeneidad está relacionada a la polimerización. Usualmente contienen regiones de baja absorción acuosa debido a un alto grado de entrecruzamiento denominados *clusters*, que se encuentran dispersos dentro de regiones de mayor hinchamiento (Drumheller & Hubbell, 1995). Estas heterogeneidades dependen de la composición del solvente, la concentración de sólidos y la temperatura durante la formación del gel, así como la cinética de entrecruzamiento. Estas heterogeneidades son frecuentes cuando las reacciones de entrecruzamiento son catalizadas por iniciadores químicos, que finalmente originan alrededor de sí mismos los *clusters*.

La cantidad de agua en el hidrogel, es decir, la fracción acuosa y la relación entre el agua unida y el agua libre determinan la absorción (o partición) y difusión de los solutos a través del hidrogel. El entramado de cadenas forma poros donde es difícil de cuantificar factores importantes como el tamaño promedio de los mismos, distribución de tamaño e interconexión entre ellos, y se suelen agrupar estas características en un parámetro único llamado “tortuosidad”.

3.2.2 Preparación de los hidrogeles

En este trabajo se utilizarán polímeros de poliAAm y polimetilmetacrilato poliHEMA. Estos polímeros se obtienen por polimerización radicalaria.

La polimerización vía radicales es una reacción en cadena que consiste en una secuencia de tres pasos: Iniciación, propagación y terminación (Ođian, 2004).

- **Iniciación:** Se generan radicales en el seno de la solución.
- **Propagación:** El radical inicial reacciona con un monómero produciendo un re arreglo de electrones, donde se forma un enlace estable entre ellos y se forma un nuevo radical con la nueva molécula.
- **Terminación:** Se produce con la combinación de dos extremos de cadena activos o con la interacción con otros radicales.

Existen diversas maneras de iniciar la polimerización, como la utilización de iniciadores químicos o foto-iniciadores que se activan utilizando luz visible o ultravioleta (Cruise *et al.*, 1999; Elisseeff *et al.*, 2000; Pathak, Sawhney, & Hubbell, 1992; Suggs & Mikos, 1999).

La iniciación química está limitada por la concentración y pureza de los iniciadores, puede provocar diferencias de temperatura y mayores heterogeneidades en la estructura del polímero. Dado que los monómeros, iniciadores, agentes entrecruzantes, y otros aditivos son tóxicos, estas sustancias no deben estar presentes en el producto final, lo que dificulta el uso biomédico.

3.2.2.1 Polimerización iniciada por radiación ionizante

La radiación ionizante (radiación gamma) genera radicales libres en la solución irradiada por la absorción de energía principalmente por el agua, por efecto fotoeléctrico y/o Compton. La gran cantidad de radicales generados permite una polimerización completa de los monómeros que se potencia por la alta penetración de esta radiación en agua. De esta manera se evita la contaminación con monómeros en el producto final y además no utiliza otros agentes químicos. Por otra parte, considerando aplicaciones biomédicas, es importante considerar que la polimerización y la radio-esterilización ocurren simultáneamente.

Los rayos gamma son una forma de radiación electromagnética producida por el decaimiento del ^{60}Co con energías del rango de MeV. El isótopo ^{60}Co emite una partícula beta con 0,31 MeV de energía por decaimiento beta y se transforma a ^{60}Ni , que tiene una vida media de 5,3 años (Ecuación 1). Éste luego decae a su estado basal a través de la emisión de dos rayos gamma de 1,17 MeV y 1,33 MeV (1,25 MeV de energía promedio) (Ecuación 2).



Al ionizar la solución se generan diferente tipo de radicales por la radiólisis del agua que activarán a los monómeros y polímeros formados, que luego se recombinarán formando uniones covalentes entre las cadenas de polímero, formando una fracción insoluble. Esta recombinación puede ocurrir entre cadenas poliméricas adyacentes (entrecruzamiento inter-molecular) que aumenta el PM, o dentro de la misma cadena polimérica (entrecruzamiento intra-molecular) que mantiene el PM reduciendo su radio de giro o expansión en el solvente.

Si la concentración de polímero formado es alta y la velocidad de dosis (Gy s^{-1}) es relativamente baja, el número de radicales generados en una cadena de polímero es mucho menor a uno. Esto causa que se formen más probablemente uniones inter-moleculares (entre cadenas adyacentes) que uniones intra-moleculares. En el caso de la formación de hidrogeles, la red tridimensional se desarrolla aumentando sostenidamente su PM (Rosiak, Olejniczak, & Charlesby, 1988). En la Figura 11 se muestran dos condiciones diferentes de cantidad de radicales por molécula de polímero. En el primer caso se forman macrogeles (comúnmente denominados hidrogeles) y en el segundo caso se generan nanogeles.

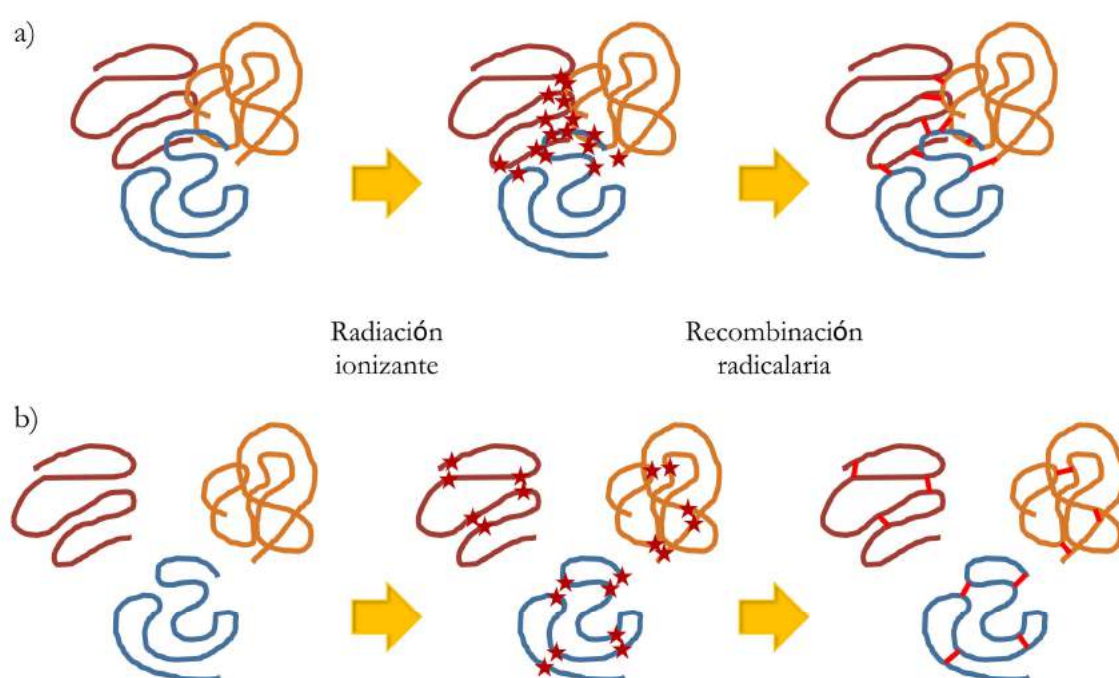


Figura 11: Esquema de reacción de entrecruzamiento: inter-molecular (a), intra-molecular (b).

Como fue descrito, el proceso de polimerización iniciado por radiación ionizante produce entrecruzamiento, sin embargo, es habitual usar un monómero bifuncional para aumentar la eficiencia de este proceso.

La cantidad de agua absorbida depende del grado de entrecruzamiento de las cadenas, cuanto mayor es el grado de entrecruzamiento, menor es la cantidad de agua absorbida. Debido a que la polimerización con radiación gamma no requiere de catalizadores químicos, no existirá una contaminación con estos productos, y tanto la hidrofiliidad como la porosidad pueden ser controladas de manera independiente de la temperatura (Nguyen & West, 2002).

Es importante destacar que el oxígeno presente en la solución debe ser removido ya que genera reacciones indeseables (provoca la escisión de cadenas por la formación de radicales peróxido). Si la dosis de irradiación es muy alta, en lugar del entrecruzamiento se provoca la escisión del enlace C-C, obteniéndose como consecuencia una disminución del PM del polímero.

3.2.3 Caracterización por espectroscopía infrarroja

La presencia de diferentes grupos funcionales afecta directamente la hidrofiliidad del hidrogel, y por lo tanto su capacidad de hinchamiento, por lo que es esencial caracterizar al hidrogel desde el punto de vista químico, comprobando su formación dentro de la membrana.

La espectroscopia infrarroja es aplicable a grupos funcionales, en particular aquellos cuya vibración provoque un cambio en el momento dipolar de la molécula, absorbiendo más energía cuanto mayor sea la variación del momento bipolar durante la vibración. Es por ello que los enlaces C=O, O-H, N-H generan bandas de absorción intensas, mientras que los alquinos simétricos no son observables.

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) es uno de los métodos más útiles para la investigación de la estructura de polímeros y el análisis de los grupos funcionales, porque permite tanto el análisis cualitativo como cuantitativo.

Es habitual combinar FT-IR con la técnica de reflexión total atenuada (en inglés *Attenuated Total Reflectance*, ATR) que permite analizar muestras opacas (Pihlajamäki, Väisänen *et al.* 1998, Belfer, Fainchtein *et al.* 2000, Bottino, Capannelli *et al.* 2001). Con FT-IR ATR puede obtenerse información de la estructura química de una muestra hasta de un espesor de entre 1 μm hasta 10 μm , por ello es el método indicado para estudiar superficies de materiales rugosos y porosos.

En la técnica de ATR la muestra se coloca sobre un cristal transparente a la radiación IR y con un índice refractivo alto. La radiación IR se focaliza en uno de los extremos del cristal, y entonces el haz se refleja varias veces dentro del cristal antes de llegar al detector. El haz penetra ligeramente en la muestra en íntimo contacto con el cristal en cada reflexión. Las muestras se analizan en seco para evitar la interferencia de la absorción IR de los OH del agua (Holmbom and Stenius, 2000). La penetración de la radiación IR en la muestra puede ser controlada cambiando el ángulo de incidencia, utilizando cristales con diferente índice refractivo.

Mediante la interpretación de los espectros de FT-IR, por comparación directa de los mismos y/o extrapolación a estudios de moléculas simples, se puede establecer la presencia / ausencia de ciertos grupos funcionales en el material a estudiar. La asignación de las bandas características de los polímeros se realiza de acuerdo con la bibliografía, así como con tablas de asignación.

3.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MEMBRANAS

La morfología y la estructura química son características importantes de las membranas, afectando su performance y estabilidad. El objetivo de este ensayo fue confirmar la presencia del polímero hidrofílico que genera el hidrogel en la membrana de manera homogénea.

3.3.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido (SEM) es un tipo de microscopia que utiliza un haz de electrones que barre la superficie de la muestra. Esto causa varios tipos de interacciones generando diferentes señales, donde los electrones secundarios y los electrones retrodispersados son utilizados para formar la imagen (Goldstein *et al.*, 2003).

Esta técnica permite caracterizar la morfología de la membrana, como la geometría, tamaño y distribución de tamaño de los poros y porosidad superficial (Schossig-Tiedemann & Paul, 2001). Gracias a su gran profundidad de campo y la resolución lateral (10-50 nm) es posible obtener imágenes de las membranas de MF con una gran resolución (Chahboun *et al.*, 1992, Goldstein *et al.*, 2003).

Debe considerarse que para el SEM convencional funciona en vacío. Esto implica que la muestra debe ser deshidratada, lo que puede afectar la estructura del poro (Bowen, Hilal *et al.* 1996); (Fritzsche *et al.*, 1992). Por otra parte, los polímeros son generalmente aislantes, por lo que debe ser recubiertos con una capa conductora (carbón, oro, platino o paladio) para eliminar la carga superficial y minimizar el daño de la muestra con el haz de electrones (Charcosset & Bernengo, 2000); Fritzsche *et al.*, 1992; (Mulder, 1996) Schossig-Tiedemann and Paul, 2001).

3.4 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

Las membranas tienen como principal función regular el pasaje de moléculas a través de su estructura. Es por ello que la caracterización funcional involucra el estudio de la permeabilidad hidráulica y la permeabilidad de solutos.

3.4.1 Permeabilidad hidráulica

En cuanto al análisis estructural del gel, la medida de la permeabilidad hidráulica (k_h) es un parámetro experimental valioso dado que depende de la microestructura del gel, y por lo tanto su determinación nos dará información de la misma. Adicionalmente, $\sqrt{k_h}$ es una medida del espacio promedio entre las cadenas del polímero que componen el hidrogel. Por otra parte,

determinar el k_h , junto con los coeficientes de permeabilidad a solutos, nos permite modelar el transporte molecular a través del gel (Tong and Anderson 1996).

En 1856, Darcy observó que el caudal de agua que fluye a través de un lecho poroso de espesor L podría estar relacionado con el gradiente presión ΔP por la simple expresión:

$$k_h = \frac{v \times \mu \times L}{\Delta P} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde k_h es la permeabilidad hidráulica de la membrana, v es la velocidad lineal del fluido a través de la membrana, entendida como el caudal del agua que pasa a través de la membrana (Q) dividido por el área de la membrana, μ es la viscosidad, L es el espesor de la membrana, y ΔP es la diferencia de presión a ambos lados de la membrana. La k_h depende de la estructura de la membrana y no del fluido, siendo k_h^{-1} la resistencia de la membrana (R_m).

3.4.1.1 Permeabilidad de un gel y membranas conteniendo a un gel

Para permitir la comparación con otras membranas de diferente composición, o bien con el hidrogel libre, debe considerarse que k_h es función de la permeabilidad hidráulica del hidrogel propiamente dicho ($k_{h,gel}$), y de la estructura de los poros de la membrana. Esta relación se describe con la fórmula:

$$k_h = k_{h,gel}(\varepsilon/\tau) \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde ε es la porosidad de la membrana (volumen total de poro / volumen total de membrana) y τ es la tortuosidad.

3.4.1.2 Cálculo de la tortuosidad (τ)

La tortuosidad se define como el cociente entre la distancia mínima entre un punto y otro y la distancia efectiva que recorre el soluto que difunde entre los puntos mencionados.

La τ puede determinarse a partir de la permeabilidad utilizando un modelo que considera poros cilíndricos, determinada por la ecuación de Hagen-Poiseuille:

$$J_w = \frac{\varepsilon r_{poro}^2 \Delta P}{8 \mu \tau L} \quad \text{Ecuación 5}$$

A partir de la Ecuación 3 y Ecuación 5 la se puede calcular la tortuosidad:

$$\tau = \frac{\varepsilon r_{\text{poro}}^2}{8k_0 A} \quad \text{Ecuación 6}$$

3.4.1.3 Determinación de la fracción de volumen ocupada por el gel

Debido a que el material consta de la membrana con un hidrogel preparado en los poros, para caracterizar a dicho hidrogel debe considerarse el volumen presente del mismo, definido como la fracción de volumen de membrana ocupada por el hidrogel.

La fracción de volumen de gel se determinó con la siguiente ecuación, a partir de la pesada de la membrana seca antes de la preparación del hidrogel (w_m) y posterior al mismo (w_{m+g}):

$$\phi = \frac{v_p (w_{m+g} - w_m)}{\pi (r_e - r_i)^2 L_f \varepsilon} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde r_e y r_i son los radios externo e interno de la fibra hueca respectivamente, L_f es el largo de la fibra, ε es la porosidad de la membrana (70 %) y v_p el volumen parcial específico del polímero utilizado (poliAAm o poliHEMA). Para los cálculos se considera el volumen específico de la poliAAm y de poliHEMA $0,83 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ y $0,79 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ respectivamente¹⁰.

3.4.1.4 Consideraciones sobre la compresibilidad

Frecuentemente la medición experimental de la permeabilidad hidráulica en geles es difícil de realizar por su compresibilidad; si la estructura del gel se comprime no sólo cambia su espesor si no también la estructura interna. En este trabajo, este problema es notoriamente menor (considerado despreciable) porque se trata de gel incluido en los poros de una matriz polimérica, una matriz que no sólo restringirá su compresibilidad, sino también su hinchamiento, brindándole al hidrogel una estabilidad mecánica única.

Dado que un gel formado por un polímero entrecruzado es un medio elástico, es importante considerar la relajación elástica para hacer las medidas de flujo bajo presión. Scherer (Scherer 1989) modeló el tiempo de compresión de un film elástico que es soportado por un plano sobre la cara opuesta por donde es ejercida la presión. Si se define el tiempo inicial cuando la caída de presión comienza a afectar el film, entonces el tiempo requerido para que el film vuelva a su posición original (τ_e) está dado por la siguiente expresión:

¹⁰ Calculado a partir de la densidad de los polímeros, <http://www.sigmaaldrich.com/>

$$\tau_e = \frac{l^2 \mu}{M_e k_h} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde M_e es el módulo elástico uniaxial en el film. Para geles poliméricos con $\varphi=0,1$; este módulo es del orden de 1 bar y aumenta con $\varphi^{2,3}$ (Sellen 1987). Considerando este valor, en un film de gel de espesor comparable a nuestras membranas ($\approx 0,25$ mm) se obtiene un $\tau_e \approx 625$ s. Por lo tanto, para evitar errores experimentales derivados de la compresibilidad, las determinaciones experimentales se realizaron después de equilibrar el sistema por 20-30 min.

3.4.1.5 Caracterización de la transferencia de materia

La transferencia de materia en una membrana de microfiltración involucra transportes convectivos y difusivos. En el transporte convectivo de solutos, estos se mueven junto con el fluido que los contiene, mientras que en el segundo caso lo harán por un gradiente de concentración.

Considerando el modelo de BAL propuesto, con membranas de MF con los poros rellenos con hidrogel solo deberá presentar un transporte de tipo difusivo. Este tipo de transporte permitiría una mayor selectividad en el transporte de solutos y favorecería el pasaje bidireccional de moléculas.

3.4.1.6 Determinación de las resistencias de la fase fluida a la transferencia de materia

Para realizar la determinación experimental del transporte difusivo, es pertinente visualizar el perfil de concentración de soluto a través de la misma, y para esto, debe considerarse que este pasaje tiene no sólo la resistencia intrínseca de la membrana, sino también las resistencias que ofrecen las fases fluidas de uno y otro lado de la misma.

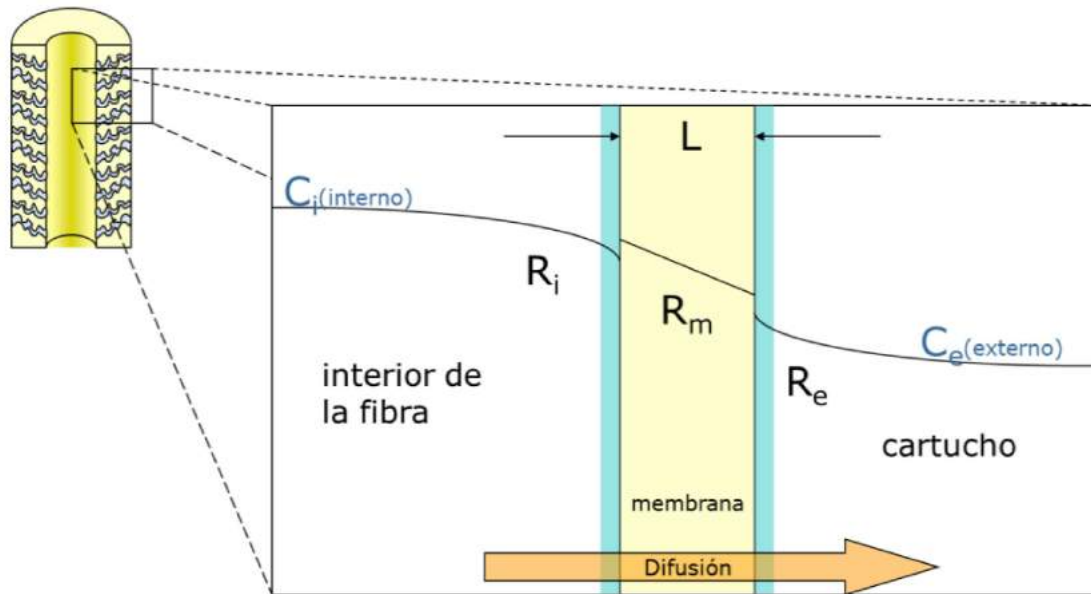


Figura 12: Modelo de difusión en membrana

En la Figura 12 se representa un corte transversal de la membrana, junto al perfil de concentración de soluto y la dirección de la transferencia de materia por difusión.

Donde C_i es la concentración de soluto en el interior de la fibra (solución que recircula desde el reservorio), C_e es la concentración de soluto en el vaso receptor, L es el espesor de la membrana, R_i y R_e son las resistencias de la fase acuosa del lado interno y externo de la membrana respectivamente. R_m es la resistencia de la membrana propiamente dicha.

En este modelo se asume un sistema de resistencias en serie y el coeficiente de permeabilidad P de cada soluto se calcula realizando las siguientes correcciones:

$$\frac{1}{k} = \frac{L}{P} + \frac{1}{k_e} + \frac{1}{k_i} = R_m + R_e + R_i \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde k_e y k_i representan los coeficientes de transferencia de materia en el exterior y en el lumen de la membrana respectivamente. L representa el espesor de la membrana y k es el coeficiente de transferencia total determinada experimentalmente, por lo que k^{-1} es la resistencia total. R refiere a cada resistencia en particular.

La resistencia a la transferencia de materia de la fase fluida se calcula normalmente por analogía con la transferencia de calor, donde la resistencia de la fase fluida es la recíproca del coeficiente de transferencia de materia, k , que puede ser determinado a partir de correlaciones del número

de Sherwood. Este número adimensional representa el cociente entre la transferencia de materia por convección y difusión.

$$Sh = \frac{k d_{ef}}{D_0} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde d_{ef} es el diámetro efectivo de la fibra hueca (calculado como 4 veces el área trasversal dividido el perímetro) y D_0 es el coeficiente de difusión para el soluto en el fluido.

3.4.1.7 Propiedades de transporte de las membranas modificadas

Por las características del fluido a ambos lados de la membrana, el análisis de transporte puede considerarse similar a la difusión entre dos compartimentos agitados con mezclado perfecto. En el caso de solutos con alta permeabilidad, el modelo a aplicar es el *pseudo-estado estacionario*, donde en la medida que el soluto difunde a través de la membrana, disminuye su concentración en el vaso reservorio. Debido a la acumulación del metabolito en el vaso receptor y a que el transporte es meramente difusivo, se observa una disminución en la velocidad de transferencia en el tiempo como consecuencia de la disminución de la diferencia de concentración de soluto entre ambos recipientes. Cada recipiente corresponde a una de las dos caras de la membrana.

La permeabilidad en estos casos se determina a partir del coeficiente global de transferencia de materia determinado por:

$$\ln \left(\frac{C_e(t) - C_i(t)}{C_e(0) - C_i(0)} \right) = -Ak \left(\frac{1}{V_e} + \frac{1}{V_i} \right) \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde V_e y V_i son los volúmenes de los vasos receptor y reservorio, respectivamente. A es el área transversal de la membrana, $C_e(t)$ y $C_i(t)$ son las concentraciones de soluto en el vaso receptor y reservorio a tiempo t , $C_e(0)$ y $C_i(0)$ son las concentraciones de soluto iniciales en los vasos receptor y reservorio respectivamente.

En el caso de solutos con permeabilidades bajas, donde la concentración de soluto del reservorio permanece constante en relación a una concentración extremadamente baja en el receptor, se puede aplicar un análisis de estado estacionario. Este fue el caso para los solutos ensayados, donde k es calculada a partir de la ecuación de *time-lag* descripta por Crank (Crank 1956):

$$M_t = \frac{APC_i \left(t - \left(L^2 / 6D_m \right) \right)}{L} \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde M_t es la masa total de soluto que difunde a través de la membrana en un tiempo t , P es la permeabilidad de la membrana para un soluto, C_i es la concentración del vaso dador que se considera constante y D_m es el coeficiente de difusión del soluto en la membrana.

Se utilizó como método estadístico para el análisis de los datos el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (correspondientes al tipo y concentración de gel). La normalidad de las subpoblaciones se comprobó con el método de Shapiro-Wilks. En este caso hay evidencias para aceptar el supuesto de distribución normal ($p > 0.05$).

3.4.2 Determinación experimental de la permeabilidad de macromoléculas

Dado que la finalidad del diseño propuesto es su utilización con plasma entero, se realizaron una serie de experimentos para determinar la permeabilidad y selectividad de los distintos componentes del plasma humano. Para ello se utilizó como técnica analítica la Electroforesis Capilar.

3.4.2.1 Fundamentos de la Electroforesis Capilar (EC)

En este método separativo, la muestra se introduce en un capilar y los analitos migran a lo largo del mismo por la aplicación de un campo eléctrico. La separación de los analitos depende entonces de una combinación del flujo electro-osmótico y la interacción con la fase estacionaria.

Las propiedades de la separación de la EC tiene características semejantes a la combinación de la electroforesis en gel de poliAAm (PAGE) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La separación por electroforesis se basa en la diferencia de velocidad de solutos en un campo eléctrico. Esta velocidad electroforética v_e se calcula como el cociente entre el tiempo de migración y el largo del capilar hasta el detector (L_d). Esta velocidad depende de la movilidad electroforética (μ_e) y la fuerza del campo eléctrico (E).

$$v_e = \mu_e E = \frac{L_d}{t_m} \quad \text{Ecuación 13}$$

La μ_e depende del buffer, el pH y la temperatura y es proporcional al cociente entre la fuerza eléctrica y la fuerza friccional

$$\mu_e \propto \frac{\text{fuerza eléctrica } (F_E)}{\text{fuerza friccional } (F_F)} \quad \text{Ecuación 14}$$

La fuerza eléctrica está representada en la siguiente ecuación:

$$F_E = qE \quad \text{Ecuación 15}$$

Y para un ion esférico la fuerza friccional está determinada por la ecuación:

$$F_F = -6\pi\eta r v_e \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde:

q: carga iónica

η : viscosidad de la solución

r: radio iónico

v_e : velocidad del ión

En estado estacionario, las fuerzas son iguales y opuestas:

$$qE = 6\pi\eta r v \quad \text{Ecuación 17}$$

Considerando la Ecuación 15:

$$qE = 6\pi\eta r \mu_e E \quad \text{Ecuación 18}$$

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad \text{Ecuación 19}$$

Para el análisis de proteínas se utiliza un pH alcalino de manera tal de que todas las proteínas tengan cargas positivas, y se establece una correlación entre la movilidad electroforética y el cociente masa/carga. Resulta entonces que la movilidad depende de manera inversa con el tamaño del ión (proteína), permitiendo la separación de diferentes macromoléculas del plasma.

3.4.2.2 Identificación de proteínas del plasma sanguíneo

El patrón de proteínas que se observa en una EC de plasma sanguíneo, está dado por las fracciones de los dos principales tipos de proteínas: albúmina y globulinas. La albúmina, el pico más grande más cerca del ánodo (mayor t_m), y las globulinas agrupadas en los grupos alfa 1, alfa 2, beta 1, beta 2 y gamma más cerca del cátodo (menor t_m). La Figura 13 muestra un patrón típico de EC de proteínas de plasma sanguíneo:

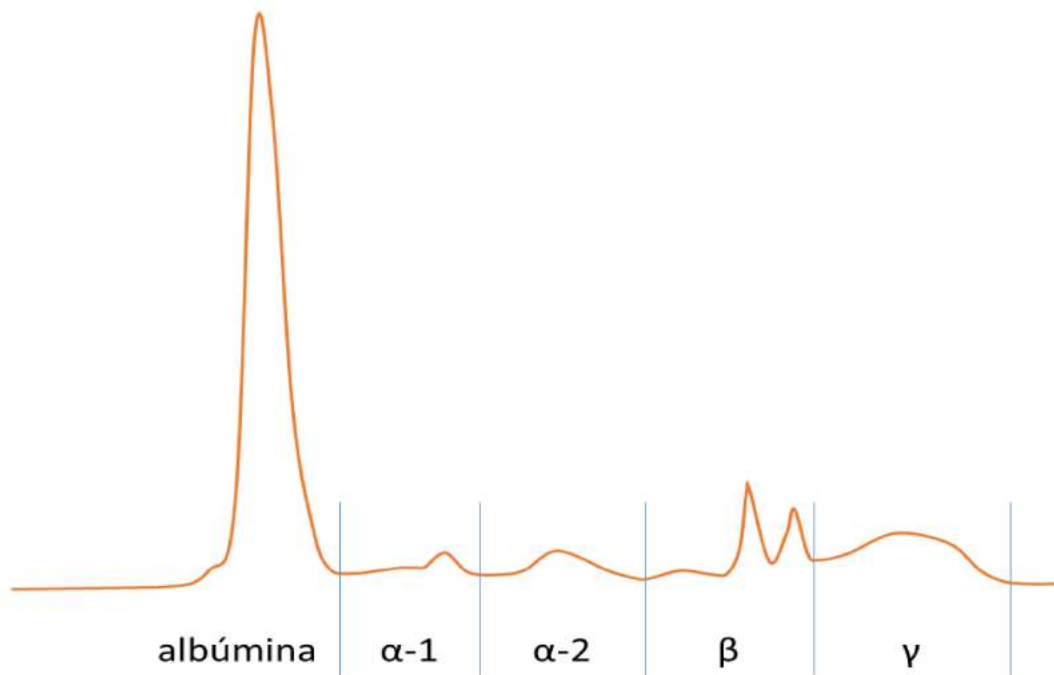


Figura 13: Patrón típico de EC de una muestra de plasma sanguíneo.

Las proteínas que se encuentran en cada fracción son (O'Connell, Horita *et al.* 2005):

- Albúmina: La albúmina representa el pico más alto en la electroforesis de proteínas de suero, usualmente se observa como una única banda de gran intensidad.
- Zona alfa: La fracción alfa-1 incluye la alfa-1 antitripsina, transcortina, y globulina fijadora de tiroxina. Alfa-2 está compuesta por ceruloplasmina, alfa-2 macroglobulina y haptoglobina.
- Zona Beta: La zona Beta consiste en beta-1 y beta-2 pero usualmente se encuentra representada gráficamente por una única banda. Beta-1 consiste mayormente de transferrina. La banda beta-2 está formada principalmente por β -lipoproteína, fibrinógeno y complemento C3. Las inmunoglobulinas IgA, IgM y a veces IgG pueden identificarse en la banda beta también en algunas situaciones.

- Zona Gamma: Las inmunoglobulinas que comprenden principalmente esta banda son IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

3.4.3 Correlación con modelos

La difusión de solutos a través de un hidrogel puede correlacionarse con diferentes modelos. Todos ellos brindan una estimación del retraso que se observa en el movimiento del soluto en el gel, expresado como el cociente entre la difusión en el gel y la difusión libre. Una limitación a la transferencia de materia estará dada por la interacción entre la matriz del gel y las sustancias que difunden rindiendo coeficientes de difusión considerablemente menores. El camino a recorrer por el soluto (*path lenght*) aumenta por las obstrucciones causadas por la estructura del gel, mientras que el volumen disponible para difundir disminuye.

3.4.3.1 Modelo de poros cilíndricos rectos

En los hidrogeles, como en otros medios porosos, donde el diámetro de poro que corresponde al espacio entre las cadenas de polímero, y otras dimensiones de la microestructura son comparables con el tamaño de la macromolécula que difunde, la difusividad tiende a disminuir respecto de la difusión libre.

Un modelo de estudio es asumir que el material poroso consiste en un arreglo de poros geométricos cilíndricos o de otra forma, que permite aplicar la teoría hidrodinámica que extiende la ecuación Stokes-Einstein, donde se consideran los efectos de las paredes de los poros (Deen 1987). Esta teoría, desarrollada principalmente para moléculas esféricas en poros cilíndricos largos y derechos, incluye dos factores que influyen en la difusividad promedio de una molécula neutra en un poro:

1. Un aumento del arrastre hidrodinámico sobre la molécula (y su consecuente reducción en la movilidad) causada por las paredes de los cilindros,
2. Las restricciones estéricas. Los datos de difusión experimentales, determinados en membranas de poros perfectos (*track-etched membranes*), en general concuerdan con este modelo (Deen 1987).

3.4.3.2 Permeabilidad hidráulica en el modelo de poros cilíndricos rectos

La permeabilidad Darcy es expresada en general en función de la fracción de volumen ocupada por las cadenas del polímero:

$$k_h = r_p^2 f(\phi)$$

Ecuación 20

Donde r_p es el radio de las cadenas de polímero y una función $f(\phi)$ que depende de la disposición espacial de las mismas. Muchos modelos están basados en una disposición regular periódica de los cilindros. Sangani (Sangani & Acrivos, 1982) consideró un arreglo regular cuadrado de cilindros, con el flujo orientado perpendicularmente a los ejes de los cilindros, en un ángulo de 45° respecto del alineamiento del arreglo. Ellos resolvieron numéricamente las ecuaciones de Stokes para esta disposición espacial y calcularon la fricción de cada cilindro. Tsay (Tsay and Weinbaum 1991) convirtió el arrastre de cada cilindro en permeabilidad Darcy, y obtuvo la siguiente expresión empírica de los cálculos de Sangani:

$$k_h = 0,0572 \left[\sqrt{\frac{\pi}{\phi}} - 2 \right]^{2,377} r_p^2 \quad \text{Ecuación 21}$$

Drummond (Drummond and Tahir 1984) también resolvió las ecuaciones de Stokes para un flujo que pasa a través de arreglos regulares de cilindros paralelos. Lo expresó en la siguiente ecuación:

$$k_h = \frac{1}{8\phi} [-\ln\phi - 1,476 + 2\phi - 1,771\phi^2 + 4,076\phi^3] r_p^2 \quad \text{Ecuación 22}$$

La diferencia entre ambas expresiones (Ecuación 21 y Ecuación 22) es menor o igual al 6 % para hidrogeles donde el polímero ocupa una fracción de volumen en el rango de $(0,01 < \phi < 0,15)$.

Jackson y James (Jackson and James 1986) revisaron los datos experimentales para el flujo a través de medio fibroso (desde cadenas de polímeros hasta fibra de vidrio) sobre una variación amplia de r_p y hallaron la siguiente expresión, de naturaleza semi-empírica, que ajusta a la mayor parte de los datos:

$$k_h = -\frac{3}{20\phi} [\ln(\phi) + 0,0931] r_p^2 \quad \text{Ecuación 23}$$

3.4.3.3 Permeabilidad a solutos en el modelo de poros cilíndricos rectos

Por mucho tiempo la permeabilidad de una membrana polimérica a un soluto fue descripta por un procesos denominado *modelo partición – difusión* (Baker 2004). El soluto debe disolverse en el

material de la membrana y luego difundir a través de la membrana en dirección decreciente de su gradiente de concentración. La solubilidad (coeficiente de partición) del soluto en la membrana contribuye con el componente termodinámico del equilibrio y la difusión del soluto a través de la membrana con el componente cinético en el proceso de permeación a través de la membrana. En un sistema de membrana con hidrogel, el mecanismo de transporte es levemente diferente ya que una parte importante de la membrana está ocupada por agua.

Hay algunos puntos en común entre la difusión de esferas rígidas en soluciones y geles muy diluidos. El impedimento a la difusión es despreciable, y la difusividad está dada por la ecuación Einstein-Stokes. Cuando el sistema no es tan diluido, pero la macromolécula (el soluto) es más chica que la separación media entre las cadenas de polímero ($r_s < k_h^{1/2}$), los factores hidrodinámicos y estéricos afectan a la difusión de manera similar. Para macromoléculas mayores ($r_s >> k_h^{1/2}$), un gel o una solución de polímero se comportarán de manera diferente.

3.4.3.4 Modelo de Ogston

Ogston (Ogston, 1958) desarrolló un modelo de exclusión de volumen donde se considera la probabilidad de la ubicación de esferas rígidas de radio r_s , para geles modelados como un conjunto de cilindros (cadenas de polímero) colocados de manera aleatoria de radio r_p . Los parámetros para caracterizar son r_s , r_p y la fracción volumen ϕ . Este concepto es la base de muchos de los trabajos teóricos sobre el transporte limitado en geles, que están enfocados principalmente en la partición y la difusión.

Su resultado puede ser expresado como definición del coeficiente de partición (K):

$$K = \exp \left[-\phi \left(1 + \frac{r_s}{r_p} \right)^2 \right] \quad \text{Ecuación 24}$$

Este modelo asume que:

- La interacción soluto- cadenas de polímero es puramente como una esfera rígida
- Las cadenas de polímero son infinitamente largas y están ubicadas de manera aleatoria en la matriz
- La concentración de soluto es muy baja, por lo que la interacción soluto - soluto sería despreciable en ambas fases.

3.4.3.5 Modelo de Brinkman

Un factor no considerado en el modelo de Ogston son las interacciones hidrodinámicas, análogo a aquello observado en los poros, entre las cadenas de polímero del hidrogel y la difusión de macromoléculas.

Phillips (Phillips, Deen *et al.* 1989) abordó este tema usando la dinámica de Stokes y la teoría generalizada de dispersión de Taylor para calcular la difusión macroscópica de una esfera moviéndose en un fluido viscoso a través de un arreglo de fibras paralelas. Se propuso que el coeficiente de difusividad podría estimarse para otros arreglos de fibras si se consideraba el arreglo de fibras como un medio efectivo caracterizado por su parámetro de permeabilidad de Darcy, k_h . Como se mencionó anteriormente, k_h es la permeabilidad intrínseca y $\sqrt{k_h}$ es del orden de magnitud del espaciado entre las fibras. Usando la ecuación de Brinkman (Brinkman 1949) para calcular la fricción de una esfera moviéndose en ese medio, donde D^{gel} y D_0 son la difusión en el gel y en una solución respectivamente, se obtiene:

$$\frac{D^{gel}}{D_0} \approx F\left(\frac{r_s}{\sqrt{k_h}}\right) = \frac{1}{1 + (r_s/\sqrt{k_h}) + \frac{1}{3}(r_s/\sqrt{k_h})^2} \quad \text{Ecuación 25}$$

Brinkman (Brinkman 1949) realizó el cálculo para esferas quietas en un fluido en movimiento, mientras que Kapur (Kapur, Charkoudian *et al.* 1997) lo calculó para el movimiento de una esfera en un fluido estacionario, obteniendo el coeficiente 1/9 en lugar de 1/3 en la Ecuación 25.

Debe destacarse que el modelo de Brinkman no considera algunos factores potencialmente importantes como son el movimiento Browniano de la propia red de gel (Sellen, 1987), los efectos hidrodinámicos por cercanía a la red polimérica sobre la difusividad del soluto y el efecto de obstaculización de la red propiamente dicha, que requiere que el soluto difunda alrededor de la cadena de polímero.

3.4.3.6 Modelo Ogston-Brinkman

El tramado del gel presenta dos barreras para el movimiento aleatorio (coeficiente de difusión) de las moléculas. Por un lado, la red crea una resistencia hidrodinámica a la molécula que difunde que es transmitida a través del solvente viscoso (modelo de Brinkman), y, por otra parte, la red presenta obstáculos (el entramado de las cadenas de polímero que componen el hidrogel) que la molécula debe sortear para difundir (modelo de Ogston).

Combinando la Ecuación 24 y la Ecuación 25 se obtiene una expresión para el coeficiente de difusión efectivo, incorporando la fracción de volumen ocupada por el gel (φ):

$$\frac{D^{gel}}{D_0} = \frac{\exp\left[-\phi\left(1 + \frac{r_s}{r_p}\right)^2\right]}{1 + r_s/\sqrt{k_h} + \frac{1}{9}\left(r_s/\sqrt{k_h}\right)^2} \quad \text{Ecuación 26}$$

Johnson *et al* (Johnson, Berk *et al.* 1995) propusieron una modificación que incluye el efecto de la obstaculización (tortuosidad) del gel en la difusión del soluto, que significa una adecuación de la Ecuación 26 para obtener la siguiente expresión:

$$\frac{D^{gel}}{D_0} = \frac{\exp\left[-0,84\left(\phi\left(1 + \frac{r_s}{r_p}\right)^2\right)^{1,09}\right]}{1 + r_s/\sqrt{k_h} + \frac{1}{9}\left(r_s/\sqrt{k_h}\right)^2} \quad \text{Ecuación 27}$$

Estos modelos serán comparados con los datos experimentales en la sección de resultados.

3.4.4 Transferencia oxígeno

3.4.4.1 Importancia de la transferencia de oxígeno

El oxígeno es uno de los nutrientes celulares más importantes, siendo el principal en todos los ciclos metabólicos aeróbicos. Sin embargo, frecuentemente es el reactivo limitante en el cultivo tisular *in vitro*. Esto se debe a la baja solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo, que dificulta la transferencia del mismo hasta la superficie celular. La solubilidad del oxígeno en un medio de cultivo típico está limitada a 0,2 mM cuando se utiliza el oxígeno atmosférico (es decir, una presión parcial de oxígeno de 0,21 atmósferas) (Glacken, Fleischaker, & Sinskey, 1983). Considerando que por cada mol de glucosa se consumen 6 moles de O₂ la disponibilidad del oxígeno será mucho menor. Como consecuencia, el oxígeno debe ser suministrado continuamente, ya sea directamente en el biorreactor o en un circuito de oxigenación en paralelo.

Desde el punto de vista de la transferencia de materia, la solución más simple sería aumentar la presión parcial de oxígeno, ya sea utilizando oxígeno puro o aumentando la presión total, pero debe considerarse además, que un exceso de oxígeno en el medio circundante a las células, sin un transportador adecuado como es la hemoglobina, induce la presencia de radicales libres, sumamente citotóxicos (Freshney, 2010). Tanto el estrés hipo- e hiperóxico están implicados

en la apoptosis, que parece ser la principal forma de muerte celular de muchas líneas celulares cultivadas (Stefanelli *et al.*, 1995).

3.4.4.2 Oxigenadores de membrana

Los oxigenadores de membrana son utilizados desde hace algunos años. En 1953 Gibbon (Gibbon Jh, 1937) (Gibbon, 1954) llevó a cabo la primera operación a corazón abierto utilizando un oxigenador de membrana. La siguiente generación en aireadores sanguíneos fueron los aireadores por burbujeo. En estos dispositivos el oxígeno se transfiere de manera eficiente reduciendo notablemente el volumen muerto; sin embargo, se forma espuma y favorece la hemólisis y la formación de micro-embolia. En los oxigenadores de membrana y los de burbujeo, se establece un contacto directo entre la fase gaseosa y la sangre. Para mejorar la biocompatibilidad, se colocó una membrana no porosa en la interfase, originando los oxigenadores sanguíneos de membrana. La gran limitación de los primeros oxigenadores de membrana fue la falta de materiales que fueran lo suficientemente permeables a los gases de la respiración. Por otro lado, estos oxigenadores estaban diseñados con poco análisis reológico, por lo que se establecía una película estanca afectando a la transferencia de gases. Los avances en la tecnología de membranas en la década de 1960-1970 introdujeron oxigenadores comerciales basados en membranas de silicona (Bramson *et al.*, 1965).

La alternativa más adecuada en un diseño de biorreactor de membranas es utilizar algunas de ellas para el transporte de oxígeno. Por lo tanto, para poder realizar un diseño adecuado y estimar la cantidad de fibras de oxigenación necesarias, debe determinarse la transferencia de oxígeno a través de las mismas.

3.4.4.3 Medida de la transferencia de oxígeno

Debido a la baja solubilidad del O₂ en agua (7 mg·l⁻¹ a 35°C) y a que las células son capaces de utilizar únicamente el O₂ disuelto, es evidente que éste deberá ser suministrado al medio de cultivo de manera continua. Para lograrlo, es necesario transferir O₂ desde la fase gaseosa (normalmente aire) a la fase líquida (medio de cultivo).

Macroscópicamente, la transferencia de O₂ puede describirse mediante la Ecuación 28:

$$R_{O_2} = k_L a (C^* - C_L) \quad \text{Ecuación 28}$$

Donde R_{O_2} es la velocidad de transferencia de O_2 , $k_{L,a}$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de O_2 , C^* es la concentración de oxígeno disuelto que se encuentra en equilibrio con la presión parcial de O_2 en el seno de la fase gaseosa (Según la ley de Henry, $P_{O_2} = H \cdot C^*$) y C_L es el valor de la concentración de O_2 en el seno del líquido. La diferencia de estos dos últimos términos es la fuerza impulsora de la transferencia. El $k_{L,a}$ es una constante de proporcionalidad que puede tomar diferentes formas dependiendo del modelo que se utilice para explicarla. Si se utiliza el modelo de la película descrito en la Figura 61, se aplica la siguiente ecuación (Ecuación 29):

$$K_L = \frac{D_{O_2}}{L}, a = \frac{A}{V} \text{ y } K_L a = K_L \times a \quad \text{Ecuación 29}$$

Donde D_{O_2} es la difusividad del O_2 en el medio utilizado, L es la longitud de la película estanca de líquido que rodea a la burbuja, A es el área total de transferencia de materia y V es el volumen del medio líquido, por lo que $a=A/V$ es el área específica.

3.4.4.4 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno: $k_{L,a}$.

Para la determinación del $k_{L,a}$ existe una diversidad de métodos. En este trabajo de tesis se consideraron 3 métodos diferentes:

3.4.4.4.1 Método dinámico (Gassing-in)

Este método es relativamente sencillo y no requiere que un cultivo celular o que una reacción química consuma oxígeno. El método consiste en reducir el oxígeno disuelto al mínimo (puede ser por desplazamiento con otro gas, como por ejemplo nitrógeno), para luego proceder a la oxigenación (o aireación) como se ilustra en la Figura 14.

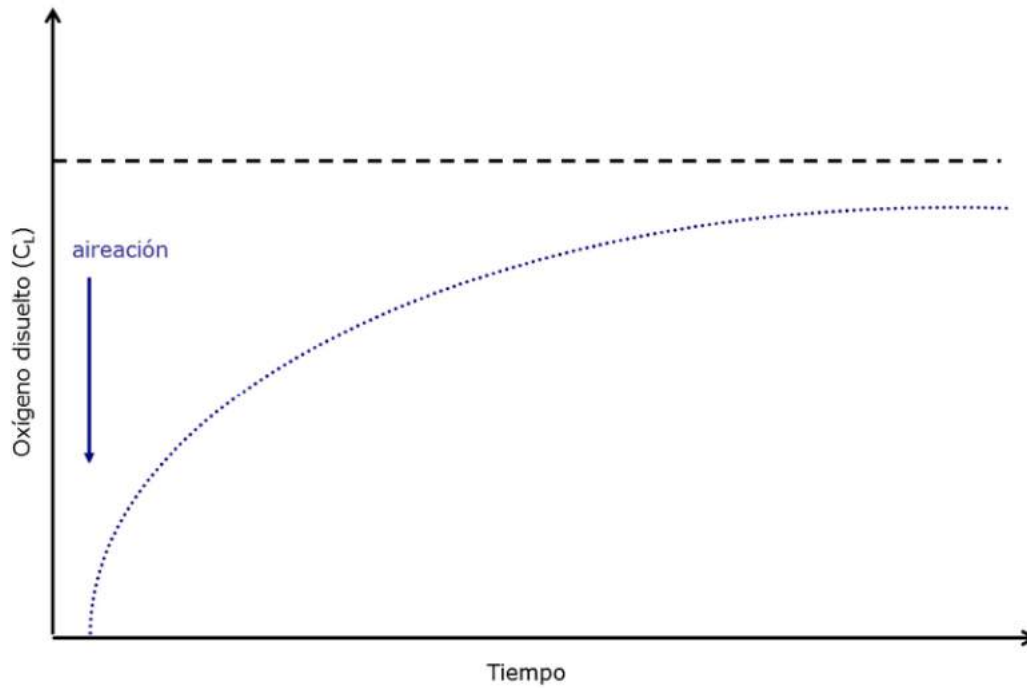


Figura 14: Curva de aireación.

A medida que se oxigena la solución se mide la concentración del oxígeno disuelto en el medio en función del tiempo (Ecuación 30):

$$K_L a = \frac{\ln(C_L - C_{L_0}) / (C_{L_0} - C_t)}{t - t_0} \quad \text{Ecuación 30}$$

La Ecuación 31 se obtiene al integrar la Ecuación 30, asumiendo un C_L uniforme, que la fase gaseosa no cambia, y por lo tanto C^* es constante, y la ausencia de consumo de oxígeno en el sistema. El $k_L a$ se calcula como la pendiente de la ecuación lineal (Ecuación 31).

$$\ln(C^* - C_{L_0}) / (C^* - C_L) = k_L a \times t \quad \text{Ecuación 31}$$

Donde C^* es la concentración saturante de oxígeno disuelto, C_{L_0} es la concentración de oxígeno disuelto inicial a tiempo t_0 . C_L es la concentración de oxígeno disuelto a cualquier tiempo t (Figura 15).

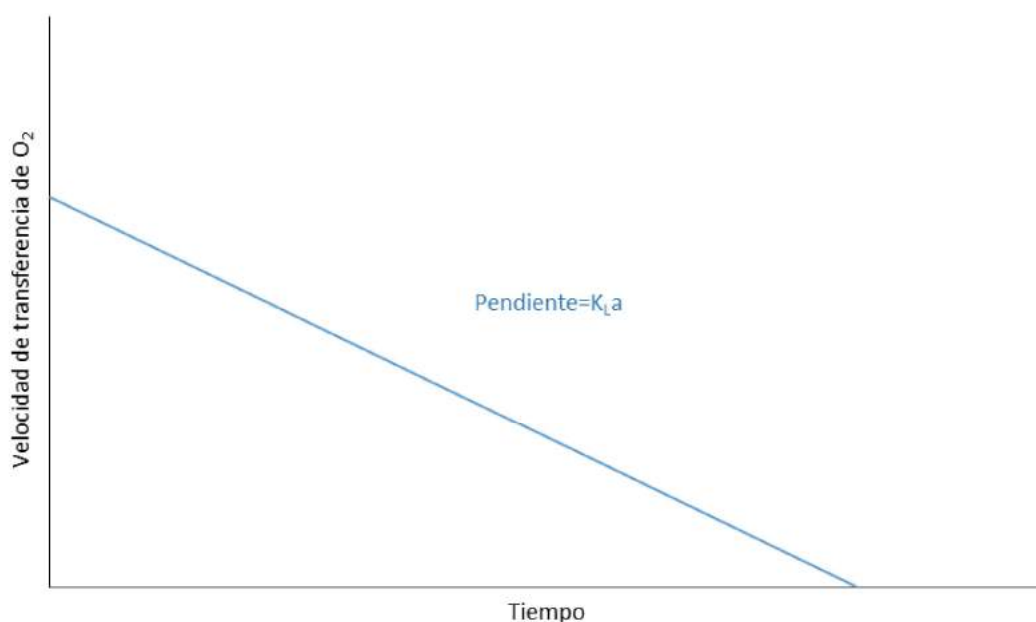


Figura 15: Determinación del k_{La} a partir de la correlación de la Velocidad de transferencia de O_2 en función del tiempo (Ecuación 31).

Para la evaluación correcta del k_{La} por este método debe considerarse el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno.

3.4.4.4.2 Método de oxidación de sulfito

El método de oxidación del sulfito, también conocido como método de Cooper (Cooper, Fernstrom, & Miller, 1944)) se basa en la reacción entre el sulfito de sodio con el O_2 en medio ligeramente alcalino y en presencia de iones Cu^{+2} o Co^{+2} . Utilizando una solución de sulfito en exceso, se mide la transferencia de oxígeno al medio por la oxidación de sulfito a sulfato, ya que el oxígeno disuelto es nulo por ser el reactivo limitante de la reacción. El inconveniente de esta técnica es que se suele sobrestimar al k_{La} porque la alta concentración de sales disminuye la coalescencia del medio. Es por ello que una alternativa es el método de Cooper modificado, en el cual se agrega una solución de concentración conocida de Na_2SO_3 (previamente desoxigenada) a un caudal tal que toda la sal se consume al momento de ingresar al reactor (en este caso, el sulfito es el reactivo limitante). Debido al corto tiempo de residencia y la baja producción de H^+ , no se requiere controlar el pH activamente.

Como la velocidad de ingreso de sulfito es menor a la velocidad de transferencia de O_2 , la concentración de O_2 disuelto es distinta de 0, y puede medirse con un electrodo.

La Ecuación 32 representa a la reacción que ocurre entre sulfito y O₂:



La velocidad de la reacción puede representarse según la Ecuación 33:

$$v = k_{m,n} \times [Na_2SO_3]^m \times [O_2]^n \quad \text{Ecuación 33}$$

Donde k es la constante de velocidad y m y n son coeficientes que deben determinarse experimentalmente y representan al orden de la reacción para sulfito y oxígeno respectivamente.

Para la medida del k_{La} , las condiciones de reacción deberían ser tales que la reacción ocurra en el seno del líquido y no en la interfase gas-líquido. Para ello, el catalizador es utilizado con una concentración de sulfito suficiente para que la velocidad de oxidación sea independiente de la concentración de sulfito. Haciendo una analogía con la cinética de un cultivo continuo, la velocidad de consumo de sulfito está dada por la Ecuación 34:

$$-\frac{d[SO_3^{2-}]}{dt} = D(S_R - \tilde{S}) \quad D = Q/V_L \quad \text{Ecuación 34}$$

Donde:

- D es la velocidad de dilución, la relación entre el caudal de la solución de sulfito (Q) y el volumen líquido del sistema (V_L).
- S_R es la concentración de sulfito en el reservorio de la alimentación
- $\tilde{S}$ Es la concentración de sulfito en la solución cuando llega al estado estacionario

A partir de la Ecuación 31 y Ecuación 34 se determina el k_{La} utilizando la siguiente expresión:

$$k_{La} = \frac{Q[(S_R - \tilde{S}) - 2(C_{LR} - C_L)]}{2V_L(C^* - C_L)} \quad \text{Ecuación 35}$$

Donde:

C_{LR} es la concentración de oxígeno disuelto en el reservorio

C_L es la concentración de oxígeno disuelto en el sistema

C^* es la concentración de oxígeno disuelto saturante, en equilibrio con la presión parcial de oxígeno

3.4.4.4.3 Método de Balance de Materia

Esta técnica consiste en el cálculo del balance molar entre los gases de entrada y salida del sistema. En este procedimiento, se establece un sistema en continuo alimentado con una solución de concentración conocida de Na_2SO_3 . Una vez que se logra el estado estacionario se determina la fracción de oxígeno en la entrada y salida de gases con un analizador de oxígeno paramagnético. La concentración de oxígeno disuelto se determina con un electrodo de oxígeno. Se miden además los caudales de entrada y salida de gases, el volumen del líquido del sistema y la temperatura.

El $k_{L,a}$ se obtiene a partir del siguiente balance de oxígeno (Ecuación 36):

$$R_{O_2} \left(\text{mol/l.h} \right) = \frac{F}{V_L} \times 0,79 \times \frac{T_0}{T} \times \frac{60}{22,4} \times \left[\frac{X_E}{1 - X_E} - \frac{X_S}{1 - X_S} \right] \quad \text{Ecuación 36}$$

Donde F es el caudal de gas, X_E y X_S son las fracciones en masa del oxígeno en la mezcla de gases (E: entrada, S: salida), V_L es el volumen de la solución de sulfito en el sistema.

La Ecuación 36 tiene algunos supuestos que deben considerarse en el procedimiento:

1. Se asume que no hay evaporación (controlando los volúmenes se comprobó que este efecto era despreciable en el tiempo en el que transcurre el experimento).
2. Esta ecuación no considera el oxígeno que ingresa y sale del reactor solubilizado en el líquido. En este procedimiento, con la concentración de sulfito utilizada, el oxígeno disuelto es prácticamente nulo.
3. Requiere medidas precisas del caudal y concentración de gases
4. La fracción de oxígeno en la entrada y la salida debe diferir de manera significativa para obtener una medida de $k_{L,a}$ confiable

3.5 MATERIALES Y MÉTODOS

3.5.1 Síntesis de los hidrogeles confinados en las membranas

3.5.1.1 *Materiales y reactivos*

Membranas de microfiltración de PS de fibra hueca fueron cedidas por A/G Technology Co (Needham, MA, USA). Las fibras huecas tienen diámetros internos y externos de 1 y 1,5 mm, respectivamente. El poro nominal promedio de las membranas es de 0,65 μm y una porosidad nominal del 70 %. Los monómeros de acrilamida (AAm), N,N'-metilen bisacrilamida (bis-AAm), el hidroxietil metacrilato (HEMA) y el dietilenglicol dimetacrilato (DEGDMA) fueron obtenidos de Silgma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y utilizados sin purificación previa. Las soluciones grado terapéutico de albúmina humana (HSA, PM: 66 kDa) y la inmunoglobulina G humana (IgG, PM: 150 kDa) fueron obtenidas del Laboratorio de Hemoderivados, UNC. La tanza monofilamento de Nylon[®] Nitanyl[®] (diámetro de 0,8 mm) fue obtenida de Nicieza y Taberna SA, Argentina. y la vaselina líquida EWE[®] fue obtenida de Sanitas SA, Argentina. El resto de los reactivos son grado analítico. Se utilizó buffer fosfato salino (PBS, conteniendo 0,0027 M KCl, 0,137 M NaCl, 0,01 M Sales Buffer Fosfato, pH 7,4) como solvente.

3.5.1.2 *Síntesis del hidrogel*

La síntesis de hidrogeles confinados al interior de una membrana se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento: en primer lugar, se enhebraron las fibras huecas (membranas de MF) con la tanza de Nylon[®]. Luego se sumergieron en la solución de monómeros (previamente desgaseada con N₂) y se mantuvieron en agitación por 5 min. Se escurrieron las fibras quitándole el excedente de solución de monómeros y se sumergieron completamente en vaselina líquida en un recipiente cerrado herméticamente. Estas fibras fueron irradiadas con una fuente Gammacell ⁶⁰Co en el Centro Atómico de Ezeiza (CNEA¹¹), según la técnica de polimerización iniciada por irradiación ionizante. La dosis fue de 10 kGy y la velocidad de dosis 1 kGy·h⁻¹. Las soluciones de los monómeros de AAm y HEMA fueron preparadas en agua y etanol: agua (1:1 v:v) respectivamente.

Se utilizaron soluciones de AAm y bis-AAm y soluciones de HEMA y DEGDMA. La concentración del monómero se calculó en base a la cantidad molar de dobles enlaces presentes

¹¹ CNEA: Comisión Nacional de Energía Atómica

(uno por monómero y dos por monómero entrecruzante). La composición de cada hidrogel se detalla en la Tabla 6.

Tabla 5: Composición química de los hidrogeles estudiados

Nombre	Monómeros	Concentración (M)	Entrecruzamiento (% mol/mol)	Entrecruzamiento (% p/p)
PoliAAm 1 % CL	AAm / bis-AAm	0,1 / 0,5 / 1	1	1,01
PoliAAm 10 % CL	AAm / bis-AAm	0,1 / 0,5 / 1	10	12
PoliHEMA 1 % CL	HEMA /DEGMA	0,1 / 0,5 / 1	1	0,98
PoliHEMA 10 % CL	HEMA /DEGMA	0,1 / 0,5 / 1	10	10,88

El remanente de las soluciones de monómeros fue irradiado en viales de vidrio, a fin de ser utilizadas como control de polimerización.

Las membranas irradiadas fueron cuidadosamente lavadas y enjuagadas con etanol: agua (1:1 v:v) y almacenadas en buffer PBS a 5°C hasta su utilización.

El grado de modificación se determinó en base a la variación de peso seco (Grasselli *et al.*, 1999). Para determinar la dosis suministrada al sistema se utilizó como dosímetro una solución de Fricke y film radiocrómico. Se midió el cambio de absorbancia de estos dosímetros luego de la irradiación. La longitud de onda utilizada para la medición espectrofotométrica fue 304 nm para la solución de Fricke y 605 nm para el film radiocrómico.

3.5.2 Espectroscopia infrarroja

Se caracterizaron membranas (sin modificar, y con hidrogel) analizando sus grupos funcionales mediante FT-IR, utilizando un espectrofotómetro Nicolet Magna-IRTM 750 equipado con un detector DTGS. Para analizar los primeros micrones del film, los espectros fueron obtenidos con el módulo *Attenuated Total Reflection* (ATR), utilizando un cristal de diamante de reflexión única. Los espectros fueron obtenidos con 32 acumulaciones en una resolución de 2 cm⁻¹.

3.5.3 Microscopias

Las muestras de membranas fueron deshidratadas por liofilización. Previamente fueron incubadas en agua, glicerol 20 % y trehalosa 12 % hasta alcanzar el equilibrio. Luego, las

muestras deshidratadas fueron recubiertas con una capa delgada de oro para lograr la conductividad necesaria para SEM. Se tomaron fotografías con un Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5600LV (SEM) con diferentes aumentos de la superficie y de fracturas para observar la estructura interna de los mismos.

3.5.4 Determinación de la permeabilidad hidráulica

La permeabilidad hidráulica de las membranas se determinó por medio de un equipo de fabricación *ad hoc* como se describe en Wolman *et al.* (Wolman, Grasselli *et al.* 2000, Rozga 2006). Brevemente, el agua desionizada es presurizada a 0,1 MPa con nitrógeno gaseoso a temperatura ambiente. Manteniendo la presión constante, la permeabilidad de la membrana se determinó midiendo el volumen permeado de agua por gravimetría en función del tiempo, corrigiendo la viscosidad para la temperatura medida durante el experimento.

3.5.5 Determinación de la permeabilidad de solutos

Los solutos utilizados para determinar la permeabilidad fueron glucosa, HSA e IgG. En la Tabla 6 se presentan algunas características fisicoquímicas útiles de los solutos utilizados para la realización de cálculos.

Tabla 6: Características fisicoquímicas de los solutos utilizados en los ensayos de permeabilidad

Soluto de interés	Valores normales en sangre ¹² (g·l ⁻¹)	Peso molecular (Da)	Radio Stokes (nm)	Difusividad en agua a 37°C (cm ² ·s ⁻¹) ¹³
glucosa	0,7-1	180	0,35	0,9 x10 ⁻⁵
HSA	35-55	69.000	3,51	1,11 x10 ⁻⁶
IgG	6-18	150.000	5,29	6,00 x10 ⁻⁷

Los valores de radio de Stokes fueron calculados a partir de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$r_s = \frac{k_B T}{6\mu\pi D_0} \quad \text{Ecuación 37}$$

¹² En ayunas

¹³ Extrapolado a 37°C usando $D\cdot\eta/T=\text{constante}$

Donde k_B es la constante de Boltzmann ($1,3806503 \times 10^{-23} \text{ m}^2\text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$). El radio de Stokes-Einstein obtenido para proteínas es muy cercano a los obtenidos por otros métodos, como los mencionados en Jackson *et al.* (Jackson and James 1986).

3.5.6 Diseño de un dispositivo de medición

El aparato diseñado (Figura 16) consta de dos vasos termostatizados a 37°C (mediante doble pared con recirculación de agua), cada uno con un agitador magnético. La membrana (fibra hueca) está completamente sumergida en el vaso receptor (Figura 17) y conectada mediante mangueras de silicona al vaso reservorio. El caudal interno de la manguera se controló con una bomba peristáltica de caudal variable con cabezal de tres puntos de contacto. Las conexiones manguera-fibra hueca se realizaron con puntas descartables de micropipeta y tubos de poliolefina termocontraíbles, sin utilizar adhesivos.

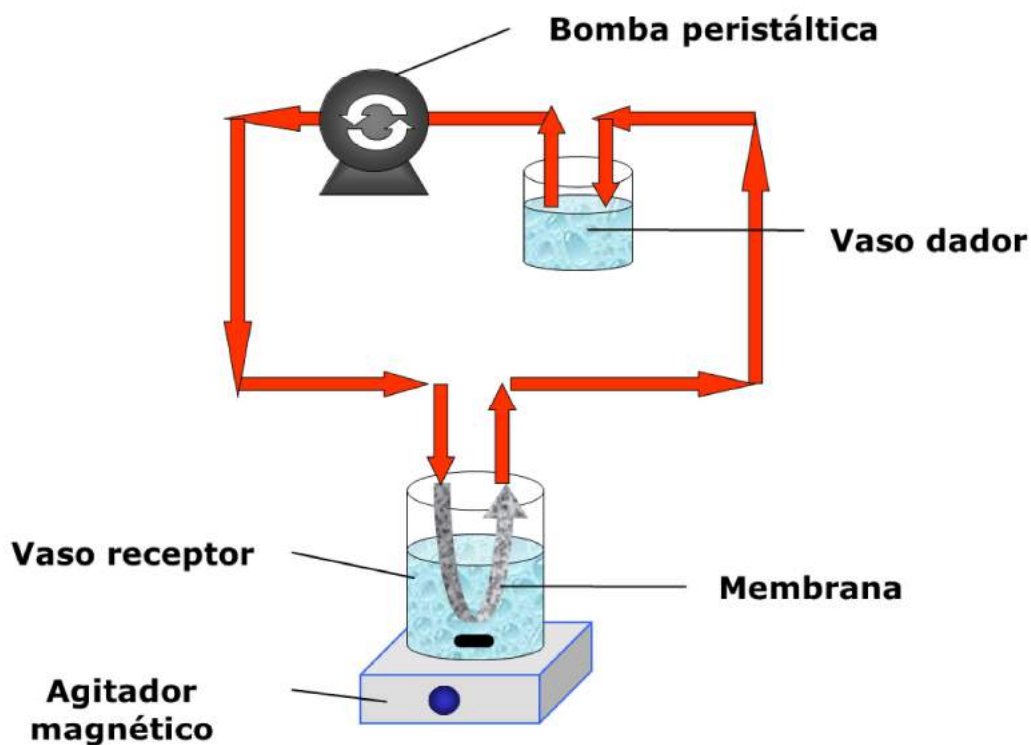


Figura 16: Esquema dispositivo de medición de permeabilidad de solutos

La determinación de las permeabilidades se realizó utilizando el sistema experimental descrito en la Figura 16. En todos los casos, el vaso receptor contuvo solución PBS 30 mM pH 7,4, con 0,01 % de Azida de sodio utilizada como bactericida.

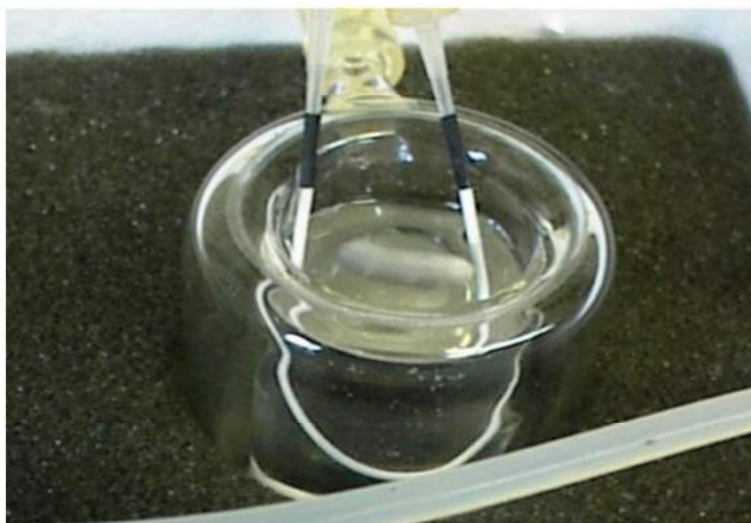


Figura 17: Detalle fibra sumergida en vaso termostatzado con agitación

Para la medición de glucosa, el vaso reservorio contuvo una solución de glucosa de $1\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en PBS 30 mM pH 7,4, con 0,01 % de Azida y para los experimentos con proteínas, el vaso reservorio contuvo además HSA e IgG en concentraciones similares a las plasmáticas, que son detalladas en la Tabla 6.

De ambos vasos se extrajeron muestras a intervalos regulares de tiempo, con la precaución de que el volumen total de muestreo sea inferior al 10 % del volumen total del vaso. El sistema fue termostatzado a 37°C . La longitud de la membrana sumergida fue de 10 cm y el caudal de recirculación de la solución del vaso reservorio fue $0,17\text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$. Los volúmenes de los vasos reservorio y receptor fueron 30 y 45 ml respectivamente.

El flujo convectivo fue despreciable en las condiciones experimentales utilizadas (determinado por el mantenimiento constante de los volúmenes de los reservorios durante el experimento). La determinación de la glucosa se realizó fuera de línea mediante el método enzimático de la glucosa oxidasa (Wiener SRL) (Trinder 1969). La cuantificación de proteínas se realizó por EC.

Para la separación de las proteínas por EC se utilizaron columnas capilares de sílica fundida (diámetro interno de 75 μm , 35 cm de largo y 27 cm el detector) de Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA. El equipo de EC es de Waters, Miliford, MA, USA. Se utilizó como electrolito una solución de buffer borato 30 mM (pH 8,3) conteniendo LiCl 15 mM, a 25°C , con detección UV a 200 nm.

3.5.7 Transferencia de oxígeno

Se desarrolló un sistema *ad hoc* (Figura 18) que consiste en el dispositivo (10 fibras de 10 cm de largo) conectado a un analizador de CO_2 (Servomex Gas Analyser 1440), un analizador de O_2 (Servomex Paramagnetic Oxygen 1100), un aireador (CX 1000, Atman[®]) y un rotámetro (Nikron[®]) y un electrodo de oxígeno disuelto polarográfico sensION+ (HACH[®]) en la disposición que indica el esquema. Las mangueras utilizadas fueron de silicona con aislamiento de aluminio y la cámara de medida del O_2 disuelto se fabricó con un conector de tubos tipo “T” y tapas de polipropileno. Por el circuito interior de las fibras (flechas azules) se circula aire a presión atmosférica, a caudal controlado y constante. Por el circuito externo se recircula una solución de Na_2SO_3 con CuSO_4 (flechas verdes). El reservorio de la solución es gaseado con N_2 , y se mantiene control de temperatura y pH.

Para el método de Sulfito y método de Balance de materia, se utilizó el dispositivo anterior y una solución de Na_2SO_3 con CuSO_4 desoxigenada con N_2 . Para el método dinámico (*Gassing in*) se utilizó el mismo dispositivo, pero sin la solución de sulfito; en este caso el solvente fue agua destilada desoxigenada con una ventilación con N_2 . Se ensayaron varios caudales de aireación y de agua destilada manteniendo en ambos casos una condición de flujo pistón (Número de Peclet >100).

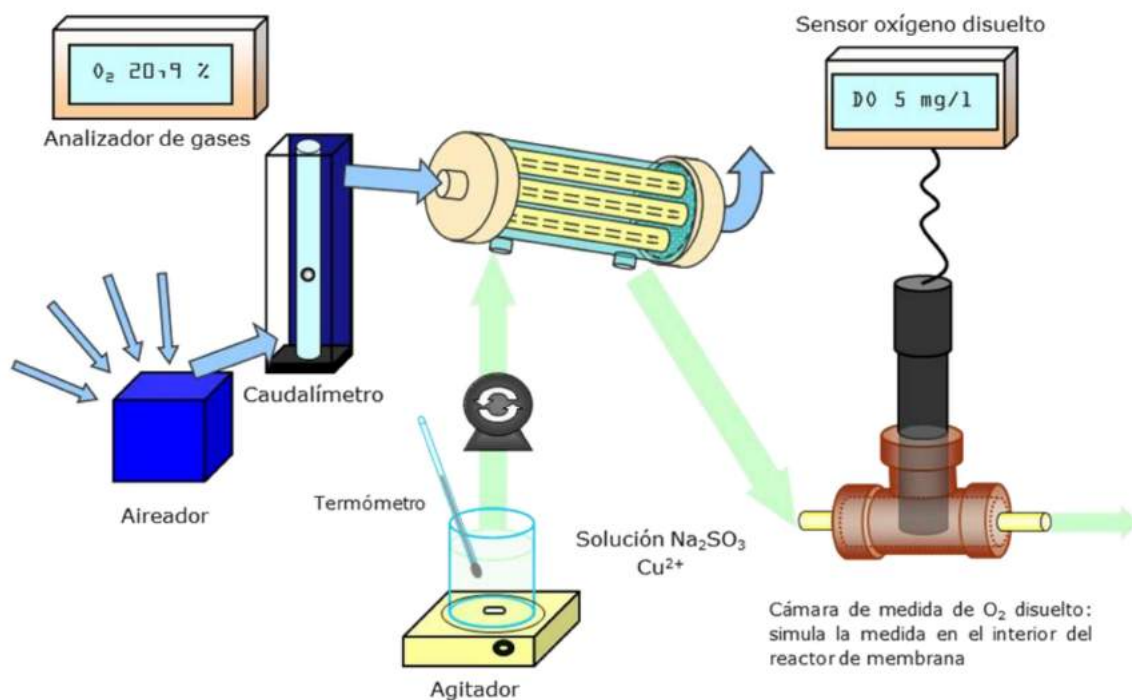


Figura 18: Sistema desarrollado *ad hoc* para la medición de k_{La} .

3.6 RESULTADOS

En este Capítulo se estudia la preparación y caracterización de una nueva membrana de alta permeabilidad y mayor selectividad para el desarrollo de un BAL del tipo reactor de fibra hueca. Las membranas, de tipo difusivas, están constituidas por una membrana de MF comercial rellenas con un hidrogel que controle la difusión de diferentes solutos de manera bidireccional. Se seleccionaron para el trabajo membranas de fibra hueca de PS de 1,5 mm de diámetro externo y un diámetro promedio de poro de 0,65 μm .

3.6.1 Selección de hidrogeles

Se eligieron 2 copolímeros por su amplia disponibilidad en el mercado y su vasta trayectoria en la utilización para dispositivos médicos: el poliHEMA y la poliAAm.

El poliHEMA o poli (2-hidroxietil metacrilato) fue inventado en 1955 para la fabricación de lentes de contacto (Wichterle, 1961; Wichterle & Lim, 1960). Los copolímeros de poliHEMA son ampliamente usados hoy en día. En nuestro caso trabajamos con un copolímero de 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) y etilen dimetacrilato (DEGDMA). El poliHEMA no es biodegradable y es estable en el rango de pH 2-13 (Figura 19).

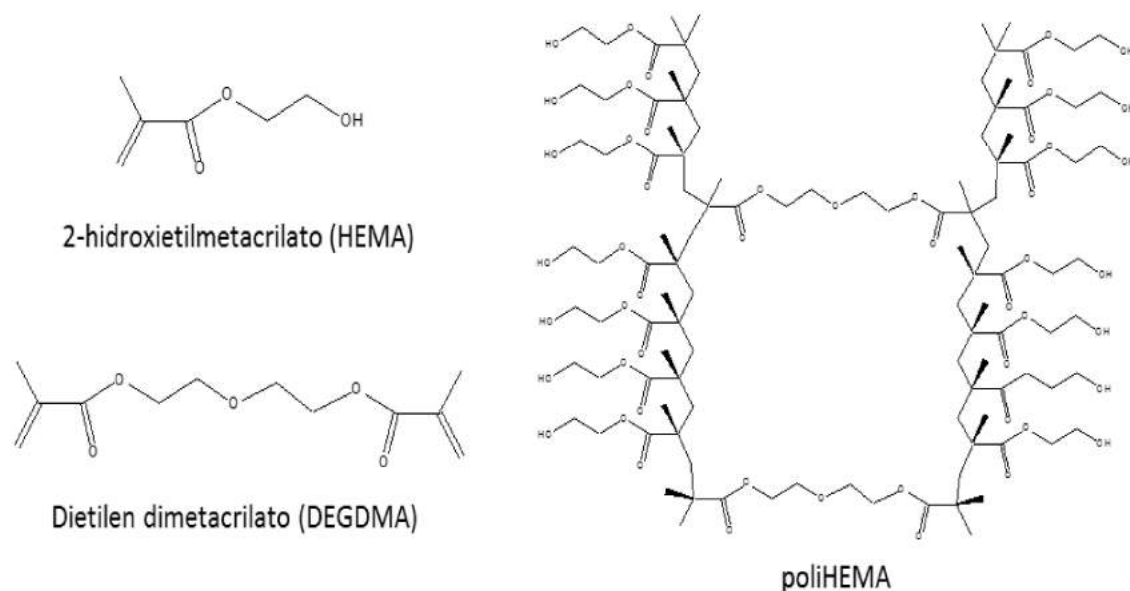


Figura 19: Estructura química del poliHEMA y monómeros que lo constituyen

La poliAAm, poli (2-propenamida) o poli (1-carbamoiletileno), es un polímero formado a partir de subunidades de acrilamida. Patentada en 1966 (Bashaw, 1966) puede ser sintetizada de

manera lineal o entrecruzada, en este último caso utilizando generalmente N,N'-metilen bisacrilamida (Figura 20).

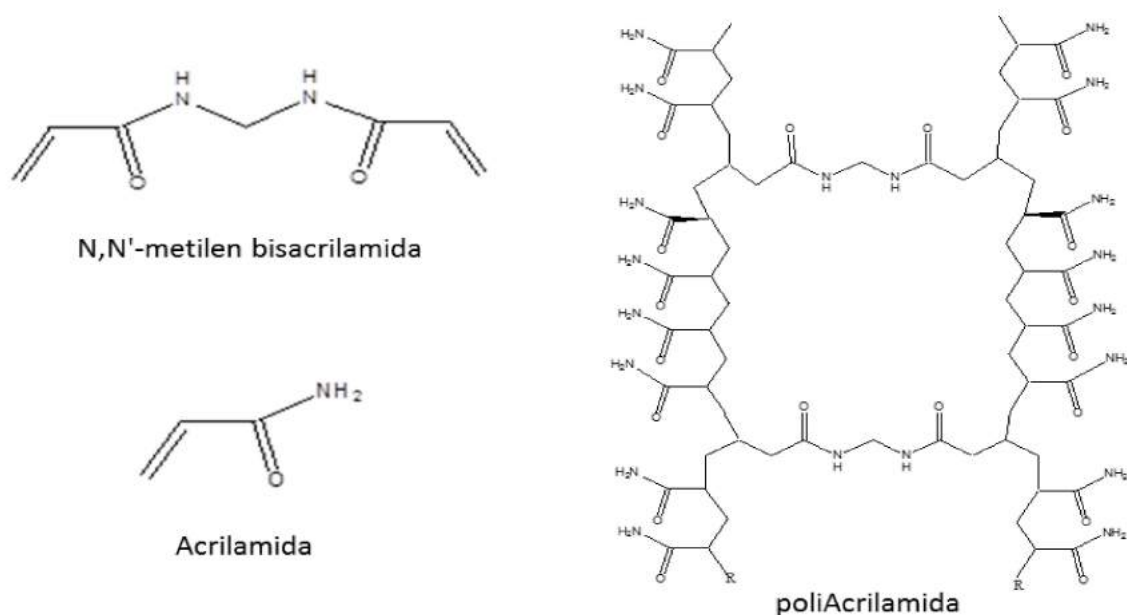


Figura 20: Estructura química de la poliAAM y los monómeros que la constituyen.

La poliAAM no es biodegradable, es químicamente inerte, transparente y estable en un amplio intervalo de pH (2-10), temperatura y fuerza iónica. Se utiliza en lentes de contacto, implantes de tejidos, transportadores de hormonas y drogas, como floculante y coagulante de residuos sólidos de agua, y lavado y pelado de frutas y vegetales.

3.6.2 Síntesis de los hidrogeles confinados en las membranas

Para la síntesis de hidrogeles confinados al interior de una membrana de MF, las fibras huecas se enhebraron con tanzas de Nylon® (material inerte) para que el lumen de la fibra no quede obstruido por hidrogel, de manera de lograr la polimerización del hidrogel solo en los poros de la membrana, sin afectar el lumen de la fibra hueca, como se ilustra en la Figura 21.

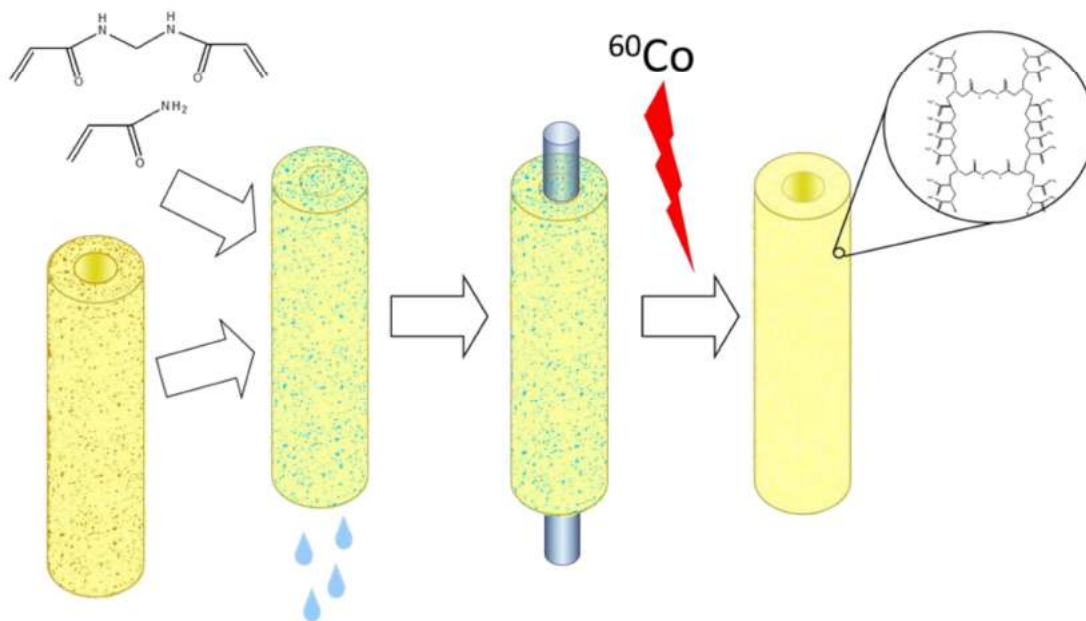


Figura 21: Esquema de la preparación de membranas con hidrogel confinado.

La solución de monómeros se degaseó con N_2 para quitar el oxígeno disuelto, que afecta la polimerización. Las fibras utilizadas midieron aproximadamente 12 cm de largo, luego de la polimerización se cortaron y se utilizaron 10 cm para evitar efectos de borde. Para asegurar que la superficie de la membrana quede libre de solución de monómero, y de esta manera evitar la formación de hidrogel en toda la solución, las membranas embebidas en la solución de monómero fueron sumergidas en vaselina líquida durante la irradiación. Esta sustancia inerte evitó que la solución de monómeros se escurriera de las fibras y por su viscosidad no penetró en los poros de la membrana.

De esta manera se logró polimerizar hidrogel con diferentes estructuras químicas confinados en membranas de fibra hueca. Esta técnica nos permitió preparar hidrogel de diferentes concentraciones y grado de entrecruzamiento dentro de las membranas, sin obstruir el lumen de la fibra hueca, como muestra el esquema de la Figura 22:

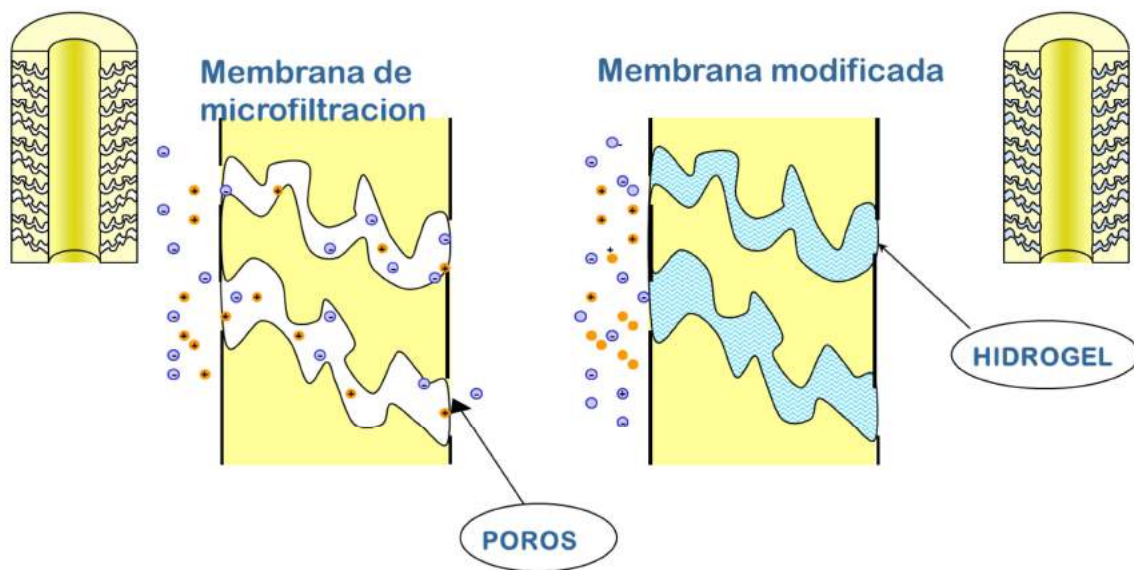


Figura 22: Esquema del detalle de la modificación de las membranas de MF

No se encontraron en la bibliografía antecedentes de la generación *in situ* de un hidrogel en fibra hueca. Si bien los poros rellenos de gel ya habían sido descritos previamente (Dai & Barbari, 1999), estas otras técnicas utilizan polímeros solubles (en reemplazo de monómeros) y presentan obstáculos experimentales relacionados con el procedimiento de llenado, principalmente como consecuencia de la viscosidad de las soluciones poliméricas y prepoliméricas (Dai & Barbari, 2000; Suryanarayan, Mika, & Childs, 2006).

Las soluciones utilizadas para embeber las membranas fueron preparadas a partir de dos tipos diferentes de monómeros, uno basado en monómeros de acrilamida y el otro en monómero de metacrilato. Se caracterizaron tres concentraciones de monómeros entre 0,1 y 1 M, cada una con dos grados de entrecruzamiento (relación monómero / entrecruzante) (1 % y 10 % de entrecruzante). Para controlar el grado de entrecruzamiento, DEGMA y bis-AAm fueron usados como entrecruzantes en soluciones de HEMA y AAm respectivamente (ver Tabla 5). Las concentraciones de monómeros y la relación con el entrecruzante fueron expresadas en base molar para permitir una comparación directa entre hidrogeles químicamente diferentes.

A través de determinaciones de peso seco se determinó la efectiva incorporación de materia, equivalente al contenido de monómero utilizado, para las respectivas membranas.

3.6.3 Espectroscopía infrarroja

3.6.3.1 Membrana de PS

Se caracterizó como control la membrana de PS sin tratar (Figura 23). Su espectro reflejó las bandas características esperadas, como la vibración de estiramiento aromático de C=C en las dos bandas cercanas a 1500 cm^{-1} , el estiramiento asimétrico de O=S=O con un doblete en la cercanía del 1300 cm^{-1} y la banda en 1050 cm^{-1} ; la banda del éter aromático se encuentra en aproximadamente 1250 cm^{-1} . Las bandas débiles en $1365 - 1385\text{ cm}^{-1}$ corresponden a grupos metilos (flexión C-H en alcanos).

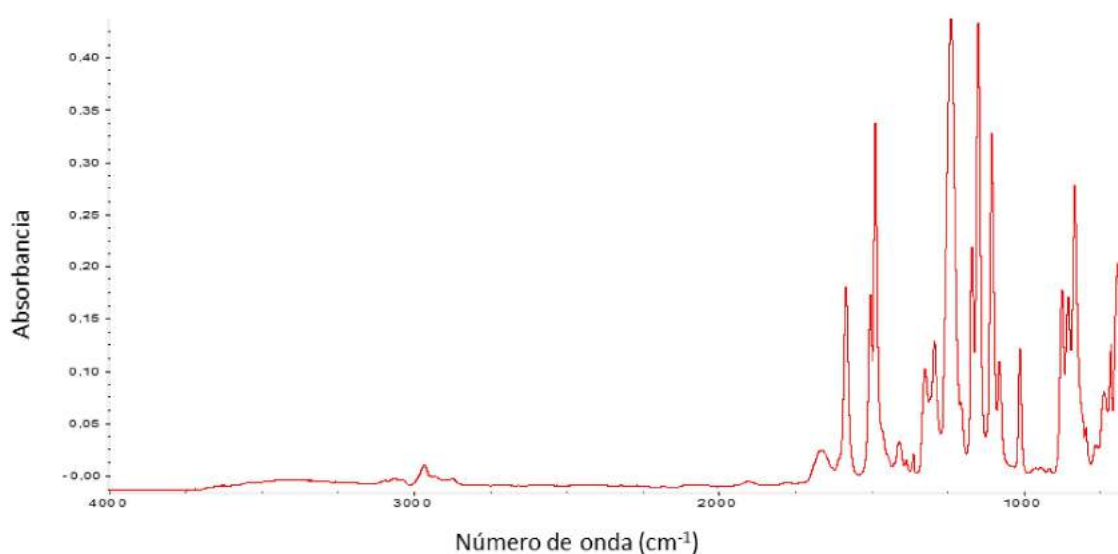


Figura 23: Espectro FT-IR de una membrana de PS virgen.

Con la finalidad de determinar la presencia de los hidrogeles en las membranas, se realizó el espectro FT-IR ATR de las membranas de PS con poliAAm para identificar las bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales incorporados.

En la Figura 24 se observan tres espectros combinados: la membrana de PS (en línea roja) y concentraciones crecientes de poliAAm (líneas verdes y azul). En estos espectros se aprecian las bandas típicas de la PS, pero además se acentúan las bandas entre 3200 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} correspondientes al estiramiento de los grupos -NH. Aparece la señal característica del carbonilo (antes ausente) con vibraciones de estiramiento del grupo C=O entre 1650 y 1700 cm^{-1} , sumándose a las vibraciones de flexión del enlace NH₂. También se observa una banda en 1425 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento del enlace C-N. La absorción correspondiente al doble enlace C=C presente en la PS no aumenta de manera apreciable con

la incorporación de la poliAAm, indicando que la polimerización fue completa ya que este enlace está presente únicamente en el monómero de AAm.

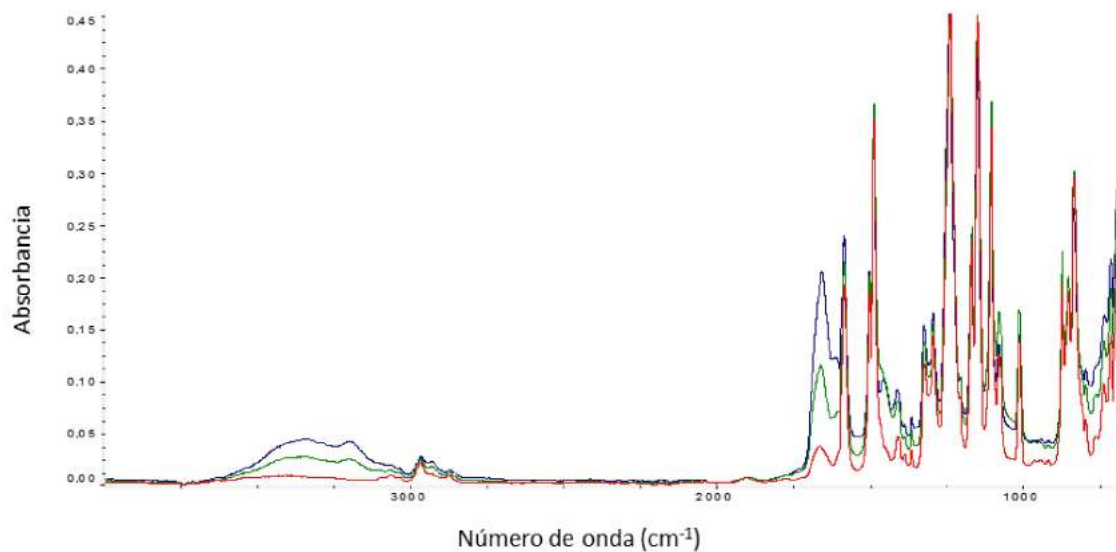


Figura 24: Membrana de PS con diferentes concentraciones de poliAAm, (10 % de entrecruzamiento)

Para observar el efecto del entrecruzamiento, se analizaron espectros con la misma concentración de poliAAm (1 M) y diferente grado de entrecruzamiento, como en la Figura 25.

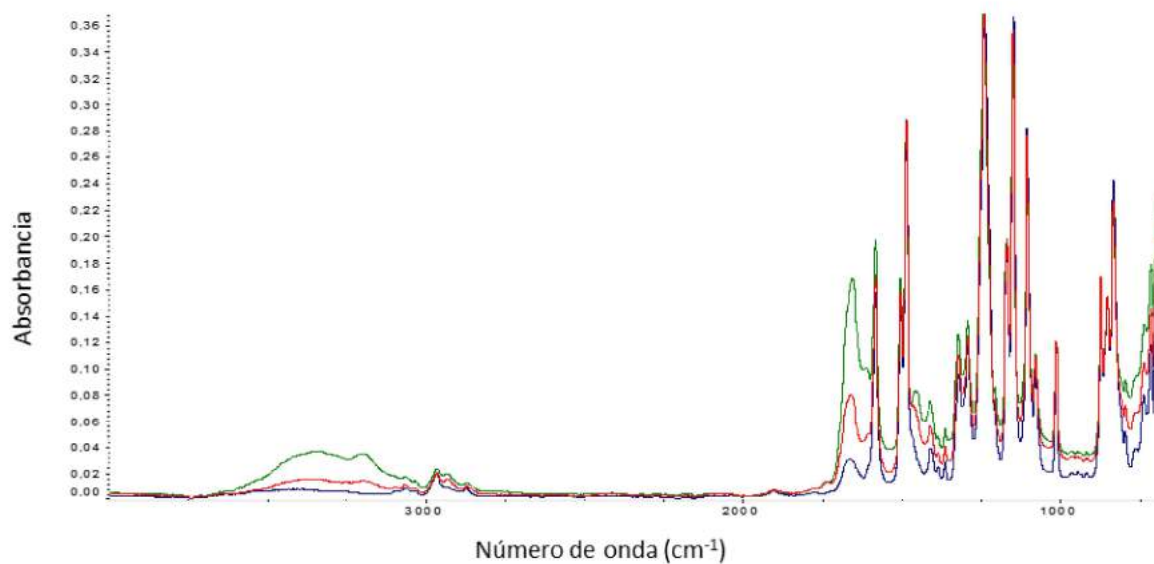


Figura 25: Membrana de PS con poliAAm 1 M, entrecruzamiento de 1 % y 10 %

Se observa que la señal a $1657\text{--}1661\text{ cm}^{-1}$ es más intensa con el grado de entrecruzamiento indicando una mayor densidad del grupo carbonilo. Lo mismo ocurre con las bandas entre 3200

cm^{-1} y 3400 cm^{-1} correspondientes al estiramiento de los grupos $-\text{NH}$. Este efecto es el mismo observado con el aumento de concentración de poliAAm, solo que en este caso la cantidad de moléculas total no aumenta, pero cambia la proporción de carbonilos y aminos por el aumento de proporción de la molécula de bisAAm.

Análogamente al análisis con la incorporación de la poliAAm en la membrana de PS, se analizaron las membranas de PS modificadas con poliHEMA (Figura 26):

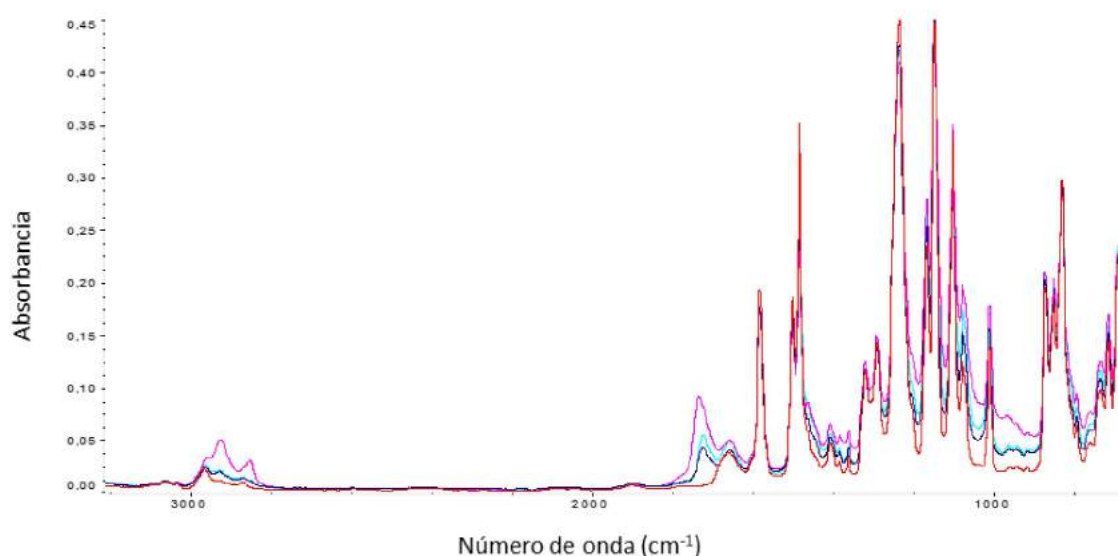


Figura 26: Membrana de PS con poliHEMA a diferentes concentraciones, entrecruzamiento de 1 % y 10 %

Las bandas más características del espectro de FTIR de poliHEMA son las asignadas al estiramiento del enlace $-\text{C}=\text{O}$ correspondiente al éster en el intervalo de $1730\text{-}1780 \text{ cm}^{-1}$, y el resto de las bandas características de la PS. Esto se observa al comparar el efecto de la concentración de poliHEMA. Se analizaron los espectros obtenidos a partir de las membranas modificadas: membrana de PS sin modificar (línea roja); 0,1 M (línea negra) 0,5 M (línea celeste) y 1 M (línea fucsia) de concentración final, todas con un 1 % de entrecruzamiento. Al comparar diferentes concentraciones se hace evidente que el aumento de la señal del éster aumenta con la concentración del polímero.

3.6.4 Caracterización superficial por microscopía electrónica de barrido

En la Figura 27 se observa la superficie de la membrana sin hidrogel y la sección transversal de la membrana sin hidrogel utilizando un Microscopio Electrónico SEM. La incorporación del hidrogel se puede apreciar en las microscopías “con hidrogel”, pero debe considerarse que, debido a la deshidratación de la muestra, el hidrogel pierde su forma. De todos modos, como

fueron muy cuidadas las condiciones de desecación, se pueden observar estructuras fácilmente diferenciables de las membranas sin hidrogel.

En las microscopías SEM de la superficie de las membranas no se observan los poros que presenta la membrana de PS original. En las microscopías de la sección transversal de la membrana con hidrogel se aprecia a una estructura más compacta con poros más cerrados.

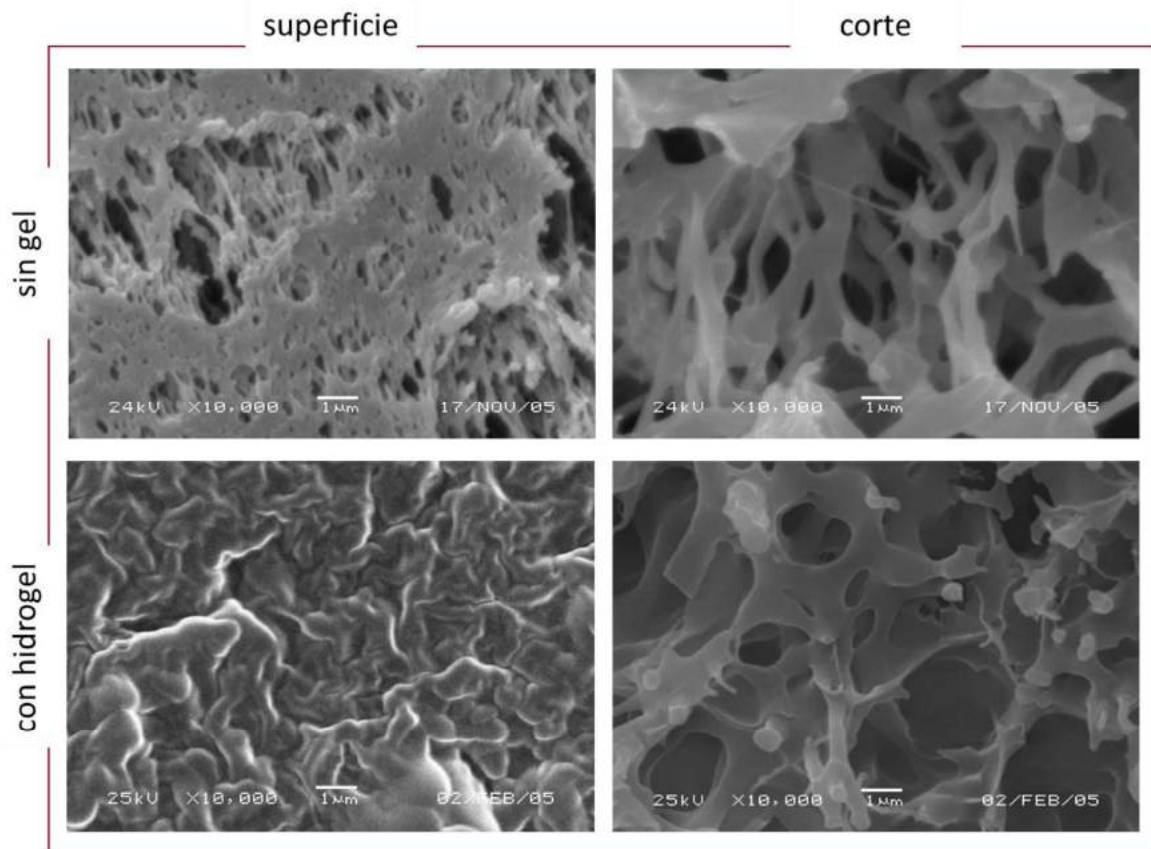


Figura 27: Microfotografías SEM de la superficie y del corte transversal de las membranas sin hidrogel y con hidrogel de poliAAm 0,5 M 1 % CL

3.6.5 Caracterización funcional

Las membranas con hidrogel desarrolladas para el uso en órganos bio-artificiales deben tener la mínima resistencia al transporte de nutrientes esenciales para mantener la viabilidad celular como el oxígeno y la glucosa. Simultáneamente, la membrana debería facilitar la difusión de proteínas terapéuticas secretadas por las células y aquellas que, como en el caso de la HSA, transportan metabolitos a detoxificar por los hepatocitos. Por otra parte, debería ser prácticamente impermeable al sistema inmunológico del hospedador, como las

inmunoglobulinas, las proteínas de complemento y las células del sistema inmunológico. Debido a la escasa diferencia de tamaño entre algunas proteínas terapéuticas (PM: 20-60 kDa) y la IgG (PM: 150 kDa), la molécula más pequeña del sistema inmunológico del hospedador, el objetivo principal de este trabajo de tesis será obtener una separación en este rango de MWCO.

3.6.6 Permeabilidad hidráulica

En las membranas de MF con un hidrogel confinado en los poros, la permeabilidad hidráulica (k_h) es función principalmente de la composición y concentración del hidrogel. Para la determinación de k_h se utilizó un equipo de fabricación casera que utiliza agua desionizada presurizada a 0,1 MPa, según se describe en la sección Materiales y Métodos. Los datos experimentales de k_h fueron compilados en la Figura 28 en función de la concentración de hidrogel.

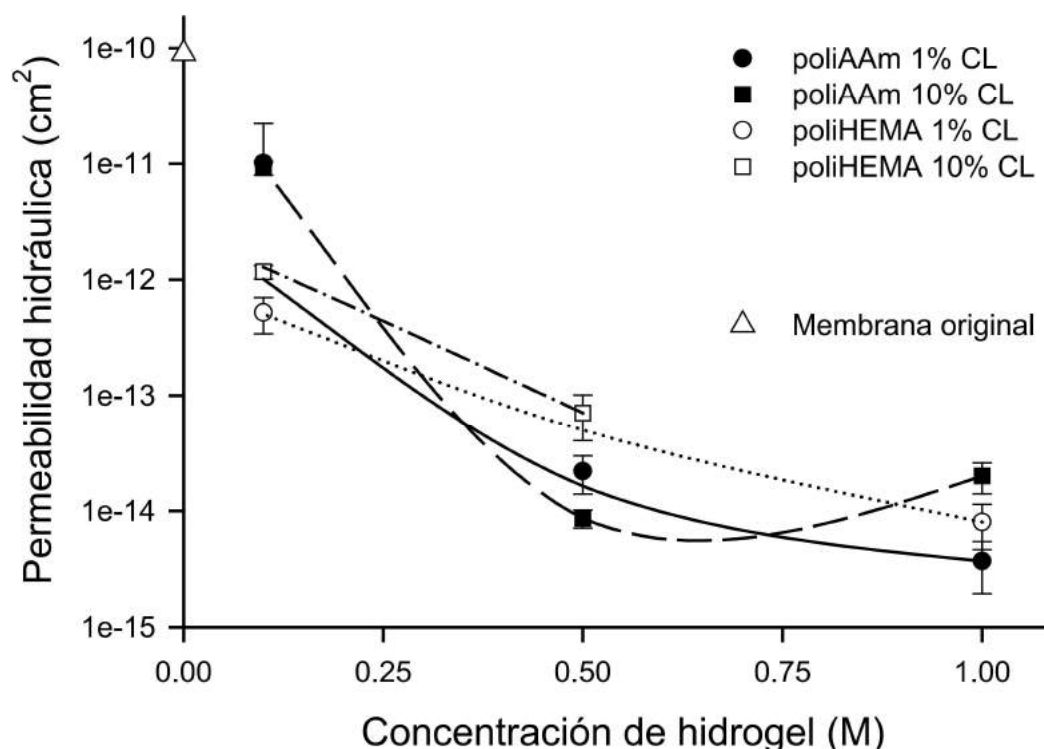


Figura 28: Medida de la permeabilidad hidráulica en función de la concentración del hidrogel

Como se observa en la Figura 28, en todos los casos hay una disminución de la permeabilidad con el aumento de la concentración del hidrogel. En cambio, no se observa una diferencia apreciable en la permeabilidad hidráulica (k_h) respecto del grado de entrecruzamiento para ambos sistemas de polímeros.

En las membranas sin hidrogel se determinaron valores de k_b del orden de $1 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$. Debido a que k_b disminuye entre 1 y 4 órdenes de magnitud en presencia del hidrogel, este parámetro fue considerado como un primer indicador de la presencia e integridad del hidrogel en los poros. Para los ensayos siguientes esta determinación se utilizó como un control de polimerización dentro del poro.

3.6.6.1 Importancia desde el punto de vista funcional

De los hidrogeles sintetizados de acuerdo a la composición descrita en la Tabla 7 se descartaron las membranas cuya permeabilidad hidráulica permitiera un transporte convectivo. Las membranas preparadas con 0,1 M de monómeros fueron descartadas para futuros experimentos por presentar transporte convectivo.

Al asegurar un transporte difusivo y no convectivo, se descartan los problemas obstrucción de los poros, que sólo podría ocurrir con una adsorción inespecífica del soluto en el hidrogel. El transporte difusivo no dificultaría el pasaje bidireccional de solutos.

Tabla 7: Permeabilidad hidráulica obtenida en función de la composición y concentración del gel

Composición gel	Concentración (M)	Permeabilidad hidráulica (cm^2)
poliAAm 1 %	0,1	Permeabilidad hidráulica alta: permiten un transporte convectivo
poliAAm 10 %		
poliHEMA 1 %		
poliHEMA 10 %		
poliAAm 1 %	0,5	Permeabilidad hidráulica despreciable: $1 \times 10^{-13} - 1 \times 10^{-15}$, se puede considerar que no hay transporte convectivo.
poliAAm 10 %		
poliHEMA 1 %		
poliHEMA 10 %		
poliAAm 1 %	1	
poliAAm 10 %		
poliHEMA 1 %		
poliHEMA 10 %		

3.6.7 Permeabilidad hidráulica: comparación con modelos

La permeabilidad de la membrana con un hidrogel contenido en los poros depende fuertemente de la fracción de volumen de poro ocupada por el gel. Kapur (Kapur, Charkoudian *et al.* 1996)

halló una ecuación empírica de determinar la permeabilidad para geles de poliAAm (6 % p/p de entrecruzamiento) dentro de poros de membranas de PDVF y lo correlacionó con la fracción ocupada (Ecuación 38).

$$k_h = 4,35 \times 10^{-18} \phi^{-3,34} \quad \text{Ecuación 38}$$

Tokita (Tokita and Tanaka, 1991) midió la permeabilidad hidráulica en geles de poliAAm (2,2 % p/p de entrecruzamiento) en bloque sintetizados como películas de 1 mm de espesor, evitando hinchamiento o compresión del gel en sus mediciones. Sus datos están representados por la siguiente expresión (Tong and Anderson, 1996):

$$k_h = 2,64 \times 10^{-16} \phi^{-1,42} \quad \text{Ecuación 39}$$

White (White, 1960) también midió la permeabilidad en geles de poliAAm (5 % p/p de entrecruzamiento) en bloque. Obtuvo datos que se ajustan a la siguiente expresión empírica dentro del rango de densidad del polímero baja ($0,04 < \phi < 0,11$):

$$k_h = 1,015 \times 10^{-16} \phi^{-1,083} \quad \text{Ecuación 40}$$

Estas permeabilidades son menores que las obtenidas por Tokita (Ecuación 39), posiblemente debido a su compresibilidad. Las medidas de White fueron realizadas a presiones 20 veces mayores que las medidas por Tokita, por lo que se espera una mayor compresión del gel y, por lo tanto, una disminución en su permeabilidad, por lo que se espera que los resultados de Tokita serían entonces más representativos de los geles en bloque (Figura 29).

Se compararon los datos experimentales obtenidos en geles de poliAAm con las correlaciones obtenidas por estos tres autores (ecuaciones 38, 39 y 40) en la Figura 29, donde se muestran los valores de permeabilidad hidráulica obtenidos respecto de la fracción de volumen ocupado por el gel para geles de poliAAm, con entrecruzamiento de 1 y 10 %.

Como se puede apreciar en la Figura 29, los geles en membranas parecen ser más permeables que los geles en bloque (Ecuación 39 y Ecuación 40) con una fracción de volumen ocupada por el gel menor al 8 % ($\phi \geq 0,08$).

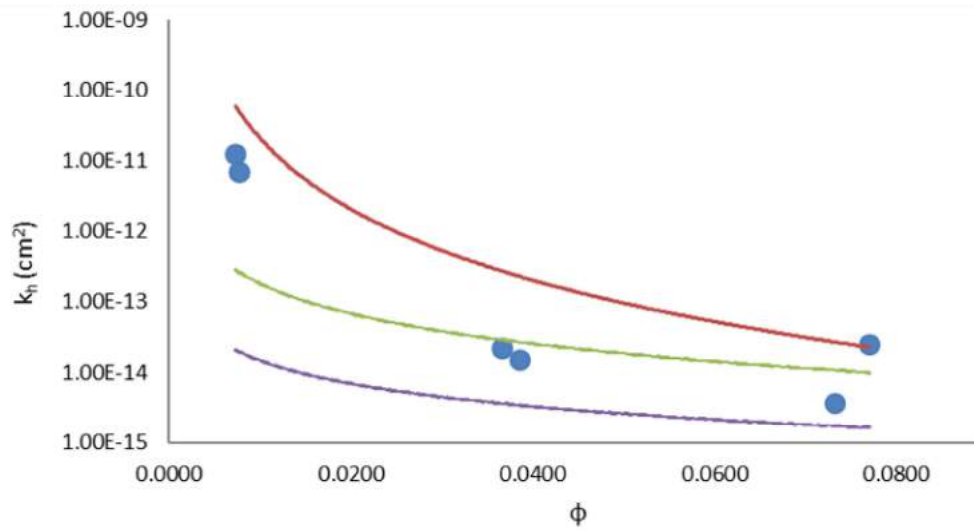


Figura 29: Permeabilidad hidráulica (k_h) versus fracción de volumen del gel (ϕ) para geles de poliAAM●, y las curvas corresponden a la — Ecuación 38 (Kapur, Charkoudian et al., 1996), - - Ecuación 39 (Tokita & Tanaka, 1991), Ecuación 40 (White, 1960) determinadas de manera empírica.

Como se observa en la Figura 29, los datos experimentales presentan una tendencia similar a las ecuaciones mostradas, especialmente las Ecuaciones 38 y 39. Con los datos experimentales obtenidos se obtuvo la Ecuación 41 y no se encontraron diferencias significativas respecto del grado de entrecruzamiento, al igual de los resultados obtenidos por Kapur (Kapur, Charkoudian, Kessler, & Anderson, 1996), ambos geles de poliAAM, soportados en membranas.

$$k_h = 2 \times 10^{-18} \phi^{-3,129} \quad \text{Ecuación 41}$$

Considerando el modelo de arreglo de cilindros descrito en la Introducción de este Capítulo, y dada la ventaja que representa para comparar entre distintos polímeros, a continuación se analiza la relación entre el radio hidrodinámico de la cadena de polímero y la fracción de volumen ocupada por el mismo, según las diferentes aproximaciones de Sangani y Acrivos (Sangani & Acrivos, 1982), Drummond y Tahir (Drummond & Tahir, 1984) y el modelo de Jackson y James (Jackson & James, 1986).

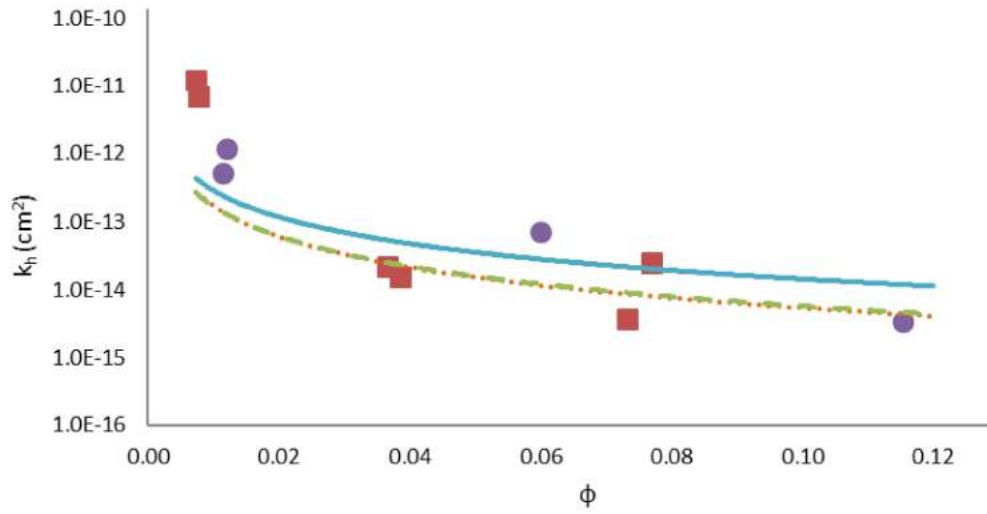


Figura 30: Permeabilidad hidráulica (k_h) en función de la fracción de hidrogel (ϕ) para los hidrogeles ● poliAAm ● poliHEMA. Las líneas representan el — Modelo de Sangani y Acrivos (Ecuación 21) --- Modelo de Drummond y Tahir (Ecuación 22) y — Modelo de Jackson y James (Ecuación 23).

En la Figura 30 se describen los datos experimentales junto con las ecuaciones del modelo de arreglo de cilindros. Las k_h para los hidrogeles de poliAAm y poliHEMA se ajustan razonablemente (considerando un error aleatorio) a las aproximaciones de Sangani y Acrivos (Ecuación 21) y Drummond y Tahir (Ecuación 22), y en menor medida al modelo de Jackson y James (Ecuación 23). También se observa una gran desviación (mayor permeabilidad) para hidrogeles de muy baja fracción de hidrogel. Este efecto es esperable porque los hidrogeles son muy frágiles y posiblemente haya algún tipo de ruptura mecánica por la presión aplicada.

3.6.8 Transporte de solutos

Como se describe en la Introducción del Capítulo, para determinar la permeabilidad a un soluto determinado hay que también considerar las resistencias de la fase acuosa del lado interno y externo de la membrana. Dado la configuración de la membrana de fibra hueca, se puede diferenciar dos caras diferentes: una cara interna y una cara externa. Se calculó la resistencia de cada lado:

La *resistencia del lado interno* (lumen) de la fibra se calculó estimando el número de Sherwood según la aproximación de Leveque (Leveque, 1928):

$$Sh = 1,62 (Gz)^{0,33} \quad \text{Ecuación 42}$$

Donde Gz es el número de Graetz, número adimensional que caracteriza el flujo laminar en un conducto, y está dado por:

$$Gr = \frac{d_{ef}^2 v}{D_0 L_f} \quad \text{Ecuación 43}$$

Donde v es la velocidad del fluido y L_f la longitud de la fibra. La ecuación de Leveque (Ecuación 42) se utiliza para la transferencia de materia en un tubo con un perfil de velocidad completamente desarrollado, como fue el caso de este trabajo, donde el número de Reynolds fue menor de 2000, indicando un flujo laminar y la relación longitud respecto del diámetro de la fibra de 70, por lo que se puede asumir de longitud infinita, donde la solución fluye paralelamente a la membrana.

La resistencia del lado interno, calculada a partir de la Ecuación 10 fue menor al 10 % de la resistencia total, razón por la cual se consideró despreciable. La resistencia del lado externo es despreciable debido a que el reservorio externo se mantiene con agitación. Por lo tanto, la resistencia de la membrana constituye más del 90 % de la resistencia total en todos los solutos estudiados.

Utilizando el diseño experimental esquematizado en la Figura 17 se realizó la determinación del transporte de los diferentes solutos descritos en la Tabla 6. Cada fibra analizada corresponde a una unidad experimental. La Permeabilidad (P) se calcula a partir de la pendiente de la recta obtenida a partir de la regresión lineal (masa vs. tiempo) y la ecuación de Crank (Ecuación 12) que responde a un modelo que considera que a bajos coeficientes de difusión la concentración del lado dador permanece invariable (Figura 31):

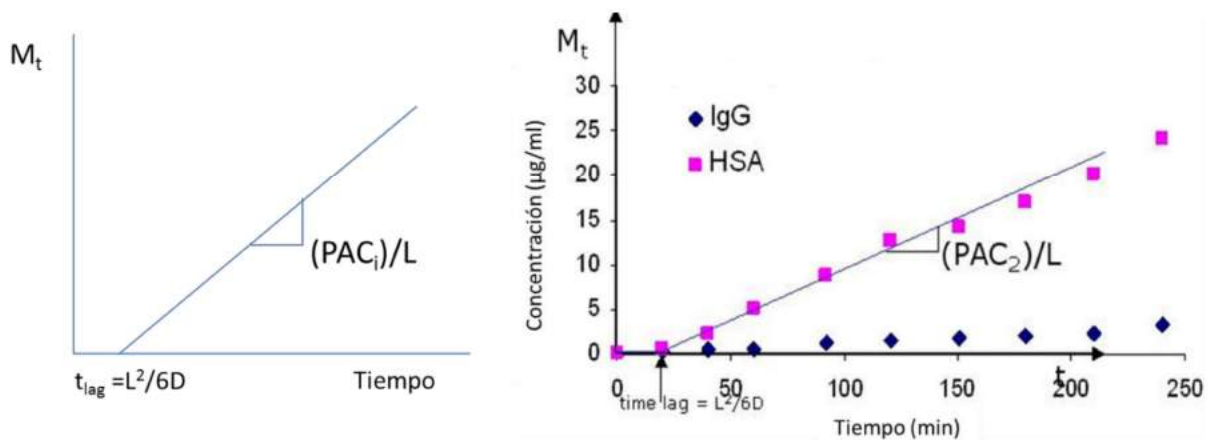


Figura 31: Determinación de la permeabilidad solutos según el modelo de estado pseudo-estacionario. En el gráfico de la izquierda se muestran los parámetros según la ecuación de Crank y en el gráfico de la derecha datos experimentales correspondientes a una membrana con un hidrogel de poliAAm 0,5 M 1 % entrecruzamiento

Todas las regresiones lineales utilizadas para el cálculo de la permeabilidad tuvieron un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0,99.

Se comprobó la distribución homocedacea de los datos experimentales, concluyendo que tanto el tipo de hidrogel (poliHEMA o poliAAm) como la concentración (0,5 y 1 M) afectan a la permeabilidad, y la concentración no afecta más a un tipo de gel que a otro cuando se mide permeabilidad a glucosa, HSA o IgG.

En la Figura 32 y en la Figura 33 se presentan los coeficientes de permeabilidad a glucosa (P_{glucosa}) en función de la concentración de cada hidrogel y del grado de entrecruzamiento. No se observa una disminución marcada en el coeficiente con el aumento en la concentración de hidrogel. Sin embargo, en ambos casos los hidrogeles preparados con menor entrecruzamiento presentan una mayor permeabilidad a bajas concentraciones de hidrogel. Los hidrogeles preparados en base a poliHEMA presentan un comportamiento difusivo a glucosa levemente menor que los de poliAAm para condiciones equivalentes de preparación.

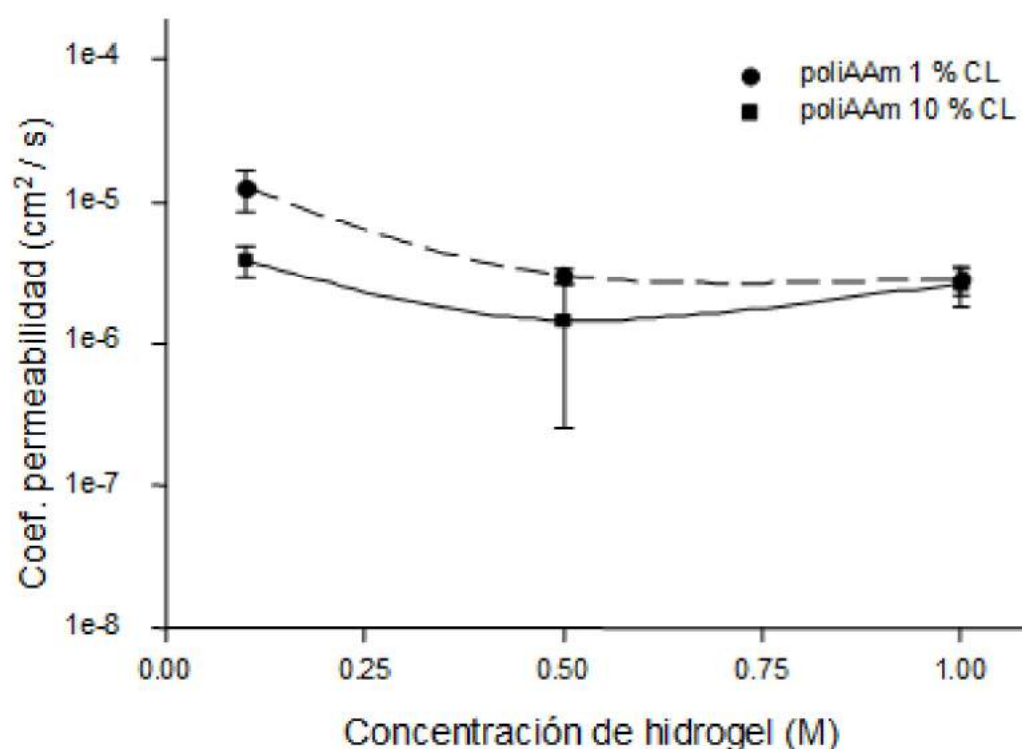


Figura 32: Efecto de la concentración de hidrogel de poliAAm sobre el coeficiente de permeabilidad a glucosa

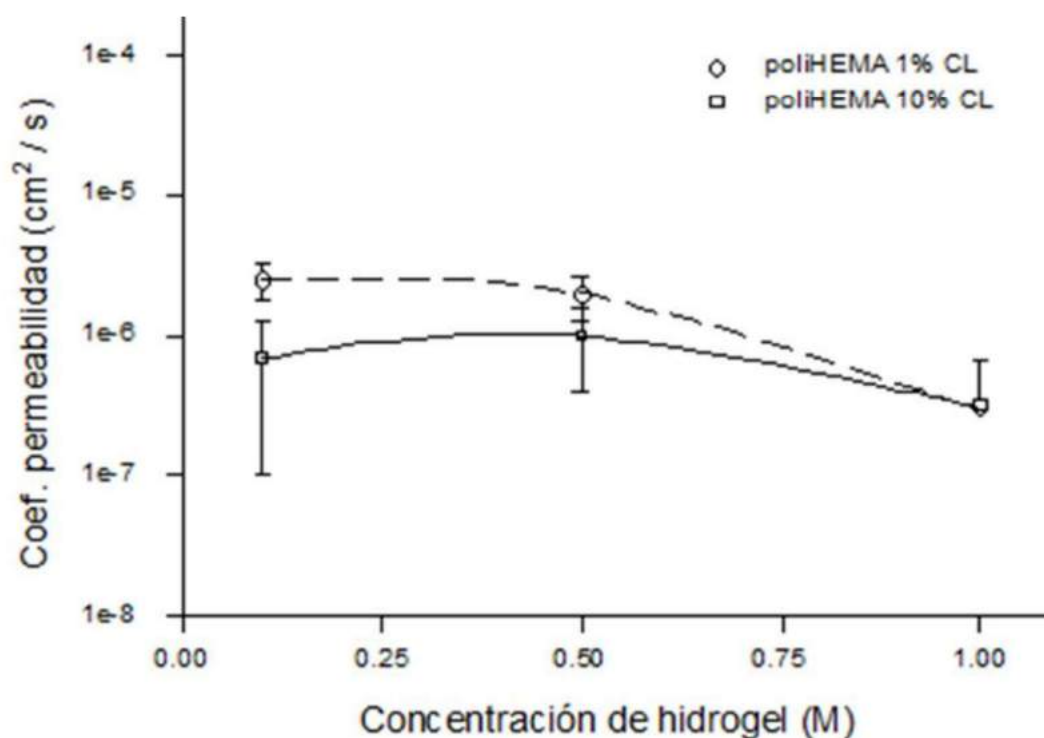


Figura 33: Efecto de la concentración de hidrogel de poliHEMA sobre el coeficiente de permeabilidad a glucosa

Debido a que los polímeros que constituyen estos hidrogeles no interactúan de manera diferente con el soluto que difunde, es posible considerarlos como una red tridimensional que ocupa un volumen, y que los solutos difunden a través de los huecos no ocupados por ella. La permeabilidad depende entonces del volumen hueco del hidrogel y del tamaño del soluto. Estas suposiciones se confirman con los resultados obtenidos para los diferentes solutos presentados en la Tabla 8.

Debe destacarse que las concentraciones ensayadas no son las usuales para la caracterización de la permeabilidad, donde se utilizan concentraciones muy diluidas de soluto, o en su defecto diferentes concentraciones para inferir el efecto de la interacción soluto – soluto. En este caso se eligió trabajar con concentraciones similares a las plasmáticas para hacer un abordaje funcional de la caracterización de las membranas, y eventualmente como se verá más adelante, se comparó lo observado con los resultados hallados en la bibliografía.

3.6.9 Transporte de solutos: Comparación con modelos

Se compararon los resultados experimentales con los modelos teóricos de transporte en geles existentes en la literatura, como una forma de validación de los resultados experimentales obtenidos.

Para realizar una comparación respecto de geles en bloque o confinados en poros se utiliza la difusión efectiva del soluto en el gel, que permite descartar el efecto sobre la transferencia de materia de la membrana propiamente dicha. La difusión efectiva (también definida en la bibliografía como permeabilidad intrínseca) está dada por:

$$D_{ef} = \left[\left(\frac{\varepsilon}{\tau} \right) \frac{1}{L} \right]^{-1} k \quad \text{Ecuación 44}$$

Donde ε es la porosidad de la membrana y τ la tortuosidad y L el espesor de la membrana.

Siendo k_0 la permeabilidad hidráulica de la membrana sin gel, A el área de la membrana utilizada en el ensayo, ε la porosidad superficial (70 % para las membranas utilizadas) y r_{poro} el radio de poro (0,65 μm para las membranas utilizadas). A partir de la Ecuación 6 se obtuvo un valor de tortuosidad de 1,17 para el agua.

Si la ley Darcy (Ecuación 3) es válida en la fase de gel de la membrana, entonces la presión obedece la ecuación de Laplace en los poros rellenos con gel porque $\nabla \cdot \mathbf{v} = 0$. La concentración de soluto dentro de los poros de la membrana sin gel también sigue la ecuación de Laplace en la difusión. Considerando la analogía matemática entre la presión en los experimentos con flujo bajo presión en las membranas con gel y la concentración de soluto dentro de las membranas desnudas en los experimentos de difusión se puede concluir que el factor de tortuosidad es el mismo en ambos procesos. Por lo tanto, considerando la Ecuación 4, la permeabilidad hidráulica del gel en sí mismo ($k_{h,\text{gel}}$) es relativo a la permeabilidad hidráulica de la membrana (k_h) con $\varepsilon/\tau=0,6$.

Para poder hacer una comparación adecuada entre diferentes solutos, se utiliza la relación entre la difusión efectiva y la difusión libre, D_{ef}/D_0 , comparando de esta forma el efecto relativo del gel sobre la difusión de dicho analito. En la Figura 34 se observa el efecto del gel sobre la difusión de la glucosa, HSA e IgG.

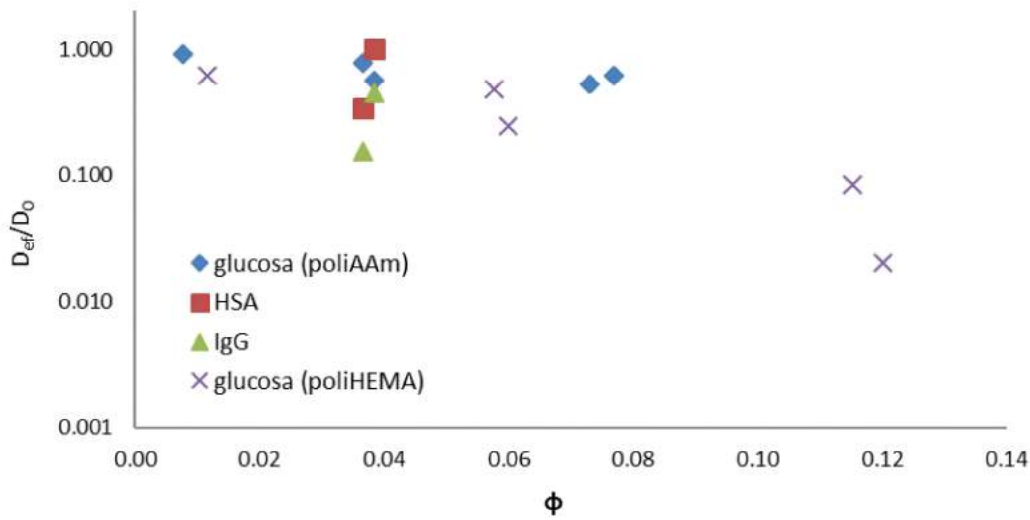


Figura 34: Efecto de la fracción de volumen ocupada por el gel en la difusión relativa de glucosa, HSA e IgG.

En la Figura 34 se observa que en la medida que aumenta la fracción de volumen ocupada por el gel (ϕ) la difusión se ve impedida de mayor manera. A valores altos de ϕ no se obtuvieron datos para HSA e IgG, como es de esperar debido a la relación de tamaños entre las macromoléculas y el espacio menor en el entramado del hidrogel, impidiendo la difusión.

En la Introducción de este Capítulo se presentaron modelos que permiten estimar D^{gel}/D_0 a partir de parámetros del hidrogel, r_s , r_p , k_h y ϕ . En la Figura 35 se presentan, junto con los datos de glucosa en gel de poliAAM, los diferentes valores estimados según diferentes modelos. El modelo de medio efectivo a partir de la ecuación de Brinkman (Brinkman 1949) incluye la permeabilidad hidráulica (k_h) (Ecuación 25). El modelo Brinkman y el modelo Ogston, considera además la fracción de volumen ocupada por el gel (ϕ) y el radio de la cadena de polímero (r_p) se describe a través de la Ecuación 26. Por último, la Ecuación 27 es un modelo mejorado del anterior donde además se considera la tortuosidad del gel.

Utilizando el parámetro D_{ef} , tanto la porosidad de la membrana como así también la tortuosidad son normalizadas. De esta manera D_{ef} representa el producto de la partición del soluto entre el medio y el entramado del gel (K) y el coeficiente de difusión basado en los gradientes de concentración dentro del gel (D^{gel}) (Kim & Anderson, 1991):

$$D_{ef} = K D^{gel} \quad \text{Ecuación 45}$$

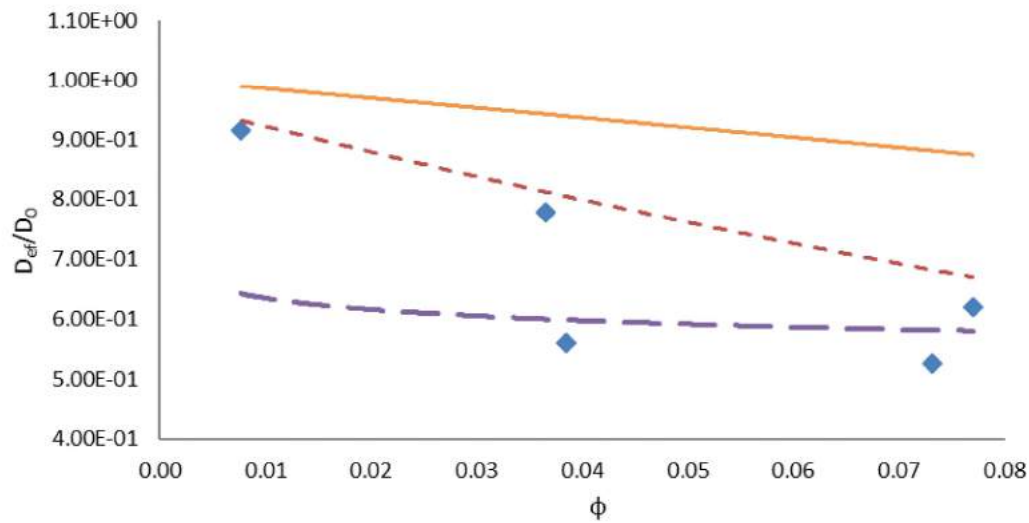


Figura 35: D_{gel}/D_0 para datos propios de glucosa en gel poliAAm $\diamond$, — Modelo de Brinkman (Ecuación 25), --- Modelo Ogston-Brinkman (Ecuación 26), y — modificación de Johnson (Johnson, Berk, Jain, & Deen, 1995) (Ecuación 27).

El coeficiente de partición para un soluto (K) se define como la relación en equilibrio de la concentración de ese soluto en el gel (basado en el volumen total de gel) y la concentración en la solución:

$$K = \frac{C^{gel}}{C^{solución}} \quad \text{Ecuación 46}$$

Donde C está expresado como la concentración del soluto en la fase designada (gel o solución). Si no existen interacciones de atracción entre el soluto y la red del gel, K es menor a 1 porque el volumen ocupado por la red del gel excluye al soluto en función de su tamaño. Este efecto de exclusión por tamaño depende de la fracción de volumen que ocupa la red polimérica (ϕ), el radio de las cadenas del polímero, y el tamaño y la forma del soluto. Se espera que el gel tenga mayor efecto en la difusión de solutos mayores, cuyo tamaño sea comparable con la distancia media entre las cadenas, la cual se encuentra en el orden de $\sqrt{k_h}$.

De acuerdo a la Figura 34, el hidrogel de poliHEMA muestra una importante dependencia de D_{ef}/D para la glucosa (solutos de bajo PM) con el ϕ en el rango estudiado. Para el caso de la poliAAm este efecto es prácticamente despreciable. El efecto se hace más evidente en poliAAm cuando se utiliza un soluto de alto PM. Mayor PM mayor es la disminución de D_{ef}/D para el mismo hidrogel (poliAAm).

El efecto de la obstaculización del gel en la difusión de solutos es considerado en el modelo de exclusión de volumen desarrollado por Ogston (Ogston 1958), que tiene en cuenta los tamaños relativos de los solutos (r_s), el entramado del gel (radio de la cadena de polímero, r_p) y la fracción de volumen ocupada por el mismo (φ). Kapur correlacionó este grupo de parámetros con la difusión relativa de los solutos, según la Ecuación 47 (Kapur, Charkoudian *et al.* 1997):

$$\frac{D_{ef}}{D_0} = \exp \left[\frac{1,365}{0,34 + \ln(r_s/r_p \varphi)} \right] \quad \text{Ecuación 47}$$

En la Figura 36 se representa la curva correspondiente a la Ecuación 47 según los datos de los hidrogeles de poliAAm y los datos experimentales de difusión relativa de glucosa, HSA e IgG.

A modo de comparación también se agregaron los datos experimentales obtenidos por Kapur para la RNAasa y BSA (Kapur, Charkoudian, & Anderson, 1997). Se consideró que el radio de giro de la cadena de poliAAm es $r_p = 6 \text{ \AA}$ (Sellen, 1987). En dicho gráfico se observa un excelente ajuste de la Ecuación 47 que como se explicó previamente, permite comparar solutos de diferentes tamaños (r_s) difundiendo en geles constituidos por cadenas de polímero de diferente radio (r_p).

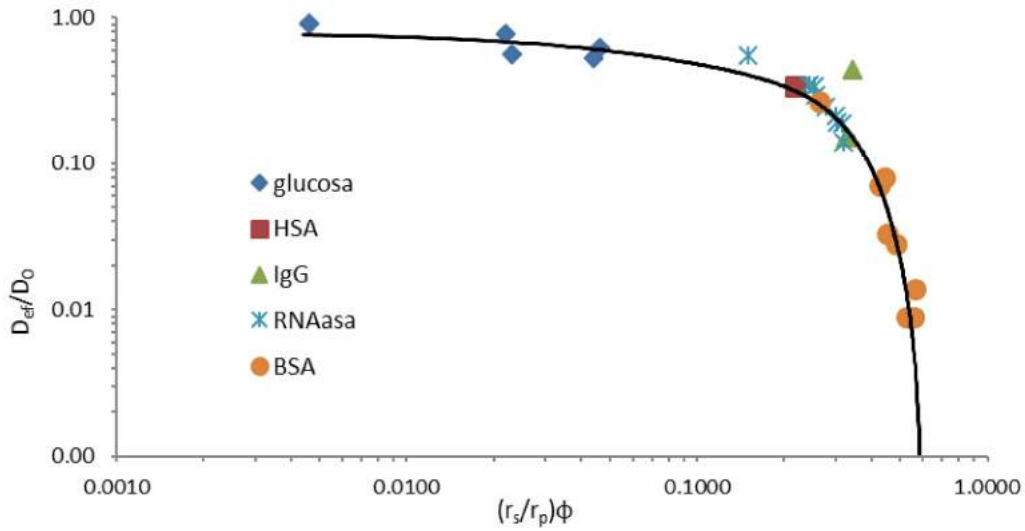


Figura 36: Efecto de la obstaculización del gel en la difusión relativa de solutos según el modelo de exclusión de volumen (Modelo de Ogston)

En este modelo, se puede correlacionar los parámetros r_p y φ , considerando al hidrogel como un modelo con retículos cúbicos uniformes formados por cilindros de radio r_p que se intersectan (Kapur *et al.*, 1997). Por lo tanto, la dimensión del retículo ξ se puede estimar por:

$$\xi = r_p \sqrt{\frac{3\pi}{\phi}}$$

Ecuación 48

Para una fracción de volumen de gel de $\varphi=0,04$ los hidrogeles tendrían un reticulado de 92 Å, (45 Å de radio). El radio hidrodinámico de la IgG es levementemente mayor a este reticulado (ver Tabla 6), sin embargo, experimentalmente se observa difusión a través del hidrogel (No se está tomando en cuenta que la IgG es una molécula asimétrica).

Kapur (Kapur, Charkoudian *et al.*, 1997) observó este mismo fenómeno para geles de poliAAM ($r_p=6$ Å y $\varphi=0,08$) con un tamaño calculado de reticulado de 65 Å, donde la esfera de mayor tamaño que puede entrar en ese espacio tendría un radio de 32 Å y sin embargo, fue observado que la BSA ($r_s=36$ Å) puede atravesar este hidrogel. Al igual que lo descrito por Kapur y Tong (Tong & Anderson, 1996) se observó pasaje de macromoléculas mayores al tamaño del retículo, como la IgG (53 Å).

Por lo tanto, el modelo de gel reticulado uniforme no puede explicar completamente la partición y transporte de macromoléculas; en su lugar se debe tener en cuenta la distribución de los espacios fluidos dentro de cualquier estructura de gel. Si bien los geles de poliAAM son considerados homogéneos en cuanto a su estructura, en relación a otros geles, hay distribuciones en el espacio entre cadenas que resulta del movimiento Browniano de las cadenas de polímero (Sellen, 1987) y heterogeneidades estructurales creadas por las reacciones de entrecruzamiento.

3.6.10 Determinación de la selectividad

Conociendo las permeabilidades para los diferentes solutos, se pueden determinar las relaciones entre ellas para un hidrogel dado. El cociente entre las permeabilidades para dos solutos corresponde a la selectividad del primero sobre el segundo: La selectividad del soluto A sobre el soluto B será igual a P_A / P_B . Como consecuencia de un transporte selectivo, se puede lograr que la relación entre las concentraciones de dos solutos sea diferente a ambos lados de la membrana en condiciones fuera del equilibrio químico.

Tabla 8: Resumen permeabilidad y selectividad para membranas de poliAAm.

Membrana	Permeabilidad ($\times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)			Selectividad	Selectividad
	glucosa	HSA	IgG	Glucosa / IgG	HSA / IgG
poliAAm 0,1 M 1 %	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
poliAAm 0,1 M 10 %	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
poliAAm 0,5 M 1 %	2,67	0,12	0,055	48,54	2,18
poliAAm 0,5 M 10 %	2,29	0,36	0,16	14,31	2,24
poliAAm 1 M 1 %	2,72	<0,0001	<0,0001	-	-
poliAAm 1 M 10 %	2,85	<0,0001	<0,0001	-	-

n.d.: no determinado porque las membranas presentaban permeabilidad hidr nica.

<0,0001: por debajo del límite de detección

3.6.11 Selectividad: comparación con modelos de literatura

En cuanto a la selectividad, se observó que la relación entre las permeabilidades $P_{\text{glucosa}}/P_{\text{IgG}}$ respecto de P_{IgG} y $P_{\text{HSA}}/P_{\text{IgG}}$ respecto de P_{IgG} disminuyen, y que las propiedades de transporte de los hidrogeles estudiados (contenidos en los poros de membranas) es consistente con la caracterización de hidrogeles en membranas y como bloques caracterizados por otros autores; en la Figura 37 se comparan los datos experimentales propios con los obtenidos por Dai y Barbari (Dai and Barbari 2000), quienes sintetizaron un hidrogel de PVA en los poros de una membrana en configuración de fibra hueca.

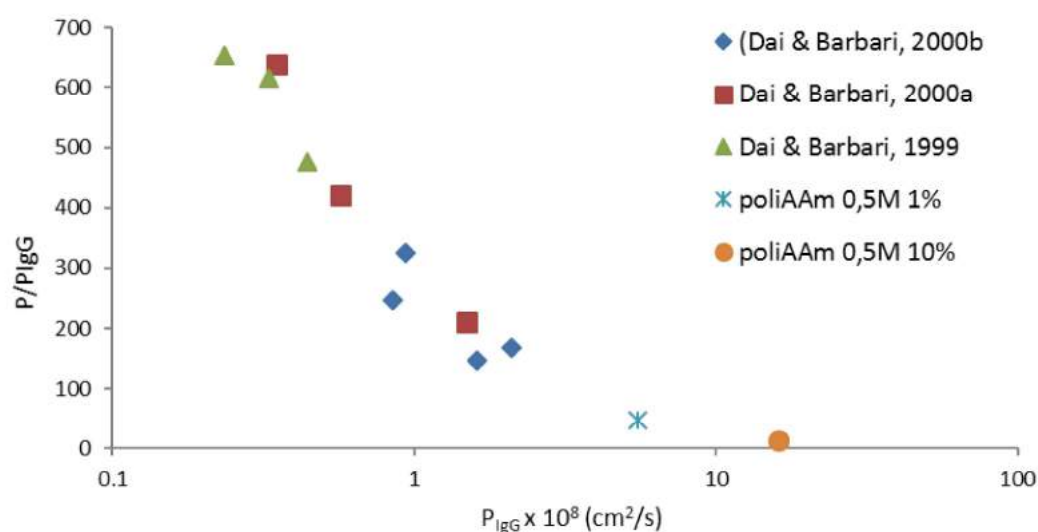


Figura 37: Selectividad de las membranas, de $P_{\text{creatinina}}/P_{IgG}$ vs P_{IgG} para hidrogeles de PVA en bloque (Dai & Barbari, 1999), para membranas impregnadas con hidrogel de PVA (Dai & Barbari, 2000a) y para fibras huecas con hidrogel de PVA (Dai & Barbari, 2000b). Selectividad de las membranas desarrolladas en este trabajo, de $P_{\text{glucosa}}/P_{IgG}$ vs P_{IgG} con hidrogel de poliAAm de 0,5 M y 1 % y 10 % de entrecruzamiento

En este gráfico (Figura 37) se observa una excelente correlación para la relación $P_{\text{glucosa}}/P_{IgG}$ vs P_{IgG} para las membranas con hidrogel de poliAAm 0,5 M con la relación $P_{\text{creatinina}}/P_{IgG}$ vs P_{IgG} para hidrogeles de PVA, polimerizados en bloque o impregnados en membranas. Esta correlación indica que las propiedades de transporte de las membranas mencionadas son consistentes entre sí.

3.6.12 Transferencia de plasma sanguíneo

Para contextualizar el análisis de transporte de solutos en una situación más próxima a una aplicación práctica (con la utilización de plasma sanguíneo), se utilizó el diseño experimental esquematizado en la Figura 16 para la determinación del transporte de macromoléculas a través de una membrana ocluida con hidrogel utilizando como solución dadora plasma humano (diluido hasta lograr una concentración normal de proteínas en sangre). A diferentes intervalos de tiempo fueron recolectadas fracciones en el vaso receptor y posteriormente analizado el contenido de proteínas mediante la técnica de EC. En la Figura 38 se muestran como ejemplo electroferogramas del perfil proteico obtenido para diferentes muestras.

Como se observa en la Figura 38, la fracción correspondiente a la HSA aumenta notablemente en el tiempo, entre los 30 y 200 minutos del experimento, las IgG en cambio, se mantienen constantes en las mismas muestras analizadas y comienza a difundir a partir de los 150 min.

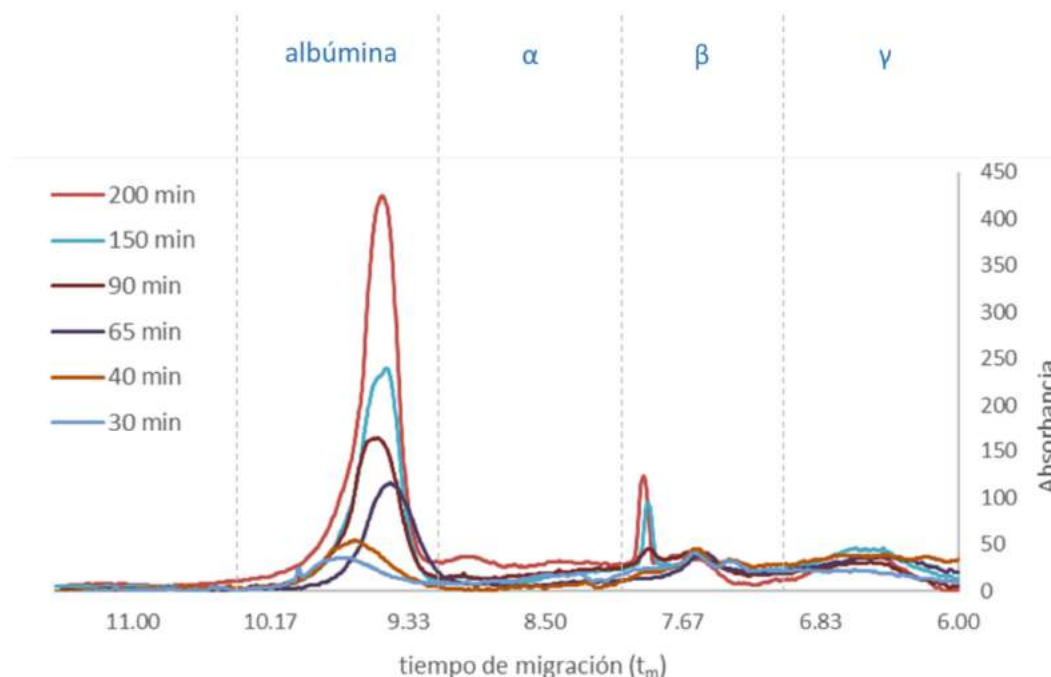


Figura 38: Electroferogramas del perfil proteico de la solución receptora en un experimento de difusión sobre una membrana con un hidrogel de poliAAm 0,5 M y 1% entrecruzamiento.

A partir de las áreas de los electroferogramas se calcularon la permeabilidad para la fracción correspondiente a la HSA y la fracción correspondiente a las IgG, obteniéndose una selectividad aproximada de 1,81 para la fracción con HSA respecto de la fracción con IgG. Este valor fue ligeramente menor al obtenido en los ensayos de transferencia de solutos (Tabla 8). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este caso se está utilizando el plasma completo como muestra, donde existen una importante cantidad de otras proteínas que pueden afectar la difusión de las mismas.

3.6.13 Transferencia de oxígeno

Las determinaciones de transferencia de oxígeno fueron realizadas con el objetivo de tener una estimación experimental de este parámetro para el módulo a desarrollar en este trabajo. El objetivo fue obtener datos aproximados que permitan dimensionar el sistema de aireación del biorreactor, en función de la densidad celular y el consumo de oxígeno.

3.6.14 Método de Oxidación de sulfito y Balance gaseoso

Estos métodos se aplicaron en simultáneo en 10 experiencias utilizando el sistema descrito en la Figura 18. En el caso del método de Balance gaseoso, se observaron resultados muy dispersos por lo que no fueron tomados en cuenta. El origen de estas fluctuaciones es probablemente

una consecuencia de la introducción de errores en las mediciones debido a la baja sensibilidad del analizador de gases a caudales bajos. Para corroborar esto se calculó el arrastre del error en el cálculo, en las condiciones experimentales. Se comprobó que una variación del 1 % en la determinación de la fracción de oxígeno en el aire de entrada puede resultar en alteraciones de hasta el 70 % en la estimación del $k_L a$.

Considerando el método de Oxidación de sulfito, la medida del $k_L a$ obtenida fue de 175 h^{-1} con un error estimado del 10 %.

3.6.15 Método dinámico (*Gassing in*)

El método, así como fue descrito en la Introducción de este Capítulo, se aplica a reactores trabajando en lotes. En nuestro caso, al tratarse del estudio de fibras huecas se debió asimilar la situación a un sistema continuo, considerando además una membrana (Figura 39).

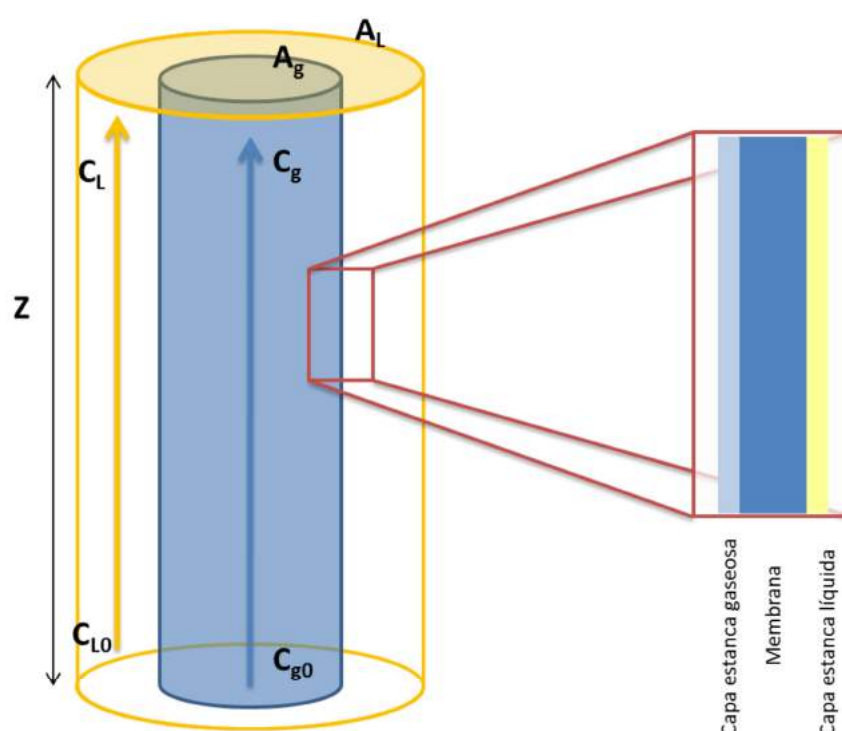


Figura 39: Esquema de la transferencia de oxígeno a través de la membrana

Las formulas se adaptaron de la siguiente manera: El flujo en el interior del tubo puede suponerse pistón (eventualmente con dispersión axial).

Según la ley de Henry: $P_g = C_g RT = C^* H$

$$C^* = C_g RT / H$$

$$R_{O_2} = k_L a (C^* - C_L)$$

Ecuación 49

k_L es el coeficiente de transferencia ligado a la capa límite formada por el líquido, que depende del caudal del líquido y la difusividad del gas en el líquido.

$k_L = f(F_L)$ si $F_L = \text{constante}$. entonces $k_L = \text{constante}$.

Otra barrera para la transferencia es la membrana en sí misma, que la representamos con k_m . Si k_m es una constante asociada a la membrana, se puede asumir que $k_T = f(k_L, k_m) = \text{cte}$.

$$R_{O_2} = k_T a (C^* - C_L)$$

Ecuación 50

Se supone flujo pistón para gas y el líquido.

$A = \text{área transversal}$

$$\frac{F_g}{A_g} \frac{dC_g}{dz} = -k_T a_T \left(C_g \frac{RT}{H} - C_L \right)$$

Ecuación 51

$$\frac{F_L}{A_L} \frac{dC_L}{dz} = +k_T a_T \left(C_g \frac{RT}{H} - C_L \right) - r_{O_2}$$

Ecuación 52

Si F_g es lo suficientemente grande se puede considerar $C_g = \text{constante}$ para todo Z .

$C_L = 0$ en $Z=0$ porque el agua que ingresa al sistema es gaseada previamente con N_2 para eliminar el aire (oxígeno).

$$F_g \begin{cases} \text{aire} \\ O_2 \text{ puro} \end{cases} \quad \frac{F_L}{A_L} \frac{dC_L}{dz} = +k_T a_T (C^* - C_L) - r_{O_2}$$

Ecuación 53

En este método el oxígeno no se consume, por lo que $r_{O_2} = 0$.

$$\therefore \frac{F_L}{A_L} \frac{dC_L}{dz} = +k_T a_T (C^* - C_L)$$

Ecuación 54

$A_L = \text{área de transferencia del tubo con líquido}$

$L = \text{largo del tubo}$.

$$\frac{dC_L}{(C^* - C_L)} = \frac{k_T a_T A_L}{F_L} dz$$

$$C_L = C^* \left(1 - e^{-\frac{k_T a_T A_L Z}{F_L}} \right) \quad \text{Ecuación 55}$$

Para $Z = L$:

$$\ln \left(\frac{C^* - C_L(L)}{C^*} \right) = -\frac{k_T a_T A_L L}{F_L} \quad \text{Ecuación 56}$$

(C^* puede se puede aumentar con oxígeno puro)

A partir de la Ecuación 56:

$$k_T a_T = -\ln \left(\frac{C^* - C_L(L)}{C^*} \right) \frac{F_L}{A_L L} \quad \text{Ecuación 57}$$

El factor crítico a fue asegurar un flujo pistón de gases y líquido para no provocar un error experimental relevante. Las medidas fueron confiables cuando el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno es menor al $k_L a^{-1}$. Considerando este requisito, el $k_L a$ se estimó en 175 h^{-1} con un error del 15 %.

Como resumen de la determinación de la transferencia de oxígeno a través de las membranas incluidas con hidrogel de poliAAm, obtuvo un valor de $k_L a$ de 175 h^{-1} determinado por dos métodos diferentes (oxidación de sulfito y *gassing-in*). El tercer método, el método del balance gaseoso, no permitió obtener valores confiables debido a la baja precisión. A partir de la superficie total de intercambio de gases, se calculó un k_L de $72,2 \text{ h}^{-1} \text{cm}^{-1}$, medida que puede utilizarse para posteriores diseños.

3.7 CONCLUSIONES

En este Capítulo se describe la preparación y caracterización de membranas difusivas a partir de membranas de MF y la síntesis de un hidrogel ocluyendo los poros de la misma.

Las membradas con hidrogel se caracterizaron por espectroscopia infrarroja, donde se comprobó la presencia del hidrogel. Se utilizó microscopia SEM para observar los cambios ocurridos en la superficie y corte de las membranas.

Para evaluar la funcionalidad se diseñó un sistema experimental para determinar la permeabilidad hidráulica y otro para la permeabilidad a glucosa, HSA e IgG. La permeabilidad a proteínas de plasma sanguíneo humano se comprobó con electroforesis capilar. Se estimaron los valores de selectividad para las membranas utilizadas, lográndose una selectividad mayor de dos para la albumina respecto de las IgGs. Este resultado fue corroborado con una muestra de plasma humano.

Adicionalmente debe destacarse que las primeras inmunoglobulinas en reaccionar frente a componentes xenogénicos son las correspondientes a las IgM (Karoor, Molina *et al.* 2003). Estas IgM son las que activan el sistema de complemento luego del contacto con células xenogénicas llevando a la destrucción total del componente biológico extraño en unas pocas horas. Estas IgM xenorreactivas representan < 0,1 % de las inmunoglobulinas totales (las IgG representan el 85 %), y tienen un PM mayor a seis veces (950 kDa frente a 150 kDa), por lo que se espera que la exposición de los esferoides hepáticos a dichas inmunoglobulinas sería prácticamente despreciable.

Respecto de los datos de transferencia de masa determinados se compararon los valores obtenidos con valores de literatura para membranas similares (según el concepto membranas macroporosas con hidrogel). Para ello, debe tenerse en cuenta que, como fue demostrado por Righetti (Righetti, Gelfi *et al.* 1981), los geles aún de la misma composición, que fueron sintetizados con diferentes iniciadores pueden tener diferentes propiedades. Es por ello que se compararon los resultados obtenidos con los de otros autores a través de diferentes modelos, que permitieron contrastar las mediciones de permeabilidad hidráulica y permeabilidad a solutos, aun tratándose de condiciones diferentes (membranas, monómeros, polimerización y moléculas que difunden). A partir de las correlaciones analizadas, se observó que las variables importantes para la comparación entre diferentes ensayos son los radios de cadena de polímero y de soluto, junto a la fracción de volumen ocupada por el gel. Se demostró que los resultados hallados en los geles confinados son consistentes con otras configuraciones, como por ejemplo los geles en membranas planas e incluso geles en bloque.

Finalmente se obtuvo una estimación de la transferencia de oxígeno, por el método de Oxidación del sulfito y el método de *gassing in*, adaptados al sistema experimental planteado en este trabajo de tesis, resultando en un k_L de $72,2 \text{ h}^{-1}$.

3.8 REFERENCIAS

- An, Y., & Hubbell, J. A. (2000). Intraarterial protein delivery via intimately-adherent bilayer hydrogels. *Journal of Controlled Release*, 64(1–3), 205-215.
- Belfer, S., R. Fainchtein, Y. Purinson and O. Kedem (2000). Surface characterization by FTIR-ATR spectroscopy of polyethersulfone membranes-unmodified, modified and protein fouled. *Journal of Membrane Science* 172(1–2): 113-124.
- Bottino, A., G. Capannelli, V. D'Asti and P. Piaggio (2001). Preparation and properties of novel organic–inorganic porous membranes. *Separation and Purification Technology* 22–23(0): 269-275.
- Bowen, W. R., N. Hilal, R. W. Lovitt and P. M. Williams (1996). Atomic Force Microscope Studies of Membranes: Surface Pore Structures of Diaflo Ultrafiltration Membranes. *Journal of Colloid and Interface Science* 180(2): 350-359.
- Campoccia, D., Doherty, P., Radice, M., Brun, P., Abatangelo, G., & Williams, D. F. (1998). Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*, 19(23), 2101-2127.
- Chahboun, A., Coratger, R., Ajuston, F., Beauvillain, J., Aimar, P., & Sanchez, V. (1992). Comparative study of micro- and ultrafiltration membranes using STM, AFM and SEM techniques. *Ultramicroscopy*, 41(1–3), 235–244.
- Charcosset, C., & Bernengo, J. C. (2000). Comparison of microporous membrane morphologies using confocal scanning laser microscopy. *Journal of Membrane Science*, 168(1–2), 53–62.
- Colton, C. K. (1995). Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplantation*, 4(4), 415-436.
- Cooper, C. M., Fernstrom, G. a., & Miller, S. a. (1944). Performance of Agitated Gas-Liquid Contactors. *Industrial & Engineering Chemistry*, 36, 504–509.
- Cruise, G. M., Hegre, O. D., Lamberti, F. V., Hager, S. R., Hill, R., Scharp, D. S., & Hubbell, J. A. (1999). *In vitro* and *in vivo* performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly (ethylene glycol) diacrylate membranes. *Cell Transplant*, 8(3), 293-306.
- Dai, W. S., & Barbari, T. A. (1999). Hydrogel membranes with mesh size asymmetry based on the gradient crosslinking of poly (vinyl alcohol). *Journal of Membrane Science*, 156(1), 67-79.
- Dai, W. S., & Barbari, T. A. (2000). Gel-impregnated pore membranes with mesh-size asymmetry for biohybrid artificial organs. *Biomaterials*, 21(13), 1363-1371.

- Dai, W. S., & Barbari, T. A. (2000). Hollow fiber-supported hydrogels with mesh-size asymmetry. *Journal of Membrane Science*, 171(1), 79–86.
- Ding, H., & Cussler. (1991). Fractional extraction with hollow fibers with hydrogel-filled walls (Vol. 37). Hoboken, NJ, United States: Wiley.
- Drumheller, P. D., & Hubbell, J. A. (1995). Densely crosslinked polymer networks of poly (ethylene glycol) in trimethylolpropane triacrylate for cell-adhesion-resistant surfaces. *J Biomed Mater Res*, 29(2), 207-215.
- Elisseeff, J., McIntosh, W., Anseth, K., Riley, S., Ragan, P., & Langer, R. (2000). Photoencapsulation of chondrocytes in poly (ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks. *J Biomed Mater Res*, 51(2), 164-171.
- Fritzche, A. K., Arevalo, A. R., Connolly, A. F., Moore, M. D., Elings, V., & Wu, C. M. (1992). Structure and morphology of the skin of polyethersulfone ultrafiltration membranes: a comparative atomic force microscope and scanning electron microscope study. *Journal of Applied Polymer Science*, 45(11), 1945–1956.
- Funatsu, K., & Nakazawa, K. (2002). Novel hybrid artificial liver using hepatocyte organoids. *Int J Artif Organs*, 25(2), 77-82.
- Goldstein, J., Newbury, D., Joy, D., Lyman, C., Echlin, P., Lifshin, E., ... Michael, J. (2003). Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. In *Scanning Electron Microscopy* (Vol. 1, p. 689).
- Grasselli, M., Navarro del Cañizo, A. n. A., Camperi, S. A., Wolman, F. J., Smolko, E. E., & Cascone, O. (1999). Immobilized metal ion affinity hollow-fibre membranes obtained by the direct grafting technique. *Radiation Physics and Chemistry*, 55(2), 203-208.
- Hill-West, J. L., Chowdhury, S. M., Sawhney, A. S., Pathak, C. P., Dunn, R. C., & Hubbell, J. A. (1994). Prevention of postoperative adhesions in the rat by *in situ* photopolymerization of bioresorbable hydrogel barriers. *Obstet Gynecol*, 83(1), 59-64.
- Hill-West, J. L., Chowdhury, S. M., Slepian, M. J., & Hubbell, J. A. (1994). Inhibition of thrombosis and intimal thickening by *in situ* photopolymerization of thin hydrogel barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(13), 5967-5971.
- Johnson, E. M., Berk, D. A., Jain, R. K., & Deen, W. M. (1995). Diffusion and partitioning of proteins in charged agarose gels. *Biophysical Journal*, 68(4), 1561–1568.
- Kapur, V., Charkoudian, J. C., Kessler, S. B., & Anderson, J. L. (1996). Hydrodynamic Permeability of Hydrogels Stabilized within Porous Membranes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 35(9), 3179-3185.
- Kapur, V., Charkoudian, J., & Anderson, J. L. (1997). Transport of proteins through gel-filled porous membranes. *Journal of Membrane Science*, 131(1-2), 143-153.
- Karoor, S., Molina, J., Buchmann, C. R., Colton, C., Logan, J. S., & Henderson, L. W. (2003). Immunoaffinity removal of xenoreactive antibodies using modified dialysis or microfiltration membranes. *Biotechnol Bioeng*, 81(2), 134-148.

- Koros, W. J., Ma, Y. H., & Shimidzu, T. (1996). Terminology for membranes and membrane processes (IUPAC Recommendations 1996). *Journal of Membrane Science*, 120(2), 149-159.
- Mulder, M. (1996). *Basic principles of membrane technology*. Kluwer Academic Publishers.
- Naughton, G. K. (2002). From lab bench to market: critical issues in tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci*, 961, 372-385.
- Nguyen, K. T., & West, J. L. (2002). Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23(22), 4307-4314.
- Odian, G. (2004). *Radical Chain Polymerization. Principles of Polymerization* (Vol. 58).
- Pathak, C. P., Sawhney, A. S., & Hubbell, J. A. (1992). Rapid photopolymerization of immunoprotective gels in contact with cells and tissue. *Journal of the American Chemical Society*, 114(21), 8311-8312.
- Peppas, N. A., Keys, K. B., Torres-Lugo, M., & Lowman, A. M. (1999). Poly (ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery. *J Control Release*, 62(1-2), 81-87.
- Perry, R. H., & Green, D. W. (2007). *Perry's Chemical Engineers' Handbook*: McGraw-Hill Professional Publishing.
- Pihlajamäki, A., P. Väisänen and M. Nyström (1998). Characterization of clean and fouled polymeric ultrafiltration membranes by Fourier transform IR spectroscopy–attenuated total reflection. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 138(2–3): 323-333.
- Ratcliffe, A., & Niklason, L. E. (2002). Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci*, 961, 210-215.
- Rosiak, J., Olejniczak, J., & Charlesby, A. (1988). Determination of the radiation yield of hydrogels crosslinking. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 32(5), 691-694.
- Rozga, J., Holzman, M. D., Ro, M. S., Griffin, D. W., Neuzil, D. F., Giorgio, T., Demetriou, A. A. (1993). Development of a hybrid bioartificial liver. *Ann Surg*, 217(5), 502-509; discussion 509-511.
- Rozga, J., Williams, F., Ro, M. S., Neuzil, D. F., Giorgio, T. D., Backfisch, G., Demetriou, A. A. (1993). Development of a bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. *Hepatology*, 17(2), 258-265.
- Sardonini, C. A., & Dibiasio, D. (1992). An investigation of the diffusion-limited growth of animal cells around single hollow fibers. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(10), 1233-1242.
- Schossig-Tiedemann, M., & Paul, D. (2001). Improved preparation of membrane surfaces for field-emission scanning electron microscopy. *Journal of Membrane Science*, 187(1–2), 85–91.
- Strathmann, H., & Gohl, H. (1990). Membranes for blood purification: state of the art and new developments. *Contrib Nephrol*, 78, 119-140; discussion 140-111.

- Suggs, L. J., & Mikos, A. G. (1999). Development of poly (propylene fumarate-co-ethylene glycol) as an injectable carrier for endothelial cells. *Cell Transplant*, 8(4), 345-350.
- Suryanarayan, S., Mika, A., & Childs, R. (2006). Gel-filled hollow fiber membranes for water softening. *Journal of Membrane Science*, 281(1-2), 397-409.
- Wichterle, O., & Lim, D. (1960). Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*, 185(4706), 117-118.
- Zielinski, B. A., & Lysaght, M. J. (2000). Chapter 26 - Immunoisolation. In P. L. Robert, L. Robert, R. L. Joseph VacantiA2 - Robert P. Lanza & V. Joseph (Eds.), *Principles of Tissue Engineering* (Second Edition) (pp. 321-329). San Diego: Academic Press

4 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL COMPONENTE BIOLÓGICO

La selección del componente biológico a utilizar en un dispositivo de remplazo hepático debe considerar la eficiencia para proveer funciones hepáticas específicas, sus potenciales efectos adversos y su disponibilidad (A. Lorenti *et al.*, 2005).

Como se describió en la Introducción General, el cultivo primario humano es la mejor opción en cuanto a la funcionalidad, pero debe considerarse que la procuración es tan limitada como los órganos para trasplante de hígado completo (Barbich *et al.*, 2004).

La alternativa más cercana es la utilización de un cultivo primario de células animales. El animal de elección suele ser el cerdo, dado que su hígado tiene similitud anatómica al hígado humano, y pueden conseguirse criaderos con las condiciones de bioseguridad adecuadas.

Posteriormente se debe considerar el modo de uso de las células, ya sea simplemente aisladas o mediante un cultivo previo. Se sabe que el cultivo de hepatocitos es influenciado por la matriz extracelular, el contacto célula-célula, factores de crecimiento, reguladores, condiciones de cultivo que determinan la viabilidad y crecimiento celular.

Las células hepáticas tienen un mayor potencial para recuperar las características originales en cultivo cuando son co-cultivadas con células no parenquimales. De hecho, se ha demostrado que tanto la supervivencia como varias funciones de los hepatocitos *in vivo* son reguladas a través de interacciones célula - célula, y la estabilidad de las funciones solo se mantiene cuando las células conservan la regulación compleja que les brinda su microentorno (Bader *et al.*, 1996; Nakamura, Yoshimoto, Nakayama, Tomita, & Ichihara, 1983)

Es por ello que para la realización de este trabajo durante el aislamiento no se realizó una selección específica de un tipo celular. Es más, durante el cultivo se favorecieron la formación de agregados multicelulares, llamados esferoides, con características morfológicas bien definidas y la funcionalidad específica necesaria. Previamente en el ICBME se realizaron cultivos de esferoides hepáticos (Lorenti, 2005), que fueron caracterizados en cuanto a su ultraestructura y metabolismo.

Los hepatocitos que conforman el esferoide presentan una estructura compacta con gran concentración de uniones estrechas que, junto a la ausencia de una red vascular, presentan un obstáculo para la transferencia de materia, especialmente relevante para la transferencia de oxígeno.

El objetivo en esta etapa fue la caracterización del componente biológico (esferoides hepáticos) en cuanto a sus cinéticas de detoxificación y consumo de nutrientes, con el fin de estimar la biomasa necesaria en un tratamiento de un paciente con falla hepática, así como las necesidades nutricionales celulares. Sólo a partir de esta información puede realizarse un escalado adecuado considerando conjuntamente el componente sintético.

4.1.1 Estado fisiológico de los hepatocitos

Se puede evaluar el estado fisiológico de las células que forman los esferoides a partir de la cuantificación de enzimas hepáticas, de la misma manera que se suele utilizar en bioquímica clínica para evaluar el estado del hígado del paciente. En este caso, nos brindan información adicional sobre la viabilidad y funcionalidad de los esferoides hepáticos.

4.1.2 Consumo de oxígeno

La velocidad de consumo de oxígeno de los esferoides hepáticos es un parámetro importante para el diseño de un dispositivo de remplazo hepático. El biorreactor, debe estar diseñado de manera de asegurar las condiciones óptimas de viabilidad y funcionalidad adecuadas del componente celular, en este caso, los esferoides hepáticos.

El oxígeno, si bien es requerido para la viabilidad y crecimiento celular, puede ser tóxico a altas concentraciones. Los efectos de diferentes concentraciones de oxígeno, expresadas en presión parcial de oxígeno (mm Hg) sobre distintas propiedades de células cultivadas están expresadas en la Tabla 9.

Tabla 9: Efectos de la presión parcial de oxígeno (mm Hg) sobre células en cultivo

Tipo celular	Efecto negativo sobre el crecimiento	Sin efecto
TK6 (Oller, Buser, Tyo, & Thilly, 1989)	>510	80-425
Vero (Oller, Buser, Tyo, & Thilly, 1989)	>310	80-215
SP2/0 hibridoma (Oller, Buser, Tyo, & Thilly, 1989)(Miller <i>et al</i> 1988)	>425	80-310
Hibridoma murino (Meilhoc, Wittrup, & Bailey, 1990) (Ozturk & Palsson, 1990)	143	7,5-135
Hibridoma murino/humano (Kilburn, Lilly & Webb, 1969)	<1,6; >320	12-160

Como se observa en la Tabla 9 el valor puede ser muy diferente según la especie y tipo celular. Las líneas celulares establecidas serían más adaptables a un rango amplio de presión parcial de oxígeno (~15-90 %), mientras que los cultivos primarios sobreviven mejor a menores presiones parciales de oxígeno, entorno más similar a las condiciones *in vivo*. Respecto de la velocidad específica de consumo de oxígeno q_{O_2} , en la Tabla 10 se resumen los datos encontrados en literatura.

Tabla 10: Velocidades específicas de consumo de oxígeno reportada en bibliografía (Wood, 1999)

Línea celular	$q_{O_2} \times 10^{-12}$ (mol O ₂ .cel ⁻¹ 1h ⁻¹)
KSI/4 (hibridoma) (Backer, Metzger, Slaber, Nevitt, & Boder, 1988)	0,15-0,16
NB1 (hibridoma) (Boraston, Thompson, Garland, & Birch, 1983)	0,21-0,25
C1a (hibridoma) (Dorresteyn, de Gooijer, Tramper, & Beuvery, 1994)	0,234±0,014
FS-4 (células humanas diploides) (Fleischaker & Sinskey, 1981)	0,05
AB2-143.2 (hibridoma) (Miller, Wilke, & Blanch, 1987)	0,19-0,4
167.AG5.3 (hibridoma) (Ozturk & Palsson, 1990)	0,023-0,087
HB-32 (hibridoma) (Ramirez & Mutharasan, 1990)	0,33-0,37
Hibridoma (Singh, 1996)	0,15
NSO (mieloma) (Yoon & Konstantinov, 1994)	0,219-0,406
MAK (hibridoma) (Zhou & Hu, 1994)	0,46±0,05
X-D (hibridoma) (Hiller, Aeschlimann, Clark, & Blanch, 1991)	0,23-0,42

La q_{O_2} cobra mayor importancia en cultivos celulares densos, y en este caso en particular, al tratarse de una conformación tridimensional, es importante que el oxígeno llegue hasta las células centrales del esferoide.

De lo mencionado se deduce la importancia de conocer el requerimiento de q_{O_2} de las células o tejido a utilizar. Si se diseña el dispositivo que oxigene por debajo de los valores adecuados se generarían zonas donde las células estén hipo-metabólicas o inviables debido a la baja tensión de oxígeno; en cambio si el dispositivo está muy oxigenado, podría ser tóxico para las células afectando su viabilidad.

4.1.2.1 Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno

Los métodos manométricos para estimar el intercambio de gases se han utilizado durante décadas para estudiar reacciones químicas y biológicas. El instrumento que se utilizó en este trabajo de tesis es conocido como “respirómetro de Warburg” (Warburg *et al*, 1926). Se trata de un método basado en el principio de que, a temperatura constante y volumen de gas constante, cualquier cambio en la cantidad de gas puede ser medido como cambios en la presión del mismo. Inicialmente fue desarrollado por Barcroft y Haldane (1902) y Brodie (1910), y modificado por fisiólogo alemán Otto Heinrich Warburg.

Este tipo de respirómetros es del tipo GSS (clasificación de la IWA - *International Water Association*), en el que la medida de la concentración de oxígeno se realiza de manera indirecta y tanto la muestra líquida como el gas permanecen de manera estática en el interior del recipiente, sin que exista renovación alguna de ambos durante la determinación respirométrica.

El aparato (Figura 40) consiste en un frasco desacoplable, algunas veces conectados a uno o más reservorios laterales, unido a un manómetro que contiene un líquido de densidad conocida.

4.1.2.2 Principios generales

El oxígeno utilizado se mide con respecto al tiempo, registrando la disminución de presión en el recipiente donde se está realizando la respirometría, que tiene volumen constante (hermético y a temperatura constante). En el recipiente se coloca la muestra a analizar dejando una cámara de aire y en el pocillo interno se coloca una solución de hidróxido de potasio para que absorba el dióxido de carbono producido. Como consecuencia, la presión de este gas en el aire es despreciable dentro de los límites de medición, y la variación en la presión medida en el manómetro corresponde únicamente al consumo de oxígeno.

4.1.2.3 Procedimiento

El manómetro tiene un extremo cerrado y un extremo abierto. Se elige un punto de referencia en el brazo cerrado del manómetro, y el líquido en el brazo cerrado se ajusta siempre a este punto (con la válvula abierta) antes de realizar las medidas de presión (Figura 40).

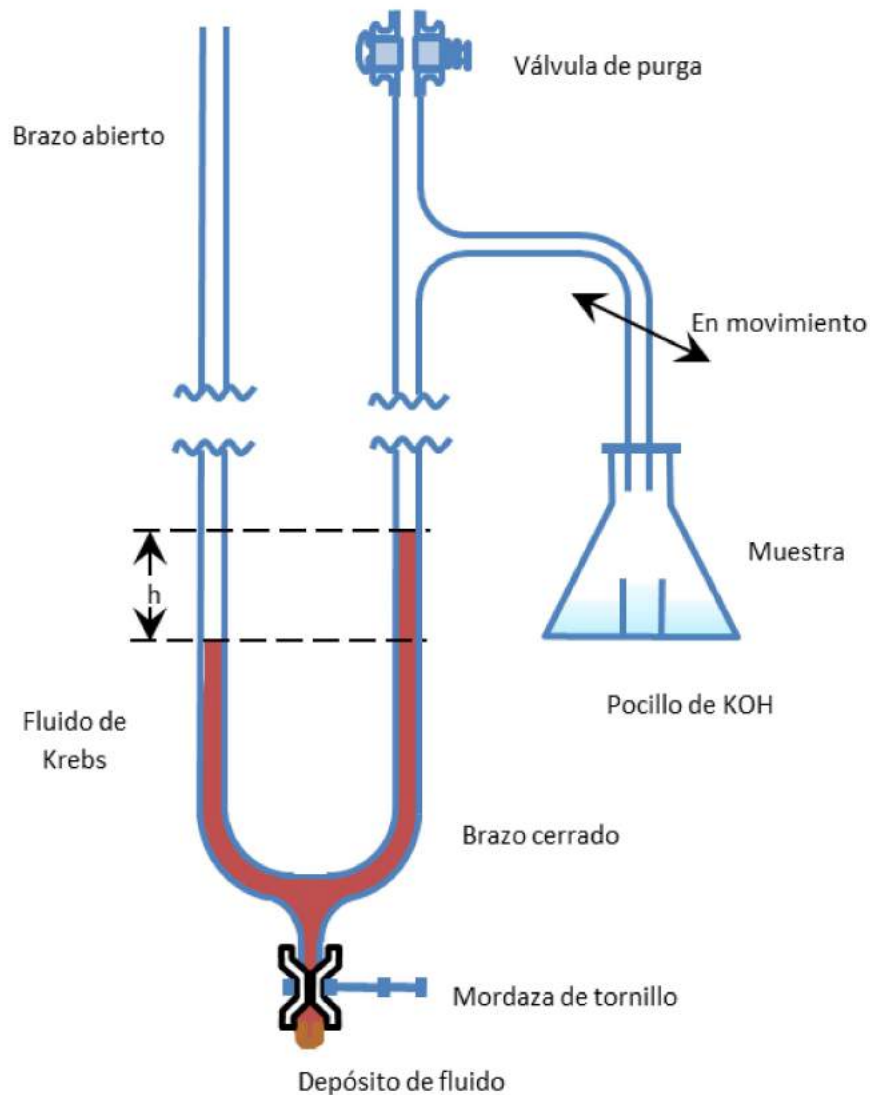


Figura 40: Esquema del respirómetro de Warburg.

El recipiente se sumerge en un baño de agua a temperatura constante. Entre mediciones se agita el sistema para favorecer el rápido intercambio gaseoso entre el fluido y la fase gaseosa. Se asume que la temperatura del manómetro, que no está sumergido, no difiere significativamente con el recipiente.

Posteriormente se cierra la válvula y se registra la medida del brazo abierto. Luego de 10 min se observa que en el brazo abierto el líquido desciende mientras asciende en el brazo cerrado, debido a la disminución de presión. En ese momento se corrige el brazo cerrado, llevando el fluido a su posición inicial, y se mide la diferencia de altura del líquido en ambos brazos.

Si se conoce el volumen de gas y el volumen de fluido del recipiente, la temperatura de operación, el gas intercambiado, y la densidad del fluido manométrico, es posible calcular la cantidad de gas consumida (o liberada), suponiendo que sólo un gas cambia su volumen. El método se basa en mantener los volúmenes de fluidos y gases constante, y medir la diferencia de presión cuando cambia la cantidad de gas.

4.1.2.4 Cálculo de la constante del respirómetro

Consiste en la calibración necesaria del sistema, donde a partir de los cambios de presión observados, se puede calcular la cantidad (en mm³ o µl a 0 °C 760 mmHg) de gas utilizado o liberado. De manera que con la medida del cambio de altura del fluido en el brazo abierto del respirómetro (h) se puede calcular la cantidad de gas intercambiado (x):

$$x = k_w \cdot h \quad \text{Ecuación 58}$$

Para calcular el valor de k del sistema, se debe traducir h en el volumen de gas, para ello se expresa la cantidad de gas en función del volumen y presión antes y después del ensayo, y a su vez, considerando el gas presente en la fase gaseosa y el gas disuelto (Ecuación 59):

$$\text{Cantidad de gas al comienzo} = \underbrace{V_g \frac{273^{\circ}\text{K}(P_g - P_v)}{TP_0}}_{\text{fase gaseosa}} + \underbrace{V_L \alpha \frac{(P_g - P_v)}{P_0}}_{\text{fase fluida}} \quad \text{Ecuación 59}$$

Donde:

h : El cambio observado en el brazo abierto del manómetro, medido en mm.

x : µl de gas (a 0 °C y 760 mmHg)

V_g : Volumen de gas en la fase gaseosa en el recipiente, incluyendo los tubos conectores hasta el punto de referencia en el brazo cerrado.

V_L : Volumen de fluido en el vaso.

P_g : Presión inicial en el vaso del gas a ser determinado. Esta es la presión parcial de un gas en particular en una mezcla de gases. Si la mezcla de gases contiene vapor de agua, la presión parcial del gas determinado será inferior a la que habría sin vapor. Es por ello que debe usarse $P_g - P_v$ para gases húmedos.

P_0 : Presión estándar, 760 mmHg o 10,000 mm en fluido de Krebs.

T : temperatura en K

α : Solubilidad del gas medido en el líquido de reacción (expresado en $\text{ml}_{\text{gas}}/\text{ml}_{\text{líquido}}$ cuando el gas está a una presión de 760 mmHg a la temperatura T . La expresión $(P - P_V)/P_0$ convierte la solubilidad a una atmosfera a la existente en el sistema.

P_V : presión de vapor del agua (u otro fluido) a la temperatura T . El fluido en el vaso ejerce una presión de vapor (P_V) en la fase gaseosa y parte del gas se disuelve en el fluido.

Al finalizar el tiempo de observación el gas habrá cambiado en una cantidad x , como resultado del cambio de presión de h mm. Si el gas fue consumido, h es negativa; si el gas fue producido, h es positiva. Por las características del ensayo descrito, se asume entonces que el gas es consumido. La presión ahora es $(P_g - P_V - h)$ en lugar que el valor inicial $(P_g - P_V)$.

$$\text{Cantidad de gas al final} = \underbrace{V_g \frac{273 K (P_g - P_V - h)}{T P_0}}_{\text{fase gaseosa}} + \underbrace{V_L \alpha \frac{(P_g - P_V - h)}{P_0}}_{\text{fase fluida}} \quad \text{Ecuación 60}$$

La cantidad de gas consumido (x) es la diferencia entre la cantidad de gas presente al inicio y la cantidad de gas al finalizar la observación:

$$x = \text{gas inicial} - \text{gas final} \quad \text{Ecuación 61}$$

$$x = \left[V_g \frac{273 K (P_g - P_V)}{T P_0} + V_L \alpha \frac{(P_g - P_V)}{P_0} \right] - \left[V_g \frac{273 K (P_g - P_V - h)}{T P_0} + V_L \alpha \frac{(P_g - P_V - h)}{P_0} \right] \quad \text{Ecuación 62}$$

$$\begin{aligned} x &= V_g \frac{273 K (P_g - P_V)}{T P_0} \\ &+ V_L \alpha \frac{(P_g - P_V)}{P_0} - V_g \frac{273 K (P_g - P_V - h)}{T P_0} - V_L \alpha \frac{(P_g - P_V - h)}{P_0} \end{aligned} \quad \text{Ecuación 63}$$

$$x = V_g \frac{273 K h}{T P_0} + V_L \alpha \frac{h}{P_0} \quad \text{Ecuación 64}$$

$$x = h \left[\frac{V_g \frac{273 K}{T} + V_L \alpha}{P_0} \right] = h k_w \quad \text{Ecuación 65}$$

Esta expresión indica que la cantidad de gas intercambiado es equivalente al cambio de altura en el brazo abierto por la constante (Ecuación 66):

$$k_w = \text{constante} = \left[\frac{V_g \frac{273 K}{T} + V_L \alpha}{P_0} \right] \quad \text{Ecuación 66}$$

La constante k depende de V_g , T , α , V_L y P_0 , que son conocidas y para un experimento dado son constantes.

4.1.2.5 La solubilidad del oxígeno

Teóricamente la solubilidad del O_2 y el CO_2 en los reactivos debería ser tomada en cuenta, pero en la mayoría de los experimentos se considera un valor despreciable. La corrección de la solubilidad puede complicar los cálculos sin aportar mayor precisión en la medida.

El fluido utilizado en el barómetro fue desarrollado por Krebs (Krebs, 1951), cuya composición es: 44 g NaBr, 0,3 g Tritón X-100, 0,3 g fucsina en 1000 ml de agua.

Tanto el fluido de Krebs como la solución de los esferoides fueron expuestos al O_2 del aire, y están, por lo tanto, en equilibrio con la concentración de O_2 existente en los vasos en el inicio del experimento. Debido a que el cambio en la cantidad de O_2 determinado en el experimento es muy pequeño, la solubilidad se puede despreciar.

4.1.2.6 Corrección de k_w por la variación de temperatura

Se estudió la influencia de las fluctuaciones de la presión ambiente y de la temperatura del baño de agua utilizando el respirómetro como un termo-barómetro conteniendo agua. Una vez conocida la influencia, pueden corregirse los datos en función de medidas independientes de presión y temperatura del agua.

A partir de las mediciones, se deduce que 1 °C de diferencia de temperatura introduce un error cercano al 0,3 % en las mediciones. Se minimizaron las fluctuaciones de temperatura mediante la agitación del baño termostático.

4.1.2.7 Determinaciones experimentales

A intervalos regulares de tiempo se mide la longitud h en mm de la columna, se le resta la medida inicial, y en cada punto se corrige por presión y temperatura (a partir de los datos elaborados con el termobarómetro). A partir de estas mediciones y la constante k_w se obtienen los μl de oxígeno consumido, que en función del tiempo es el R_{O_2} para la cantidad de biomasa establecida.

4.1.3 Análisis metabólico de los esferoides

La función de detoxificación es la función más importante en la falla hepática, y continúa siendo irremplazable por los tratamientos que se aplican actualmente. De hecho, la carencia de estas vías de detoxificación y la acumulación de endotoxinas provocan la encefalopatía hepática. Si bien no se conocen exactamente los mecanismos por los cuales esto ocurre, la ausencia de la detoxificación ya es considerada como la causa principal. Varios estudios se enfocan en la caracterización de las múltiples isoformas del citocromo P450 para la detoxificación de endotoxinas y xenobióticos (Behnia *et al.*, 2000).

Una manera de cuantificar este proceso de detoxificación puede ser a través de la cuantificación de la degradación de un fármaco bien establecido. El diazepam (7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona) es una benzodiazepina utilizada como ansiolítico. Es metabolizada en humanos por el hígado a través de dos vías metabólicas (que incluyen al citocromo P450) a sus 3 principales metabolitos: N-desmetil-diazepam (nordiazepam), temazepam y oxazepam, el cual es conjugado y excretado principalmente como derivado glucurónico en la orina (Figura 41).

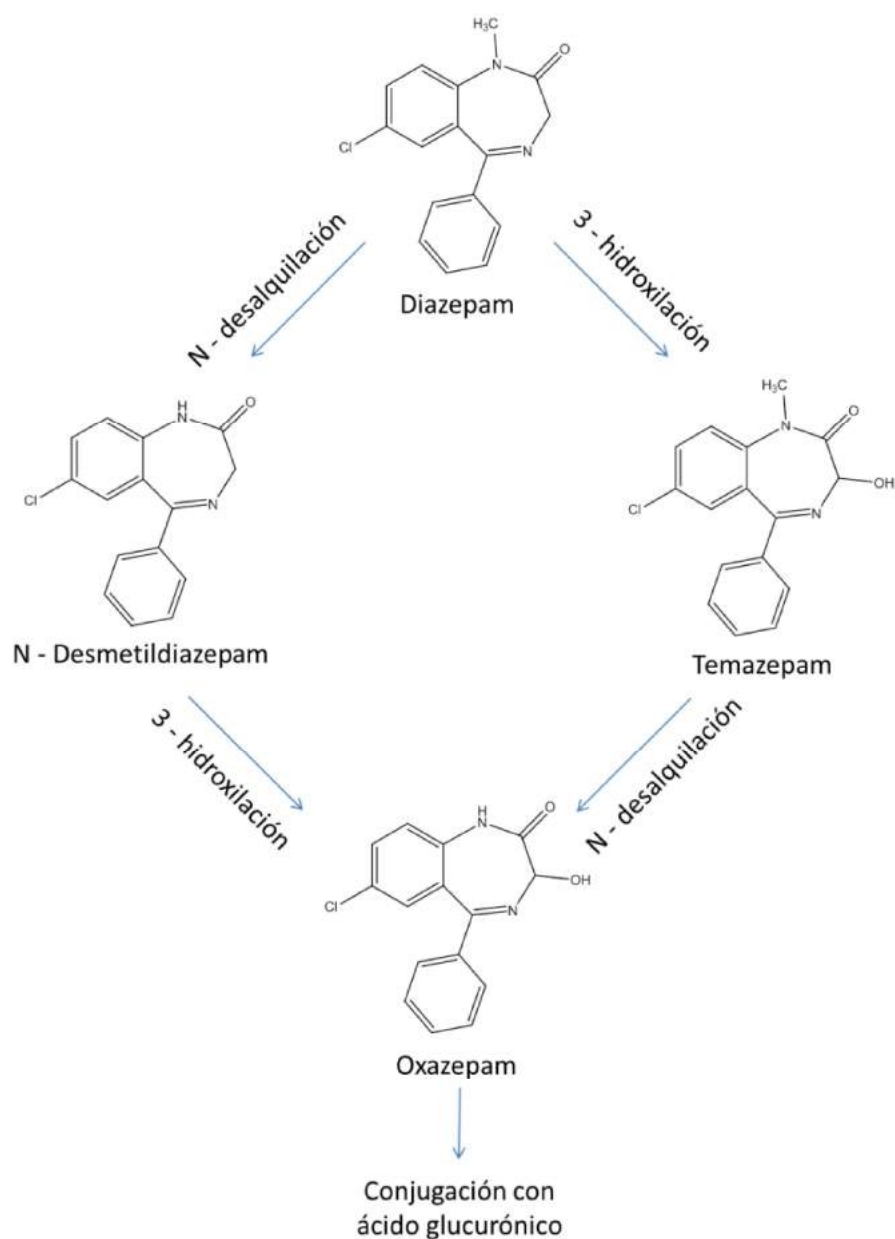


Figura 41: Metabolismo del diazepam descrito para los hepatocitos.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Ablación hepática

Para el aislamiento de células hepáticas se utilizaron cerdos *Landrace* de ambos sexos de entre 8 a 12 kg de peso y se siguieron los mismos protocolos descritos por Lorenti (Lorenti, 2005). Los animales fueron adquiridos en criaderos que mantienen las condiciones de bioseguridad,

controles sanitarios, antiparasitarios y vacunas. Previo a la cirugía los animales estuvieron en ayunas durante 12 h con agua *ad libitum*.

Los procedimientos de ablación hepática estuvieron a cargo de médicos cirujanos especializados en trasplante, en un quirófano de animales especialmente instalado, próximo al bioterio en el Hospital Italiano de San Justo “Agustín Roca”.

Todas las cirugías se realizaron bajo anestesia general inhalatoria con Sevoflurano[®] y monitoreo cardíaco y de la saturación de oxígeno. Luego de antisepsia de la piel con Povidona yodada se colocaron campos quirúrgicos estériles y se ingresó en la cavidad abdominal por laparotomía mediana xifopubiana. Se realizó una inspección minuciosa para descartar patologías que pudieran contraindicar la ablación (tumores, traumatismos, malformaciones, etc.). Se extrajo la vesícula biliar y se ligó el conducto biliar. A continuación, se identificó y se disecó la vena porta dejándola reparada. Se ligó la arteria hepática en su tronco y se seccionaron tanto el ligamento menor como las adherencias del hígado al diafragma para excluir toda perfusión de sangre distinta de la provista por la vena porta. Con la mayor rapidez posible se ligó la vena cava infra-hepática, se introdujo en la vena porta una cánula conectada al frasco de la solución de preservación *Universidad de Wisconsin* (UW, a 4 °C), se abrió la cavidad torácica y luego de seccionar la vena cava supra-hepática (para permitir el vaciado de la sangre del hígado) se inició, *in situ*, el lavado del órgano con UW. Inmediatamente se cubrió el hígado con hielo picado. Se lavó el órgano con 1000 ml UW mientras se verificaba que el drenaje venoso por la vena supra-hepática seccionada se encontrara perfectamente permeable, con el fin de prevenir la congestión del órgano. Una vez completado el lavado se introdujo el hígado en una bolsa de polietileno estéril con 500 ml UW a 4 °C y se trasladó al laboratorio (en un doble recipiente estéril) en una conservadora con cubos de hielo para mantenerlo en frío.

El transporte hasta la sede del Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (Hospital Italiano de Buenos Aires) situado en Almagro en todos los casos demoró entre 30 y 45 min, donde se prosiguió con el protocolo de aislamiento de hepatocitos dentro de un gabinete de flujo laminar de seguridad biológica.

4.2.2 Aislamiento de hepatocitos

Una vez que se tiene el hígado en la cabina de flujo laminar (Figura 42). Éste es perfundido a través de un sistema de perfusión que se esquematiza en la Figura 43.



Figura 42: Detalle de perfusión del hígado ablacionado.

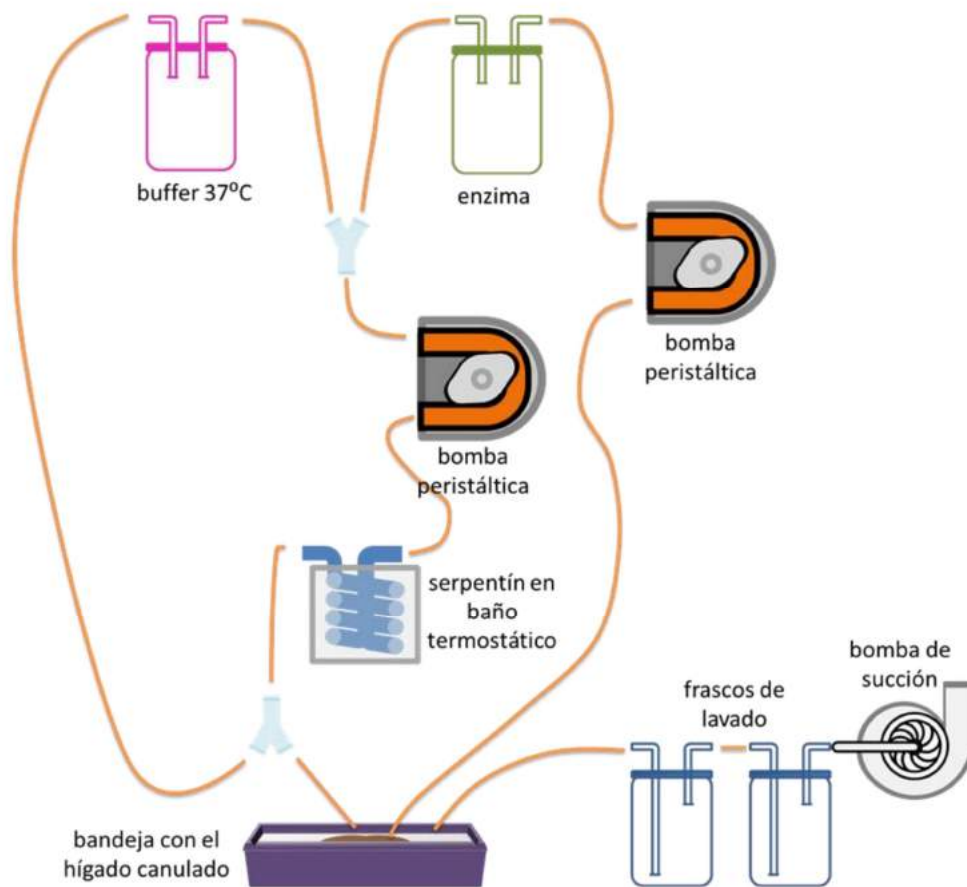


Figura 43: Esquema del sistema de perfusión utilizado para el aislamiento de hepatocitos.

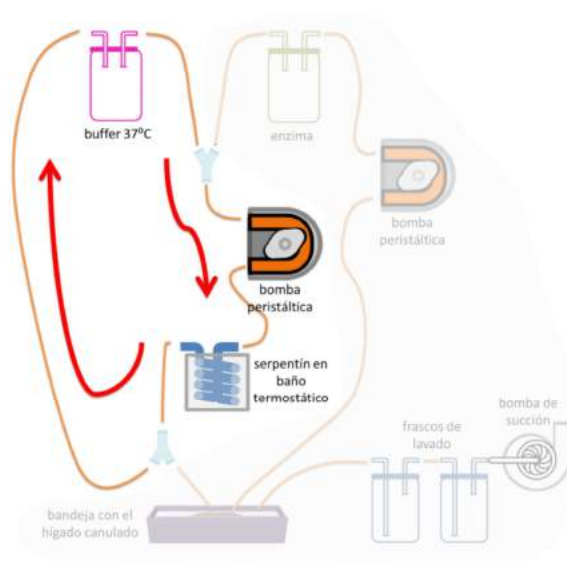


Figura 44: Acondicionamiento del buffer a 37°C.

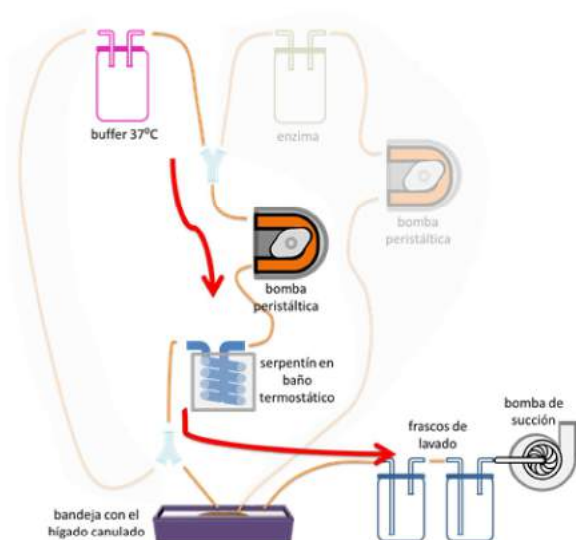


Figura 45: Perfusión con buffer sin calcio, 37 °C.

El primer paso es termostatar el buffer a 37°C, para ello se utilizó un baño de agua a 42°C. La diferencia de temperatura permite compensar la pérdida de calor del sistema (Figura 44).

La perfusión del hígado (Figura 43) se inicia a través de la cánula colocada en la vena porta (Figura 45), durante 20 -30 min, a un caudal de 100 ml·min⁻¹, con una solución de perfusión conteniendo: 7,85 ml·min⁻¹ NaCl (Biopack, Argentina), 0,5 ml·min⁻¹ KCl (Biopack, Argentina), 0,09 ml·min⁻¹ NaHPO₄ (Merck, Darmstadt, Alemania), 0,06 ml·min⁻¹ KH₂PO₄ (Mallinckrodt, St, Louis, MO, USA), 25 mM de ácido hidroxietilpiperazina-etanosulfónico (HEPES) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), 5 µg·ml⁻¹ insulina (GIBCO BRL, Gaithersburg, Maryland, USA), 0,4 µg·ml⁻¹ dexametasona (FADA, Buenos Aires, Argentina), 0,15 mM glucosa (Sigma), 20 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Merck) a 37°C.

Este paso de perfusión se establece una condición sin el agregado del ion calcio, de manera de favorecer la desintegración de las uniones desmosómicas. Adicionalmente este proceso de perfusión a 37°C facilita la atemperación del órgano para la siguiente perfusión enzimática.

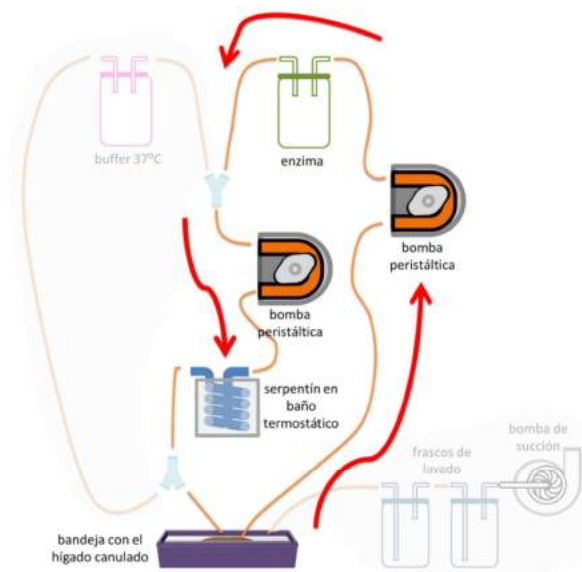


Figura 46: Perfusión con colagenasa

La segunda perfusión (Figura 46) con recirculación fue realizada durante 20 – 30 min a 37°C, a un caudal de $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, con una solución perfusión igual a la anterior sin EDTA y con el agregado de 0,025 % de colagenasa tipo II (Worthington, Lakewood, NJ, USA) y $0,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ CaCl (Biopack, Argentina). Esta solución restituye el calcio para una función óptima de la colagenasa. Luego las células liberadas fueron filtradas a través de una malla metálica de $260 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, y centrifugadas a 50 G, durante 5 min a 4 °C. Luego de dos lavados con buffer

Hanks (Hanks Balanced Salt Solution-HBSS) que contiene $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ NaCl, $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ KCl, $0,0358 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Na_2HPO_4 , $0,06 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ KH_2PO_4 , $0,288 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ CaCl_2 , $0,492 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,035 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ NaHCO_3 y $5,95 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ HEPES, pH 7,2, las células son resuspendidas a una concentración de 4×10^6 células viables $\cdot \text{ml}^{-1}$ en PBS (ver Figura 47).

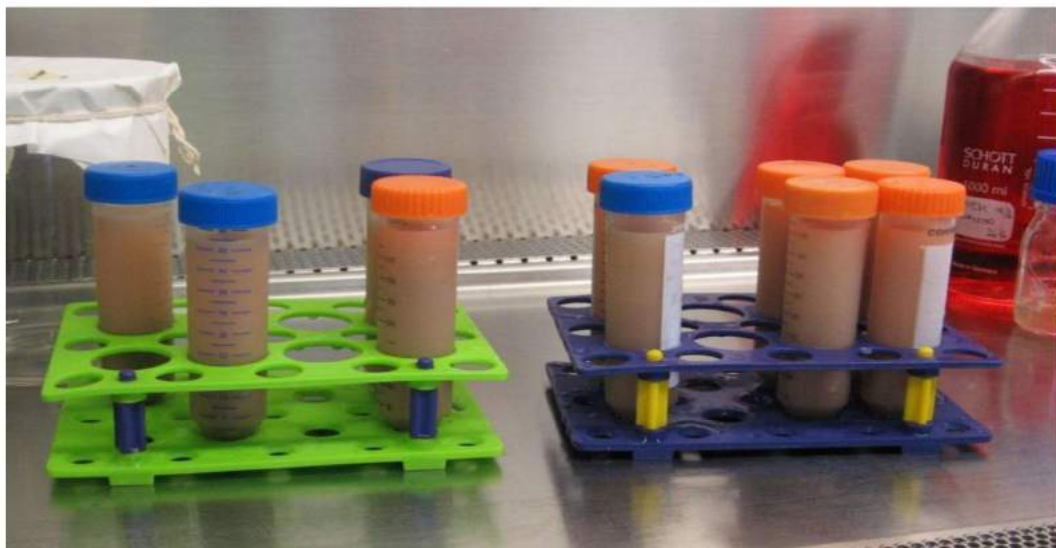


Figura 47: Células aisladas en tubos Falcon® antes de la concentración mediante centrifugación

4.2.3 Viabilidad y funcionalidad

El test de exclusión del Azul Tripán es una técnica muy utilizada para determinar viabilidad celular (R. R. Mitry *et al.*, 2003; Terry, Dhawan, Mitry, & Hughes, 2006), que consiste en medir la integridad de la membrana. En este método las células muertas son permeables al colorante y se tiñen de azul, mientras que las células vivas no captan el colorante, por lo que puede contarse fácilmente con cámara de Neubauer en microscopio óptico. La viabilidad celular se mide en porcentaje y se calcula con la Ecuación 67:

$$\begin{aligned} & \% \text{viabilidad celular} \\ &= \frac{(\text{promedio n}^\circ \text{ total de células} - \text{promedio n}^\circ \text{ total de células muertas}) \times 100}{\text{promedio n}^\circ \text{ total de células}} \end{aligned} \quad \text{Ecuación 67}$$

4.2.4 Cultivo de esferoides

Para lograr la formación de esferoides hepáticos, los hepatocitos se cultivaron en frascos agitados magnéticamente, siguiendo el protocolo esquematizado en la Figura 48:



Figura 48: Frascos de cultivo preparados para ser incubados

Las células aisladas fueron resuspendidas a una concentración de 4×10^6 células viables /ml, y colocadas en frascos para agitación magnética (Spinner flasks) de 500 ml y 1000 ml de volumen total, con agitador tipo pendular, conteniendo 100-150 y 300-350 ml de medio de cultivo respectivamente, según el tamaño del frasco (Figura 49 y Figura 50).

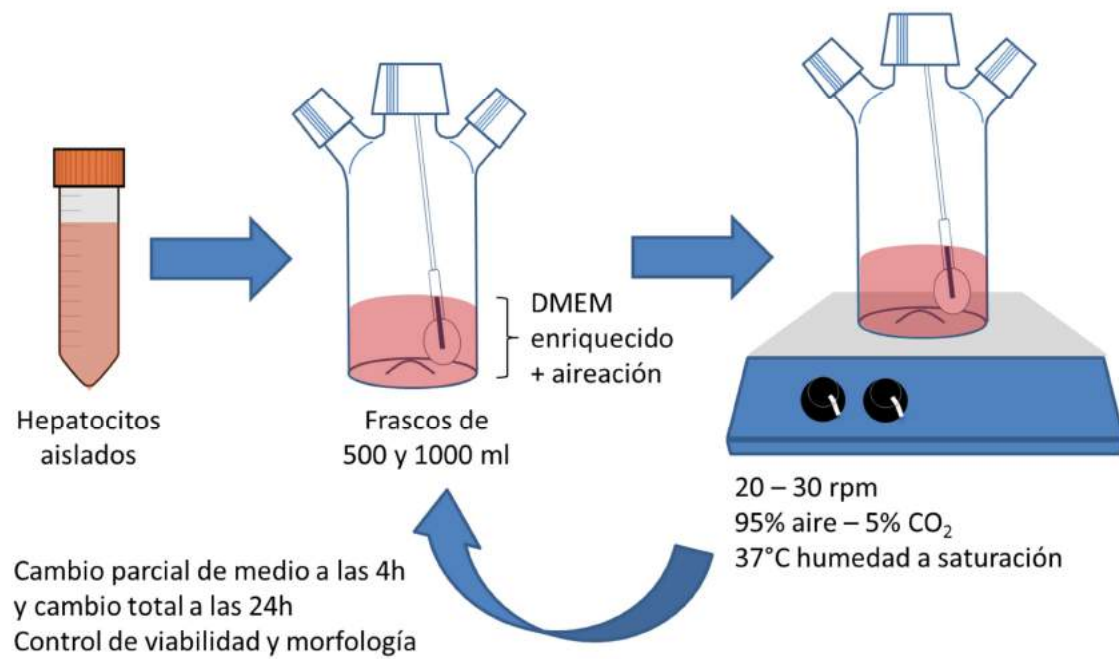


Figura 49: Esquema de cultivo de hepatocitos para la formación de esferoides



Figura 50: Frascos de cultivo, adentro de la estufa con plataforma giratoria.

El medio de cultivo utilizado fue el DMEM, suplementado con 5 ng·ml⁻¹ factor de crecimiento epidérmico (EGF, Gibco), 5 µg·ml⁻¹ insulina (Gibco), 5 µg·ml⁻¹ transferrina (Gibco), 0,5 µg·ml⁻¹ hidrocortisona (Sigma), extracto pituitario bovino (equivalente a 50 µg proteínas ·ml⁻¹, BPE Gibco), 4 µM glutamina (Gibco), 20 % suero fetal bovino (BioSer, Nutrientes celulares, Argentina), 0,5 mM ácido ascórbico (Sigma) y antibiótico - antimicótico (penicilina 100 U·ml⁻¹, estreptomicina 100 µg·ml⁻¹, anfotericina B 0,25 µg·ml⁻¹, Gibco).

La suspensión celular fue incubada con agitación constante en una plataforma de agitación magnética (Figura 50) (Wheaton, Millville, NJ, USA), a 20-30 rpm, dentro de una incubadora con atmosfera de 5 % de CO₂ – 95 % aire, saturada de humedad, a 37 °C. Las células fueron oxigenadas cada 12 h, durante 15 min cada vez, con carbógeno 95 % O₂-5 % CO₂. El medio de cultivo fue renovado en un 50 % a las 4 h de iniciado el cultivo y totalmente al día siguiente. El proceso de renovación fue realizado por decantación por acción de la gravedad porque se observó de esta manera que se descartaban con mayor eficiencia las células muertas y detritos celulares.

4.2.5 Cuantificación de la biomasa

En este trabajo los parámetros metabólicos se refirieron a la biomasa equivalente a células aisladas. De esa manera, se facilita la comprensión del metabolismo *in vitro*.

4.2.5.1 Determinación del peso húmedo en esferoides hepáticos

Se centrifugaron las muestras de esferoides hepáticos a 50 G durante 10 min cada muestra en tubos de 15 ml previamente tarados, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta y se pesó en una balanza analítica.

4.2.5.2 Determinación del peso seco en esferoides hepáticos

Luego de determinar el peso húmedo las muestras fueron re-suspendidas en agua destilada y vertidos en un vaso de precipitado pequeño previamente tarado. Se enjuagó el tubo que contenía la muestra 2 veces con 5 ml de agua destilada, que se vertieron en el mismo vaso.

Los vasos con muestras se colocaron en estufa a 80 °C durante 48 h (previamente se determinó que este tiempo era suficiente para obtener un peso constante). Posteriormente se enfriaron hasta temperatura ambiente en un desecador de vidrio, y se pesaron en balanza analítica.

Considerando el diámetro de un hepatocito porcino aislado fresco reportado por Darr (Darr & Hubel, 1997) $18,3 \pm 3,2 \mu\text{m}$, y la densidad de 1 g·ml⁻¹, el peso de un hepatocito sería de $3,26 \times 10^{-9}$ g.

4.2.5.3 Determinación proteínas totales

Se extrajeron la totalidad de las proteínas de los esferoides con el siguiente protocolo:

1. Se lavaron los esferoides con buffer fosfato salino (PBS 20 mM pH 7,4) a 4 °C
2. Se agregó buffer de lisis (IGEPAL 1 %, deoxicolato de sodio 0,5 %, SDS 0,1 %, aprotinina 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y leupeptina 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en buffer PBS 20 mM pH 7,4) a 4 °C a razón de 1 ml de buffer de lisis cada 100 mg de esferoides.
3. Se incubó 60 min en el buffer de lisis a 4 °C y se resuspendió con agitador de vórtice cada 5 min (A partir de este momento puede guardarse a -20 °C).
4. Se centrifugó la muestra 20 min a 14.000 rpm a 4 °C y se tomó el sobrenadante.
5. Se cuantificó proteínas con la técnica de Bradford (Bradford, 1976).

4.2.5.4 Determinación ADN total

Se extrajo ADN de los esferoides de acuerdo el siguiente protocolo:

1. Se agregó proteinasa K en una relación de 100 μl por cada ml de suspensión de esferoides, y se incubó 30 min a 40 °C.
2. Se agregó un volumen equivalente de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Se agito suavemente para homogeneizar y se centrifugó a 14 rpm durante 10 min.
3. Se quitó la fase acuosa (superior).
4. Se repitieron los pasos 2 y 3 hasta que no se observó interfase (donde se elimina la fracción proteica).
5. Se adicionaron 500 μl de Cloroformo y luego de resuspender suavemente se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min.
6. Se extrajo la fase acuosa.
7. Se agregó 1 ml de isopropanol frio y se conservó la muestra refrigerada a -20 °C.
8. Se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70 %.
9. Se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min
10. Se resuspendió el ADN aislado con 100 μl de agua bidestilada a 55 °C durante 5 min.
11. Se cuantificó el ADN por absorbancia a 260 nm y se determinaron posibles contaminaciones proteicas determinando la relación de las absorbancias 260 nm/ 280 nm (se considera optimo obtener un cociente igual a 2).

4.2.5.5 Estado fisiológico de las células

Luego del cultivo primario, se cosecharon los esferoides y se distribuyeron en placas de Petri para los ensayos metabólicos. La evaluación del estado fisiológico de los esferoides sin el agregado de amonio o diazepam se utilizó como control positivo. Para ello, se incubaron esferoides con una concentración (calculada referida a la original) de por lo menos $2,05 \times 10^6$ células viables $\cdot \text{ml}^{-1}$ en placas de cultivo de 100 mm, conteniendo 25 ml finales de buffer Hanks –glucosa (Hanks 9,8; 25 ml de HEPES, 0,35 g NaHCO_3 , glucosa 0,9 g en 1 litro, a pH 7,2).

Las placas fueron incubadas a 37 °C en estufa gaseada con 5 % CO_2 y 95 % aire. Las muestras fueron tomadas por duplicado a los tiempos 0, 1, 2 y 4 h.

En las muestras tomadas se determinaron los niveles de alanina transaminasa (ALT), y lactato deshidrogenasa (LDH) en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Italiano de Buenos Aires (Synchron LX, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Todas las muestras colectadas fueron mantenidas en frío y trasladadas inmediatamente al laboratorio para hacer las determinaciones.

Luego del ensayo se cosecharon los esferoides, se lavaron con agua destilada (dos veces) en tubos de centrifuga Falcon® de 15 ml, tarados para realizar posteriormente la cuantificación celular.

4.2.5.6 Medida del consumo de oxígeno

Inmediatamente después de la cosecha se midió el consumo de oxígeno de los esferoides. Para ello se utilizó un respirómetro de Warburg. El líquido que se utilizó en el manómetro fue el fluido de Krebs, y todo el sistema se mantuvo a 37 °C constante en un baño termostatzado.

El procedimiento fue el siguiente:

1. En el reservorio accesorio se colocó una solución de glucosa ($1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) en buffer HEPES pH 7,2.
2. Se agregó 0,2 ml de KOH 20 % en el pocillo central, luego de engrasar el borde superior del mismo.
3. Se engrasaron las conexiones del manómetro.
4. En el recipiente se agregó 1 ml de la suspensión de esferoides en buffer HEPES pH 7,2
5. Se conectó el recipiente con el manómetro.
6. Se colocó el equipo en un baño de agua a temperatura constante.
7. Luego de 5 min en el baño termostatzado se volvieron a ajustar las conexiones.
8. Se consideraron 10 min para lograr el equilibrio del sistema.

9. Se ajustó la altura del fluido del manómetro al punto de referencia abriendo la válvula.
10. Se cerró la válvula.

Comenzaron las medidas, siempre registrando la temperatura para realizar las correcciones que fueran necesarias.

Una de las precauciones claves fue no colocar un exceso de biomasa de manera que la demanda sea mayor que la transferencia de oxígeno de la cámara de aire al medio ($k_L a$)

4.2.6 Metabolismo y determinación del ion amonio

Para analizar la capacidad de detoxificación de amonio por los esferoides, éstos fueron incubados con una concentración (calculada referida a la original) de por lo menos $2,05 \times 10^6$ células viables $\cdot \text{ml}^{-1}$ en placas de cultivo de 100 mm, conteniendo 25 ml finales de buffer Hanks –glucosa (Hanks 9,8: 25 ml de HEPES, 0,35 g NaHCO_3 , glucosa 0,9 g en 1 litro, a pH 7,2). Las placas fueron incubadas a 37 °C en estufa gaseada con 5 % CO_2 y 95 % aire.

Al iniciar la cinética, la solución fue suplementada con NH_4Cl 2 mM (Mallinckrodt), para lograr concentraciones de 370 a 880 $\mu\text{g} \cdot \text{dl}^{-1}$. Las muestras fueron tomadas por duplicado a los tiempos 0, 1, 2, 3 y 4 h.

La concentración inicial fue seleccionada en base en las concentraciones halladas en pacientes con hiperamonemia. La determinación del ion amonio fue realizada por el método enzimático basado en la condensación de amonio y α -cetoglutarato para producir glutamato (Synchron LX, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Así mismo se determinó la concentración de urea por el método de diacetil-monoxima (Sigma).

De las mismas placas se tomaron además muestras para determinar los niveles de ALT, y LDH en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Italiano de Buenos Aires (Synchron LX, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Todas las muestras colectadas fueron mantenidas en frío y trasladadas inmediatamente al laboratorio para hacer las determinaciones.

Luego del ensayo, se cosecharon los esferoides, se lavaron con agua destilada (dos veces) en tubos de centrifuga Falcon® de 15 ml, tarados para realizar posteriormente la cuantificación celular.

4.2.7 Metabolismo y determinación de diazepam

El metabolismo no inducido por drogas, dependiente del citocromo P-450, fue analizado mediante el suministro de diazepam y la posterior determinación del mismo y sus metabolitos.

Para analizar la capacidad de detoxificación de amonio por los esferoides, éstos fueron incubados con una concentración (calculada referida a la original) de por lo menos $2,05 \times 10^6$ células viables $\cdot \text{ml}^{-1}$ en placas de cultivo de 100 mm, conteniendo 25 ml finales de buffer Hanks –glucosa (Hanks 9,8, 25 ml de HEPES, 0,35 g NaHCO_3 , glucosa 0,9 g en 1 litro, a pH 7,2). Las placas fueron incubadas a 37 °C en estufa gaseada con 5 % CO_2 y 95 % aire. Al iniciar la cinética, las placas fueron suplementadas con diazepam 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Las muestras fueron tomadas por duplicado a los tiempos 0, 1, 2, 3 y 4 h.

El diazepam y sus metabolitos se determinaron mediante un método analítico por HPLC (ver Anexo 1), para ellos, las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta su procesamiento. Las mismas fueron descongeladas en el momento de ser utilizadas para su análisis, se les agregó una cantidad conocida de solución de midazolam como estándar interno y se concentraron por centrifugación durante 5 min a máxima velocidad (*spin down*), se evaporaron con vacío a 30 °C (Eppendorf concentrator 5301) hasta sequedad y se resuspendió cada una en 50 μl de buffer de corrida. Seguidamente se filtraron con una malla de 0,22 μm .

De las mismas placas se tomaron además muestras para determinar los niveles de ALT, y LDH en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Italiano de Buenos Aires (Synchron LX, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Todas las muestras colectadas fueron mantenidas en frío y trasladadas inmediatamente al laboratorio para hacer las determinaciones.

Luego del ensayo, se cosecharon los esferoides, se lavaron con agua destilada (dos veces) en tubos de centrífuga Falcon® de 15 ml, tarados para realizar posteriormente la cuantificación celular.

4.3 RESULTADOS

En este Capítulo se describe la obtención del componente biológico y su caracterización biológica y fisiológica que permita el diseño de un BAL del tipo reactor de fibra hueca. En base a las consideraciones mencionadas en la Introducción del Capítulo, se decidió utilizar un cultivo primario porcino en formato de esferoides.

4.3.1 Aislamiento y preparación de los esferoides

Berry y Friend en 1969 fueron los primeros en desarrollar el procedimiento para el aislamiento de hepatocitos de rata mediante la perfusión del hígado *in situ* utilizando colagenasa, y sentaron las bases de los protocolos actuales (Berry & Friend, 1969). La colagenasa es una enzima proteolítica que permite la digestión del tejido extracelular hepático y el aislamiento de sus

componentes celulares (Berry & Friend, 1969; Ragai R. Mitry, Hughes, & Dhawan, 2002; Terry *et al.*, 2006).

Los procedimientos de ablación hepática estuvieron a cargo de médicos cirujanos especializados en trasplante, en un quirófano de animales especialmente instalado, próximo al bioterio, en el Hospital Italiano de San Justo “Agustín Roca”.

En experiencias previas en el ICBME se observó que tanto el rendimiento del cultivo primario como la viabilidad celular presentaron un descenso a medida que aumentaba el tiempo de isquemia fría, por lo tanto, en este trabajo se procedió a transportar el hígado ablacionado en solución de la Universidad de Wisconsin (UW), de forma análoga al utilizado en el transporte de hígados humanos para trasplante.

La solución de preservación empleada, la logística para realizar la ablación, traslado y procesamiento del órgano entero en el menor tiempo posible, la variabilidad de la actividad específica de la colagenasa, la necesidad de mantener el tejido a 37 °C durante la perfusión con colagenasa y la digestión incompleta del tejido han sido aspectos clave del proceso que se han ido optimizando en este trabajo.

Durante el transcurso de este trabajo de tesis se realizaron ocho procedimientos de ablación con un número de células hepáticas obtenidas que osciló entre $3,75 \times 10^9$ y 9×10^9 , con un promedio de $6,05 \times 10^9$. En la Tabla 11 se detallan los procedimientos realizados. No se consideraron los datos de los procedimientos 4 y 6 ya que la baja cantidad de células obtenidas y la baja viabilidad fueron causadas por problemas previos a la obtención de las células Tabla 11.

Tabla 11: Características de los aislamientos de células realizados en un trabajo a partir de ablaciones

Procedimiento	Nro. de células	Viabilidad	Observaciones
Nro.	obtenidas		
1	8,05x10 ⁹	94 %	
2	5,30x10 ⁹	93 %	
3	3,75x10 ⁹	93 %	
4	5,30x10 ⁷	36 %	Inconveniente en la cirugía, el hígado no estaba lavado correctamente.
5	9,00x10 ⁹	93 %	
6	1,27x10 ⁸	85 %	Animal más pequeño, hígado más pequeño y lábil
7	5,35x10 ⁹	94 %	
8	4,85x10 ⁹	97 %	

La viabilidad promedio, determinada por tinción de azul Tripán fue del 94 %, oscilando entre 93 % y 97 %. Las células aisladas fueron sometidas a las condiciones de cultivo para la generación de esferoides, según se describe en la Sección 4.4.4. A partir de las células aisladas se formaron cúmulos a las 24 h de cultivo con agitación constante. Las células que permanecieron aisladas a las 24 h no fueron viables y se eliminaron con los cambios de medio de cultivo. A las 48 h, los cúmulos de células tuvieron una apariencia compacta, de bordes alisados de tamaño menor a 150 μm (Figura 51). Estos cúmulos constituyen lo que se denominan Esferoides hepáticos.

La etapa de disgregación con colagenasa es crítica para obtener las células aisladas, ya que un tiempo insuficiente reduce el rendimiento del aislamiento y un tiempo excesivamente largo disminuye notablemente la viabilidad celular, afectando no solo al rendimiento, si no a la reproducibilidad de los resultados posteriores.

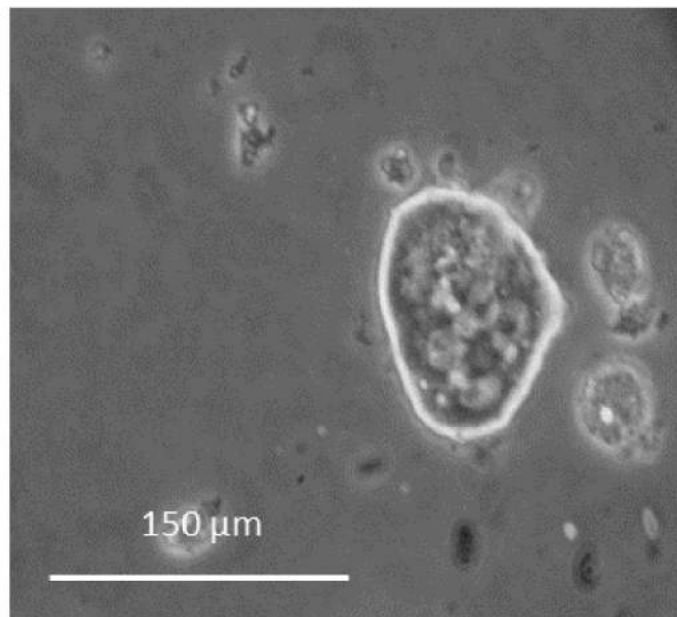


Figura 51: Microscopía óptica de un esferoide hepático

Durante las perfusiones con colagenasa se realizó un masaje manual suave del órgano (Figura 43) y constante facilitando la irrigación del mismo con las soluciones y permitiendo determinar los cambios en la turgencia del órgano.

Cuando el hígado presenta, visualmente y al tacto, una disminución de la turgencia se rompió la cápsula y se realizó digestión mecánica con bisturí y tijeras para continuar con el proceso de aislamiento celular.

4.3.2 Cuantificación de la biomasa

La cuantificación de la biomasa es un parámetro esencial, ya sea para el estudio metabólico de los esferoides hepáticos (y su comparación con otras estrategias de cultivo), así como también el control de proceso y calidad del material biológico del dispositivo. Por un lado, permitirá determinar las velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos y por otro adecuar la terapia a las necesidades del paciente y poder diseñar el escalado del dispositivo. Tradicionalmente, el número de células ha sido determinado a través del recuento en microscopio utilizando una Cámara de *Neubauer*. Sin embargo, cuando se trabaja con esferoides, por su tamaño no pueden contabilizarse de esa manera, y es por ello que se suelen cuantificar por otros métodos indirectos, como proteínas totales, ADN total, peso húmedo, peso seco, entre los más utilizados. Otra alternativa utilizada es referenciar al número inicial de células (Lorenti *et al.*, 2003). Sin embargo, esta estimación sobreestima la cantidad de biomasa porque

en la formación de los esferoides, una parte de las células iniciales termina siendo descartada en los procesos de lavado.

En la Figura 52 se muestran los resultados de las determinaciones de peso seco y peso húmedo. Como se observa en la misma se confirma la correlación entre las dos determinaciones. Se obtuvo un ajuste del $R^2=0,98$ en la regresión lineal.

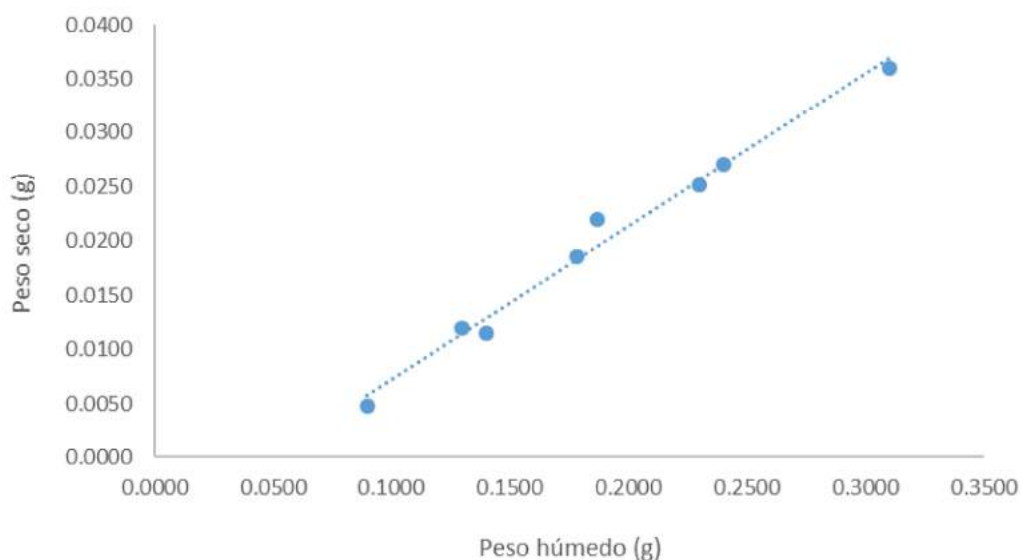


Figura 52: Correlación entre peso húmedo y peso seco

Estos métodos de cuantificación por peso son sencillos. Si bien son precisos, no son específicos, porque pueden ser afectados por impurezas, ya que no pueden distinguir entre células, fragmentos y otros restos celulares.

4.3.3 Cuantificación de proteínas totales y ADN total

Las curvas de calibración de los métodos de Bradford para determinación de proteínas y el método convencional (proteínasa K y absorción 260/280 nm) para cuantificación de ADN dieron la linealidad esperada en los rangos de concentración estudiados (de 0,25 a 4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ para proteínas y 2 a 300 ng para ADN). Las muestras analizadas mostraron una importante disparidad entre los duplicados tanto en la medida de proteínas totales como la de ADN total. Posiblemente este error experimental se deba a problemas en la correcta disgregación del tejido para el aislamiento de los componentes mencionados. Por lo constatado por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), los protocolos aplicables a tejido resultaron muy agresivos (obteniéndose una muestra muy deteriorada) y los aplicables a células no lograban la recuperación total de proteínas o ADN presentes.

Dado la poca reproducibilidad de estas determinaciones se eligió como método de cuantificación a la determinación de peso húmedo y con ella su correlación con el peso seco.

4.3.4 Estado fisiológico de las células

Se realizó una medida indirecta a través de la cuantificación de las enzimas intracelulares típicas de los hepatocitos. Las enzimas liberadas en el medio de reacción se consideraron indicador de daño celular. Se cuantificaron las enzimas ALT y LDH.

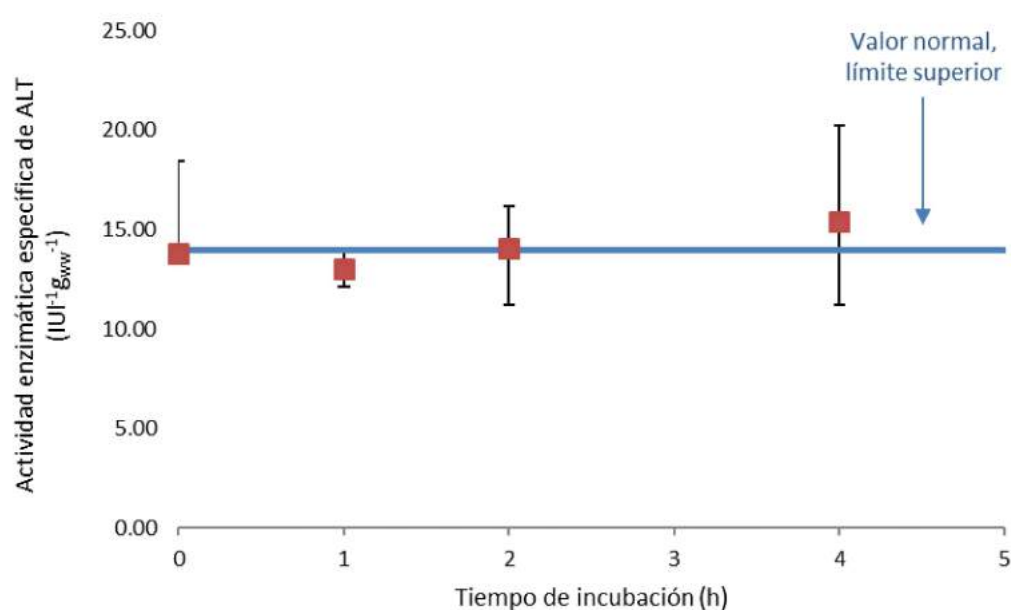


Figura 53: Presencia de ALT en el sobrenadante del cultivo de esferoides hepáticos.

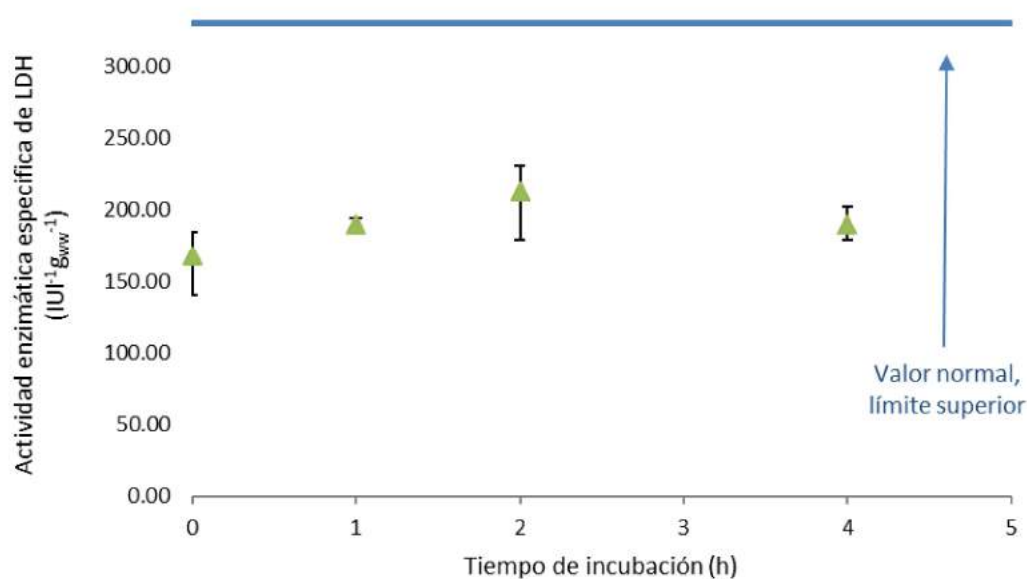


Figura 54: Presencia de LDH en el sobrenadante del cultivo de esferoides hepáticos⁵⁴

Como se observa en las Figuras 53 y Figura 54, las enzimas ALT y LDH se mantuvieron dentro de los límites normales para cerdos. Los valores se calcularon en función de la masa celular para poder integrar todas las muestras y obtener gráficos comparables con otras experiencias.

4.3.5 Evaluación del Consumo de oxígeno

Mediante el uso del respirómetro de Warburg se realizaron las determinaciones del consumo de oxígeno por parte de los esferoides. Los resultados se expresaron en base a la biomasa seca por tiempo como se describe en la Ecuación 68:

$$q_{O_2} = \frac{\mu l O_2}{mg \text{ de biomasa} \cdot hora} \quad \text{Ecuación 68}$$

El valor de consumo específico de oxígeno para los esferoides fue aproximadamente de 33 attomol.cel⁻¹.seg⁻¹ (0,12 x10⁻¹² mol O₂.cel⁻¹.h⁻¹). Este valor se encuentra dentro de los valores presentados en la Tabla 10.

Si bien las mediciones no fueron realizadas en la cantidad suficiente como para ser estadísticamente relevantes, se realizaron con el fin de confirmar el estado metabólico global y estimar un rango de q_{O_2} con el fin de diseñar adecuadamente la oxigenación del dispositivo.

4.3.6 Evaluación metabolismo amonio y diazepam

Las benzodiazepinas y la hiperamonemia cumplen un rol clave en la patogénesis de la encefalopatía hepática (Basile *et al.*, 1991). Se ha demostrado que existe una relación directa entre la concentración de ligandos al receptor de benzodiazepinas en plasma y la severidad de las encefalopatías hepáticas. Estos resultados sumaron evidencia del rol de los ligandos de receptores de benzodiazepinas en la patogénesis de la encefalopatía hepática asociada a la FHF.

Itzhak (Itzhak, Roig-Cantisano, Dombro, & Norenberg, 1995) estableció la relación entre benzodiazepinas, el aumento de la amonemia y la FHF. Sus resultados llevaron a la deducción de un mecanismo integrado por el cual un nivel alto de amonio en el plasma induce la activación de receptores tipo periféricos diazepínicos. Esto a su vez provoca un aumento de neuro-esteroides derivados de la pregnenolona. Se sabe que estos últimos incrementan la neurotransmisión GABAérgica. En la bibliografía se encuentra más evidencia sobre el rol de las benzodiazepinas endógenas en la encefalopatía hepática (Baker, Morrow, Vergalla, Paul, & Jones, 1990; Bauer *et al.*, 1995; Olasmaa *et al.*, 1990), químicamente análogas a la droga sintética diazepam y sus metabolitos en la encefalopatía hepática.

La hiperamonemia ha sido implicada en la regulación de receptores periféricos de benzodiazepinas y la neurotransmisión GABAérgica. Es debido a estas evidencias que se consideró a la capacidad de metabolizar diazepam y amonio como elementos clave en la evaluación de un dispositivo BAL de remplazo hepático, para evaluar su funcionalidad.

4.3.6.1 Metabolismo del ion amonio

El hígado juega un papel fundamental en el metabolismo del amonio a través del ciclo de la urea, a través de la actividad de las enzimas carbamoil fosfatosintetasa, ornitina transcarbalimalasa, argininosuccinato sintetasa y liasa del ácido argininosuccínico y arginasa. En los hepatocitos el amonio se metaboliza en urea que luego es excretada por la orina.

En la Figura 55 se observa la capacidad de detoxificación de amonio por los esferoides cuando fueron expuestos a una concentración de entre 370 y 880 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de amonio. Esta capacidad de detoxificación puede evaluarse de manera más precisa en función de la producción de urea (Figura 56) dado que el método utilizado para medir amonio no es lo suficientemente sensible.

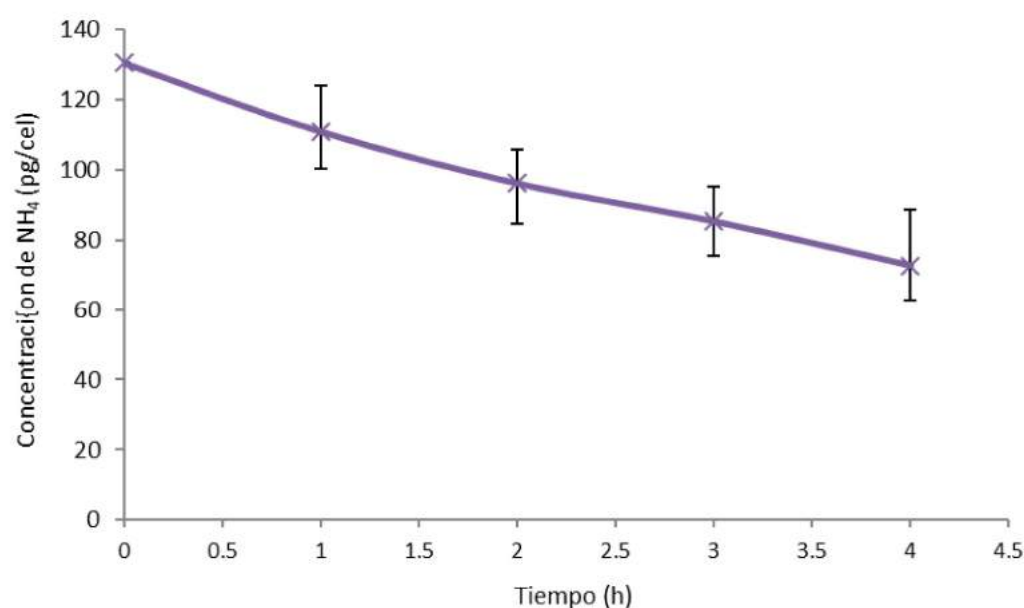


Figura 55: Metabolización del amonio por los esferoides hepáticos que fueron expuestos a una concentración de entre 370 y 880 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de amonio en el medio.

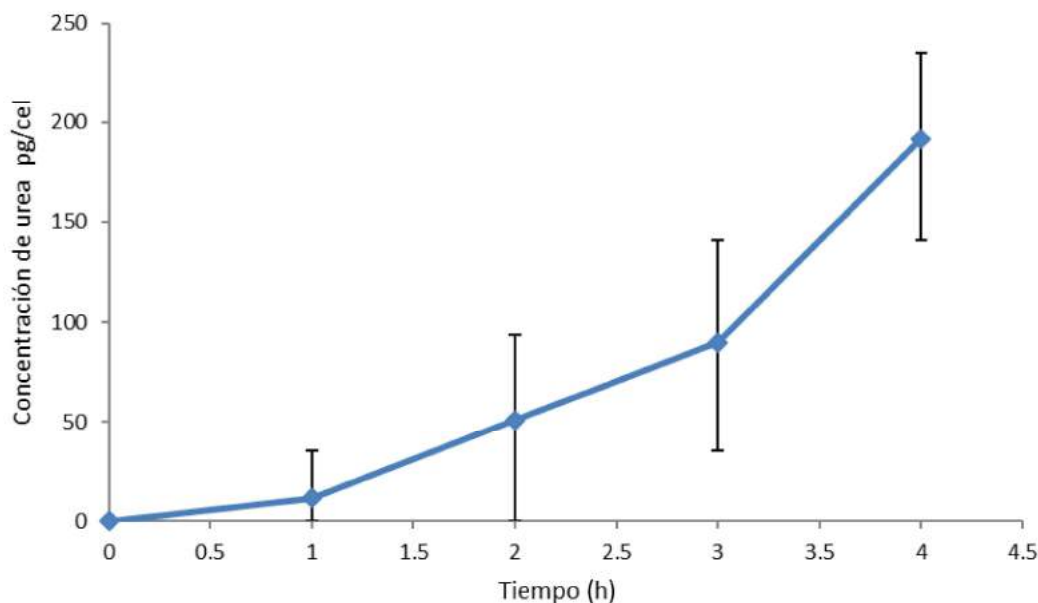


Figura 56: Producción de urea por los esféroides fueron expuestos a una concentración de entre 370 y 880 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de amonio en el medio.

De los valores obtenidos, es el metabolismo del ion amonio es el que se considerara en el diseño del dispositivo que, al calcular la velocidad de degradación como velocidad específica, se obtiene un valor de $14,1 \text{ pg}\cdot\text{celula}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

4.3.6.2 Metabolismo del diazepam

Los compuestos hidrofóbicos xenobióticos como drogas o toxinas son metabolizados en el hígado de mamíferos a derivados más polares. La ruta metabólica principal incluye una hidroxilación por la citocromo P450 hidroxilasa y la citocromo reductasa asociada a NADPH. Luego se produce una conjugación para formar sustancias más polares (Behnia *et al.*, 2000). Es por ello que se utilizó diazepam como la droga modelo para evaluar la actividad del citocromo P450. Para la evaluación del metabolismo del diazepam, se incubaron entre 247 y 357 mg de esféroides en 20 ml de buffer Hanks con $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de diazepam. En experimentos previos (A. Lorenti *et al.*, 2005) se demostró que la concentración y tiempo de incubación eran adecuados para obtener una cuantificación significativa en HPLC del diazepam y sus metabolitos.

La identidad del diazepam y sus principales metabolitos (temazepam, N-desmetil-diazepam y oxazepam) fue analizada en el sobrenadante de las muestras mediante una técnica analítica de HPLC descrita en el Anexo 1. La presencia de los diferentes metabolitos fue confirmada mediante la utilización de estándares grado HPLC. Para el análisis cuantitativo se realizaron curvas de calibración y se utilizó midazolam como estándar interno.

4.3.6.3 Curva de calibración

A partir del área bajo el pico de elución de cada metabolito (Figura 57) se obtuvo una curva de calibración (Figura 58) para la evaluación cuantitativa de las muestras biológicas en base a la relación de masa inyectada.

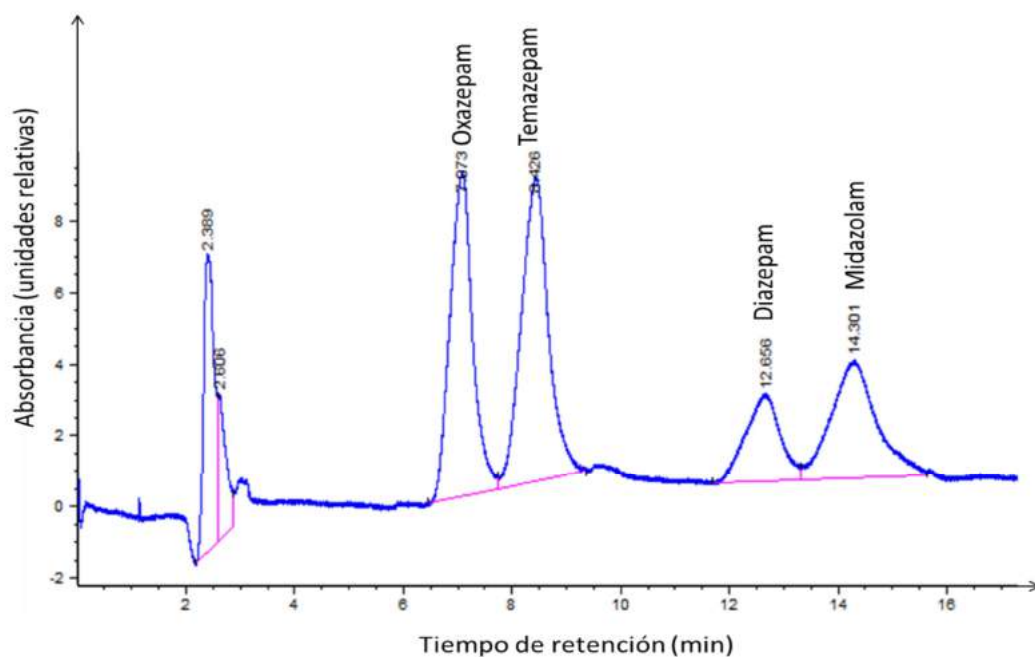


Figura 57: Cromatograma HPLC del diazepam y sus metabolitos de acuerdo al método descrito en el Apéndice 1

Como se muestra en la Figura 59, a partir de las 2 h se observa una tendencia a la metabolización que se confirma a las 4 h de incubación de los esferoides hepáticos.

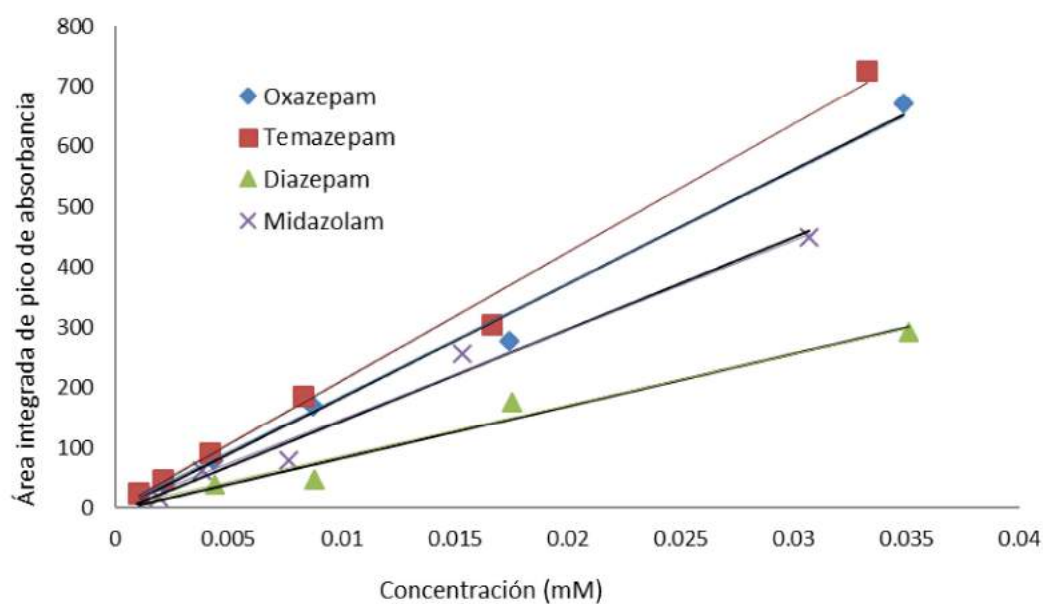


Figura 58: Curva de calibración HPLC. Se obtuvieron los siguientes R^2 : oxazepam 0,9920; temazepam 0,9923; diazepam 0,9631; midazolam 0,9832

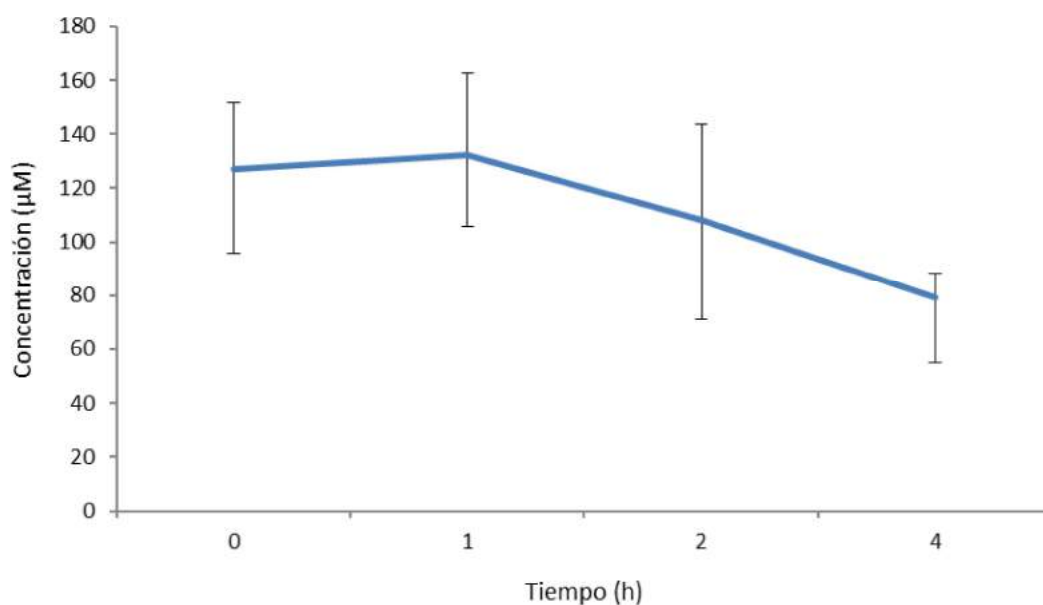


Figura 59: Degradación del diazepam por los esféroides cuando son expuestos a una concentración de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de diazepam.

Los metabolitos generados a partir de la transformación del diazepam también fueron detectados (Figura 60). La formación del temazepam fue cuantitativamente mayor, indicando la importancia de la hidroxilación (de diazepam a temazepam) como la vía metabólica más

importante que la desmetilación en estos hepatocitos. Sin embargo, no se descartan las otras vías metabólicas de degradación del diazepam.

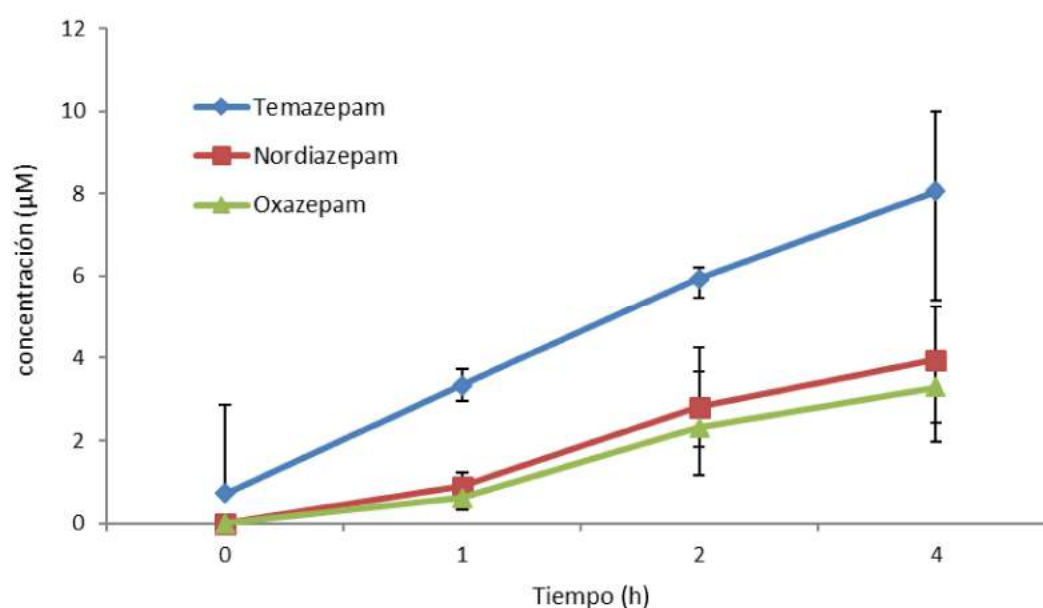


Figura 60: Evolución de la generación de metabolitos de degradación por los esferoides cuando son expuestos a una concentración de $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de diazepam.

La actividad de detoxificación observada es una buena señal de la viabilidad e integridad de los hepatocitos en el esferoide, ya que las enzimas del citocromo P450 son unas de las enzimas más sensibles, que en condiciones desfavorables se inactivan. Los valores de degradación específica del diazepam depende del tiempo de incubación, obteniéndose valores desde 0,53 hasta $1,35 \text{ pg}\cdot\text{celula}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Estos valores estuvieron en el rango de los reportados en bibliografía de 0,47 y $2,62 \text{ pg}\cdot\text{celula}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Bader, De Bartolo, & Haverich, 2000).

4.4 CONCLUSIONES

El componente biológico del dispositivo BAL considerado en este trabajo consiste en esferoides hepáticos porcinos. Para obtenerlos, las células hepáticas (mayormente hepatocitos) se aislaron a partir de hígados ablacionados siguiendo los protocolos utilizados para trasplante, y luego con un tratamiento combinado de quelación, hidrólisis enzimática y disgregación mecánica. Los esferoides se formaron a partir de las células obtenidas, a partir de cultivo en frascos agitados con medio de cultivo nutritivo. La biomasa fue cuantificada por peso húmedo, y los esferoides fueron caracterizados en cuanto a su potencial funcionalidad en el dispositivo.

Se obtuvieron esferoides funcionales con un consumo de oxígeno de $0,12 \text{ pmol} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, un metabolismo del amonio de $14,1 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y un metabolismo del diazepam en el orden de $0,53 - 1,35 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Durante los diferentes ensayos, se realizó además un seguimiento de las enzimas LDH y ALT liberadas, hallándose valores dentro del rango que se considera normal en porcinos, lo que ratifica el buen estado fisiológico general de los esferoides obtenidos.

4.5 REFERENCIAS

- Backer, M. P., Metzger, L. S., Slaber, P. L., Nevitt, K. L., & Boder, G. B. (1988). Large-scale production of monoclonal antibodies in suspension culture. *Biotechnol Bioeng*, 32(8), 993-1000.
- Bader, A., De Bartolo, L., & Haverich, A. (2000). High level benzodiazepine and ammonia clearance by flat membrane bioreactors with porcine liver cells. *Journal of Biotechnology*, 81(2-3), 95-105.
- Bader, A., Knop, E., Kern, A., Boker, K., Fruhauf, N., Crome, O., . Sewing, K. F. (1996). 3-D coculture of hepatic sinusoidal cells with primary hepatocytes-design of an organotypical model. *Exp Cell Res*, 226(1), 223-233.
- Baker, B. L., Morrow, A. L., Vergalla, J., Paul, S. M., & Jones, E. A. (1990). Gamma-aminobutyric acid (GABAA) receptor-function in a rat model of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*, 5(4), 185-193.
- Barbich, M., Lorenti, A., Hidalgo, A., Ielpi, M., de Santibanez, M., de Santibanez, E., Argibay, P. F. (2004). Culture and Characterization of Human Hepatocytes Obtained after Graft Reduction for Liver Transplantation: A Reliable Source of Cells for a Bioartificial Liver. *Artificial Organs*, 28(7), 676-682.
- Basile, A. S., Hughes, R. D., Harrison, P. M., Murata, Y., Pannell, L., Jones, E. A., Skolnick, P. (1991). Elevated brain concentrations of 1,4-benzodiazepines in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med*, 325(7), 473-478.
- Bauer, T. M., Ritz, R., Haberthur, C., Ha, H. R., Hunkeler, W., Sleight, A. J., . Haefeli, W. E. (1995). Prolonged sedation due to accumulation of conjugated metabolites of midazolam. *Lancet*, 346(8968), 145-147.
- Behnia, K., Bhatia, S., Jastromb, N., Balis, U., Sullivan, S., Yarmush, M., & Toner, M. (2000). Xenobiotic metabolism by cultured primary porcine hepatocytes. *Tissue Eng*, 6(5), 467-479.
- Berry, M. N., & Friend, D. S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol*, 43(3), 506-520.
- Boraston, R., Thompson, P. W., Garland, S., & Birch, J. R. (1983). Growth and oxygen requirements of antibody producing mouse hybridoma cells in suspension culture. *Dev Biol Stand*, 55, 103-111.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

- Broxmeyer, H., Cooper, S., Lu, L., Miller, M., Langefeld, C., & Ralph, P. (1990). Enhanced stimulation of human bone marrow macrophage colony formation *in vitro* by recombinant human macrophage colony-stimulating factor in agarose medium and at low oxygen tension. *Blood*, 76(2), 323-329.
- Darr, T. B., & Hubel, A. (1997). Freezing characteristics of isolated pig and human hepatocytes. *Cell Transplantation*, 6(2), 173-183.
- Dorresteyn, R. C., de Gooijer, C. D., Tramper, J., & Beuvery, E. C. (1994). A method for simultaneous determination of solubility and transfer coefficient of oxygen in aqueous media using off-gas mass spectrometry. *Biotechnol Bioeng*, 43(2), 149-154.
- Fleischaker, R., Jr., & Sinskey, A. (1981). Oxygen demand and supply in cell culture. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 12(4), 193-197.
- Hiller, G. W., Aeschlimann, A. D., Clark, D. S., & Blanch, H. W. (1991). A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum-free medium. *Biotechnol Bioeng*, 38(7), 733-741.
- Itzhak, Y., Roig-Cantisano, A., Dombro, R. S., & Norenberg, M. D. (1995). Acute liver failure and hyperammonemia increase peripheral-type benzodiazepine receptor binding and pregnenolone synthesis in mouse brain. *Brain Res*, 705(1-2), 345-348.
- Kilburn, D. G., Lilly, M. D., & Webb, F. C. (1969). The Energetics of Mammalian Cell Growth. *Journal of Cell Science*, 4(3), 645-654.
- Koller, M. R., Bender, J. G., Miller, W. M., & Papoutsakis, E. T. (1992). Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. *Exp Hematol*, 20(2), 264-270.
- Koller, M. R., Bender, J. G., Papoutsakis, E. T., & Miller, W. M. (1992). Beneficial effects of reduced oxygen tension and perfusion in long-term hematopoietic cultures. *Ann N Y Acad Sci*, 665, 105-116.
- Krebs, H. A. (1951). The use of 'CO₂ buffers' in manometric measurements of cell metabolism. *Biochem J*, 48(3), 349-359.
- Lin, H. S., & Hsu, S. (1986). Modulation of tissue mononuclear phagocyte clonal growth by oxygen and antioxidant enzymes. *Exp Hematol*, 14(9), 840-844.
- Lorenti, A., Barbich, M., Ceballos, C., Spaho, N., Mele, M., Sorroche, P., Argibay, P. (2005). Cultivo y utilización de esferoides de hepatocitos porcinos en un dispositivo de hígado bioartificial y su evaluación en un modelo animal de falla hepática fulminante. Paper presented at the XVIII Congreso de la Sociedad latinoamericana y del Caribe de Transplantes., Cancún, Mexico.
- Lorenti, A., Barbich, M., Santibanes, M. d., Ielpi, M., Vazquez, J. C., Sorroche, P., & Argibay, P. (2003). Ammonium Detoxification Performed by Porcine Hepatocyte Spheroids in a Bioartificial Liver for Pediatric Use: Preliminary Report. *Artificial Organs*, 27(7), 665-670.
- Meilhoc, E., Wittrup, K. D., & Bailey, J. E. (1990). Influence of dissolved oxygen concentration on growth, mitochondrial function and antibody production of hybridoma cells in batch culture. *Bioprocess Engineering*, 5(6), 263-274.

- Miller, W. M., Wilke, C. R., & Blanch, H. W. (1987). Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. *J Cell Physiol*, 132(3), 524-530.
- Mitry, R. R., Hughes, R. D., Aw, M. M., Terry, C., Mieli-Vergani, G., Girlanda, R., . . . Dhawan, A. (2003). Human hepatocyte isolation and relationship of cell viability to early graft function. *Cell Transplant*, 12(1), 69-74.
- Mitry, R. R., Hughes, R. D., & Dhawan, A. (2002). Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13(6), 463-467.
- Nakamura, T., Yoshimoto, K., Nakayama, Y., Tomita, Y., & Ichihara, A. (1983). Reciprocal modulation of growth and differentiated functions of mature rat hepatocytes in primary culture by cell-- contact and cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(23), 7229-7233.
- Olasmaa, M., Rothstein, J. D., Guidotti, A., Weber, R. J., Paul, S. M., Spector, S., . . . Costa, E. (1990). Endogenous benzodiazepine receptor ligands in human and animal hepatic encephalopathy. *J Neurochem*, 55(6), 2015-2023.
- Oller, A. R., Buser, C. W., Tyo, M. A., & Thilly, W. G. (1989). Growth of mammalian cells at high oxygen concentrations. *J Cell Sci*, 94 (Pt 1), 43-49.
- Ozturk, S. S., & Palsson, B. O. (1990). Effects of dissolved oxygen on hybridoma cell growth, metabolism, and antibody production kinetics in continuous culture. *Biotechnol Prog*, 6(6), 437-446.
- Ramirez, O. T., & Mutharasan, R. (1990). Cell cycle- and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng*, 36(8), 839-848.
- Rich, I. N. (1986). A role for the macrophage in normal hemopoiesis. II. Effect of varying physiological oxygen tensions on the release of hemopoietic growth factors from bone-marrow-derived macrophages *in vitro*. *Exp Hematol*, 14(8), 746-751.
- Singh, V. (1996). On-line measurement of oxygen uptake in cell culture using the dynamic method. *Biotechnol Bioeng*, 52(3), 443-448.
- Suleiman, S., & Stevens, J. (1987). The effect of oxygen tension on rat hepatocytes in short-term culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, 23(5), 332-338.
- Terry, C., Dhawan, A., Mitry, R. R., & Hughes, R. D. (2006). Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology*, 53(2), 149-159.
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1926). Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. *Klinische Wochenschrift*, 5(19), 829-832.
- Wood, E. J. (1999). *Cell and tissue culture: Laboratory procedures in biotechnology* Edited by A. Doyle and J.B. Griliths 332 pp. Wiley, Chichester, UK. 1998. £55. ISBN 0-471-98255-5. *Biochemical Education*, 27(3), 187-188.
- Yoon, S. J., & Konstantinov, K. B. (1994). Continuous, real-time monitoring of the oxygen uptake rate (OUR) in animal cell bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 44(8), 983-990.
- Zhou, W., & Hu, W. S. (1994). On-line characterization of a hybridoma cell culture process. *Biotechnol Bioeng*, 44(2), 170-177.

5 DISEÑO DE UN BIORREACTOR

5.1 INTRODUCCIÓN

Como se describe en el Capítulo 1, el hígado ocupa un lugar central en el metabolismo corporal manteniendo la homeostasis, y es por ello que restituir o reemplazar las múltiples funciones hepáticas requiere un enfoque multidisciplinario para el desarrollo de un dispositivo híbrido de componentes biológicos y sintéticos.

En este Capítulo se analiza el diseño y construcción del componente sintético a partir de los resultados y conclusiones desarrollados en los Capítulos anteriores.

5.1.1 Aspectos críticos del diseño

Como también se mencionó en el Capítulo 1, la construcción de un dispositivo de soporte hepático que contenga células, tiene algunos aspectos críticos fundamentales a tener en cuenta (Ellis, Jarman-Smith *et al.* 2005, Pörtner, Nagel-Heyer *et al.* 2005, Burdick & Mauck 2010, Salehi-Nik, Amoabediny *et al.* 2013):

- Mantener la función y viabilidad celular de una cantidad óptima de biomasa para el tratamiento de los metabolitos: disposición espacial, nutrientes, temperatura, pH y evitar fuerzas de corte; y a su vez, proveer los requisitos nutricionales de estas células.
- Asegurar la transferencia de materia: de manera bidireccional, requerido para proporcionar nutrientes vitales para las células, evitar el contacto con el sistema inmunológico del paciente y simultáneamente permitir la exportación de catabolitos celulares.
- Proveer oxígeno a las células en las concentraciones adecuadas y de manera constante.
- Escalado a niveles terapéuticos efectivos, sumado a los aspectos logísticos como el almacenado y transporte, para disponer de dispositivos flexibles e independientes. Costos significativamente menores a un trasplante y compatibilidad con otros tratamientos y procedimientos que se realicen en la terapia intensiva.
- Considerar el modo de operación y la inoculación del reactor, a fin de reponer biomasa si fuera necesario para prolongar el tiempo de tratamiento

Los tejidos para que sean funcionales son necesariamente de mayor tamaño que las células y lograr este aumento de masa y por lo tanto una reducción de la relación área/volumen afecta a uno de los aspectos más críticos del diseño de un biorreactor: la transferencia de materia. La

viabilidad del tejido depende de gradientes de moléculas difundiendo hacia adentro y afuera del mismo, así como también estímulos mecánicos adecuados.

Es por ello que la transferencia de materia en el biorreactor es crítica, y es uno de los principales desafíos en los cultivos de tejidos en escala. Los nutrientes, el oxígeno y las moléculas regulatorias deben ser transferidas desde el medio de cultivo a la superficie del tejido (transferencia de materia externa), así como desde la superficie del tejido al interior de cada célula (transferencia de materia interna), como se describe en la Figura 61, donde:

- La transferencia de gas en la burbuja es rápida.
- La interfaz gas-líquido contribuye con una resistencia a la transferencia despreciable.
- La película líquida alrededor de las burbujas representa la resistencia principal a la transferencia de oxígeno.
- La transferencia en el seno del líquido es rápida si hay un buen mezclado.
- La película líquida alrededor del tejido o cúmulo de células representa una resistencia a la transferencia de oxígeno que puede ser importante.
- La resistencia en la interfaz líquido-tejido suele ser despreciable.
- La resistencia intra-partícula (cúmulo de células o tejido celular) puede ser significativa porque el oxígeno debe transportarse hasta las células que se encuentren más lejos de la superficie: la magnitud de esta resistencia depende del espesor del tejido.

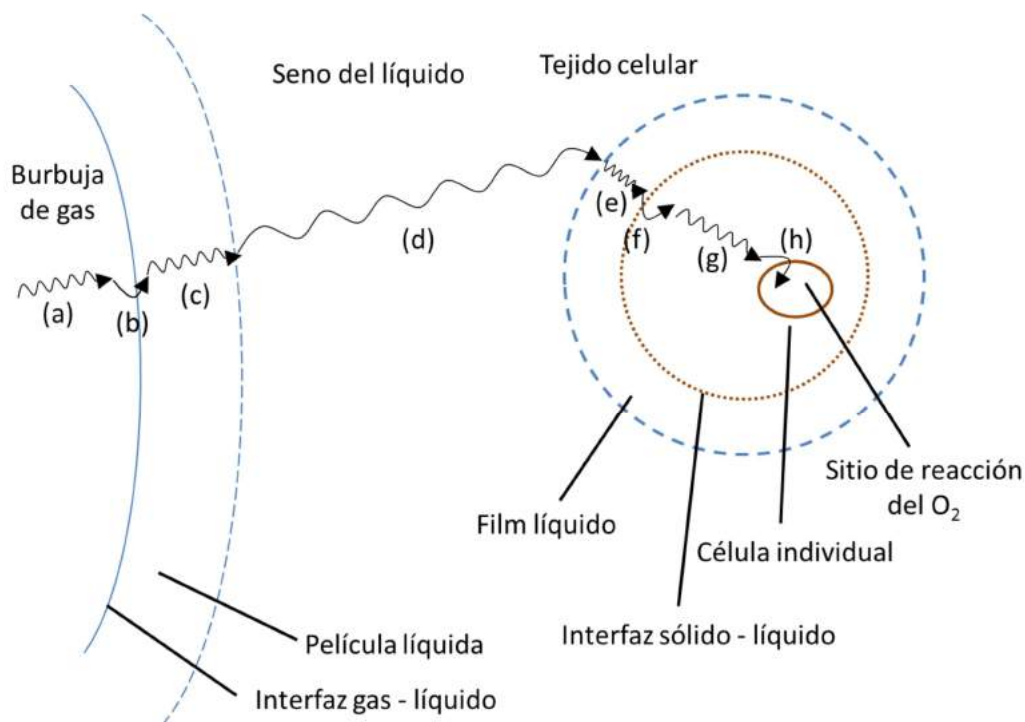


Figura 61: Transferencia de oxígeno desde la burbuja gaseosa a la célula, adaptado de (Doran, 1995)

Análogamente, pero en sentido opuesto, el CO_2 y los metabolitos producidos por las células deben transferirse desde el interior de las células donde se genera, a la superficie del tejido y luego al medio de cultivo.

La *velocidad de la transferencia de materia externa* depende esencialmente de las condiciones hidrodinámicas del biorreactor y la velocidad de transferencia interna. A su vez, la *velocidad de transferencia de materia interna* depende de la combinación de la difusión y la convección hacia dentro del tejido y de la matriz donde se sembraron las células (si este fuera el caso), considerando tamaño, forma y porosidad (Doran, 1995).

Dentro de la transferencia de materia, la transferencia de oxígeno es de los procesos más críticos debido a la baja solubilidad de oxígeno en el medio ($35,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en agua a 35°C con O_2 puro a 1 atm, $7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en agua a 35°C con O_2 0,21 atm). Esto se suma a que además la profundidad de penetración del O_2 en un tejido *in vivo* debido a la difusión se encuentra en el orden de 100 a $200 \mu\text{m}$ (dado que un hepatocito mide aproximadamente $25 \mu\text{m}$ de diámetro, esto sería el equivalente a entre 4 y 8 células). Además, los tejidos tienen un rango de tensión de oxígeno adecuado por debajo del cual sufren necrosis y por encima de éste, estrés oxidativo. Es por ello que considerar las distancias de difusión es clave en el diseño de un biorreactor (Schumpe & Deckwer, 1979).

Para suministrar oxígeno a un cultivo celular, pueden utilizarse uno, o una combinación de los siguientes métodos: aeración superficial, burbujeo directo, burbujeo indirecto y/o aireación con membranas (difusión), perfusión del medio (en un cultivo alimentado), incremento en la presión parcial de oxígeno, incremento en la presión atmosférica (presión total). Los dos últimos métodos buscan aumentar la solubilidad del oxígeno, mientras que los anteriores aumentan el área de intercambio gaseoso aire - medio de cultivo.

La concentración de O_2 en el medio de cultivo es por lo tanto un balance entre el O_2 transferido y el O_2 consumido, y debido a ello es que puede ser unas 10 veces menor que el calculado a partir del equilibrio con la fase gaseosa.

En un dispositivo de soporte hepático que contenga células, el suministro de oxígeno puede realizarse como parte del mismo dispositivo o como un dispositivo independiente que oxigene por ejemplo el plasma sanguíneo a detoxificar.

5.1.2 Elección de la membrana

Para elegir el tipo de membrana de fibra hueca más adecuado para la construcción de un biorreactor deben considerarse los siguientes parámetros y su influencia sobre el dispositivo final (Tabla 12).

Tabla 12: Parámetros de la fibra hueca y su importancia en el diseño del biorreactor

Parámetro	Importancia en el diseño
Material	Propiedades de difusión, hidrofiliicidad, hemocompatibilidad, resistencia al ensamblado e irradiación
Dispersión de tamaño de poro	Permeabilidad hidráulica y a solutos
Porosidad superficial	Superficie útil
Espesor de la membrana	Transferencia
Diámetro de la fibra:	Superficie / volumen, caudal de recirculación
Largo de la fibra:	Gradiente de concentración, superficie total de membrana
Número de fibras:	Superficie total de membrana, ensamblado dispositivo

Otros aspectos importantes a considerar en la construcción de un módulo de fibra hueca son:

- disponibilidad de los materiales
- métodos de esterilización
- costo

En el Capítulo 2 se describió el desarrollo de nuevas membranas con la incorporación de hidrogeles en sus poros. De los hidrogeles sintetizados de acuerdo a la composición descrita en la Tabla 5 se descartaron las membranas cuya permeabilidad hidráulica permitiera transporte convectivo, como así también las que impidieran totalmente el transporte de proteínas. Luego se estudió la selectividad de las membranas restantes como se mostró en la Tabla 8.

A partir de los resultados obtenidos se decidió trabajar con las membranas de PS con gel de poliAAm porque mostraron una mayor influencia de la composición química sobre la permeabilidad.

5.1.3 Diseño de un biorreactor de fibra hueca

Los biorreactores de fibra hueca permiten un incremento en la densidad celular respecto de otros biorreactores, facilitando el cultivo de tejidos tridimensionales y asegurando un microentorno adecuado a la funcionalidad celular debido a la comunicación célula - célula necesaria para muchos procesos metabólicos. Esto no es posible con un cultivo de baja densidad o en monocapa. Otra ventaja no menos importante de los reactores de fibra hueca es que los módulos de expansión del cultivo (escalado hacia arriba) pueden fabricarse industrialmente.

El módulo de fibras huecas puede considerarse como un manojo de fibras contenidas en la carcasa. Una sección transversal del mismo se describe en la Figura 62:

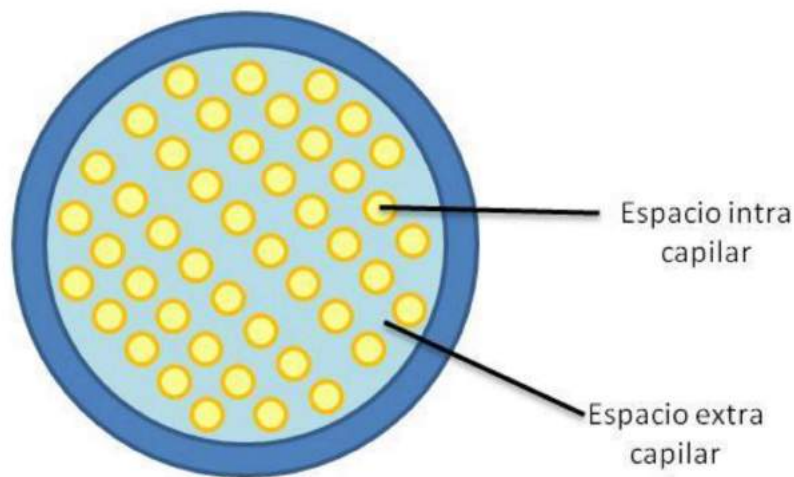


Figura 62: Corte transversal de un módulo de fibras huecas

Los reactores de fibras huecas utilizan membranas semipermeables. Estas membranas son selectivamente permeables a solutos según su tamaño, por lo que su permeabilidad está sujeta al tamaño de poro. Las membranas son utilizadas generalmente para separar dos compartimentos independientes, y gracias a ellas se puede transferir o retener sustancias en un compartimento u otro.

Las membranas semi-permeables se han utilizado en múltiples aplicaciones biomédicas, como por ejemplo riñones artificiales para el tratamiento de falla renal crónica (Klinkmann & Vienken 1995, Clark 2000) o en hígados artificiales, como los mencionados en la Introducción General y el propósito de diseño de esta tesis (Gerlach 1994, Flendrig *et al.* 1997). Otras aplicaciones frecuentes de las membranas semi-permeables es en los oxigenadores, utilizados en cirugías

corazón abierto (Wegner 1997, Mueller, Tevacaari *et al.* 2000) y como tratamiento de neonatos con insuficiencia respiratoria.

El biorreactor de fibras huecas inspirado en módulos de hemodiálisis fue descrito por Knazek (Knazek, Gullino *et al.* 1972). Las células pueden ser inoculadas en el lumen de las fibras o en el espacio extracapilar, según la aplicación. El oxígeno es transportado por convección (por el fluido perfundido) y difusión a través de la membrana desde el lumen de las membranas de aireación.

5.1.4 Esquema de un reactor de fibras huecas

La 63 muestra un esquema que describe la estructura de un dispositivo de fibras huecas, que consiste en un módulo con fibras huecas fijadas en los extremos de la carcasa. Los espacios intracapilares de las fibras están conectados entre sí en los extremos del dispositivo, formando un único espacio intracapilar. El espacio intracapilar y el espacio extracapilar están separados por la membrana semipermeable.

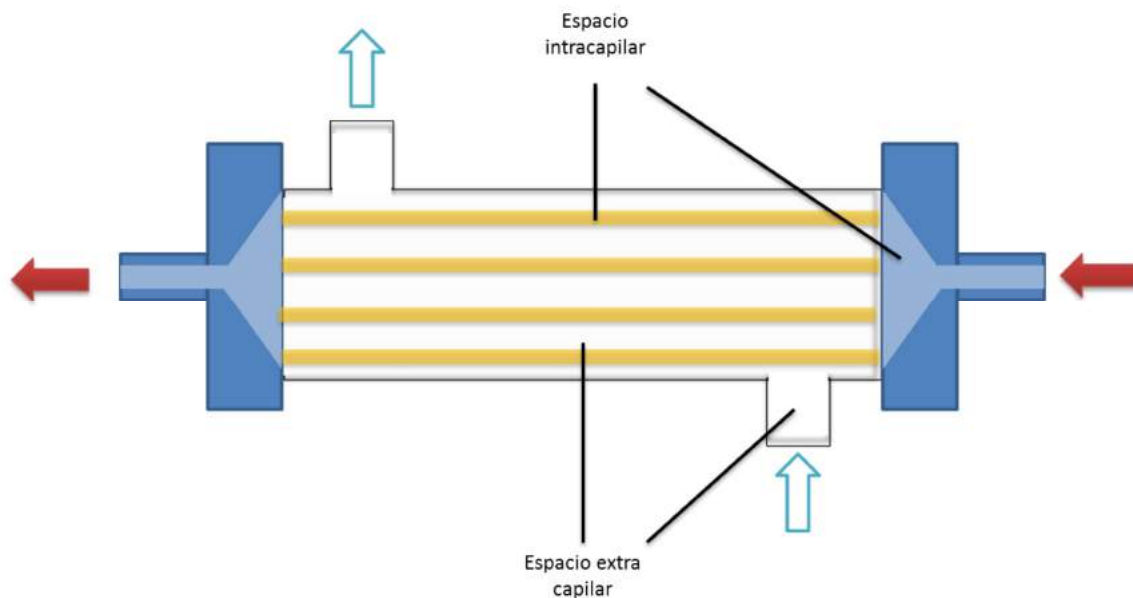


Figura 63: Esquema de un reactor de fibras huecas, las membranas de fibra hueca están representadas en amarillo. Los extremos representados en azul conectan los lúmenes de las mismas.

La membrana semipermeable permite la difusión de algunas moléculas a través de la misma. Dada la situación donde dos fluidos con diferente concentración de una sustancia cuyo PM es menor al MWCO, circulan uno por el espacio intracapilar y el otro por el extracapilar, la

sustancia mencionada difunde a través de la membrana desde el compartimento donde está en más concentración hacia el otro compartimento.

Desde el punto de vista funcional, el sistema consta de al menos dos compartimentos distintivos, que son:

- El circuito intracapilar de recirculación del fluido a tratar (como ser plasma del paciente). El fluido intracapilar se recircula por lo que el gradiente de concentración axial de metabolitos es despreciable.
- El espacio entre las fibras que aloja al componente biológico. Los metabolitos a detoxificar de tamaño menor al MWCO de la membrana difunden al espacio extracapilar.
- Puede agregarse un tercer compartimento si se destinan algunas fibras para el intercambio de gases. Los gases difunden desde y hacia el espacio intracapilar de las fibras de aireación y el espacio extracapilar.

Completan el sistema:

- Bomba peristáltica: moviliza el fluido intracapilar.
- Intercambiador de calor: mantiene a la temperatura óptima del fluido intracapilar.
- Intercambiador de gases: difusión de gases desde las fibras de aireación al medio donde se encuentra el componente biológico por difusión.
- La unidad de control es una unidad que censa, controla y actúa sobre diferentes variables del módulo de fibras huecas. Estas variables pueden ser la temperatura, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, pH o metabolitos.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Prototipos contruidos

Los dispositivos contruidos se ensamblaron de manera tal que posibiliten la polimerización del hidrogel *in situ*. Durante el ensamblado se enhebraron las fibras con tanzas de Nylon® (como se describió en Capítulo 2) y se contruyeron colocando tapas provisorias, en algunas ocasiones las mismas que se utilizarían en la operación, y en otras unas tapas que luego se descartaron. Al igual que en el caso de la polimerización de las fibras solas, se rellenó el volumen extra-membrana con vaselina líquida. Luego de la irradiación, se drenó la vaselina, se quitaron cuidadosamente las tapas de los extremos y se quitaron las tanzas de Nylon®. Se enjuagó todo

el cartucho con agua destilada varias veces hasta quitar en exceso de vaselina. Se verificó la integridad de las fibras una a una, descartando aquellas que mostraban permeabilidad hidráulica mediante la obstrucción física.

Se ensayaron 4 modelos diferentes de dispositivo, explorando materiales disponibles en el laboratorio, modos de construcción y tipos de fibras. A continuación, se describen los dispositivos.

5.2.1.1 Dispositivo 1

El primer dispositivo construido fue elaborado a partir de un tubo de PS, conteniendo 68 membranas de fibra hueca de microfiltración de PS (Needham, EEUU) de 8 cm de largo. El tubo y los extremos utilizados se obtuvieron de un cartucho de microfiltración (Needham, EEUU) y fueron torneados y re adaptados para el dispositivo. Se utilizaron además conectores *luer-lock*, manguera de silicona, y una membrana porosa de Nylon[®]. También se utilizó una membrana de aireación de polipropileno sinterizado (Porex[®]) de diámetro de poro promedio de 100 μm .

Las membranas se unieron entre sí con resina epoxídica (Poxipol[®] transparente) previamente pasándolas a través de los orificios de una malla plástica para que se mantengan separadas y equidistantes. Para unir y sellar los componentes del cartucho se utilizó pegamento termofusible a base de copolímero del acetato del etileno-vinilo (Suprabond[®]).

El hidrogel utilizado fue poliAAM 0,5 M y 1 % de entrecruzamiento, obtenido según el protocolo de polimerización descrito en el Capítulo 2.

5.2.1.2 Dispositivo 2

En este dispositivo se utilizaron 18 membranas de plasmaféresis fabricadas en polietileno (Plasmaflow[®], Japón), en configuración fibra hueca de 7,5 cm de largo, 340 μm de diámetro interno, 440 μm de diámetro externo, 50 μm de espesor y un tamaño de poro promedio de 0,3 μm . Se utilizó filamento de Nylon[®] de 0,2 mm (Nitanyl[®]) en la polimerización. La carcasa se fabricó con un cilindro de PS de 2 cm de diámetro.

Las membranas se unieron entre sí con resina epoxídica (Poxipol[®] transparente). Para unir y sellar los componentes del cartucho se utilizó pegamento termofusible a base de copolímero del acetato del etileno-vinilo (Suprabond[®]).

5.2.1.3 Dispositivo 3

Este módulo fue diseñado *in silico* utilizando el software Rhinoceros®. Las piezas diseñadas fueron torneadas en polioximetileno (Delrin®, de DuPont®) en un taller de tornería de precisión (Tornería Mecánica Svarychevski, Bernal). El módulo contiene 12 fibras huecas de microfiltración idénticas a las utilizadas en el Dispositivo 1.

Se diseñó una pieza separadora y las fibras se unieron al mismo con adhesivo a base de cianoacrilato (La Gotita Gel® de Poxipol®).

La determinación de las permeabilidades se realizó utilizando el dispositivo y dos bombas peristálticas para la recirculación de las soluciones intra y extra capilar. Por el espacio extracapilar se recirculó buffer fosfato salino (PBS) 30 mM pH 7,4, con 0,01 % de Azida de sodio utilizada como bactericida. Por el espacio intracapilar se recirculó una solución idéntica a la anterior, más el agregado de glucosa 1 g·l⁻¹, HSA 40 g·l⁻¹ e IgG 12 g·l⁻¹. Todo el sistema se termostató a 37 °C. El flujo convectivo fue despreciable en las condiciones experimentales utilizadas (determinado por el mantenimiento constante de los volúmenes de los reservorios durante el experimento). La determinación de la glucosa se realizó fuera de línea mediante el método enzimático de la glucosa oxidasa (Wiener SRL) (Trinder 1969). La cuantificación de proteínas se realizó por EC. Las columnas capilares de sílica fundida (diámetro interno: 75 mm x 35 cm largo, 27 cm el detector) son de Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA. El equipo de EC es de Waters, Miliford, MA, USA. Se utilizó como electrolito una solución de buffer borato 30 mM (pH 8,3) conteniendo LiCl 15 mM, a 25 °C, con detección UV en 200 nm.

5.2.1.4 Dispositivo 4

El cuarto dispositivo fue diseñado *in silico* con el software Rhinoceros®. Las piezas diseñadas fueron torneadas en polioximetileno (Delrin®, de DuPont®) en un taller de tornería de precisión (Tornería Mecánica Svarychevski, Bernal). Este diseño es más complejo que el anterior, agregándose mayor cantidad de fibras de microfiltración (50 fibras de 10 cm de largo) con la posibilidad de utilizar algunas para oxigenación.

El dispositivo descripto tiene un volumen total de 59,4 cm³ y un volumen interior (volumen total – volumen ocupado por las fibras) de 50,6 cm³, espacio donde se inocularon los esferoides. No se utilizaron las fibras de aireación, en su lugar se aireó con aire estéril la solución intracapilar y previamente la solución con extracapilar, donde después se colocaron los esferoides hepáticos.

En este dispositivo, luego de verificar la integridad de las membranas comprobando que no haya permeabilidad hidráulica, se realizó el ensayo de detoxificación de amonio con el

dispositivo. Para ello, se introdujeron en el espacio extracapilar 7 g de esferoides hepáticos (equivalentes a 4×10^8 células) obtenidos según el protocolo descrito en el Capítulo 3.

Por el espacio extracapilar se recirculó buffer Hanks pH 7,2 con el agregado de HEPES $25 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$, NaHCO_3 $0,35 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, glucosa $0,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ y por el espacio intracapilar se recirculó una solución idéntica con el agregado de NH_4Cl , para lograr una concentración final aproximada de 1 mM. Todo el sistema se termostató a 37°C . La determinación del ion amonio fue realizada por el método enzimático basado en la condensación de amonio y α -cetoglutarato para producir glutamato (Synchron LX, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Este ensayo se extendió por 2 h.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se estudia la generación de prototipos de BAL del tipo reactor de fibra hueca para ser utilizados en la caracterización funcional del sistema.

Los requerimientos mínimos que se deben cumplir deben considerar los requerimientos del componente biológico: mantener la viabilidad y función celular asegurando el transporte de nutrientes y oxígeno, proteger los esferoides hepáticos de las fuerzas de corte y del sistema inmunológico del receptor. Facilitar la inoculación y el recambio de biomasa. Como también los requerimientos para cumplir con la función de detoxificación: asegurar un transporte de los metabolitos a detoxificar, junto a la posibilidad de escalado a niveles terapéuticos efectivos.

Para el desarrollo de un reactor de fibra hueca que reúna las características mencionadas se deben considerar los siguientes requisitos mínimos, que serán retomados en el análisis final:

- a) Determinación del rango de detoxificación.
- b) Cálculo de biomasa requerida.
- c) Cálculo de la superficie de membrana.
- d) Dimensionamiento del cartucho de detoxificación.
- e) Definición de los parámetros de operación.

Dado que este escalado presenta desafíos en cuanto a su ensamblado y operación, se ensayaron los dispositivos mencionados para evaluar, en escala pequeña, los materiales y adhesivos utilizados, pasos en el ensamblado y la escalabilidad del transporte de materia necesario para preservar la viabilidad celular.

5.3.1 Prototipos desarrollados

5.3.1.1 Dispositivo 1

Se construyó el primer dispositivo (Figura 64) de 3 compartimentos, indicados en la Figura 63. El mismo tiene las siguientes características:

- Espacio intracapilar: 68 fibras de 8 cm de longitud con acceso desde los extremos del dispositivo.
- Membrana de aireación de polipropileno (cilindro de 5 mm de diámetro interno y 10 mm de diámetro externo. Porosidad 45 % y diámetro de poro de 100 μm).
- Espacio extra capilar con acceso lateral.

Este dispositivo se irradió para la síntesis del hidrogel (poliAAm 0,5 M, 1 % entrecruzamiento) sin las tapas y tras verificar la integridad del hidrogel en las membranas se colocaron las tapas en los extremos.

En el ensamblado se observó que el hidrogel polimerizó adecuadamente en las membranas, por lo que la dosis de radiación gamma fue suficiente, pero el hidrogel no se generó en los extremos de las fibras, por lo que para los siguientes dispositivos se utilizó un agitador rotatorio. Por otra parte, la resina epoxídica (Poxipol® transparente) por el efecto de la radiación gamma se torna amarillenta y más rígida. El pegamento termofusible utilizado como sellante (copolímero del acetato del etileno-vinilo), se vio afectada su propiedad de refundirse con temperatura por efecto de la radiación gamma.



Figura 64: Dispositivo 1

Este dispositivo fue descartado a nivel de construcción porque no se logró un sellado perfecto, pero se decidió mejorar el diseño debido a que la membrana colocada con el propósito de oxigenar generaba burbujas, lo que podría ocasionar un daño a los esferoides por efecto cizalla.

5.3.1.2 Dispositivo 2

El Dispositivo 2 fue construido sobre un tubo de PS de 2 cm de diámetro conteniendo 18 membranas de ultrafiltración (tamaño de poro promedio de 50 nm) con un diámetro interno de la fibra hueca de 0,5 mm, diámetro externo de 1 mm y 7,5 cm de largo. Se utilizó filamento de Nylon® de 0,2 mm para bloquear temporalmente el lumen de las fibras evitando la formación de hidrogel. Este ensayo se realizó para evaluar la posibilidad de cambiar de membranas que implicara una mayor relación superficie/ volumen. El dispositivo construido se observa en la Figura 65.



Figura 65: Dispositivo 2

De un análisis macroscópico se observó que el hidrogel polimerizó, y se encontró presente a lo largo de todas las membranas, no obstante, se observó una alta permeabilidad, posiblemente por rotura de la membrana (debido a la presión transmembrana utilizada durante el experimento) y por unión deficiente con la carcasa externa. Es por ello que, al realizar los primeros ensayos, se encontraron diversos inconvenientes que imposibilitaron mediciones cuantitativas.

Por otra parte, el ensamblado de este modelo tuvo inconvenientes, ya que al utilizar el adhesivo termofusible se fundían tanto la membrana de PS como la tanza de Nylon® enhebrada. Se observó también el cambio de textura del Poxipol® luego de la irradiación.

5.3.1.3 Dispositivo 3

En base a los inconvenientes encontrados en los dispositivos anteriores, se decidió realizar un diseño *de novo* del dispositivo como primer prototipo con una pequeña cantidad de fibras y una relación largo / diámetro de 100 veces, que minimiza la resistencia de la fase fluida en condiciones de flujo laminar (ver Capítulo 2).

Este módulo se diseñó utilizando software de diseño 3D (Rhinoceros® y Fusion 360®) que contenga 12 fibras huecas de PS. En la Figura 64 se observa el diseño renderizado: la pieza representada en color amarillo semitransparente es un tubo de PS, las varillas amarillas son varillas roscadas para permitir la sujeción de los extremos, las piezas azules son terminaciones que sujetan las mangueras conectadas al dispositivo, y las piezas blancas son las piezas de los extremos que fueron torneadas en Delrin® (Figura 66).

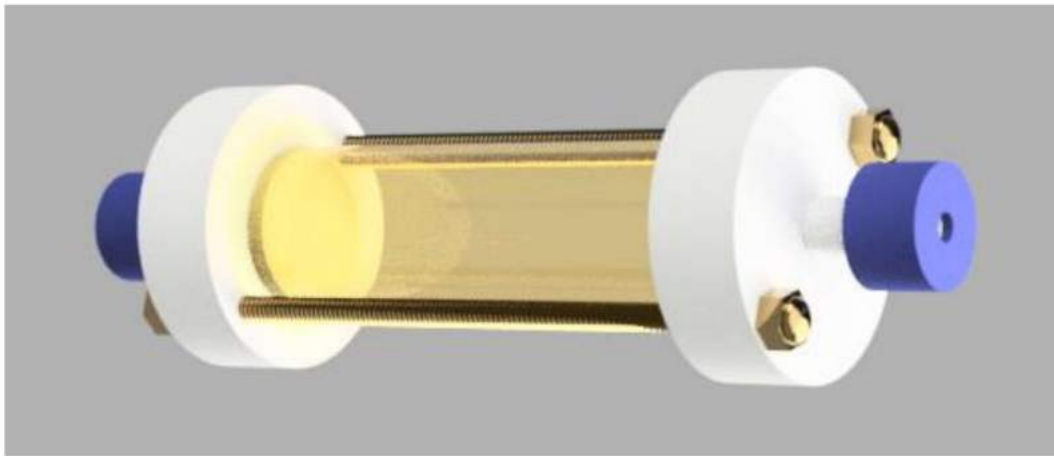


Figura 66: Modelo renderizado del Dispositivo 3, realizado con Rhinoceros®, sin incluir las fibras huecas

En la Figura 67 se observa el corte transversal de las piezas torneadas en Delrin®: A) pieza interna del acople de la manguera, B) extremo del dispositivo, donde convergen los espacios intracapilares, C) separador de fibras, que facilita el ensamblado y mejora la circulación de líquido en el espacio extracapilar.

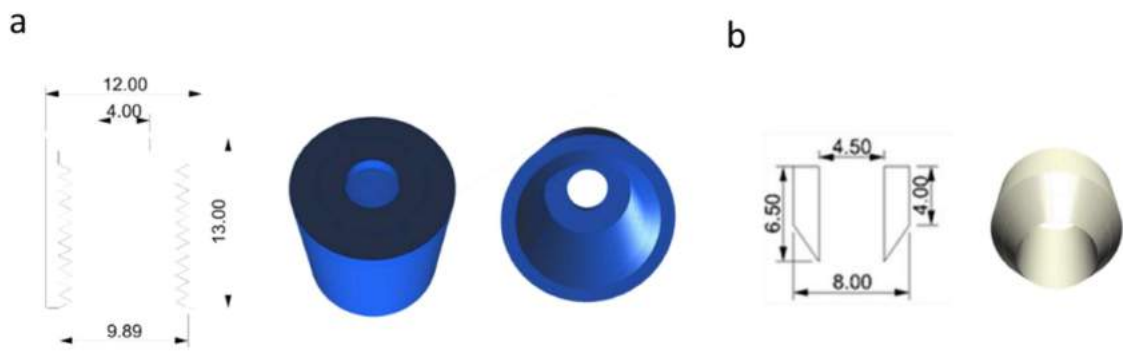


Figura 69: a) Detalle acople: pieza metálica b) Detalle acople: pieza Delrin®

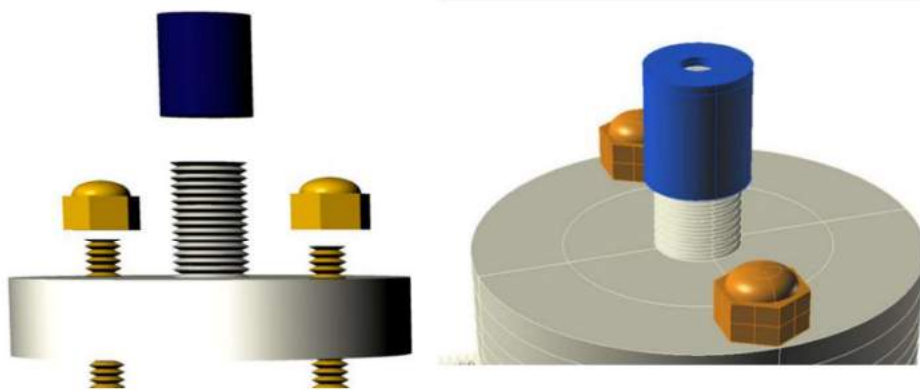


Figura 70: Detalle del extremo del dispositivo 3

El dispositivo ensamblado se aprecia en la Figura 71:

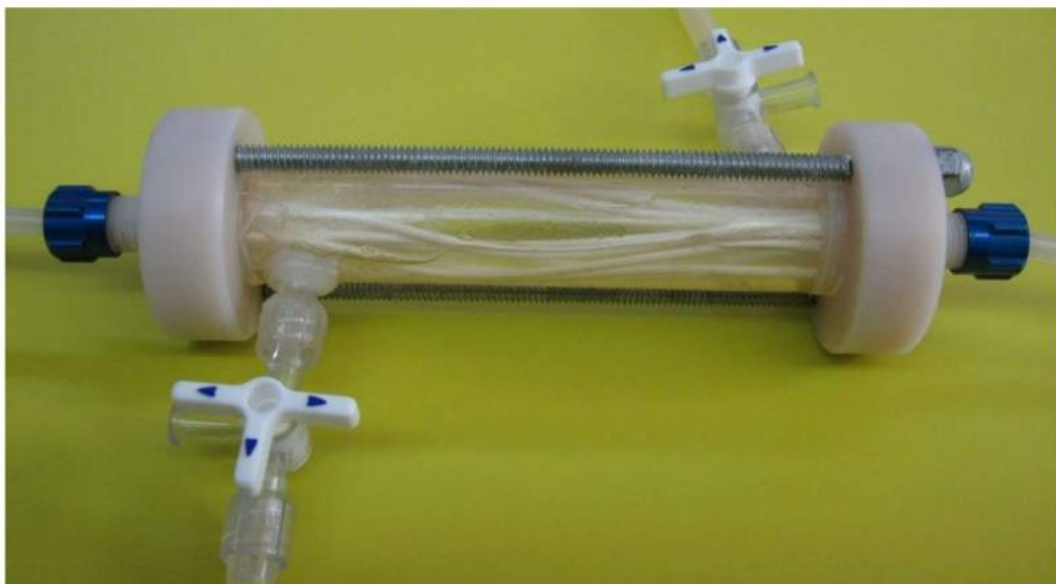


Figura 71: Dispositivo 3

El Dispositivo 3 preparado resultó ser hermético, y de ensamblado sencillo. Con este Dispositivo 3 se realizaron 5 experimentos reemplazando las fibras cada vez con las respectivas radiaciones para obtener el hidrogel confinado (ver Tabla 13). El dispositivo fue utilizado para la determinación de la permeabilidad de las membranas. Se obtuvieron en promedio valores de permeabilidad similares a los determinados para una fibra individual: $1,10 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para la glucosa, $6,72 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para HSA y $5,02 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para IgG.

Las piezas torneadas del Dispositivo 3 no fueron afectadas por la radiación en cuando a su función. Solamente se observó un cambio en la tonalidad del material con las sucesivas radiaciones.

Tabla 13: Experimentos de determinación de la permeabilidad realizados con el Dispositivo 3

	Permeabilidad (cm^2s^{-1})			Observaciones
	Glucosa	HSA	IgG	
1	$1,31 \times 10^{-6}$	$6,81 \times 10^{-7}$	$5,08 \times 10^{-7}$	11 fibras efectivas, 1 fibra anulada
2	$8,50 \times 10^{-7}$	$6,55 \times 10^{-7}$	$4,70 \times 10^{-7}$	12 fibras efectivas
3	$1,30 \times 10^{-6}$	$6,81 \times 10^{-7}$	$5,34 \times 10^{-7}$	9 fibras efectivas, 3 fibras anuladas
4	$1,28 \times 10^{-6}$	$6,78 \times 10^{-7}$	$5,14 \times 10^{-7}$	10 fibras efectivas, 2 fibras anuladas
5	$7,80 \times 10^{-7}$	$6,64 \times 10^{-7}$	$4,85 \times 10^{-7}$	12 fibras efectivas

Estas mediciones fueron consistentes con las determinadas para las fibras simples, confirmando los resultados obtenidos previamente y avalando el escalado a un módulo.

El dispositivo en general tuvo un desempeño satisfactorio, por lo que el siguiente paso fue desarrollar un dispositivo más complejo, que incluyera membranas de oxigenación.

5.3.1.4 Dispositivo 4

En el Dispositivo 3 se resolvieron temas como la correcta polimerización del hidrogel en las membranas dentro del dispositivo y el ensamblado del resto de las piezas, especialmente conectores que garanticen la hermeticidad del módulo. En este dispositivo el objetivo principal fue incorporar membranas destinadas a la transferencia de oxígeno y demostrar la funcionalidad incluyendo el componente biológico.

Para ello, en el diseño de este dispositivo se consideraron tres compartimentos: uno para el componente biológico (esferoides hepáticos porcinos), otro para la solución a tratar (solución que contiene amonio) y el último exclusivo para la transferencia de oxígeno.

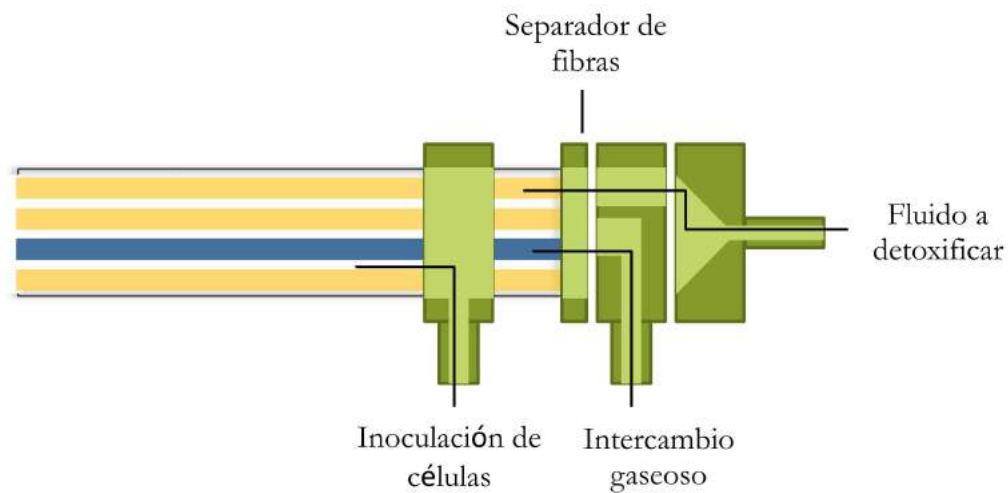


Figura 72: Detalle del diseño Dispositivo 4 con acceso a tres compartimentos: espacio para el componente celular, interior de membranas de intercambio de gases e interior de membranas para la recirculación de la solución a detoxificar.

Se agregaron respecto del diseño anterior (Dispositivo 3) dos piezas: pieza para aireación y pieza para acceso al espacio extracapilar.

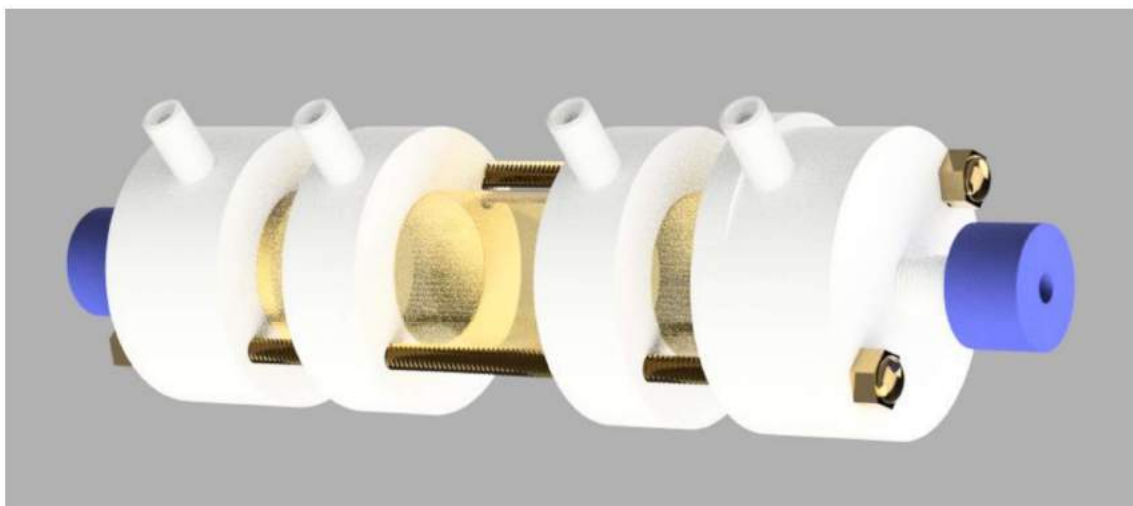


Figura 73: Imagen renderizada del Dispositivo 4.

En la Figura 74 se aprecia la construcción del dispositivo: a) muestra el enhebrado de las fibras de microfiltración con tanza de Nylon® de 0,7 mm de diámetro, para evitar que polimerice la poliAAm en el lumen de la fibra; b) ensamblado del dispositivo, utilizando una pieza que permite la separación de las fibras, asegurando una correcta distribución espacial; c) dispositivo listo para irradiar (no se colocó la pieza que se utiliza para oxigenación). El dispositivo contuvo un total de 50 fibras huecas.

Este dispositivo se ensambló varias veces, ya que en la construcción se observaron algunos inconvenientes, como la alteración de las propiedades de los pegamentos y problemas con la polimerización del hidrogel en las membranas con el cartucho ensamblado: en algunas ocasiones el hidrogel no se formaba cerca de las uniones, posiblemente porque las fibras no se embebían adecuadamente. En algunas ocasiones las tapas no se pegaron bien ocasionando la pérdida de monómeros, o se pegaron demasiado y no era posible quitarlas para extraer las tanzas de Nylon® y permitir el enjuague y posterior uso. Cada dificultad fue evaluada y corregida hasta lograr un dispositivo funcional.

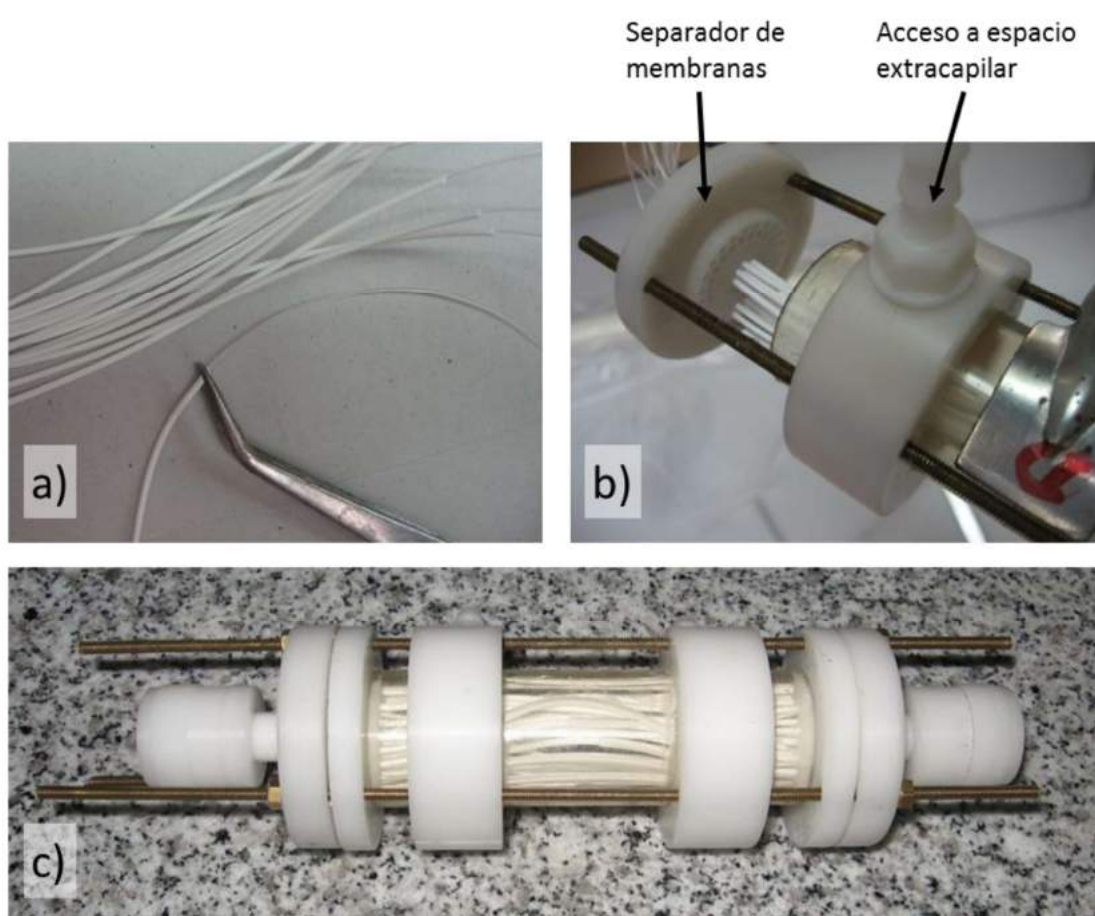


Figura 74: Construcción dispositivo: (a) fibra hueca con tanza enhebrada, (b) ensamble de fibras y (c) dispositivo preparado para la irradiación (c)

5.3.2 Evaluación del prototipo que contiene el componente biológico

Se realizó una prueba de concepto, considerando el ensayo de detoxificación como se explicó en la sección 4.4., utilizando el dispositivo 4 que fue ensamblado correctamente y generado *in situ* las membranas con hidrogel.

El Dispositivo 4 fue inoculado en el espacio extracapilar ($50,6 \text{ cm}^3$) con 7 g de esferoides hepáticos (biomasa equivalentes a 4×10^8 células) y perfundido durante 2 h con 1 l de buffer Hanks pH 7,2 y aditivos, entre los cuales está la glucosa y NH_4^+ en una concentración final 1 mM.

Se determinó una reducción del amonio de $2 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $1,8 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ durante el tiempo de perfusión analizado, que corresponde a una masa total de $2 \times 10^{-3} \text{ g}$ de amonio. Esto corresponde a una velocidad de detoxificación promedio de $3,02 \text{ pg} \cdot \text{celula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Si bien pudo determinarse una metabolización del amonio, este valor fue mucho menor que la velocidad obtenida ($14,127 \text{ pg} \cdot \text{celula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) determinada en el Capítulo 4 para los esferoides aislados. Sin embargo, debe destacarse que, de acuerdo a los cálculos, la limitación en este caso estuvo determinada por el dispositivo que limitó la transferencia de materia. Considerando que el amonio difunde de manera similar a la glucosa y, el área de intercambio disponible es de 157 cm^2 , la transferencia de soluto máxima esperable en las 2 h de tratamiento está en el orden de los $2 \times 10^{-3} \text{ g}$ encontrados experimentalmente.

Los resultados obtenidos no son estadísticamente significativos ya que el experimento pudo realizarse una única vez, pero significó una prueba de concepto necesaria para plantear un escalado.

5.4 CONCLUSIONES

En este capítulo se mostraron los diseños de reactores de fibras huecas realizados para aplicar las fibras desarrolladas en el Capítulo 2, que implicaron diversos desafíos tanto en el diseño como en su construcción. En el último diseño se incorporó el componente biológico, desarrollado en el Capítulo 3.

Se pudo demostrar que es posible el ensamblado de un dispositivo del tipo reactor de membranas que optimicen el transporte de determinados solutos de interés (en este caso solutos de bajo PM como la glucosa o el amonio y otras que podrían causar encefalopatías en pacientes con falla hepática), y que incluso favorezcan el transporte de la albúmina, pero limite la transferencia de moléculas del sistema inmunológico, como la IgG.

En el Dispositivo 1, se exploraron los materiales y su comportamiento frente a la radiación gamma. Los adhesivos utilizados y la manera de ensamblar fueron factores críticos para asegurar que el hidrogel penetre adecuadamente en los poros de las membranas de fibra hueca. La membrana de aireación, por su parte, generó burbujas que podrían ser muy dañinas para el componente biológico. Este diseño fue descartado por presentar inconvenientes en estos aspectos.

En el Dispositivo 2, se exploró la posibilidad de utilizar otras membranas (UF en lugar de MF) por su gran disponibilidad en el mercado. El dispositivo fue descartado por problemas de ensamblado y porque si bien estas membranas presentan una mejor relación área/volumen, el tamaño y dispersión de tamaño de poro, así como la porosidad total no representó una ventaja respecto de las membranas de MF.

En el Dispositivo 3, se consideraron los aspectos relevados del Dispositivo 1, y se diseñó el dispositivo utilizando software de diseño en 3 dimensiones (Rhinoceros®). Las piezas de los extremos y conectores fueron torneadas en Delrin®. Este dispositivo representó una mejora sustancial, ya que permitió un correcto ensamblado, síntesis del hidrogel, y además verificar las propiedades de las membranas embebidas con hidrogel en cuanto a la permeabilidad para diferentes solutos, obteniéndose valores similares de los hallados para las membranas aisladas.

En el Dispositivo 4, continuando el desarrollo del dispositivo anterior, se consideró un compartimento adicional, dado que se incluyeron membranas especiales para aireación, con la entrada y salida de aire correspondientes. En este dispositivo pudo demostrarse la función de detoxificación de amonio, mediante la inclusión de esferoides hepáticos en el espacio extracapilar del mismo.

5.5 REFERENCIAS

- Arkadopoulos, N., H. Lilja, K. S. Suh, A. A. Demetriou & J. Rozga (1998). Intrasplenic transplantation of allogeneic hepatocytes prolongs survival in anhepatic rats. *Hepatology* 28(5): 1365-1370.
- Bilello, J. A., G. Bauer, M. N. Dudley, G. A. Cole & G. L. Drusano (1994). Effect of 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine in an *in vitro* hollow-fiber pharmacodynamic model system correlates with results of dose-ranging clinical studies. *Antimicrob Agents Chemother* 38(6): 1386-1391.
- Burdick, J. A. & R. L. Mauck (2010). *Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Review of the Past and Future Trends*, Springer Vienna.
- Clark, W. R. (2000). Hemodialyzer membranes and configurations: a historical perspective. *Semin Dial* 13(5): 309-311.

- Doran, P. M. (1995). 9 - Mass Transfer. *Bioprocess Engineering Principles*. P. M. Doran. London, Academic Press: 190-217.
- Ellis, M., M. Jarman-Smith & J. B. Chaudhuri (2005). Bioreactor Systems for Tissue Engineering: A Four-Dimensional Challenge. *Bioreactors for Tissue Engineering: Principles, Design and Operation*. J. Chaudhuri & M. Al-Rubeai. Dordrecht, Springer Netherlands: 1-18.
- Flendrig, L. M., A. A. te Velde & R. A. Chamuleau (1997). Semipermeable hollow fiber membranes in hepatocyte bioreactors: a prerequisite for a successful bioartificial liver?. *Artif Organs* 21(11): 1177-1181.
- Gerlach, J. C. (1994). Use of hepatocyte cultures for liver support bioreactors. *Adv Exp Med Biol* 368: 165-171.
- Hoekstra, R., Nibourg, G. A. A., Van Der Hoeven, T. V., Plomer, G., Seppen, J., Ackermans, M. T., Chamuleau, R. A. F. M. (2013). Phase 1 and phase 2 drug metabolism and bile acid production of HepaRG cells in a bioartificial liver in absence of dimethyl sulfoxide. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(3), 562–567.
- Karoor, S., J. Molina, C. R. Buchmann, C. Colton, J. S. Logan & L. W. Henderson (2003). Immunoaffinity removal of xenoreactive antibodies using modified dialysis or microfiltration membranes. *Biotechnol Bioeng* 81(2): 134-148.
- Klinkmann, H. & J. Vienken (1995). Membranes for dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 10 Suppl 3: 39-45.
- Knazek, R. A., P. M. Gullino, P. O. Kohler & R. L. Dedrick (1972). Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth *in vitro*. *Science* 178(4056): 65-66.
- Lorenti, A. S. (2005). Evaluación de la funcionalidad y viabilidad de esferoides hepáticos porcinos, en un modelo de hígado bioartificial. Universidad de Buenos Aires.
- Morsiani, E., M. Brogli, D. Galavotti, P. Pazzi, A. C. Puviani & G. F. Azzena (2002). Biologic liver support: optimal cell source and mass. *Int J Artif Organs* 25(10): 985-993.
- Mueller, X. M., H. T. Tevæarai, D. Jegger, Y. Boone, M. Augstburger & L. K. von Segesser (2000). Impact of hollow-fiber membrane surface area on oxygenator performance: Dideco D903 Avant versus a prototype with larger surface area. *J Extra Corpor Technol* 32(3): 152-157.
- Nagasue, N., H. Yukaya, Y. Ogawa, H. Kohno & T. Nakamura (1987). Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Ann Surg* 206(1): 30-39.
- Pörtner, R., S. Nagel-Heyer, C. Goepfert, P. Adamietz & N. M. Meenen (2005). Bioreactor design for tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100(3): 235-245.
- Ross, M. H. & W. Pawlina (2007). *Histología, Médica Panamericana*.
- Salehi-Nik, N., G. Amoabediny, B. Pouran, H. Tabesh, M. A. Shokrgozar, N. Haghighipour, N. Khatibi, F. Anisi, K. Mottaghy & B. Zandieh-Doulabi (2013). Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering. *BioMed Research International* 2013: 762132.

- Schumpe, A. & W. D. Deckwer (1979). Estimation of O₂ and CO₂ solubilities in fermentation media. *Biotechnology and Bioengineering* 21(6): 1075-1078.
- Strain, A. J. & J. M. Neuberger (2002). A bioartificial liver--state of the art. *Science* 295(5557): 1005-1009.
- Sumaru, K. & T. Kanamori (2004). Optimal design of bio-hybrid systems with a hollow fiber scaffold: model analysis of oxygen diffusion/consumption. *Biochemical Engineering Journal* 20(2-3): 127-136.
- van de Kerkhove, M. P., R. Hoekstra, R. A. Chamuleau & T. M. van Gulik (2004). Clinical application of bioartificial liver support systems. *Ann Surg* 240(2): 216-230.
- Wegner, J. A. (1997). Oxygenator anatomy and function. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 11(3): 275-281.

6 DISCUSIÓN

Con el propósito de diseñar un dispositivo de soporte hepático extracorpóreo, en este trabajo, se desarrollaron membranas difusivas en base a membranas embebidas en un hidrogel. Las mismas se caracterizaron desde el punto de vista químico y funcional.

A partir de los desarrollos experimentales realizados se obtuvieron una serie de parámetros de los componentes individuales que permiten hacer estimaciones para el escalado de un dispositivo BAL en base a esferoides hepáticos.

Para realizar una primera aproximación a un futuro BAL es base a esta tecnología se realizaron las siguientes consideraciones.

6.1 CONSIDERACIONES

Se consideró dimensionar un sistema BAL basado en las membranas de MF embebidas con poliAAm 0,5 % 1 % entrecruzamiento para tratar un adulto que sufre una falla hepática fulminante.

Se consideró como primer objetivo la disminución de la amonemia. Un valor normal de amonemia es menor a $50 \mu\text{M}$ ($9,0 \times 10^{-7} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y una hiperamonemia presenta valores mayores a $80 \mu\text{M}$ e hiperamonemia severa valores por encima de $1000 \mu\text{M}$ ($1,8 \times 10^{-5} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Häberle *et al.*, 2012). Para este análisis se consideró un valor de $2 \times 10^{-5} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Hiperamonía severa).

6.1.1 Cantidad de células y sus requerimientos

La cantidad mínima de células requeridas no se conoce, pero basándose en resecciones quirúrgicas seguras (Nagasue, Yukaya, Ogawa, Kohno, & Nakamura, 1987), un valor aceptable sería entre 150-450 g de células (en el orden de 10^{10} hepatocitos), que suministra la actividad de un 10 a 30 % de la masa de un hígado normal (Morsiani *et al.*, 2001; Strain & Neuberger, 2002; van de Kerkhove, Hoekstra, Chamuleau, & van Gulik, 2004). Asumiendo que el paciente tiene una actividad hepática residual, el dispositivo de soporte hepático podría contener un 15 % de masa hepática. Sin embargo, las células aisladas en el biorreactor no siempre están en condiciones óptimas de viabilidad y funcionalidad, por lo que otros autores han utilizado entre 20 y 30 %. En experimentos con animales, se ha logrado recuperación espontánea con menores cantidades de células, posiblemente por la eliminación de sustancias inhibitoras de la regeneración, como el TGF- β (Arkadopoulos, Lilja, Suh, Demetriou, & Rozga, 1998).

Los dispositivos que se han desarrollado en los últimos años contienen una cantidad de células de entre $0,5 \times 10^9$ y 1×10^{11} , como se describió en el Capítulo 1. Este parámetro es importante evaluarlo desde la funcionalidad, ya que las funciones hepáticas pueden tener mayor eficiencia con un diseño adecuado del dispositivo y del componente biológico a utilizar, como por ejemplo el co-cultivo de hepatocitos con células no parenquimales en una configuración tridimensional.

Como se describió previamente, el sistema elegido en este trabajo son los esferoides, ya que las células hepáticas tienden a perder la actividad fisiológica rápidamente en cultivos en suspensión o en monocapa (Lorenti, 2005). El sistema de esferoides contiene una cantidad de células que es compatible con la difusión del oxígeno en los tejidos y por lo tanto reemplaza la falta de vasos sanguíneos. El tamaño reducido de los esferoides evita que ocurra necrosis (perdiendo efectividad y generando compuestos tóxicos) en su interior siempre y cuando la presión parcial de oxígeno se encuentra por encima de un nivel crítico (Sumaru & Kanamori, 2004). Esta concentración crítica de oxígeno disuelto (la concentración de oxígeno disuelto mínima necesaria para evitar la hipoxia) depende del tipo celular, la temperatura y el tipo de sustrato. Sin embargo, a los efectos prácticos 0,5 % de saturación de aire, o $35 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ es lo utilizado por otros autores.

6.1.2 Tratamiento

Se considera un tratamiento típico de por lo menos 2 h. Considerando un caudal de perfusión en $150 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, y un volumen sanguíneo a tratar de 5,6 l (correspondiente a una persona de 70 kg).

6.2 CÁLCULO DEL ESCALADO

Para realizar el cálculo de lo que sería el dispositivo BAL a la escala adecuada para tratar un paciente con falla hepática, los parámetros de diseño y operación se consideraron siguiendo el siguiente esquema (Figura 75):

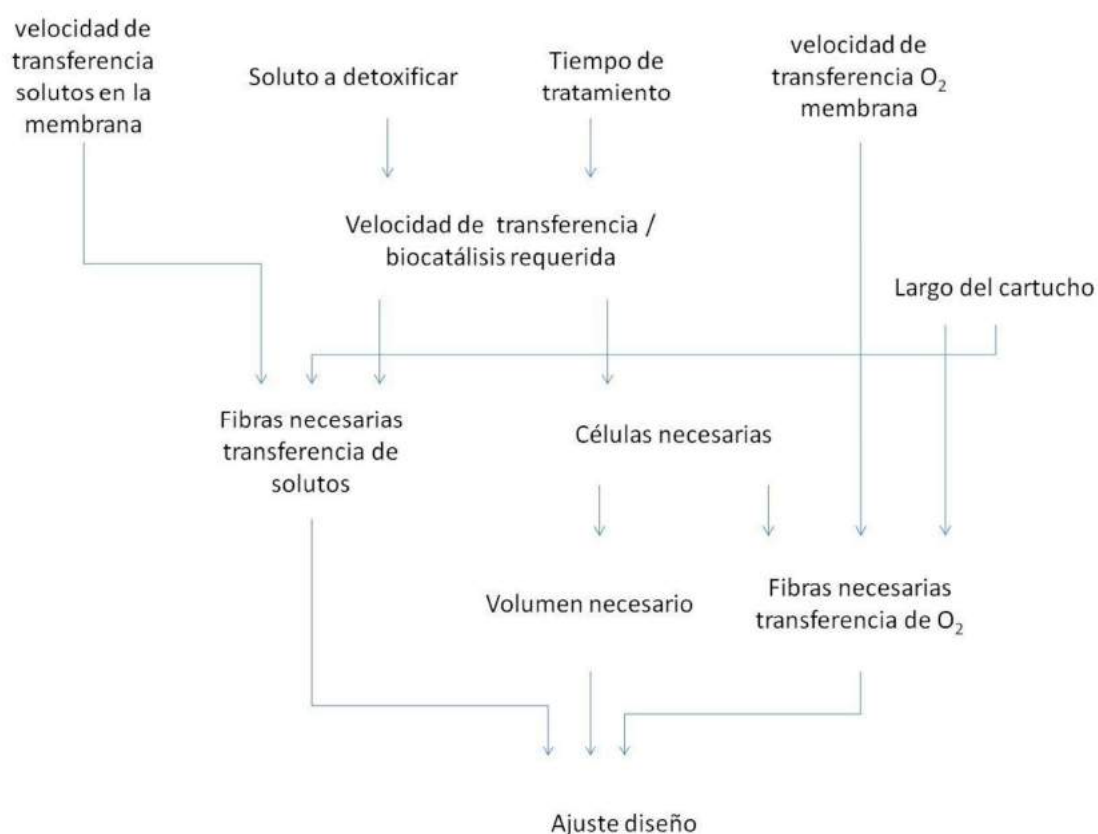


Figura 75: Parámetros considerados para el diseño del dispositivo en escala funcional

Los cálculos se realizaron utilizando una planilla de Microsoft® Excel® considerando como las variables principales: tiempo de tratamiento, cantidad de células y superficie total de membrana. Los valores que se utilizaron se detallan en la Tabla 14 para el componente sintético, en la Tabla 15 para el componente biológico, y en la Tabla 16 para las condiciones de operación.

Tabla 14: Parámetros considerados para la simulación (componente sintético)

Diámetro externo fibra (mm)	1,5
Diámetro interno fibra (mm)	1
Espesor membrana (mm)	0,25
Porosidad membrana (%)	70
Permeabilidad a solutos pequeños ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$2,67 \times 10^{-6}$
Permeabilidad a HSA ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$1,20 \times 10^{-7}$

Permeabilidad a IgG ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$6,00 \times 10^{-8}$
Número de fibras para recirculación de plasma	400
Número de fibras aireación	100
Área total transferencia para el plasma (cm^2)	2.500
Área total transferencia O_2 (cm^2)	630
Volumen disponible para componente biológico (cm^3)	425
k_L ($\text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	72,2
a (área transferencia de O_2 /volumen componente biológico) (cm)	1,48
$k_L a$ (h^{-1})	107
OTR^{14} ($\text{ml O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	0,68

Tabla 15: Parámetros considerados para los cálculos (componente biológico)

Número de células	4×10^9
Masa de células (g)	68
Volumen necesario (ml)	400
Concentración celular ($\text{células} \cdot \text{ml}^{-1}$)	1×10^7
Velocidad específica de consumo de oxígeno ($\text{amol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	33
Velocidad específica de consumo de NH_4 ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	14,12
Velocidad de consumo de oxígeno, ($\text{ml O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	7×10^{-3}

Tabla 16: Parámetros considerados para los cálculos (operación del módulo)

Duración del tratamiento (h)	2
Volumen total a tratar (ml)	5600^{15}
Concentración de NH_3^{16} ($\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	2×10^{-5}
NH_3 transferido (g)	$3,87 \times 10^{-2}$
NH_3 detoxificado (g)	$1,13 \times 10^{-1}$
NH_3 transferido y detoxificado (%)	34,5
HSA transferida (%)	1,6

¹⁴OTR= Velocidad de transferencia de oxígeno (del inglés *Oxygen Transfer Rate*).

¹⁵ Se considera la volemia de un individuo adulto de 70 kg.

¹⁶ En falla hepática.

IgG transferida (%)	0,8
---------------------	-----

Existen varias posibilidades para combinar estos valores, sin embargo, el diseño que se consideró más adecuado es el calculado a partir de las tablas anteriores, considerando un dispositivo de 20 cm de largo (largo efectivo de fibras) por 6 cm de diámetro conteniendo 400 fibras para recirculación de plasma y 100 fibras para aireación. El módulo debería contener 4×10^9 células con lo cual podría detoxificar el 34 % en un periodo de 2 h (se consideró como factor limitante a la transferencia, por la variabilidad que puede presentar el metabolismo celular). Las fibras de aireación están sobrestimadas, para asegurar una transferencia optima al interior de los esferoides.

Una alternativa respecto de la aireación es disminuir la cantidad de fibras de aireación y aumentar la presión parcial de oxígeno, aunque este cambio podría aumentar la toxicidad del mismo. Otra posibilidad es la incorporación de un oxigenador conectado a la circulación que ingresa al dispositivo.

Las dimensiones calculadas se encuentran dentro de las posibilidades técnicas para realizar un ensamblado de este dispositivo BAL. La fabricación de un dispositivo BAL con 500 fibras huecas realizando el procedimiento descrito en el Capítulo 2 resultaría demasiado complejo para su fabricación y escalado. En su lugar se propone la liofilización de las membranas de MF embebidas con hidrogel y el ensamblado de las mismas de manera similar a la fabricación de los módulos de fibra hueca para hemodiálisis.

6.3 REFERENCIAS

- Arkadopoulos, N., Lilja, H., Suh, K. S., Demetriou, A. A., & Rozga, J. (1998). Intrasplenic transplantation of allogeneic hepatocytes prolongs survival in anhepatic rats. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 28(5), 1365–1370.
- Häberle, J., Boddaert, N., Burlina, A., Chakrapani, A., Dixon, M., Huemer, M., ... Dionisi-Vici, C. (2012). Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7, 32.
- Lorenti, A. S. (2005). Evaluación de la funcionalidad y viabilidad de esferoides hepáticos porcinos, en un modelo de hígado bioartificial. Universidad de Buenos Aires.
- Morsiani, E., Brogli, M., Galavotti, D., Bellini, T., Ricci, D., Pazzi, P., & Puviani, A. C. (2001). Long-term expression of highly differentiated functions by isolated porcine hepatocytes perfused in a radial-flow bioreactor. *Artificial Organs*, 25(9), 740–748.
- Mulder, M. (1996). Basic principles of membrane technology. Kluwer Academic Publishers.

- Nagasue, N., Yukaya, H., Ogawa, Y., Kohno, H., & Nakamura, T. (1987). Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Annals of Surgery*, 206(1), 30–39.
- Strain, A. J., & Neuberger, J. M. (2002). A bioartificial liver--state of the art. *Science* (New York, N.Y.), 295(5557), 1005–1009.
- van de Kerkhove, M. P., Hoekstra, R., Chamuleau, R. A. F. M., & van Gulik, T. M. (2004). Clinical application of bioartificial liver support systems. *Annals of Surgery*, 240(2), 216–230.

7 CONCLUSIONES

Este trabajo de tesis de doctorado se enfocó en la problemática de los sistemas BAL en base a la combinación de la tecnología de los módulos de fibra hueca y los esferoides hepáticos.

En el Capítulo 1 se realizó una introducción general a la problemática de la falla hepática, la baja disponibilidad de órganos para trasplante (único tratamiento efectivo para la falla hepática) y los métodos alternativos de tratamiento utilizando sistemas extracorpóreos. Después de dos décadas de estudio, los sistemas basados en reactores de fibra hueca han sido los más estudiados en todo el mundo, y los que han llegado a obtener resultados alentadores en estudios en fase clínica.

El sistema de intercambio de materia entre la sangre y el dispositivo es uno de los puntos críticos de estos sistemas BAL. Es por ello que en el Capítulo 2 se estudió la generación de una nueva membrana de intercambio de solutos en base a un hidrogel inmovilizado en el interior de una membrana de MF.

El hidrogel fue optimizado de manera de maximizar la transferencia de solutos de bajo PM, tomándose como modelo a la glucosa, y la albúmina. Esta última es también de gran importancia porque es considerada el “carrier” molecular por excelencia del cuerpo humano. Su gran tamaño respecto de los metabolitos y similitud a las inmunoglobulinas constituyó el gran reto a sortear. En este trabajo se logró optimizar una composición definida de hidrogel de poliAAm 0,5 % con un 1 % de entrecruzamiento que tiene como característica una selectividad de 2,2 veces a la difusión de albúmina respecto a las IgG.

En el Capítulo 3 se prepararon y analizaron esferoides hepáticos porcinos como potencial componente biológico del BAL. El análisis desde el punto de vista funcional permitió cuantificar los requerimientos de oxígeno y su capacidad de detoxificación, parámetros clave para el escalado de un prototipo funcional.

En el Capítulo 4 se desarrollaron dispositivos a escala reducida para explorar y resolver posibles inconvenientes de ensamblado y comprobar la factibilidad de su construcción. Finalmente se obtuvo un dispositivo que reunió los requisitos mínimos planteados: control de transferencia de solutos, transferencia de oxígeno, y mantenimiento de la viabilidad de los esferoides hepáticos.

Finalmente, en la Discusión se analizó y calculó las dimensiones de un dispositivo BAL en base a las membranas desarrolladas y su capacidad de detoxificación máxima esperada de acuerdo a los datos experimentales obtenidos en este trabajo.

Por último, este trabajo espera contribuir con la aplicación de diversas técnicas y determinaciones experimentales que permitan caracterizar los diferentes componentes de un sistema híbrido y avanzar en el desarrollo racional de dispositivos extracorpóreos BAL del tipo de reactor de fibra hueca.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO 1: METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE DIAZEPAM Y SUS METABOLITOS

Se han utilizado diversos métodos para la determinación del diazepam y sus metabolitos, ya sea cromatografía líquida de alta performance con detector de UV (HPLC-UV), cromatografía gaseosa con captura y detección de electrones (GC-ECD), y cromatografía en capa delgada (TLC). Usualmente involucran varios pasos de extracción, y en el caso de GC la técnica requiere una alta temperatura de trabajo que no es apropiada para el análisis de metabolitos termolábiles como el oxazepam y temazepam. Debido a esto, se seleccionó el HPLC como técnica analítica para la detección simultánea de diazepam y sus metabolitos.

El objetivo fue separar los analitos de interés entre sí y poder cuantificarlos. Para desarrollar el método se consideraron tanto las características de la muestra como el objetivo de separación:

- Número de compuestos
- Estructura química de los compuestos (grupos funcionales)
- Pesos moleculares
- Constantes de equilibrio ácido/base (pKa)
- Espectros UV-Visible y MS
- Rango de concentraciones de los analitos
- Solubilidad de la muestra

Se eligió la detección UV-vis de matriz de diodos (o arreglo de diodos).

De esta manera, cuando una sustancia dada cluye a través del detector, la información que se adquiere a partir de cada diodo se utiliza para construir un espectro de absorción que puede compararse con espectros estándar con el fin de identificar los componentes de la muestra. Alternativamente, mediante la selección apropiada del diodo, la longitud de onda de la luz en la que hay una máxima absorción puede detectarse selectivamente el compuesto deseado a la máxima sensibilidad para dicha sustancia.

8.1.1 Análisis cualitativo / cuantitativo

La primera característica en cuanto al análisis cuantitativo es la resolución. Si la mezcla tiene menos de cinco componentes se puede obtener una resolución de línea base (esto es $R_s > 1.5$).

Este tipo de resolución ayuda al ajuste de los resultados. Si la muestra tiene más de diez componentes, en cambio, las exigencias de la resolución serán más flexibles ($1.0 < R_s < 1.5$).

Cuando el análisis es cualitativo, esto es, cuando el objetivo es más identificar componentes que cuantificarlos, entonces la resolución no requiere ser $R_s > 1.5$ y puede ser suficiente el hecho de distinguir los picos y compararlos contra estándares.

En cuanto al tiempo de corrida, se intentará minimizar siempre y cuando ello no afecte la resolución.

Además de las características anteriores existen otras que no son tan importantes como la presión, altura de los picos y la utilización de disolvente. La presión no debe de llegar a valores superiores a 170 bar (2500 psi) en el caso de columnas nuevas puesto que disminuye el tiempo de uso de la misma.

8.1.2 Fundamentos de la separación

Entre las características de la separación la resolución es la de mayor importancia. La resolución está definida por la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{k'}{k' + 1} \right) (s - 1) \quad \text{Ecuación 69}$$

Donde k' es el factor de capacidad, N el número de platos teóricos de la columna y α el factor de separación. Esta ecuación reúne las variables de la separación de analitos en 3 aspectos: retención (k'), eficiencia de la columna (N) y selectividad (s).

Para evaluar las condiciones, se debe considerar que los valores de k' y s serán función de los siguientes factores que regulan el equilibrio de los analitos entre la fase estacionaria y la fase móvil:

- Componentes de la fase móvil
- Componente de la fase estacionaria
- Temperatura

Y los valores de N dependen de las condiciones de la columna:

- Caudal
- Longitud de columna
- Tamaño de partícula

De las variables mencionadas, las más sencillas de optimizar son la fase móvil, temperatura y el caudal, siendo el resto dependientes del tipo de columna y su empaquetamiento.

La elección de la fase móvil es esencial para modificar el tiempo de retención (k'). La misma está formada por una mezcla de al menos dos solventes, que pueden caracterizarse por su “fuerza” con la que compiten por atraer al analito respecto de la fase estacionaria: los disolventes fuertes disminuyen el tiempo de retención, los débiles ayudan a la retención. Para elegir los solventes de la fase móvil, se buscará que el intervalo de k' sea lo suficientemente amplio como para separar los picos y que las impurezas salgan primero.

En la cromatografía de fase reversa (RPC) la relación entre k' y la fase móvil puede calcularse con la siguiente ecuación empírica:

$$\log k' = \log k'_{H_2O} - S\Phi \quad \text{Ecuación 70}$$

Donde k'_{H_2O} es el factor de capacidad del agua, S es una constante para cada analito, y Φ es la fracción de volumen del solvente más fuerte en la mezcla que forma la fase móvil. En la mayoría de los analitos de PM pequeño (<500 Da) el valor de $S \approx 4$. Según esta ecuación entonces, un aumento del 10 % en la fracción del solvente más fuerte de la fase móvil puede disminuir dos o tres veces el valor de k' .

No sólo hay que tener en cuenta la fuerza de los disolventes, sino que también tiene su importancia el tipo de disolvente utilizado. Los disolventes más utilizados son el acetonitrilo (AcN), el metanol (MeOH) y el tetrahidrofurano (THF). Entre ellos la sucesión en función de su fuerza es la siguiente:

$$\text{agua} < \text{metanol} < \text{acetonitrilo} < \text{etanol} < \text{tetrahidrofurano} < \text{propanol} < \text{cloruro de metileno}$$

De todos ellos, el cloruro de metileno no es muy utilizado debido a que es inmisible en agua.

El más utilizado es el AcN porque tiene la suficiente fuerza y porque tiene muy baja absorción en el UV-Vis a longitudes de onda bajas. Por otra parte, las mezclas de AcN son de baja viscosidad y eso, en cierta manera, aumenta la eficacia de la columna (N) y la presión del sistema es menor. Menos frecuentemente se utiliza el metanol y raramente el THF.

Tabla 17: Características de los disolventes más utilizados en la fase móvil

Disolvente	Polaridad (P')	Barrera UV (nm)	Viscosidad (cP)	Temperatura de ebullición (°C)
Acetona 5.1	5,1	330	0.36	56,3
Acetonitrilo	5,8	190	0,38	81,6
Cloroformo	4,1	245	0,57	61,1
Dimetilsulfóxido	7,2	268	2,24	189,0
1,4-dioxano	4,8	215	1,37	101,3
Acetato de Etilo	4,4	256	0,45	77,1
Éter etílico	2,8	215	0,24	34,5
Hexano	0,1	195	0,31	68,7
Iso-octano	0,1	215	0,50	99,2
Metanol	5,1	205	0,55	64,7
Metil-etilcetona	4,7	329	0,43	79,6
Tetrahidrofurano	4,0	212	0,55	66,0
Tolueno	2,4	284	0,59	110,6
o-Xileno	2,5	288	0,81	144,4
Agua	10,2	190	1,0	100

Dentro de las características de la fase móvil, la más importante es la polaridad. A partir de ella pueden predecirse las interacciones de los analitos con cada fase. Para calcular la polaridad se consideran los siguientes desarrollos empíricos:

Número de polaridad de Snyder (P'):

$$P' = \log K_{d(etanol)} + \log K_{d(dioxano)} + \log K_{d(nitrometano)} \quad \text{Ecuación 71}$$

Donde a través de cada una de las sustancias de reparto se mide la basicidad, acidez y el momento dipolar.

$$\chi_e = \frac{\log K_{d(etanol)}}{P'} \quad \text{Basicidad} \quad \text{Ecuación 72}$$

$$\chi_e = \frac{\log K_{d(dioxano)}}{P'} \quad \text{Acidez} \quad \text{Ecuación 73}$$

$$\chi_e = \frac{\log K_d(\text{nitrometano})}{P_r} \quad \text{Momento dipolar} \quad \text{Ecuación 74}$$

Parámetro de la solubilidad de Hildebrand (δ_t):

$$\delta_t = \left(\frac{\Delta E_b}{B} \right)^{1/2} \quad \text{Ecuación 75}$$

Donde ΔE_b es la energía interna de vaporización del compuesto y B es el volumen molar de ese compuesto. Análogamente se puede considerar que el parámetro de solubilidad tiene tres aportes:

$$\delta_t^2 = \delta_h^2 + \delta_p^2 + \delta_d^2 \quad \text{Ecuación 76}$$

δ_h Poder de formación de enlaces de hidrogeno

δ_p Polaridad

δ_d Coeficiente de dispersión

Los anteriores desarrollos empíricos llevan a la opción de cambiar el disolvente.

Basándose en la definición de polaridad de Snyder se han clasificado muchos disolventes, y suele utilizarse esquema triangular muy práctico, por lo que no se necesitan más de tres disolventes en la fase móvil.

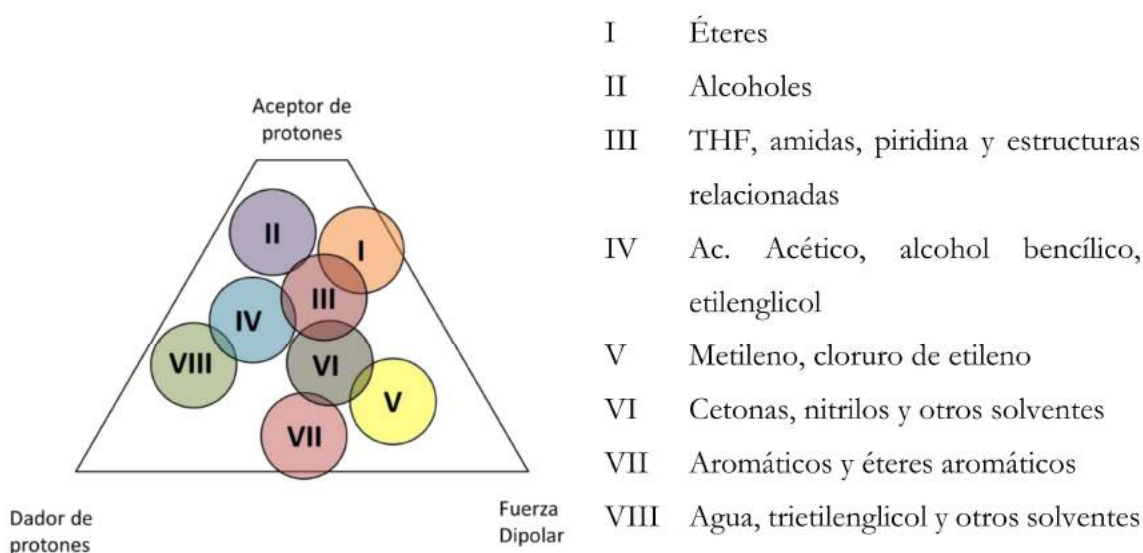


Figura 76: Clasificación de disolventes en base a la definición de polaridad de Snyder

Además de la fase móvil, k' presenta dependencia respecto a la fase estacionaria. La fase estacionaria abarca 3 características principales de la columna: tipo de fase ligando, concentración y superficie.

Si se analiza el tipo de ligando, la retención de analitos apolares y no iónicos sigue el siguiente orden:

$$\text{Sílica no unida} < \text{ciano} < C_1 (\text{IMS}) < C_3 < C_4 < \text{fenilo} < C_8 \approx C_{18}$$

Igualmente, los valores de k' muestran una dependencia respecto de la superficie de la columna. Las columnas empaquetadas típicas (poros de 8 nm) tienen superficies de $250 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, mientras que las columnas con poros más grandes, como por ejemplo de 30 nm poseen una superficie de $60 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

8.1.3 Procedimiento práctico

Como metodología práctica, para lograr un cambio de selectividad en fase reversa se sigue el siguiente procedimiento, considerando la fuerza de elución de cada solvente (Tabla 18).

Tabla 18: Fuerza de elución de solventes en fase reversa

Solvente	Fuerza de elución
Agua	0,0
Metanol	2,6
Acetonitrilo	3,2
Tetrahidrofurano	4,5

1. Se ajusta la concentración del modificador para conseguir un k' comprendido entre 2 y 10.
2. Se calcula la composición de las mezclas agua-AcN y agua-THF que tengan la misma fuerza de elución. La fuerza de elución total se calcula como la sumatoria de la fuerza de elución de cada componente de la mezcla de solventes, considerando la fracción.

$$S_t = \sum_{i=1}^n S_i \Phi_i$$

Ecuación 77

Donde S_T es la fuerza total de la fase móvil, S_i la fuerza de elución de cada solvente (indicada en la Tabla 18 y Φ_i la fracción de volumen del solvente i .

De esta manera, para una fase móvil compuesta por una mezcla de MeOH-agua:

$$S_{T_{MeOH}} = S_{MeOH}\Phi_{MeOH} + S_{H_2O}\Phi_{H_2O} \quad \text{Ecuación 78}$$

$$S_{MeOH}\Phi_{MeOH} = S_{AcN}\Phi_{AcN} = S_{THF}\Phi_{THF} \quad \text{Ecuación 79}$$

$$\Phi_{AcN} = \frac{S_{MeOH}\Phi_{MeOH}}{S_{AcN}} \quad \text{Ecuación 80}$$

$$\Phi_{THF} = \frac{S_{MeOH}\Phi_{MeOH}}{S_{THF}} \quad \text{Ecuación 81}$$

Entonces, una mezcla de agua-MeOH (30:70) tendrá aproximadamente la misma fuerza de elución que una mezcla de agua-AcN (43:57) o una mezcla de agua-THF (60:40).

Luego de preparar las mezclas con fuerza de elución equivalente, se realizan los ensayos con cada muestra y se evalúa, analizando los cromatogramas, la selectividad de los picos, deben ser lo más estrechos posibles y no estar solapados, para poder extrapolar mediante una curva de calibración, una cuantificación confiable.

8.2 MATERIALES Y REACTIVOS

Estándares grado analítico de diazepam, midazolam, temazepam y oxazepam fueron gentilmente cedidos por el Dr. Adolfo Guinle (Laboratorio de Neuroquímica Dr. N. A. Chamoles S.R.L.).

Se prepararon soluciones de los metabolitos diazepam, midazolam, temazepam y oxazepam con concentraciones de $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en agua: AcN (50:50). Estas soluciones fueron filtradas con filtro de $0,22 \mu\text{m}$, se realizaron diluciones seriadas y se almacenaron a 4°C . Fueron utilizadas tanto para elaborar las curvas de calibración como para realizar las validaciones.

Tabla 19: Metabolitos utilizados y algunas características químicas

Metabolito	Fórmula molecular	PM
diazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	284,74 g·mol ⁻¹
oxazepam	$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$	286,71 g·mol ⁻¹
temazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$	300,74 g·mol ⁻¹
midazolam	$C_{18}H_{13}ClN_3F$	325,78 g·mol ⁻¹

8.3 RESULTADOS

Para optimizar la fase móvil, en primer lugar, a partir de las ecuaciones empíricas descriptas arriba se calculó la fuerza de elución de diferentes mezclas de solventes, considerándose en principio tres que tienen características opuestas en cuanto a la polaridad y capacidad de aceptar o ceder electrones.

Para la fase acuosa, por experimentos anteriores se utilizó una solución de trietilamina (TEA) en agua como par iónico para mejorar la selectividad de la columna.

Se calculó la fuerza de elución para diferentes proporciones de solventes (Figura 77).

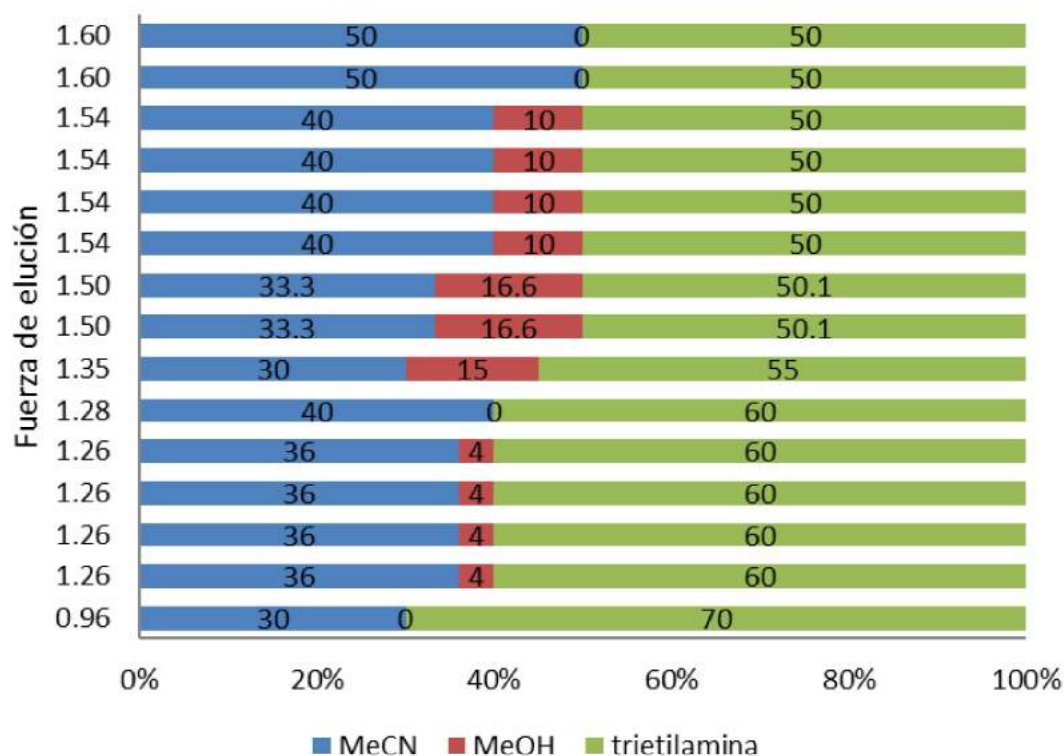


Figura 77: Fuerza de elución total según la composición de la fase móvil

8.3.1 Optimización de la fase móvil

Se estudió la influencia del porcentaje de AcN en la fase móvil en la resolución de los picos, en este caso, a partir de los picos identificados, observando el intervalo de los tiempos de retención (figura 78).

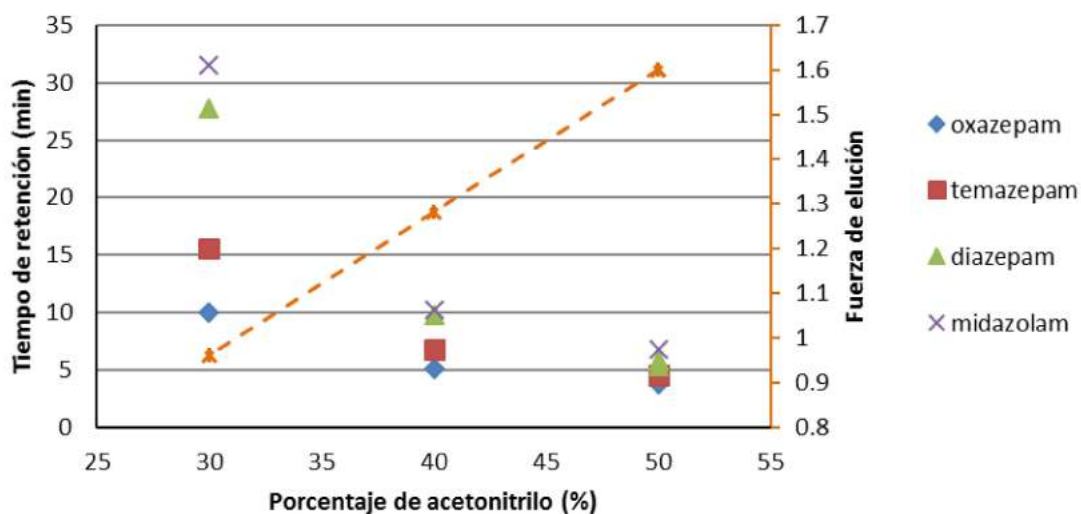


Figura 78: Influencia del % AcN en el tiempo de retención

De la misma manera se estudió la influencia del porcentaje de MeOH en el intervalo de tiempos de retención de los metabolitos ensayados (Figura 79).

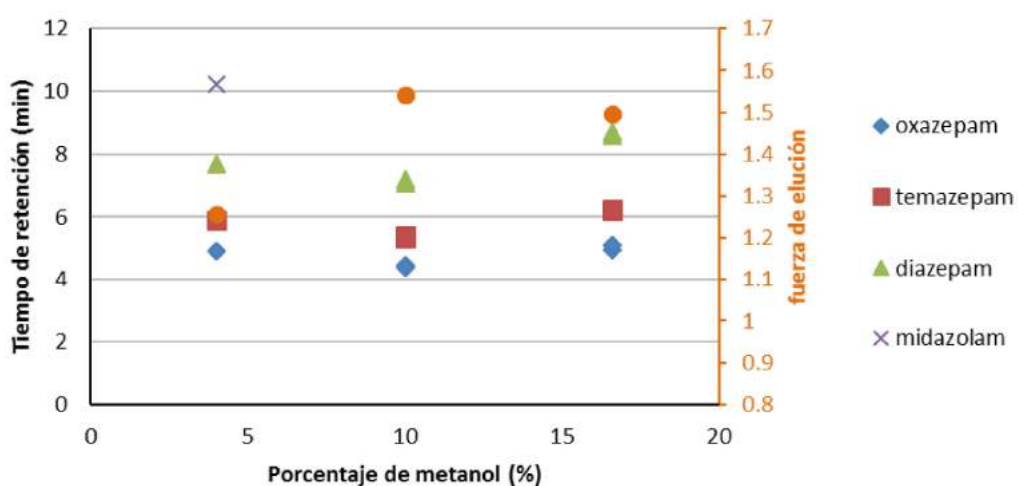


Figura 79: Influencia del % MeOH en el tiempo de retención

A partir de lo analizado teóricamente y comprobado experimentalmente se eligieron las siguientes condiciones de elución de la muestra:

Fase móvil: AcN/MeOH/ solución de TEA en una proporción 40/10/50. La solución de TEA es 0,04 % en agua. El pH de la fase móvil se ajustó en 7 y el flujo utilizado fue de $1,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Fase estacionaria: Se utilizó una columna HD 100-5 C18 250x4 con un tamaño de partícula de $0,5 \mu\text{m}$.