

Evento

Universidad de los Andes - Universidad del Rosario Primer Simposio de la Maestría en Ciencias Biomédicas 1 de marzo de 2005 - Sala Marta Traba, Universidad de los Andes

PRESENTACIONES:

ENCAPSULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE HEMOGLOBINA BOVINA LIBRE DE ESTROMA COMO TRANSPORTADOR DE OXÍGENO INTRAVASCULAR

J. G. Crump*, J. C. Briceño*

La hemoglobina es la proteína sanguínea responsable del transporte de oxígeno. Diferentes problemas surgen al utilizarla directamente como hemosustituto: toxicidad del estroma celular; altas presiones osmóticas; dimerización del tetramero en circulación, que causa falla renal y muy corta vida media en circulación; una alta afinidad por el óxido nítrico (NO), que causa vasoconstricción, y una excesiva afinidad por el oxígeno, debido a la falta del cofactor 2,3 DPG.

Para solucionar estos problemas se propone, en primer lugar, utilizar hemoglobina bovina purificada, que al no contener estroma, no es tóxica y en ausencia del cofactor 2,3 DPG transporta y libera oxígeno en cantidades comparables a la hemoglobina humana, aparte de que es una fuente económica e ilimitada. El proceso de purificación de hemoglobina para producir hemoglobina

bovina libre de estroma (bSF-Hb) se hace por medio de una lisis celular para extraer la hemoglobina del glóbulo rojo, seguida por una extracción de fase orgánica con tolueno para separar la proteínas hidrofílicas (hemoglobina) de las hidrofóbicas (estroma celular). Este proceso presenta una eficiencia entre el 58% y el 75%.

Los resultados obtenidos en el proceso de purificación son interesantes, ya que en las publicaciones internacionales el tiempo de lisis utilizado es de media hora, el tiempo de la primera extracción es de una hora y el tiempo de la segunda extracción es de doce horas. Los resultados obtenidos en este proyecto demuestran que el tiempo óptimo de lisis está alrededor de las veinte horas, que el tiempo de la primera extracción a medida que aumenta, incrementa la eficiencia de purificación, y que el tiempo de la segunda extracción no presenta correlación alguna con la eficiencia de purificación.

La segunda solución es la encapsulación de la hemoglobina, a fin de que asemeje la manera natural del transporte de oxígeno en membranas de

* Miembro del Grupo de Ingeniería Biomédica, Universidad de los Andes y Laboratorio de Hemosustitutos, Fundación Cardio Infantil, Bogotá D.C., Colombia.

fosfolípido, como la fosfatidilcolina (PC), por medio de la microfluidización de una emulsión de bSF-Hb con PC, que produce liposomas. También se sugiere la encapsulación con un biopolímero como el ácido poliláctico (PLA), por medio de una difusión de fase orgánica que contiene el PLA, con un solvente y una en fase acuosa, donde se encuentra la bSF-Hb. Estos dos procesos nivelan la presión osmótica, ya que la microcápsula ejerce presión osmótica independientemente de la cantidad de hemoglobina que se encuentra dentro de ella, evita la dimerización de la hemoglobina y no permite que la hemoglobina penetre en las paredes vasculares y actúe como sifón retirando el NO.

Actualmente se están produciendo nanocápsulas de fosfolípido con diámetros entre 200 y 300 nanómetros y se demostró que a medida que se aumentan los ciclos de microfluidizado (entre tres y seis ciclos), se reduce la distribución del diámetro de partícula y se hace más homogéneo.

Las nanocápsulas de biopolímero presentan diámetros entre 270 y 400 nanómetros. Este tamaño depende del peso molecular de biopolímero, pues entre menor sea éste, menor es el tamaño de partícula generado y mayor es la eficiencia de encapsulación obtenida. La caracterización in vitro de estos hemosustitutos ha mostrado que sus propiedades son comparables a las propiedades sanguíneas normales: P_{50} , coeficiente de Hill, efecto de Bohr, pH, osmolaridad, concentración de hemoglobina y viscosidad. Se está trabajando con el fin de aumentar la eficiencia de encapsulación sin modificar el diámetro de partícula obtenido. Actualmente la eficiencia de encapsulación en liposomas está en el 20% y la encapsulación en nanocápsulas de biopolímero está alrededor del 35%, eficiencia comparable a la obtenida por otros grupos de investigación.

EVALUACIÓN IN VITRO DE CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DEL CLORHIDRATO DE COCAÍNA EN CÉLULAS DE FIBROSARCOMA HUMANO HT1080

M. Rojas*, C. Monroy†, A. Cortés†, H. Groot de Restrepo†

El clorhidrato de cocaína es una sal hidrosoluble con efectos anestésicos y estimulantes sobre el sistema nervioso central (SNC); sin embargo, presenta efectos adversos en los sistemas cardiovascular, pulmonar y nervioso. En las células, gracias a sus propiedades químicas y a su degradación metabólica (vía microsomal oxidativa), induce la producción de radicales libres que pueden interactuar directamente con el material genético o producir alteraciones en la fisiología celular.

El objetivo de este trabajo fue determinar la citotoxicidad crónica, aguda y la genotoxicidad del clorhidrato de cocaína en células de fibrosarcoma humano HT1080. Para tal fin, las citotoxicidades crónica y aguda se determinaron mediante el colorante cristal violeta y azul de Trypan respectivamente, después de exponer las células a diferentes dosis del compuesto. La genotoxicidad se estableció mediante el ensayo del cometa. Los datos se analizaron utilizando la prueba de Dunnett y la correlación de Pearson.

En los resultados se observa un efecto citotóxico dosisdependiente (porcentaje de viabilidad celular y concentración de cocaína) en dosis superiores a 3.000 μ M después de 72 horas de exposición ($p < 0,05$). En la citotoxicidad aguda las células HT1080 expuestas a concentraciones menores a 3,5 mM, presentaron una viabilidad $>70\%$. Se evidencia daño en el ADN

* Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

† Laboratorio de Genética Humana, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

después del tratamiento en concentraciones de 0,5-3,5 mM ($p < 0.001$). En conclusión el clorhidrato de cocaína es genotóxico para la células HT1080 en dosis mayores a 0,5 mM.

CARACTERIZACIÓN DE PLACAS ARTERIOESCLERÓTICAS EN ESCANOGRAFÍAS DE LA ARTERIA CARÓTIDA

M. A. Zuluaga*, S. I. Mesa*, L. F. Uriza†, M. H. Hoyos*

Este trabajo propone una metodología para la caracterización de zonas en placas arterioescleróticas a partir de imágenes de tomografía computarizada (TC). La propuesta consiste en extraer el eje central de la arteria, por medio del análisis de momentos de inercia, seguido de la detección de sus contornos en el plano localmente perpendicular al eje. Esta detección de contornos se lleva a cabo utilizando información fotométrica en combinación con características de gradiente y contraste de lumen y de zonas hipodensas e hiperdensas. La combinación de estas características permite no sólo la delimitación del lumen, sino la caracterización de la placa de ateroma.

La primera parte del trabajo está enfocada en la extracción del eje central para obtener, posteriormente, los cortes perpendiculares con los cuales se detectan los contornos para caracterizar la placa. La segunda etapa del trabajo parte de los cortes perpendiculares y pretende extraer los contornos de la placa y el lumen.

Antes de poder realizar el proceso de extracción, es necesario eliminar las estructuras que no hacen parte de la arteria y que pueden interferir en la correcta ejecución del algoritmo que

extrae el eje. Por ello, para evitar los inconvenientes que pueden generar las estructuras no deseadas, la primera etapa se enfoca en determinar la condición ideal de segmentación de la arteria, para que le sea aplicado el algoritmo de extracción de ejes, a fin de evitar errores en el eje resultante. Por esto se evalúan cuatro alternativas para el proceso de la segmentación.

En consecuencia, para evaluar los cuatro esquemas de preprocesamiento de la imagen se desarrolla una herramienta de *software* que permite cargar una serie de imágenes y aplicar las diferentes propuestas de segmentación. Con la herramienta se evaluaron tres series de imágenes de pacientes, cuyos resultados son presentados.

La fase de extracción del eje arroja como resultados tres ejes diferentes: uno que pasa por el centro de la arteria; otro, por el lumen, y otro más, por la placa. El eje que pasa por el centro de la arteria es utilizado para generar los planos perpendiculares que se utilizan para la extracción de contornos. Los otros dos, al pasar por lumen y placa respectivamente, son utilizados para tomar sus puntos como valores de referencia de las intensidades que pueden tener el lumen y la placa en una arteria.

La extracción de contornos parte de un punto del eje central desde el cual se lanzan rayos de forma axial. En cada punto del rayo se calcula el gradiente de la imagen y se evalúa el valor de intensidad. La información del gradiente, en combinación con los valores de intensidad obtenidos y los valores de intensidad referencia, permite la detección de los contornos de lumen y calcificación. Aunque esta etapa del proceso aún no está muy refinada y requiere mejoras, en especial para detectar los bordes de la arteria, se muestran los resultados obtenidos hasta el momento

* Departamento de Ingeniería de Sistemas y Computación, Universidad de Los Andes.

† Hospital Universitario San Ignacio.

MICROCULTIVO POR CAPAS DE SUBMUCOSA INTESTINAL DELGADA DE PORCINO (SIS) PARA CRECIMIENTO TRIDIMENSIONAL DE FIBROBLASTOS

M. X. Borrás*, D. M. Tabima*, H. Groot*, J. C. Briceño*

El crecimiento de células en matrices es indispensable para la generación de tejidos in vitro. La submucosa intestinal (SIS) ha probado ser el ambiente propicio para inducir el crecimiento celular tridimensional. De los resultados de este tipo de procedimientos depende la formación de tejido en el laboratorio, por lo que se diseñó e implementó una metodología novedosa para facilitar la formación de tejido conectivo. A partir de ahí se obtuvieron resultados que apoyan la idea de la efectividad del microcultivo por capas de SIS y nos sitúan en el proceso de la generación in vitro de tejido.

Objetivos: Mediante el microcultivo por capas de SIS con células de fibrosarcoma HT1080 se busca generar tejido conectivo in vitro. De la misma manera se busca probar la metodología con fibroblastos normales.

Metodología: Se cultivaron células de la línea celular HT1080 y se desarrolló un cultivo primario de fibroblastos de piel de ratón. La submucosa intestinal estéril se preparó, cortó e hidrató antes de la siembra de las células. El microcultivo se refiere a la siembra de las células en diferentes concentraciones sobre la SIS hidratada en la microplaca, por medio de discos de SIS según períodos determinados, así como seguimiento y cambios de medio permanentes. Se realizaron controles de crecimiento sobre la SIS con MTT.

Las pruebas para evaluación de formación de tejido realizadas fueron análisis histológico, determinación cualitativa de procolágeno I en cortes histológicos y microscopía electrónica de transmisión.

Resultados: Los cortes histológicos permiten ver el crecimiento celular sobre la SIS. Se observan estructuras identificadas como células, en la gran mayoría de los campos analizados. Los conteos de células realizados en los cortes histológicos evidencian un comportamiento similar entre los diferentes períodos con 2 y 3 capas de SIS sembradas. Luego de ocho días, el número de células decrece en cualquiera de los tratamientos analizados. En cuanto a la concentración celular inicial, los datos obtenidos no permiten establecer un comportamiento de esta condición de cultivo.

La detección de procolágeno I se constituye en un indicador de síntesis de matriz extracelular por células cultivadas sobre la SIS. Cada muestra se enfrenta a su control negativo (sin anticuerpo primario), lo que indica la presencia del antígeno.

La MET confirma y evidencia varias observaciones previas: crecimiento multicapa sobre la SIS, síntesis de matriz extracelular (presencia de vacuolas con colágeno), muerte celular a mayor tiempo de cultivo y desarrollo celular entre la SIS.

Las pruebas iniciales con células normales representan un gran logro y brindan las herramientas necesarias para continuar los estudios en el microcultivo por capas de submucosa, por lo que son la base para realizar ensayos con fibroblastos humanos normales y así alcanzar la experimentación clínica.

Conclusiones: Las pruebas presentadas son un hallazgo importante de la síntesis de matriz

* Grupo de Ingeniería Biomédica Universidad de los Andes.

extracelular sobre la SIS como el primer paso para la generación de tejido in vitro. La confluencia de capas promueve las formaciones racémicas entre las células, de manera que el crecimiento tridimensional es un hecho.

DETERMINACIÓN DE LA PERMEABILIDAD VIRAL DE LOS CONDONES DE MEMBRANA DE POLIOLEFINAS AL BACTERIÓFAGO ÖX174

O.E. Sierra*, M. A. Gaona*, G. J. Rey†

En la literatura médica se han descrito diversos métodos para determinar la capacidad que tienen las membranas de los condones para impedir la penetración de agentes infecciosos. En éstos se ha demostrado la eficacia de emplear in Vitro, como virus de reto, al bacteriófago ÖX174 (ATCC 13706-B1), cuyo diámetro es de 27 nanómetros. Uno de los argumentos se fundamenta en el hecho de que si el virus ÖX174 no puede atravesar la membrana del condón, tampoco lo podrían hacer los virus humanos que tienen un tamaño mayor (inmunodeficiencia humana-VIH/sida, papiloma humano-VPH y hepatitis B-VHB con 100, 55 y 42 nanómetros de diámetro respectivamente).

Debido a que los condones que se ofrecen en el mercado circulan bajo el sólo cumplimiento de algunas pruebas físicas y químicas, es necesario evaluar la capacidad de barrera física frente a agentes biológicos, como soporte en la prevención de las infecciones de transmisión sexual (ITS). En el presente trabajo se determinó la capacidad de barrera de condones de mem-

branas de poliolefina comparadas con condones de látex, siguiendo las instrucciones de la Food and Drug Administration (FDA), División of Life Science-USA, referentes a la "Información para la determinación de las propiedades de barrera de los condones a la penetración de virus".

Objetivo: Evaluar la capacidad de barrera física a la difusión del virus ÖX174 de condones de membrana de poliolefinas, con relación a condones de látex, que permita extrapolar su comportamiento frente a los agentes etiológicos de ITS.

Metodología: Se procesaron sesenta condones de membrana de poliolefinas en forma comparativa con veinte condones de látex. Se simuló las condiciones fisiológicas de uso en cuanto a presión, pH, tensión superficial, longitud, tiempo de exposición y título del virus. Brevemente la técnica consistió en: (a) llenado de los condones con el virus de reto; (b) presurización simultánea de diez condones; (c) inmersión de cada condón en un eluyente recolector durante treinta minutos; (d) toma de alícuota del eluyente y siembra en cultivo bacteriano, y (e) incubación a 37°C durante 24 horas y cuantificación de las placas de lisis.

Resultados: La determinación del número de UFP/ml se logró mediante la fórmula descrita en ISO/DIS 10705-2 (2000). Los condones de membranas de poliolefina fueron impermeables al virus en un 93,3%. Asimismo, los condones de membrana de látex se comportaron en un 95% impermeables, las cuales son diferencias no significativas estadísticamente (Ji al cuadrado con corrección por continuidad de Yakes para dos grupos independientes = 0,7897) con respecto a la cualidad de impermeabilidad de las dos membranas.

* Docente del Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario.

† Coordinadora del Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud.

Evento

Conclusiones: Se determinó que frente a un título alto de partículas virales con tamaño inferior al de los virus causantes de ITS, las membranas de los condones de poliolefina muestran ser 93% impermeables al bacteriófago ÖÖX174, lo cual señala un comportamiento similar a los condones elaborados con membrana de látex. De esta manera se aportan elementos con fundamento científico a la discusión sobre la efectividad de los condones en la prevención de ITS, que pueden ser incorporados a los preceptos culturales de los diversos contextos sociales.

Por otro lado, la técnica estandarizada evidenció ser lo bastante sensible, segura y de fácil reproducibilidad para la detección y cuantificación de virus bacteriófagos que pueden atravesar estos dos tipos de membranas empleadas como aislantes biológicos. Esto abre la posibilidad de consolidar una línea de investigación autónoma, que involucre estudiantes de la Facultad de Medicina en el trabajo de laboratorio con proyección a la salud pública y que genere la oportunidad de evaluar la capacidad de impermeabilidad de éstas y otras membranas que tengan similar aplicación.