(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 624 177**

(51) Int. Cl.:

C12M 1/12 (2006.01)
C12M 1/04 (2006.01)
C12M 1/32 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2007** **PCT/US2007/073065**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2008** **WO08006104**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2007** **E 07799408 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 2044192**

(54) Título: **Plataformas de cultivo celular potenciadas en oxígeno**

(30) Prioridad:

07.07.2006 US 819153 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2017

(73) Titular/es:

UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
1475 NW 12TH AVENUE, SUITE 2012
MIAMI, FL 33136, US

(72) Inventor/es:

FRAKER, CHRISTOPHER, A.;
DOMINGUEZ-BENDALA, JUAN;
RICORDI, CAMILLO y
INVERARDI, LUCA

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 624 177 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

Descripción

Plataformas de cultivo celular potenciadas en oxígeno

Campo de la invención

La invención se refiere generalmente a un aparato y métodos para cultivar células o cultivos de tejidos in vitro. Más particularmente, la presente invención se refiere a un aparato de cultivo celular que contiene al menos una membrana permeable a los gases que permite una transferencia rápida, mejorada y uniforme de oxígeno entre el entorno de células contenidas en el aparato contenedor del cultivo celular y la atmósfera de la incubadora, en la que se incuba el aparato de cultivo celular.

Antecedentes de la invención

En los sistemas de cultivo de células eucarióticas, el cultivo de las células está generalmente bajo condiciones controladas de pH, temperatura, humedad, osmolaridad, concentraciones iónicas e intercambio de gases. Respecto a este último, el oxígeno y el dióxido de carbono (CO_2) son de particular importancia para el cultivo de células. En los sistemas de cultivo de células eucariotas típicos, se proporciona una incubadora en la que se infunde CO_2 para mantener una atmósfera de aproximadamente 5% de CO_2 dentro de la incubadora. El CO_2 interactúa con el medio de cultivo de tejidos, particularmente su sistema tampón, manteniendo el pH cerca de los niveles fisiológicos. Los recipientes de cultivo de células convencionales comprenden frascos de cultivo de tejidos, botellas de cultivo de tejidos y placas de cultivo de tejidos. La entrada de CO_2 desde la atmósfera de la incubadora en una placa de cultivo de tejidos generalmente implica una cubierta de ajuste holgada que sobresale de la placa para excluir que los contaminantes en partículas entren en la cámara o las cámaras de la placa, pero permite el intercambio de gas entre la atmósfera de la incubadora y la atmósfera dentro de las placas del cultivo de tejido. De manera similar, para los frascos o botellas de cultivo de tejidos, una tapa de ajuste suelto excluye los contaminantes en partículas que entran en la cámara del frasco o de la botella, pero permite el intercambio de gases entre la atmósfera de la incubadora y la atmósfera dentro del matraz o de la botella. Más recientemente, se proporciona una tapa con una membrana o filtro permeable a los gases, permitiendo de este modo el intercambio de gases con una tapa ajustada herméticamente.

Además del CO_2, el cultivo de células depende de la capacidad de suministrar a las células una cantidad suficiente de oxígeno necesaria para la respiración celular y la función metabólica. El suministro de oxígeno para la respiración celular en recipientes convencionales de cultivo celular está en el espacio de cabecera del recipiente, por ejemplo, el espacio vacío en el recipiente que está por encima de la superficie del medio de cultivo de tejidos. Los esfuerzos para aumentar la concentración de oxígeno en las células cultivadas incluyen la agitación mecánica, la perfusión o aireación del medio, el aumento de la presión parcial de oxígeno y/o el aumento de la presión atmosférica, así como el uso de un sustrato de cultivo celular preparado a partir de una mezcla de un perfluorocarbono, un perfluoro-aldehído y un factor de adhesión (documento WO 02/44341 A2). Por lo tanto, en recipientes de cultivo de células convencionales, el volumen o la superficie proporcionada para el intercambio gaseoso, en relación con el volumen o las superficies del recipiente entero, se utiliza ineficientemente y/o da como resultado la limitación de la velocidad de intercambio gaseoso o el equilibrado de gases. Esto es aún más notable en cultivos de pequeña escala (15 ml o menos) en los que la tasa de crecimiento celular, la densidad celular y el número total de células son frecuentemente bajas debido al espacio, la superficie y las limitaciones del intercambio gaseoso. También hay pruebas de que los niveles subóptimos de oxígeno a través de los tejidos precursores in vitro resultan en un menor grado de diferenciación.

Los niveles variables de oxígeno en las células madre embrionarias cultivadas, por ejemplo, determinan si proliferarán o se diferenciarán. También se ha observado una clara relación entre la oxigenación y la diferenciación en las células madre endoteliales y mesenquimatosas. En otro sistema in vitro, los inventores han demostrado que la diferenciación de las células beta pancreáticas in vitro es muy potenciada por el oxígeno. Esto es consistente con la observación de que la segunda y más significativa onda de especificación de células beta durante el desarrollo embrionario (transición secundaria) es concurrente con el inicio del flujo sanguíneo dentro de los brotes pancreáticos. Existe, por lo tanto, una necesidad en la técnica de proporcionar sistemas de cultivo de tejidos en los que la liberación de oxígeno se mejore o se ajuste dependiendo del establecimiento del cultivo, la proliferación, la diferenciación y/o la viabilidad.

Sumario

Se describe un aparato que proporciona una liberación mejorada de oxígeno a las células en plataformas convencionales de cultivo estático a través de la modificación de sistemas de cultivo convencionales en los que se produce difusión de oxígeno en ambos lados del recipiente de cultivo, arriba y abajo. También se proporciona una composición de membrana permeable a los gases.

En recipientes de cultivo típicos, hechos de plásticos estables, relativamente impermeables a los gases tales como poliestireno o polipropileno, las células descansan sobre la superficie de plástico inferior y están cubiertas por una profundidad de medio dada para permitir una oxigenación adecuada del aire por encima de la capa de medio. Este sistema está lejos de ser ideal porque la capa de célula/medio forma rápidamente gradientes de oxígeno agudos dependiendo de la densidad de la siembra y de la tasa de consumo de oxígeno del tejido cultivado. Esto conduce al

desarrollo de regiones núcleo anóxicas en células cultivadas cuando tienen un diámetro mayor que aproximadamente 400 micrómetros o cuando se cultivan en densidades de siembra que exceden el 1 - 3% de la superficie del matraz de cultivo. El resultado es un mayor coste e ineficiencia en el cultivo de grandes cantidades de células, sin mencionar el mayor riesgo de contaminación debido a la manipulación de numerosos vasos de cultivo. Además, el efecto sobre la funcionalidad celular, la viabilidad y la diferenciación, particularmente en células con actividad metabólica significativa, tales como islotes de Langerhan, es significativamente negativo.

En una realización preferida, un aparato de cultivo de células y tejidos comprende un pocillo de cultivo de tejido que comprende una barrera de membrana; miembros de soporte que se extienden desde el fondo del pocillo de cultivo de tejidos para elevar el pocillo del cultivo de tejido; y, una bandeja o un matraz de cultivo de tejidos que comprende el pocillo de cultivo de tejidos. Los miembros de soporte también pueden estar en el lado o en la parte superior del pozo, o de cualquier otra manera para que la barrera inferior esté elevada y el aire pueda fluir a través de él. El pocillo de cultivo de tejidos comprende una abertura superior e inferior; y una barrera de membrana permeable a los gases, no permeable a los líquidos, en la que dicha barrera define una superficie inferior continua del pocillo de cultivo de tejidos.

En una realización preferida, la barrera de membrana comprende una composición de hidrocarburo perfluorado y silicona. Preferiblemente, el hidrocarburo perfluorado comprende fluoroheptanos, fluorocicloheptanos, fluorometilcicloheptanos, fluorohexanos, fluorociclohexanos, fluoropentanos, fluorociclopentanos, fluorometilciclopentanos, fluorodimetilciclopentanos, fluorometilciclobutanos, fluorodimetilciclobutanos, fluorotrimetilciclobutanos, fluorobutanos, fluorociclobutanos, fluoropropanos, fluoroéteres, fluoropoliéteres, fluorotributilaminas, fluorotrietilaminas, perfluorohexanos, perfluoropentanos, perfluorobutanos, perfluoropropanos o hexafluoruro de azufre.

Otras moléculas alternativas que promueven el intercambio de oxígeno y que podrían usarse en la formulación de la barrera incluyen, pero no se limitan a, neuroglobina, hemoglobina y mioglobina.

En una realización preferida, la composición de hidrocarburo perfluorado y silicona tiene una relación de entre aproximadamente 0,001% v/v de hidrocarburo perfluorado por ml de silicona hasta un 80% v/v de hidrocarburo perfluorado por ml de silicona.

En otra realización preferida, el O_2 se mejora adicionalmente cultivando las células en diversos medios que permiten una mayor absorción de O_2. Por ejemplo, emulsiones de perfluoro.

En otra realización preferida, la barrera de membrana comprende al menos un material seleccionado entre cerámicas, polímeros, sustratos tejidos, sustratos no tejidos, poliamida, poliéster, poliuretano, polímeros de fluorocarbono, polietileno, polipropileno, hidrocarburo perfluorado, alcohol polivinílico, hidrogeles y silicona.

En otra realización preferida, la barrera de membrana comprende poros de al menos aproximadamente 0,001 µm hasta 0,5 µM de tamaño. Preferiblemente, la barrera de membrana es al menos aproximadamente 0,01 µM de espesor hasta aproximadamente 1 mm de espesor.

En otra realización más, el pocillo de cultivo de tejidos está hecho de al menos un material que comprende polipropileno, poliestireno, vinilo, otros plásticos, metales, aleaciones, minerales, minerales no metálicos, madera, fibras, tela y vidrio. La bandeja que comprende al menos uno o más pocillos de cultivo de tejidos está hecha de al menos un material que comprende polipropileno, poliestireno, vinilo, otros plásticos, metales, aleaciones, minerales, minerales no metálicos, madera, fibras, tela y vidrio.

La forma, las dimensiones del pocillo y la bandeja del cultivo de tejidos pueden variar dependiendo de las necesidades del usuario. Por ejemplo, el pocillo del cultivo de tejidos puede ser circular, rectangular y similar. El tamaño del pocillo del cultivo de tejidos puede ser el tamaño de una placa de 384 pocillos típica, una típica placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos, una típica placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos, una placa de cultivo de tejidos de 12 pocillos, una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos, y similares. El sistema también puede tener la forma de un matraz de cultivo de tejidos. La barrera puede estar a lo largo de la base o al lado del matraz.

En un aspecto de la invención, la bandeja comprende una tapa que permite el intercambio gaseoso. El sistema puede incubarse en incubadoras con diferentes porcentajes de oxígeno. Por ejemplo, incubadoras con aproximadamente de 1% a 100% de O_2 y/o cámaras hiperbáricas. El sistema asegura que el suministro de O_2 es continuo, eficiente y mejorado en comparación con los sistemas de cultivo de tejidos típicos.

En otra realización preferida, una composición comprende una matriz de silicona altamente permeable impregnada con un perfluorocarbono. Preferiblemente, el perfluorocarbono comprende fluoroheptanos, fluorocicloheptanos, fluorometilcicloheptanos, fluorohexanos, fluorociclohexanos, fluoropentanos, fluorociclopentanos, fluorometilciclopentanos, fluorodimetilciclopentanos, fluorometilciclobutanos, fluorodimetilciclobutanos, fluorotrimetilciclobutanos, fluorobutanos, fluorociclobutanos, fluoropropanos, fluoroéteres, fluoropoliéteres, fluorotributilaminas, fluorotrietilaminas, perfluorohexanos, perfluoropentanos, perfluorobutanos, perfluoropropanos, o hexafluoruro de azufre.

En una realización, la composición de perfluorocarbono y silicona tiene una relación entre aproximadamente 0,001% v/v de perfluorocarbono por ml de silicona hasta 80% v/v de perfluorocarbono por ml de silicona.

También se describe en este documento un método para cultivar células o explantes de tejido en un aparato de cultivo de tejido de liberación de oxígeno mejorada, el método comprende (a) suspender las células o explantes de tejido a cultivar en el aparato de la invención, en una cantidad apropiada de medio de cultivo de tejido para formar una suspensión; (b) introducir la suspensión en un instrumento para inyectar la suspensión en un pocillo de cultivo de tejidos del aparato; y, (c) incubar el aparato de cultivo celular, que contiene la suspensión de medio y células, en una incubadora de cultivo celular. Preferiblemente, las células a cultivar son células dependientes del anclaje o células independientes del anclaje. También se contemplan secciones de tejido cultivado dentro del alcance de la invención.

En otra realización preferida, el sistema de cultivo que comprende las células, tejidos u órganos se incuba en un intervalo de niveles y temperaturas de oxígeno. Por ejemplo, incubadoras con aproximadamente de 1% a 100% de O_2, y/o cámaras hiperbáricas.

También se describe en este documento un método para determinar el efecto de liberación y disponibilidad de oxígeno mejorado a un cultivo celular que comprende cultivar células en un aparato que comprende: un dispositivo de cultivo de tejido que contiene una barrera de membrana; miembros de soporte que se extienden desde el fondo, el lateral o la parte superior del pocillo de cultivo de tejidos para elevar el pocillo de cultivo de tejido; y, una bandeja o frasco de cultivo que comprende el pocillo de cultivo de tejidos.

En otra realización preferida, el aparato comprende una abertura superior e inferior; y una barrera de membrana permeable a los gases en la que dicha barrera define una superficie inferior continua del dispositivo de cultivo de tejidos. Preferiblemente, la barrera de membrana comprende al menos un material seleccionado entre cerámicas, polímeros, sustratos tejidos, sustratos no tejidos, poliamida, poliéster, poliuretano, polímeros fluorocarbonados, polietileno, polipropileno, hidrocarburo perfluorado, alcohol polivinílico, hidrogeles y silicona.

En una realización preferida, la barrera de membrana comprende un hidrocarburo perfluorado y composición de silicona. Ejemplos de hidrocarburos perfluorados incluyen, pero no se limitan a fluoroheptanos, fluorocicloheptanos, fluorometilcicloheptanos, fluorohexanos, fluorociclohexanos, fluoropentanos, fluorociclopentanos, fluorometilciclopentanos, fluorodimetilciclopentanos, fluorometilciclobutanos, fluorodimetilciclobutanos, fluorotrimetilciclobutanos, fluorobutanos, fluorociclobutanos, fluoropropanos, fluoroéteres, fluoropoliéteres, fluorotributilaminas, fluorotrietilaminas, perfluorohexanos, perfluoropentanos, perfluorobutanos, perfluoropropanos, o hexafluoruro de azufre.

En otra realización preferida, un aparato para el transporte de células, tejidos y órganos comprende un dispositivo de cultivo que contiene una barrera de membrana; y un recipiente que encierra el dispositivo de cultivo en condiciones estériles.

En otra realización preferida, el dispositivo de cultivo comprende una abertura superior e inferior; y una barrera de membrana permeable a los gases, en la que dicha barrera define una superficie continua de al menos un lado del dispositivo de cultivo. Preferiblemente, la barrera de membrana comprende una composición de hidrocarburo perfluorado y silicona.

En otra realización preferida el hidrocarburo perfluorado comprende fluoroheptanos, fluorocicloheptanos, fluorometilcicloheptanos, fluorohexanos, fluorociclohexanos, fluoropentanos, fluorociclopentanos, fluorometilciclopentanos, fluorodimetilciclopentanos, fluorometilciclobutanos, fluorodimetilciclobutanos, fluorotrimetilciclobutanos, fluorobutanos, fluorociclobutanos, fluoropropanos, fluoroéteres, fluoropoliéteres, fluorotributilaminas, fluorotrietilaminas, perfluorohexanos, perfluoropentanos, perfluorobutanos, perfluoropropanos, o hexafluoruro de azufre.

En una realización preferida, la composición de hidrocarburo perfluorado y silicona tiene una relación de entre aproximadamente 0,001% v/v de hidrocarburo perfluorado por ml de silicona hasta un 80% v/v de hidrocarburo perfluorado por ml de silicona.

En otra realización preferida, la barrera de membrana comprende poros de al menos aproximadamente 0,001 μm hasta 1 mm de tamaño.

El dispositivo, aparato o sistema de cultivo está hecho de al menos un material seleccionado que comprende polipropileno, poliestireno, vinilo, otros plásticos, metales, aleaciones, minerales, minerales no metálicos, madera, fibras, tela y vidrio. El recipiente está hecho de al menos un material que comprende polipropileno, poliestireno, vinilo, otros plásticos, metales, aleaciones, minerales, minerales no metálicos, madera, fibras, tela y vidrio.

En otra realización preferida, la barrera de membrana es de al menos aproximadamente 0,01 μM de espesor hasta aproximadamente 1 mm de grosor.

Otros aspectos de la invención se describen a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Las ventajas anteriores y adicionales de esta invención pueden entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada en conjunción con los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es una representación esquemática que ilustra una realización del aparato de la invención.

Las Figs. 2A-2D son escaneos de fotografías que muestran: La figura 2A son neurosferas cultivadas en altas condiciones de control de O_2 (48 h). La figura 2B son neurosferas cultivadas en placas de PFC/Si, también a alto O_2 (48 h). Estos son representativos de Control vs. condiciones de PFC/Si a concentraciones estándar y altas de O_2. La tinción de BrdU rojo (que indica proliferación) se muestra en el control (Figura 2C) y en las neurosferas de cultivo PFC/Si (Figura 2D). DAPI (azul) es una contra-tinción nuclear. Barras de escala (filas superior e inferior): 500 µm.

La figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de la comparación de todos los tipos de platos 24 horas después de la fabricación. La figura muestra curvas medias representativas de las repeticiones de cada grupo. No se muestran las barras de error, pero las diferencias entre las plataformas PFC/Silicona frente a la silicona sola y frente al poliestireno fueron altamente significativas a favor de las plataformas PFC/Silicona ($P < 0,01$ frente a la silicona sola y el poliestireno para el tiempo a la mitad de la concentración máxima y la velocidad de la pendiente de reoxigenación).

La figura 4 es una representación esquemática de un sensor de oxígeno de punto óptico de película delgada.

Las Figuras 5A-5C muestran una mayor oxigenación en los dispositivos PFC/Si. La Fig. 5A es una representación esquemática del principio de "sándwich de oxígeno". En vasos de cultivo estándar, el oxígeno atmosférico puede llegar al tejido sólo después de la difusión a través del medio de cultivo. En los dispositivos PFC/Si, la muestra descansa encima de una membrana de silicona permeable al aire, enriquecida con perfluorocarbono, que proporciona oxigenación adicional. La figura 5B es un modelo matemático COMSOL v.3.2 de gradientes de oxígeno en brotes pancreáticos inmediatamente después del equilibrio (día 0) en condiciones estándar a 21% de oxígeno (arriba), condiciones estándar a 35% de oxígeno (medio) y dispositivos PFC/Si al 35% de oxígeno (abajo). Izquierda, escala de presión parcial de oxígeno (mm Hg), de azul (mínimo) a rojo (máximo). El blanco representa áreas con <0,1 mm Hg de oxígeno (anoxia).

Las Figs. 6A - 6B muestran que los PFC/dispositivos inducen mayores velocidades de proliferación. La figura 6A es un gráfico que muestra el volumen de brotes pancreáticos (m^3) después de tres días de cultivo en cada condición (control estándar, alto control de oxígeno y PFC/Si), mostrando un efecto favorable del oxígeno sobre la proliferación celular. La línea de base representa el volumen promedio de brotes inmediatamente después de la recolección (día 0). Barras de error: error estándar para cada grupo. La figura 6B muestra en la columna izquierda: microfotografías de brotes cultivados durante 3 días en cada condición. Barra de escala: 400 µm. Columna derecha: análisis inmunofluorescente de los brotes pancreáticos (día 3 del cultivo) con un Hipoxyprobe (Chemicon), que detecta áreas a <10 mm Hg (hipoxia) (verde). Azul, contra-tinción nuclear DAPI. Barra de escala: 500 µm.

La figura 7 es una serie de fotografías que muestran que el crecimiento inducido por PFC/Si es debido a la replicación de células epiteliales indiferenciadas. Análisis confocal inmunofluorescente de brotes pancreáticos cultivados durante tres días en dispositivos de PFC/Si en presencia de BrdU (verde). Azul, contra-tinción nuclear DAPI. Fila superior: en rojo, en el sentido de las agujas del reloj de la izquierda: Glucagón (Glu), Insulina (Ins), Carboxipeptidasa A (CPA) y Amilasa (Amy). Pocas células diferenciadas terminalmente tuvieron tinción con BrdU Fila inferior: tinción BrdU (verde), DAPI (azul) y E-cadherina (E-cad) (rojo) de brotes de cultivo de PFC/Si, mostradas como combinaciones de dos canales (microfotografías 1, 2 y 3) y combinación de 3 canales (microfotografía 4). La mayoría de las células en el brote son E-caderina+ (epitelial). La proliferación ocurre preferentemente dentro de la población E-caderina+ -indiferenciada. Barras de escala: 50 µm (Glu, Ins, CPA) y 75 µm (Amy, E-cad).

Las Figs. 8A-8C muestran que el cultivo en plataformas PFC/Si promueve la diferenciación endocrina. La figura 8A es un gráfico que muestra el análisis relativo de qRT-PCR de brotes pancreáticos cultivados en condiciones estándar (barras cerradas), oxígeno alto (barras estriadas) y dispositivos PFC/Si (barras grises). Los valores se representan como un aumento de x veces sobre el control (= 1). Barras de error: error estándar (7 experimentos independientes). Todos los valores se normalizaron contra el ARN 18S (véase Métodos). La figura 8B es un gráfico que muestra el análisis Metamorph® de la señal de insulina (izquierda) y glucagón (derecha) en los brotes inmunoteñidos cultivados en configuraciones estándar (barras cerradas), oxígeno alto (barras estriadas) y PFC/Si (barras grises). Eje Y: incremento de x veces sobre el control estándar (= 1). Barras de error: error estándar (5 experimentos independientes). La figura 8C muestra microfotografías confocales de secciones representativas de brotes e13.5 cultivados durante tres días en condiciones estándar (izquierda), altas de oxígeno (medio) y plataformas PFC/Si (derecha). Las células positivas a la insulina (Ins) se tiñen en rojo y las células positivas al glucagón (Glu) en verde. Azul: Contra-tinción nuclear DAPI. Se ha añadido una línea punteada blanca para resaltar el contorno de las muestras. Barra de escala: 100 µm.

Las Figuras 9A-9B son gráficas que muestran el contenido de insulina y los perfiles de expresión génica de brotes e13.5 cultivados con PFC/Si aproximados a los de brotes e16.5. La figura 9A muestra el contenido total de insulina en cada grupo (control estándar, alto control de oxígeno y PFC/Si), representado como la proporción de la que se

encuentra en los brotes pancreáticos dorsales obtenidos de embriones e16.5 (= 1). Barras de error: error estándar para cada grupo (n = 4). La figura 9B muestra el perfil de expresión génica de brotes E13.5 cultivados con PFC/Si, expresados como un porcentaje de los brotes recién aislados de e16.5. Una línea punteada destaca el 100% de la expresión e16.5. Barras de error: error estándar para cada grupo (n = 4 cosechas independientes para e16.5 y 7 experimentos independientes para PFC/Si).

Las Figuras 10A-10B son gráficos que muestran que PFC/Si induce una preferencia endocrina sobre células exocrinas y la diferenciación de células β sobre α. Análisis ratiométrico de la expresión génica en el grupo PFC/Si en comparación con brotes e16,5 (cajas estriadas), así como controles estándar (cajas grises) y de alto oxígeno (cajas cerradas). Los valores se representan como aumento de x veces de la relación neta para cada par de genes en el grupo PFC/Si sobre el de los otros tres grupos. La figura 10A muestra el análisis ratiométrico endocrino-exocrino: Ins1/Amy (Insulina 1 a amilasa); Ins1/p48 (Insulina 1 a P48); e Ins1/CPA (Insulina 1 a Carboxipeptidasa A). Se calcularon las mismas relaciones para Insulina 2 (Ins2). La figura 10B muestra el análisis ratiométrico de las células β a α: Pax4/Arx; Ins1/Glu (Insulina 1 a Glucagon); Ins2/Glu (Insulina 2 a Glucagón); y Pax4/Pax6. Barras de error: error estándar para cada grupo.

La figura 11 es una representación esquemática de un modelo hipotético para explicar el papel del O_2 en el desarrollo pancreático. Según la hipótesis de las condiciones hipóxicas presentes en el páncreas antes de la iniciación del flujo sanguíneo se favorecería la activación mediada por HIF-1α de Notch en células progenitoras endocrinas, promoviendo su auto-renovación pero impidiendo en gran medida su diferenciación. La estabilización de HIF-1α en condiciones hipóxicas también induce la angiogénesis mediada por VEGF, lo que eventualmente conducirá al inicio del flujo sanguíneo en torno a e13,5. El aumento de la oxigenación de los tejidos pancreáticos en ese punto desestabilizará HIF-1α, lo que resulta en la disminución de la regulación de Notch y la diferenciación de los tipos de células endocrinas. Las células progenitoras exocrinas, por el contrario, pueden reaccionar a mayores niveles de O_2 mediante la activación de la vía Wnt/β-catenina vía el secuestro de NRX por ROS. Esto promovería su expansión durante el resto del desarrollo embrionario.

Descripción detallada

Un aparato proporciona el suministro mejorado de oxígeno a las células en plataformas de cultivo estáticas que proporcionan difusión de oxígeno en ambos lados del recipiente de cultivo, arriba y abajo.

El presente aparato de cultivo de tejidos es superior a cualquier sistema típico proporcionando un suministro aumentado de oxígeno a las células. En sistemas típicos, se aumentan las necesidades de oxígeno mediante métodos de agitación mecánica y el rociado de gases en el cultivo. Sin embargo, tanto la agitación como el rociado de los gases pueden dar como resultado células dañadas, disminuyendo así la viabilidad del cultivo y la eficiencia y productividad totales del cultivo de células y/o tejidos. Además, el rociado directo de cultivos de células y tejidos con gas puede conducir a la producción de espuma que, también es perjudicial para la viabilidad celular. Por otra parte, el solo aumento de la concentración de oxígeno en la incubadora ha demostrado ser insuficiente debido a la generación de gradientes de oxígeno agudos a lo largo de la muestra. La presente invención permite además el cultivo de tejidos de alta densidad de células.

Los niveles variables de oxígeno en las células madre embrionarias cultivadas, por ejemplo, determinan si éstas proliferarán o se diferenciarán. También se ha observado una clara relación entre la oxigenación y la diferenciación en las células madre endoteliales y mesenquimatosas. En otro sistema in vitro, los inventores han demostrado que la diferenciación de las células beta pancreáticas in vitro está muy potenciada por el oxígeno. Esto es consistente con la observación de que la segunda y más significativa onda de especificación de células beta durante el desarrollo embrionario (transición secundaria) es concurrente con el inicio del flujo sanguíneo dentro de los brotes pancreáticos.

En una realización preferida, un aparato de cultivo de tejidos proporciona suministro mejorado de oxígeno a células o tejidos que se están cultivando. El aparato o sistema es superior a los sistemas de cultivo convencionales al proporcionar difusión de oxígeno a través de ambos lados del recipiente de cultivo, arriba y abajo. En recipientes de cultivo típicos, hechos de plásticos estables, relativamente impermeables a los gases, tales como poliestireno o polipropileno, las células descansan sobre la superficie de plástico inferior y están cubiertas por una profundidad del medio dada para permitir una oxigenación adecuada del aire por encima de la capa de medio. Estos tipos de sistemas están lejos de ser ideales porque la capa de célula/medio forma rápidamente gradientes de oxígeno agudos dependiendo de la densidad de siembra y la tasa de consumo de oxígeno del tejido cultivado. Esto conduce al desarrollo de regiones núcleo anóxicas en células cultivadas cuando tienen un diámetro mayor que aproximadamente 400 micrómetros o cuando se cultivan en densidades de siembra que exceden el 1 - 3% de la superficie del matraz de cultivo. El resultado es un mayor coste e ineficiencia en el cultivo de grandes cantidades de células, sin mencionar el mayor riesgo de contaminación debido a la manipulación de numerosos vasos de cultivo. Además, el efecto sobre la funcionalidad celular, la viabilidad y la diferenciación, particularmente en células con actividad metabólica significativa, tales como islotes de Langerhans, es significativamente negativo.

El aparato de cultivo de tejidos de la invención comprende plataformas de cultivo en las que la superficie inferior comprende una capa de silicona de película delgada que contiene una suspensión micelar de perfluorocarbono al

10-20% v/v. En realizaciones preferidas, la suspensión micelar de perfluorocarbono oscila entre aproximadamente 0,001% y 80% v/v, perfluorocarbono a silicona. Tanto la silicona como el perfluorocarbono tienen solubilidad y difusividades/permeabilidades para el oxígeno que son mucho mayores que el medio de cultivo o los plásticos. Colocando las células en una capa altamente oxigenada y permeable, el tejido cultivado se cubre eficazmente por el oxígeno eliminando los gradientes de arriba a abajo presentes en condiciones de cultivo convencionales. En este caso, el área de menor oxigenación se convierte en la región media de la capa celular en lugar de la zona inferior del plato, y con modificaciones en la concentración de oxígeno, esta región puede ser controlada para evitar la anoxia.

El aparato es superior a plataformas de cultivo similares donde la superficie inferior comprende una fina capa de silicona sin perfluorocarbono. Las ventajas de PFC/Si sobre la silicona sola en términos de difusión de O_2 se confirmaron mediante mediciones directas utilizando biosensores ópticos no invasivos de O_2 (véanse los estudios de transferencia de oxígeno en la sección de Ejemplos que sigue). Los resultados de diferenciación endocrina también fueron superiores en un modelo murino de desarrollo pancreático (véanse los ejemplos que siguen: oxigenación mejorada promueve la diferenciación de células beta in vitro).

Las dimensiones de los pocillos o insertos de cultivo tienen dimensiones variables dependiendo del cultivo deseado de las secciones de tejido o células. Por ejemplo, si se desea un cultivo de tipo de 24 pocillos, entonces los pocillos tendrían una dimensión correspondiente a las placas típicas de 24 pocillos.

En otro ejemplo, se encuentra una arquitectura de placa de 96 pocillos que ejemplifica la configuración general del formato estándar industrial actual. Su altura, anchura y longitud totales están estandarizadas en aproximadamente 0,560, 3,365 y 5,030 pulgadas (0,014, 0,085, 0,1277 m), respectivamente. La placa incluye un faldón circundante, una superficie superior y una serie de pocillos dispuestos en doce filas de ocho pocillos cada una, para proporcionar 96 pocillos idénticos en la placa. Por ejemplo, la superficie de fondo inferior de placas de microtitulación estándar (96 pocillos) es de 0,32 cm^2. Esto se traduciría en un radio de 0,32 cm y el espesor de la membrana estaría todavía en el intervalo de micrómetros, p. ej. 50-600 μm). La superficie superior se extiende entre el faldón y la periferia de los pocillos en el exterior de la matriz de 96 pocillos. Las placas típicamente están moldeadas de plástico y están provistas de cubiertas transparentes con anillos de gota para controlar la pérdida de agua por evaporación, permitiendo al mismo tiempo el intercambio de gases y manteniendo la esterilidad.

La estandarización del formato de 96 pocillos ha conducido al desarrollo de una variedad sustancial de equipo para realizar transferencias de líquidos hacia y desde las cámaras de los pozos, para transmitir la luz a través de los pozos, para leer los cambios colorimétricos o fluorescentes o quimioluminiscencia en los pocillos individuales y muchas otras funciones. El equipo de transferencia de líquido es manual o robotizado y gran parte del equipo utilizado para estudiar el contenido de los pozos está automatizado e instrumentado para registrar, analizar y manipular los datos. La presente invención proporciona recipientes favorables a la automatización y bien un único depósito o bien una placa base de pocillos múltiples que es compatible con el equipo auxiliar diseñado para el formato de 96 ó 384 pocillos en todos los aspectos.

En otro ejemplo, los pocillos o insertos de cultivo de tejidos tienen un diámetro interior de 1 cm y tienen aproximadamente 1 cm de altura, manteniendo un volumen máximo de aproximadamente 785 µl. Los fondos del inserto de cultivo comprenden una matriz de silicona altamente permeable impregnada con perfluorocarbono en un porcentaje de volumen/volumen dado. Esta combinación proporciona un depósito de oxígeno en la superficie basal, sin barrera de medio entre las células y el aire, ya que la superficie inferior sería impermeable al líquido.

Volviendo a una descripción general del aparato de cultivo como se muestra como una ilustración esquemática en la FIG. 1. La referencia a las figuras es a modo de ejemplo y no limitan en modo alguno el alcance de la presente invención. El pocillo o inserto de cultivo de tejido 110 comprende una barrera permeable a los gases 111 que proporciona una liberación mejorada de oxígeno a las células que se están cultivando 112. El pocillo de cultivo de tejidos (insertos) comprende además al menos dos o más miembros 113 unidos al fondo del inserto que elevan el pocillo/inserto de cultivo de tejido sobre la bandeja 114. Los miembros elevadores 113 elevan el pocillo de cultivo de tejidos/inserto 110 de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 3 mm por encima de la bandeja. La bandeja comprende una tapa 115, usada típicamente en cultivo de tejidos para permitir el intercambio de gases. Las placas típicamente están moldeadas de plástico y están provistas de cubiertas transparentes con anillos de gota para controlar la pérdida de agua por evaporación, permitiendo al mismo tiempo el intercambio de gas y manteniendo la esterilidad.

Los insertos/pocillos de cultivo de tejidos se pueden fabricar individualmente para su uso, por ejemplo, en placas convencionales de cultivo de tejidos, en donde la bandeja 114 sería la placa de cultivo de tejidos. Alternativamente, los pocillos de cultivo de tejidos/insertos pueden fabricarse como parte de una placa de cultivo de tejidos, tal como, por ejemplo, una placa de 24 pocillos, una placa de 12 pocillos, una placa de 6 pocillos y similares. Las células cultivadas en el aparato de la invención pueden incubarse en incubadoras de cultivo de tejidos regulares. El contenido de O_2 de la incubadora variaría dependiendo de las necesidades óptimas de crecimiento del tipo celular.

El aire útil para la presente invención puede ser cualquier mezcla adecuada de gases adecuados para cualquier crecimiento celular incluyendo, pero sin limitarse a, aire. En una realización, el volumen/volumen de perfluorocarbono y silicona se varía para modular el suministro de oxígeno como se desee. Además, el aparato de

cultivo puede incubarse en porcentajes variables de CO_2, CO, NO, O_3, H_2S o cualquier otra composición de gas considerada apropiada para el crecimiento, la viabilidad o la diferenciación celular. Por ejemplo, incubadoras con aproximadamente de 1% a 100% de O_2, y/o cámaras hiperbáricas.

La tapa o los medios de cierre de la bandeja pueden ser de cualquier conformación o forma incluyendo, pero sin limitarse a, una tapa roscada o una tapa a presión. Los medios de tapa/cierre están dimensionados para adaptarse a la bandeja. Además, los medios de cierre pueden estar construidos a partir de cualquier material incluyendo, pero sin limitarse a, plástico. En una realización preferida, los medios de cierre pueden contener un filtro de aire de manera que el filtro de aire no permita el paso de microorganismos, células, virus o cualquier contaminante dentro o fuera del dispositivo de cultivo de células. Los filtros de aire de esterilización son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Millipore, Mass.

En otra realización preferida, el aparato y los pocillos de cultivo de células/tejidos pueden configurarse según las necesidades del usuario. Por ejemplo, en una realización, el conjunto está configurado en una placa de cultivo tisular típica. Otras configuraciones incluyen placas de 6 pocillos, placas de 12 pocillos, placas de 24 pocillos, placas de 96 pocillos y similares. Otras configuraciones incluyen matraces de cultivo de tejidos, recipientes para el transporte de órganos, especialmente aquellos órganos para uso en el trasplante de órganos, botellas de rodillo para cultivar grandes volúmenes de células, bolsas y similares.

Bolsas de silicona PFC: La mezcla PFC/silicona se inyecta a alta presión en un molde de acero inoxidable (fabricado previamente por mecanizado CNC) que es el inverso del objeto deseado, en este caso una bolsa. El molde comprende una porción interna sólida de la bolsa, un canal delgado para la inyección del material al espesor deseado de la membrana y un bloque exterior final que servirá para mantener el material con el espesor deseado durante el proceso de curado. El molde está hecho generalmente de dos piezas, el núcleo y la cavidad, que permite que la pieza sea extraída después del moldeo por inyección. Una vez que la mezcla ha curado, puede ser retirada del molde por una serie de pasadores integrados en el molde antes de la fabricación, o por expulsión de aire a través de canales cortados en el molde. Las bolsas de silicona PFC se pueden hacer a cualquier espesor deseado utilizando esta técnica.

Moldeo por compresión de prototipos de PFC/Silicona: En un ejemplo, se fabricó una cavidad de molde de un bloque de acero inoxidable con un canal circular de 8 mm de profundidad y un espesor de 6 mm. Se perforaron orificios de inyección de aire a lo largo del lado del canal para permitir la retirada del molde. Éste se colocó dentro de las cerraduras de tornillo de una máquina de moldeo por compresión y se bloqueó enrasado con la superficie principal de la máquina de moldeo. Sobre la cavidad y sobre la superficie de la máquina de moldeo por compresión, se vertió la mezcla de PFC/silicona en exceso, y se colocaron unos calzos de acero inoxidable de 300 micrómetros a lo largo de los lados de la superficie de moldeo apical (superficie de compresión hidráulica). La superficie superior, que es simplemente una gran superficie de acero inoxidable de aproximadamente 24"x 24" (0,6096 m x 0,6096 m), se comprimió hasta el nivel de los calzos y el material se dejó curar durante tres horas a 37ºC. Al final del período de tres horas, se liberó el compresor, se elevó la superficie apical y se inyectó aire en los orificios liberando una placa de silicona sólida con una membrana de fondo de 300 micrómetros.

En una realización preferida, el aparato comprende 96 pocillos y es del mismo tamaño que los típicamente usados para los ensayos.

En otra realización preferida, los pocillos de cultivo de tejidos pueden comprender un inserto separable en el que la única pieza del pocillo comprende la barrera de membrana, similar a la arquitectura de transpocillos. Por ejemplo, la porción del pocillo del cultivo de tejido utilizada para ayudar al crecimiento de células que comprende la membrana PFC/Si, está fijada de forma desmontable a la parte del dispositivo usada para suspender la membrana dentro de un pocillo que contiene medio de crecimiento. Esta disposición permite una fácil manipulación de las células cultivadas.

En esta configuración, el dispositivo de cultivo de tejidos comprende un transpocillo de dos piezas que tiene dos componentes, un elemento de retención de células y un colgador para suspender el elemento de retención de células dentro de un pocillo. El elemento de retención está fijado de forma desmontable a la parte inferior del colgador. El elemento de retención de células incluye la superficie de la membrana PFC/Si. El colgador está construido y dispuesto de tal manera que puede estar suspendido desde la periferia del pozo, con una porción inferior del colgador que se extiende dentro del pozo. Cuando el colgador está suspendido de la periferia del pozo, el elemento de retención está suspendido horizontalmente dentro del pozo.

En otra realización preferida, el elemento de retención comprende elementos sobresalientes o elevadores.

En una realización, el elemento de retención está asegurado al fondo del colgador mediante un ajuste por fricción. En otra realización, el elemento de retención está asegurado al fondo del colgador mediante un ajuste por fricción pero en una orientación invertida en comparación con la de la primera realización. En otra realización más, el elemento de retención está colgado del colgador.

El colgador incluye preferiblemente una pestaña que se extiende hacia fuera que está escalonada de modo que pueda colgarse sobre el extremo superior de un pocillo en un plato de grupo de cultivo de tejidos. La pestaña escalonada impide que el colgador se desplace lateralmente dentro del pocillo, manteniendo de este modo la pared

lateral del colgador separada de la pared lateral del pozo para evitar la acción capilar del fluido entre la pared lateral. La acción capilar se evita adicionalmente en una realización mediante el uso de un colgador en forma de embudo que elimina adicionalmente la pared lateral del colgador de la pared lateral del pozo. La pestaña es discontinua para proporcionar una abertura que permita insertar una pipeta en el espacio entre el colgador y la pared lateral del pozo para proporcionar acceso al medio dentro del pocillo.

El elemento de retención tiene preferiblemente una pared lateral que define un interior y un labio periférico que se extiende desde la pared lateral. Una membrana está unida a la superficie inferior de la pared lateral formando un tejido o soporte de crecimiento celular. El labio periférico permite una fácil manipulación del elemento de retención, así como una estructura que permite el uso del elemento de retención.

El conjunto puede contener una o más membranas PFC/Si y cámaras de medios. Por ejemplo, una por debajo, una entre y una por encima de las membranas. Esto permite que las células se cultiven en las membranas para los estudios de transporte y el estudio de la interacción célula a célula.

Otro aspecto más de la invención es un plato de agrupamiento que tiene una pluralidad de pocillos que contienen el dispositivo de cultivo de tejidos como se ha descrito anteriormente.

Es un objeto de esta invención proporcionar un dispositivo de cultivo de tejido o células capaz de ser colocado en un plato de agrupamiento de tal manera que se proporcionen nutrientes a los tejidos o a las células mientras se permite el acceso a los pocillos del plato de agrupamiento para la adición o eliminación de medios.

El sistema de cultivo tridimensional de la invención puede usarse en una variedad de aplicaciones. Éstas incluyen pero no se limitan al cultivo de células y tejidos, expansión y diferenciación de células madre, ensayos, cribado de compuestos citotóxicos, alérgenos, factores de crecimiento/regulación, compuestos farmacéuticos, etc., in vitro; elucidar el mecanismo de ciertas enfermedades; estudiar el mecanismo por el cual funcionan los fármacos y/o los factores de crecimiento; diagnosticar y monitorear el cáncer en un paciente; terapia de genes; y la producción de productos biológicamente activos, por nombrar sólo algunos.

Las células de la presente invención son preferiblemente células eucariotas. En una realización preferida, las células son células animales, células de mamífero, preferiblemente células humanas. Las células pueden ser cualquier tipo de célula eucariótica recombinante o no recombinante, incluyendo, por ejemplo, células de insecto, p.ej. Sf-9; células de primates, por ejemplo, Vero; de ratón, por ejemplo, BHK o C-127; de hámster, por ejemplo, CHO; células humanas, por ejemplo, tumorales, transformadas, no transformadas, epiteliales, endoteliales, osteoblastos, embrionarias o mesenquimales. Cualquier célula puede crecer en el dispositivo de cultivo de células de acuerdo con la presente invención. En particular, las células de elección para la presente invención pueden ser dependientes del anclaje o independientes del anclaje. Las células dependientes del anclaje requieren una superficie sobre la cual crecer mientras que las células independientes del anclaje pueden crecer en una suspensión líquida.

En otra realización preferida, el sistema/aparato se utiliza para cultivar células madre/progenitoras para la diferenciación eficiente de estas células. El suministro eficaz y mejorado de O_2 a las células madre da como resultado niveles de diferenciación mejorados de estas células.

En otra realización más, la presente invención proporciona un aparato de cultivo de células para el cultivo de cultivos de tejidos tridimensionales. El cultivo de tejidos para el trasplante requiere que se cumplan varias condiciones antes de que el tejido reciba la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA). Esos requisitos de la FDA, incluyen, pero no se limitan a, la funcionalidad que mejora la consistencia de la enfermedad y la reproducibilidad para el crecimiento de la construcción de tejido; y una probada esterilidad. Para lograr la funcionalidad in vivo, los constructos de tejido manipulado deben ser tridimensionales. Los datos de la vigilancia aséptica de la construcción en crecimiento pueden utilizarse para validar la esterilidad y establecer especificaciones.

El tejido transplantado tiene tres características clave: 1) una matriz extracelular para la estabilidad mecánica y el armazón; 2) el contacto célula a célula para mantener la viabilidad y la función; y 3) una forma tridimensional para segregar las subpoblaciones celulares para el crecimiento y la proliferación. Los enfoques estándar de cultivo de tejidos (por ejemplo, matraces t, placas petri, botellas rodantes y botellas con rodillos agitados) han fracasado consistentemente en producir tejido transplantable que suplanta directamente la función del órgano.

Las formulaciones de polímero que contienen compuestos perfluorados se describen en la Patente de EE.UU. No. 6.630.154 que se incorpora en este documento en su totalidad.

El metabolismo del oxígeno es esencial para la función metabólica de las células eucariotas. Particularmente, con las técnicas de cultivo celular de mamíferos y animales, el flujo de oxígeno es importante durante las etapas tempranas de la rápida división celular. Algunas células de mamíferos y animales son dependientes del anclaje, requiriendo una superficie para crecer, mientras que otras células de mamíferos y animales son independientes del anclaje y pueden crecer en ambientes líquidos independientemente de los tipos de células. Sin embargo, todas estas células requieren oxígeno disuelto en el medio. No obstante, durante las fases posteriores del cultivo celular con células dependientes de anclaje e independientes, a medida que aumenta el número de células por unidad de volumen, aumentan los requisitos de transferencia de masa de oxígeno en masa.

Tradicionalmente, al menos con células independientes del anclaje, se ajustan las mayores necesidades de oxígeno mediante métodos de agitación mecánica y el rociado de gases en el cultivo. Sin embargo, tanto la agitación como el rociado de los gases pueden dar como resultado células dañadas, disminuyendo así la viabilidad del cultivo y la eficiencia y productividad totales del cultivo de células y/o tejidos. Además, el rocío directo de cultivos de células y tejidos con gas puede conducir a la producción de espuma, lo cual es también perjudicial para la viabilidad celular.

La presente invención supera estas deficiencias mediante un mejor aporte de oxígeno.

Como ejemplo ilustrativo que no pretende limitar o interpretar la invención de ninguna manera, se proporciona lo siguiente. Las formas de acero inoxidable fueron fabricadas por BioRep, Inc. de Miami, Florida, con las siguientes especificaciones: diámetro interior de 8,5 cm con una ranura biselada a lo largo de la cresta inferior a aproximadamente 300 micras desde el borde inferior para permitir que la silicona se cure en su lugar y se mantenga rápido. Estas formas se ajustaron dentro de un anillo exterior, también hecho de acero inoxidable, con tres pies a lo largo del borde exterior, para permitir el intercambio de gases a lo largo de la superficie inferior cuando se colocaba en una incubadora, manteniendo los pies la superficie inferior elevada sobre los estantes de acero inoxidable de la incubadora de cultivo. Otro dispositivo fue fabricado usando insertos de cultivo Millipore CM, eliminando los fondos de teflón permeables a los líquidos y reemplazándolos con silicona vertida/PFC. Sin embargo, cualquier forma de cultivo geométrico podría fabricarse eficazmente. El PFC/Silicona se preparó de la siguiente manera: se pesó silicona eléctrica Dow Corning RTV-615A (densidad 1,1 g/mL) para conseguir un volumen específico. A esto se añadió FC43 (corporación 3M) y se pesó (1,9 g/ml) de tal manera que el volumen añadido fue de 10% -20% el de la silicona y el catalizador que se añadiría posteriormente a una relación en porcentaje en volumen de 10 partes de silicona a 1 parte del catalizador. La mezcla de PFC-silicona enfriada con suspensión de hielo en una cónica de 50 ml se sonicó luego usando un sonicador de sonda a veinte segundos de intervalos de pulso, comenzando en la parte inferior de la cónica y moviendo gradualmente el sonicador hacia arriba hasta la parte superior de la cónica para dispersar homogéneamente la PFC en todas partes. Se realizaron intervalos de enfriamiento de cinco minutos después de cada minuto de sonicación. Lo que ocurre es la formación de una mezcla opaca blanca. La sonicación continúa hasta que ya no hay evidencia de separación de fases entre el PFC y la silicona y hasta que la dispersión es visiblemente uniforme. En este punto, la mezcla se agita en vórtice durante 1 minuto para homogeneizar más y luego se coloca en una cámara de desecación de vacío de vidrio para su desgasificación. La desgasificación se realiza mediante la eliminación al vacío de burbujas de aire de la mezcla de silicona, rompiendo el vacío cada cinco a diez minutos para romper las burbujas. Cuando ya no hay ninguna burbuja visible, la mezcla se retira de la cámara de desgasificación y el catalizador se añade añadiendo 10% de volumen a la mezcla. El catalizador es mucho menos viscoso que la suspensión de polímero y, por tanto, invirtiendo el tubo cuidadosamente durante varios minutos, el catalizador se dispersa bien a través de la mezcla de silicona. En este punto, las áreas de fondo abiertas de las formas están cubiertas con una superficie uniforme y tensa de Parafilm. A continuación, utilizando una pipeta de distribución de émbolo, que impide la adhesión de la silicona a lo largo del interior de las puntas de pipeta, se añade un volumen dado de la mezcla de silicona/PFC a la capa de parafilm para obtener el espesor de membrana deseado. Por ejemplo, en un plato de 8,5 cm se utiliza un espesor de membrana de 300 micrómetros, por lo que el volumen añadido sería $\pi r^2 h$, o $0{,}03*(\pi)*(4{,}25)^2$ o 1,7 ml. Este volumen se distribuye entonces uniformemente a través de la superficie girando el plato y permitiendo que la silicona se disemine y cubra completamente el Parafilm. A continuación, se deja reposar el plato que distribuye adicionalmente la mezcla de silicona uniformemente a medida que se asienta a lo largo de la superficie. Una vez que esto se completa, el plato entero se coloca en una incubadora o estufa a 45ºC para curar durante la noche. El curado se produce dentro de las 6 horas, pero para asegurar el curado completo, las placas se curaron durante aproximadamente 18 horas antes de utilizar los dispositivos. Una vez curados, los dispositivos pueden esterilizarse en autoclave para asegurar la esterilidad antes de usarlos en cultivo celular, aunque con los insertos más pequeños, las placas se remojaron en etanol al 70% durante varias horas antes de su uso.

Ejemplos

Ejemplo 1: Plataformas de cultivo celular de alto contenido en oxígeno de silicona perfluorada

Los fondos del inserto del cultivo se modificaron con una matriz de silicona altamente permeable impregnada con perfluorocarbono en un porcentaje de volumen/volumen dado. Esta combinación proporciona un depósito de oxígeno en la superficie basal, sin barrera de medio entre las células y el aire, ya que la superficie inferior sería impermeable al líquido.

Se compraron en Dow Corning Chemical silicona RTV de grado biomédico/eléctrico (RTV-615A) y el correspondiente catalizador de vulcanización (RTV-615B), ambos con una densidad de 1,1 g/cm^3. Esta silicona se eligió por sus características conocidas de biocompatibilidad, alta solubilidad en oxígeno y dureza alta. Dado que el espesor de la membrana afecta en gran medida a las propiedades de transferencia de oxígeno de la membrana, los inventores desearon la membrana más delgada posible con un potencial mínimo de rotura.

La perfluorotributilamina (PFC), FC-43, con una densidad de 1,9 g/cm^3 se adquirió de 3M corporation. Aunque otros hidrocarburos perfluorados tienen solubilidades de oxígeno más altas, el FC-43 se eligió más por su estabilidad química y propiedades no reactivas (punto de ebullición alto, baja presión de vaporización), haciéndolo más susceptible de mezclarse en la silicona.

Se pesó silicona en un tubo cónico estéril de 50 ml utilizando la densidad para obtener un volumen dado de silicona. Por ejemplo, cuando se deseaban 10 ml de silicona, se añadieron 11 g de silicona a los 50 ml cónicos (10 x 1,1 g/cm^3). A la silicona, se añadió una fracción dada de FC-43 (10% ó 20% v/v) de la misma manera. Por ejemplo, para obtener una concentración de PFC al 10% v/v en los 10 ml de silicona anteriores, se añadirían 1,9 g de FC-43.

Debido a la extrema densidad de los compuestos perfluorocarbonados, son virtualmente inmiscibles con todos los compuestos menos densos. Cuando se mezclan con otro componente, forman inmediatamente un sistema de dos capas con la otra sustancia. Con el fin de obtener una suspensión homogénea del PFC dentro de otros líquidos o componentes menos densos, se requiere sonicación o emulsificación a alta presión. El resultado final de estos procesos es una suspensión de partículas de micelas de perfluorocarbono de dimensiones de micrómetros a nanométricas. Sin embargo, con el tiempo, las micelas a menudo comienzan a unirse en gotitas más grandes, un fenómeno conocido como maduración de Oswaldt. Esto es sólo característico de las emulsiones en líquidos no viscosos, y en la experiencia previa de los inventores con soluciones de polímero gelificado, no se observó. La ventaja de usar hidrogeles semi-sólidos o compuestos tales como silicona, es que tienen la capacidad de atrapar las gotitas de PFC dentro de sus matrices que previenen o reducen en gran medida la coalescencia de gotitas.

Las mezclas de PFC/Silicona de dos capas se sonicaron usando un sonicador de sonda Virsonic 200 durante 20 segundos de impulsos, con intervalos de enfriamiento de un minuto entre los dos, para un tiempo de sonicación total de tres minutos a 40 W. La mezcla se enfrió continuamente en una suspensión de baño de hielo. El resultado final de la sonicación fue una mezcla blanca, opaca y homogénea. Una vez sonicada, no se observó más separación de fase del FC-43 y la silicona. En este punto, se añadió una alícuota al 10% v/v del catalizador de vulcanización a la mezcla y se agitó en vórtice dentro de la suspensión para obtener una distribución homogénea.

A continuación, la mezcla completa se colocó en una cámara de vacío para extraer todas las burbujas de gas de la mezcla. Según las burbujas eran extraídas a la superficie, el vacío se interrumpía regularmente para hacer a las burbujas a estallar. La desgasificación total duró aproximadamente 45 minutos. El resultado final fue una suspensión lisa y opaca libre de bolsas de gas que de otro modo afectarían la integridad de la silicona.

Las membranas de Teflon se retiraron entonces de la superficie inferior de los insertos Millipore CM usando fórceps microquirúrgicos estériles. Se colocó Parafilm cuidadosamente a lo largo de toda la superficie inferior. El parafilm fue tensado sobre los pies del plato y fue fijado alrededor del borde exterior de cada inserto para asegurar un fondo plano y rígido para que la silicona cure.

Después de que se aseguró el Parafilm, se añadió un volumen dado de la mezcla de silicona/PFC a la superficie inferior usando un pipeteador de émbolo especial diseñado especialmente para el pipeteado de precisión de líquidos viscosos. Se añadieron volúmenes específicos para obtener espesores de membrana precisos. Utilizando las dimensiones conocidas de los insertos, se calculó un grosor deseado usando la fórmula para el volumen de un cilindro, $\pi R^2 h$. Se deseaba hacer que las membranas fueran lo más delgadas posibles y tuvieran una probabilidad mínima de fallo de la membrana. Por estas razones, se ensayaron diversas profundidades de membrana. La profundidad de 300 µm se utilizó para proporcionar la optimización de la difusión y la integridad de la membrana. Por lo tanto, el volumen de silicona/PFC añadido a cada fondo de la placa fue $\pi(0{,}5\ cm)^2*(0{,}03\ cm)$ o 23,5 µl.

Tras la adición de la mezcla de silicona/PFC, las placas se giraron lentamente sobre un rotador de tubo modificado para distribuir uniformemente la solución a lo largo de toda la superficie de Parafilm. A temperatura ambiente, el curado con silicona es relativamente lento, permitiendo una posterior sedimentación de la solución una vez que los platos se colocaron en posición vertical. Lo que se observó fue que la silicona después de una manipulación manual/rotación se distribuía más y más uniformemente cuando se colocaba sobre una superficie plana. Una vez que se observó una distribución homogénea, los insertos se colocaron en una estufa a 40ºC y se dejaron curar completamente, lo que ocurrió en 2-3 horas.

Después de que la silicona se hubiese curado completamente, los insertos se retiraron del horno y se dejaron enfriar. A continuación, se retiró cuidadosamente la base de Parafilm, para no romper la membrana de silicona/PFC, dejando un fondo intacto permeable a los gases capaz de contener el líquido y el tejido. Antes del uso, los insertos se esterilizaron por inmersión durante la noche en etanol al 70%, seguido de 30 minutos en etanol al 100%. Inmediatamente antes de añadir el tejido recolectado, se lavaron cinco veces con PBS estéril para eliminar completamente todo el etanol y después se dejaron secar sobre una media lámina estéril en una campana laminar

Ejemplo 2: Modelo matemático

Los brotes pancreáticos se recolectaron y se midieron cuidadosamente usando un retículo graduado en un microscopio invertido. La Tabla 1 describe las mediciones de 18 brotes pancreáticos.

Tabla 1

Dimensiones promedio	anchura μm	longitud μm	
1	375	525	
2	500	525	
3	500	625	
4	550	625	
5	375	500	
6	525	512.5	
7	525	550	
8	437.5	750	
9	250	625	
10	500	500	
11	375	675	
12	625	750	
13	375	750	
14	375	800	
15	437.5	750	
16	625	750	
17	375	750	
18	375	800	
Dimensiones promedio	anchura μm	longitud μm	
promedio	450,0	653,5	551,7
desv st	99,9	111,8	105,8
cv	22,20%	17,11%	19,65%

El modelo matemático se realizó utilizando una elipse con las dimensiones anteriores para todas las condiciones suponiendo que la tercera dimensión era uniforme a lo largo de todo el brote. La tasa de consumo de oxígeno de los brotes se determinó mediante el uso de un sistema de cámara de microlitros agitado de Instech, Inc. Brevemente, se colocaron tres brotes en una cámara que contenía 400 μl de medio de cultivo convencional sin bicarbonato. La cámara se precalibró a concentraciones de oxígeno en aire ambiente en medio y cero, usando $NaSO_3$ suspendido en agua destilada. En todo momento la temperatura se mantuvo dentro del sistema a 37,5ºC ± 0,05ºC por medio de una cámara de titanio de baño de agua. Después de que las células y el medio se añadieran a la cámara, se selló por medio de una tapa de vidrio biselado que extruía las burbujas de aire y el exceso de medio a través de un orificio lateral y se llevó el volumen final a 250 μl. El software espectroscópico monitorizó y registró la presión parcial de oxígeno cada segundo a lo largo de la duración de la medición. Los perfiles de oxígeno se analizaron a partir de presiones parciales inferiores a 140 mmHg, cuando el sistema se había estabilizado térmicamente, hasta un punto de linealidad adecuada, usualmente alrededor de 70-80 mmHg.

La pendiente se convirtió de mmHg a μM mediante el uso de un factor de conversión (210/158,8). A continuación, la pendiente convertida en μM se convirtió en micromoles de oxígeno consumidos multiplicando por el volumen de la cámara. Este valor se dividió por 60 para convertir el consumo por minuto en consumo por segundo, y finalmente, la cantidad total fue dividida por el volumen de todos los brotes utilizados, en m^3 de tejido, para obtener una tasa de consumo final en $mol/m^3\backslash s^{-1}$. Esto se realizó en cada lote individual de brotes que fueron cosechados y lo que se

observó fue que la tasa de consumo era muy consistente independientemente de la cosecha. La Tabla 2 muestra las tasas de consumo individual y el promedio utilizado en el modelado matemático.

Tabla 2

OCR de BUD	mol/m^3 s
Experimento 2	
	OCR
1	8,35E-03
2	9,68E-03
Experimento 3	
1	8,57E-03
2	7,97E-03
Experimento 4	
1	9,53E-03
Media	8,82E-03
dev st.	7,49E-04
cv	8,50%

Las condiciones de cultivo fueron modeladas utilizando el software de modelado de elementos finitos Comsol Multiphysics 3.2. Las condiciones de cultivo convencionales se modelaron con los siguientes parámetros. Se supuso que la concentración inicial de oxígeno era de 0,1995 mol/m^3, basada en las condiciones convencionales de cultivo de 95% RA/5% CO_2. La difusividad de oxígeno a través del medio se tomó como la del oxígeno a través del agua a 37ºC, 3,3 E-09 m^2/s. La difusividad del oxígeno a través del tejido también se tomó de la media de los valores informados en la bibliografía, 1,3E-09 m^2/s. La tasa de consumo de oxígeno se consideró de primer orden con un valor de Km de 5,81E-04 mol/m^3, también basado en los valores de la bibliografía para el consumo de oxígeno endocrino y fue modelado como Rm*(c/(c+Km), basado en la cinética de Michaelis-Menten. El valor Rm utilizado fue el valor medio mostrado anteriormente en la tabla de 8,82E-03 mol/m^3 de tejido. Las condiciones de contorno utilizadas fueron la concentración inicial a lo largo de la superficie superior del medio de cultivo de una altura de 2,65 mm y 3,15 mm en las placas de silicona PFC y tanto la concentración de oxígeno con un coeficiente de difusión en el medio sobre la superficie inferior del plato, como la difusión efectiva de oxígeno en el caso de los platos de pfc/silicona.

El cultivo se modeló con dos y tres brotes en un plato, agrupados juntos, como se observó, y se mantuvieron separados. Los perfiles de oxígeno se determinaron a través de las distancias dimensionales para cada brote. Se calculó el porcentaje de tejido anóxico como tejido donde la concentración de oxígeno en equilibrio fue menor que el valor Km, 5,81E-04 mol/m^3 de la tasa de consumo de oxígeno, nuevamente tomado de los supuestos de la bibliografía. La Tabla 3 resume los cálculos de tejido anóxico para todas las condiciones de cultivo, suponiendo o bien dos brotes o tres brotes por plato de 1 cm.

Tabla 3

CONDICIONES DE CULTIVO	ANOXICO %	O2 mínimo
2 brotes característicos de cultivo convencional	59%	
2 brotes característicos de cultivo con alta concentración de oxígeno	30%	
2 brotes característicos de cultivo de pfc silicona	0%	0,083
2 brotes separados de cultivo convencional	33%	

2 brotes separados de cultivo con alta concentración de oxígeno	11%	
2 brotes separados de cultivo de pfc silicona	0%	0,134
3 brotes característicos de cultivo convencional	68%	
3 brotes característicos de cultivo con alta concentración de oxígeno	41%	
3 brotes característicos de cultivo de pfc silicona	0%	0,038
3 brotes separados de cultivo convencional	43%	
3 brotes separados de cultivo con alta concentración de oxígeno	24%	
3 brotes separados de cultivo de pfc silicona	0%	0,12

El modelado adicional demostró que el PFC Silicona también tiene una ventaja en comparación con las plataformas de cultivo compuestas únicamente de silicona. En el caso de los brotes pancreáticos, la diferencia media en la concentración de oxígeno fue un aumento de 0,012 moles/m^3 de concentración de oxígeno localizada en las placas de PFC/Silicona en comparación con la Silicona, sola. Esto es extremadamente importante, ya que los inventores han observado que incluso pequeñas diferencias en la concentración de oxígeno pueden afectar drásticamente el aumento del pliegue relativo de la expresión del gen marcador endocrino durante el cultivo del tejido embrionario. Con base en esta información de modelado, se realizaron experimentos para evaluar los efectos sobre la diferenciación del aumento del oxígeno. El diseño experimental y los resultados se detallan en el siguiente ejemplo.

Ejemplo 3: Estudios de transferencia de oxígeno

El propósito de estos estudios fue evaluar las características representativas de transferencia de oxígeno de los sistemas PFC/Silicona en relación con la silicona sola y los sistemas convencionales de cultivo de plástico, donde el oxígeno procede principalmente de la superficie apical.

Uso de sensores ópticos de oxígeno basados en la decaimiento de fluorescencia para medir la transferencia de oxígeno: Materiales: Platos de 2,4 cm de silicona PFC, silicona y plástico.

Para la medición de la concentración de oxígeno se utilizaron sensores de oxígeno de punto ópticos de película delgada (PreSens Inc, Alemania y WPI Inc, Sarasota, Fla.). Estos sensores tienen aproximadamente 5 mm de diámetro y 50 µm de espesor. Estos sensores están generalmente sujetos dentro de un sistema de cultivo sobre una superficie plana y un cable de detección de fibra óptica se fija de forma no invasiva al exterior de la plataforma de cultivo, valores de fluorescencia (intensidad y ángulo de fase) a un detector y paquete de software para análisis. Los sensores se basan en la caída de la fluorescencia con el tiempo (fluorescencia de por vida) y están construidos de fluoróforos sensibles al oxígeno con características de fluorescencia inversamente proporcionales a la cantidad de oxígeno presente. Los sensores son increíblemente estables y una vez calibrados pueden ser reutilizados varias veces y esterilizados en autoclave, según sea necesario. La deriva es mínima y puede ser fácilmente contrarrestada por una calibración puntual a una temperatura conocida y presión parcial del aire ambiente. La imagen a continuación detalla el conjunto de sensor/fibra para la medición: Los sensores de punto se fijaron a la parte central inferior de los insertos de PFC/Silicona (10% v/v FC-70, FC-43), silicona y plástico (poliestireno) de 2,4 cm silicona de curado rápido. Los conectores SMA se pegaron en el fondo exterior de las placas de 6 pocillos alineadas de tal manera que la superficie fluorescente del sensor estaba al ras con la salida óptica del conector SMA.

Después de que el pegamento se había endurecido, se aseguraron los cables de transmisión de fibra óptica en los conectores SMA y se probó la transmisión de señal para asegurar que la señal fluorescente pudiera pasar a través de la silicona, PFC/silicona y plástico con suficiente intensidad para ser analizada. La distancia de separación de varios milímetros entre la sonda de fibra óptica y los sensores de punto no generó lecturas de artefactual ni problemas de intensidad de señal.

La placa de pocillo se colocó entonces en una incubadora de 5% de CO_2 estándar a 37ºC y se añadieron 1,8 ml de ddH_2O a cada plato. A continuación, se cubrió la placa del pocillo y se dejó equilibrar el sistema mientras se monitorizaba durante aproximadamente 1 hora. Cuando el sistema había alcanzado el equilibrio y estaba leyendo cerca de la presión parcial de oxígeno esperada de 142 mmHg, se inició la grabación del software durante una lectura de referencia de 10 minutos. Al final de la lectura de referencia de 10 minutos, se añadieron 18 µl de una solución de sulfito de sodio 1M recién preparada y precalentada a cada pocillo mediante un pipeteo inicial y después una mezcla completa mediante un pipeteado adicional.

El sulfito sódico es un sistema bien establecido y utilizado para la eliminación del oxígeno. En equilibrio, el agua contendrá aproximadamente 192 µM de oxígeno disuelto, que es mucho menor que la concentración final de 10 mM de sulfito de sodio tras la adición de la reserva de 1M. Por lo tanto, existe un consumo rápido y extremo de oxígeno que excede con mucho cualquier tipo de célula en cultivo y por lo tanto, puede utilizarse como un "peor escenario" de control para cualquier sistema. El volumen de agua (1,8 ml) elegido para su uso era asegurar una altura media suficiente (4 mm) de manera que la mayor parte de la transferencia de oxígeno medida por el sensor en los sistemas de membrana se debiera a la difusión a través de la membrana ya que los gradientes de la superficie apical a la basal eran grandes y les tomaría algún tiempo equilibrarse (L^2/D, donde L es la longitud de la trayectoria de la difusión de la superficie al sensor en centímetros y D es la difusividad del oxígeno en el agua a 37ºC, 3,0E-05 cm^2/s). Los valores de oxígeno se registraron hasta que los sistemas regresaron a por lo menos el 95% del valor basal. Las comparaciones de transferencia de oxígeno se hicieron utilizando la pendiente durante el retorno a la línea de base O_2 y el tiempo a la mitad de la concentración máxima de oxígeno T en: (concentración máxima-concentración mínima)/2. Estos estudios se realizaron después del período de curado de 24 horas después de la fabricación, para minimizar la pérdida debido a la volatilidad de PFC.

Resultados: La figura 3 detalla los resultados de la comparación de todos los tipos de platos 24 horas después de la fabricación. La figura muestra curvas medias representativas de las repeticiones de cada grupo. No se muestran barras de error, pero las diferencias entre las plataformas PFC/Silicona frente a la silicona sola y frente al poliestireno fueron altamente significativas a favor de las plataformas PFC/Silicona (P <0,01 frente a la silicona sola y el poliestireno para el tiempo a la mitad de la concentración máxima y la velocidad de la pendiente de reoxigenación). Las diferencias entre las plataformas FC-70 frente a las plataformas FC-43 no fueron estadísticamente significativas, aunque hubo una tendencia que favoreció al FC-70 con respecto al FC-43 tanto para la tasa de reoxigenación como para el tiempo hasta la mitad de concentración máxima. Claramente, las plataformas PFC/Silicona ofrecen una mejora sustancial tanto en la placa de silicona como en las placas de poliestireno en términos de capacidades de transferencia de oxígeno.

Actualmente, se están llevando a cabo experimentos para estudiar las tasas de transferencia a lo largo del tiempo junto con la pérdida observada de PFC debido a la volatilidad. Adicionalmente, los experimentos se realizarán usando alturas de medios más bajas para simular mejor el cultivo celular y se están generando modelos matemáticos para describir las observaciones de cultivo y para usarlas en la optimización posterior del sistema.

Ejemplo 4: Optimización del proceso de fabricación

Importante para el desarrollo de las plataformas de cultivo de PFC/Silicona es la capacidad de fabricar lotes individuales de platos con variación mínima. Cada variable de fabricación se examinó cuidadosamente para desarrollar un método óptimo para generar suspensiones micelares homogéneamente reproducibles del perfluorocarbono dentro de la silicona y la mezcla de catalizador asegurando concentraciones uniformes de perfluorocarbono a través de la matriz de membrana antes del proceso de curado.

Métodos.

Fabricación de PFC/Silicona: Después de la manipulación de variables componentes y ajustes de procesamiento, así como estudios de la estabilidad del PFC para determinar las propiedades de volatilidad y las características óptimas de transferencia, se formuló un protocolo de fabricación óptimo. Los pasos detallan el protocolo. En este ejemplo, se fabrican 10 ml de PFC al 10% v/v, 20% de la composición de membrana del catalizador y se generan insertos de transpocillo de 2,4 cm a partir de la solución de PFC/Silicona.

Materiales: RTV615-A GE Silicona, catalizador RTV615-B para RTV615-A, y 3M Inc. FC-70 Fluorinert líquido.

Verter un exceso de silicona en un tubo cónico de 50 ml. Centrifugar la silicona durante 5 minutos a aproximadamente 1000 g con un tubo de contrapeso lleno de agua. Esto es para desgasear la silicona. Pesar un tubo cónico de 50 ml (sin tapa) en un soporte de tubo cónico y registrar el peso. Tener cuidado de no introducir burbujas de aire en la silicona, pipetear 7 ml de la silicona en el tubo cónico pesado de 50 ml. Es necesario utilizar una pipeta de émbolo común para la transferencia de soluciones viscosas ya que una pipeta convencional no extruirá un volumen exacto ya que la mayor parte de la silicona se adherirá a las paredes de la punta de la pipeta. Para asegurar que se han añadido 7 ml de la solución al tubo, se pesa de nuevo el tubo y se resta el peso inicial. Esto dará el peso de la silicona sola. Dividir este número por la densidad de la silicona y esto dará el volumen de silicona añadido. Por ejemplo, la densidad de la silicona es 1,013 g/mL y por lo tanto, 7 ml deben producir un peso de 7,091 g. Preparar una lechada de hielo en un cubo mezclando 1/2 cubo de hielo con 1/2 de agua fría. En una campana, colocar los 50 ml cónicos que contienen la silicona sostenida con un soporte de anillo y una abrazadera tal que todo el volumen de silicona se sumerja en la suspensión de hielo. Colocar la punta de la sonda del sonicador de 3/16" (VirTis 390910 para Virsonic 100), sostenida sobre el soporte del anillo con otra pinza en la silicona, colocar la punta 1/8" del fondo del tubo cónico. Se debe tener cuidado para asegurarse que la punta del sonicador no toque ninguna parte del tubo cónico y permanezca centrada en el fondo. Comenzar a sonicar la solución a 25-30 W (ajuste 16 en el sonicador VirSonic 100). La silicona hará que el sonicador suene como si no esté sintonizado, pero proceda añadiendo 1 mL del FC-70 con una pipeta de émbolo. Trate de poner la punta de la pipeta tan cerca de la sonda como sea posible. Esto asegurará que el PFC comience a mezclarse al introducirlo en la silicona. Como el PFC es

mucho más denso que la silicona (ρ = 1,9243 g/mL), se hundirá rápidamente al fondo del tubo. Dejar de sonicar después de 30 segundos y dejar que la solución se enfríe en el baño de hielo durante 30 segundos. Repetir este paso dos veces adicionales para un total de 3 sonicaciones. Después de la sonicación 3ª, no permitir que la muestra se enfríe durante 30 segundos. En lugar de permitir que la solución se enfríe durante los últimos 30 segundos, levantar la punta de la sonda de la solución, que ahora debe comenzar a parecer blanquecina y opaca, permitir que el exceso gotee de nuevo en la cónica y, a continuación, retirar el tubo cónico de la abrazadera colocando el tapón en la cónica. Agitar con vórtice la solución durante 1 minuto en el ajuste más alto. Devolver la mezcla a la suspensión de hielo, retirar la tapa y colocar la punta de la sonda del sonicador en la posición anterior en la mezcla. Si la suspensión de hielo se está calentando y el hielo está desapareciendo en cualquier paso, reemplazar la suspensión con las cantidades descritas anteriormente. Dejar enfriar la solución durante 1 minuto. Sonicar la solución como antes, 30 segundos de pulso y 30 segundos de enfriamiento, por 3 veces más (ahora 6 ciclos totales). Levantar la punta de la sonda, permitir que el exceso vuelva a caer en la mezcla y luego extraer la mezcla de la abrazadera y la suspensión. Colocar la tapa en el tubo y apretar firmemente. Centrifugar a 1000 g durante 5 minutos con el tubo de equilibrio en su lugar (esto es para eliminar las burbujas de aire y evaluar si no se mezcla PFC). Retirar la mezcla de la centrífuga, retirar la tapa del tubo cónico y agregar 2 ml de solución de catalizador a la mezcla. Agitar en el catalizador completamente con una espátula estéril. Retirar la espátula de la mezcla que raspa el exceso de solución en el tubo. Volver a colocar la tapa del tubo y apretar firmemente. Agitar con un vórtice la solución durante 1 minuto, como arriba. Centrifugar la solución hasta el tiempo final, como arriba.

El resultado general de este procesamiento es una suspensión micelar homogénea, opaca y viscosa. Estos protocolos producen una suspensión libre de separación de fase. A menudo, hay una capa muy fina y más transparente cerca de la parte superior de la mezcla que es probablemente debido a la incapacidad del sonicador para forzar la mezcla completamente a la parte superior. Por esta razón generalmente se tomaron alícuotas para la fabricación de la plataforma a partir de la región central de la mezcla (en la dirección vertical) cuando se observó la uniformidad más reproducible en esta porción. Los siguientes experimentos utilizarán el flujo a través de sonicadores que mezclarán continuamente los volúmenes juntos durante el procesamiento.

Fabricación de platos: Soportes transpocillos permeables de 2,4 cm de Corning (para placa de 6 pocillos), parafilm, bisturí para la eliminación de la membrana.

Retirar el número deseado de insertos de transpocillos del embalaje estéril. Utilizando el bisturí, cortar con cuidado a través del fondo de la membrana de policarbonato y retirar la membrana completamente del marco plástico del inserto. Colocar un cuadrado de parafilm lo suficientemente grande como para cubrir el fondo del inserto y tirar tenso a lo largo del marco del inserto con cuidado para no arrugar el parafilm. Esto servirá como una plataforma temporal en la que el PFC/Silicona curará. El volumen añadido a cada plato se determina por el espesor de membrana deseado calculado usando la siguiente fórmula:

$$V = \pi r^2 m\ T_d \qquad (1)$$

donde V es el volumen añadido, r es el radio de la plataforma de cultivo y T_d es el espesor deseado de la membrana. El espesor típico de la membrana que utilizamos para asegurar una distribución uniforme a través de la superficie de la plataforma con una variación mínima es de 650 µm, aunque utilizando otros métodos de fabricación (moldeo por compresión) se es capaz de generar membranas más uniformes y más delgadas. Con un espesor de membrana de 650 µm, el volumen necesario de la mezcla de PFC/Silicona es de 295 µl. Si se utilizan las placas para estudios de volatilidad o determinaciones de homogeneidad, véanse las instrucciones a continuación, si no, pipetéese cuidadosamente, usando la pipeta de émbolo, 295 µl de la composición PFC/Silicona en el centro de cada plato. Se debe tener cuidado de evitar la introducción de burbujas de aire en la mezcla y asegurarse de que la punta de la pipeta se llena completamente cuando se aspira la mezcla. Al expulsar el volumen, téngase cuidado de asegurarse de que toda la mezcla se extruye eliminando la última gotita tocando la punta de la pipeta en la superficie del parafilm. La mezcla se extenderá uniformemente a través de la superficie del parafilm con el tiempo, pero si las regiones del parafilm permanecen descubiertas, manténgase el plato a 90º con la región descubierta en una orientación basal de modo que la mezcla fluya hacia abajo y cubra el parafilm. Gírese el plato según sea necesario para asegurar un recubrimiento uniforme. Colóquense los platos en placas de 6 pocillos y cubra con la tapa de la placa. Poner en la incubadora a 37ºC para curar durante la noche. Después de un período de noche, tocar con una punta de pipeta la superficie de varias superficies de membrana de plato para ver que el curado ha llegado a su finalización (debe ser flexible y resistente, no pegajoso o pegajoso). Pelar el parafilm cuidadosamente fuera de cada fondo del plato. La membrana puede estirarse a medida que el parafilm se separa, pero deben separarse sin rasgarse ni romperse. En este punto los platos están listos para su uso.

Determinación de la homogeneidad: Para cada lote de platos fabricados, se utilizaron mediciones gravimétricas para determinar el porcentaje en volumen de PFC en cada plato individual fabricado con respecto al ideal calculado a partir de las adiciones en volumen conocidas de cada componente de la matriz. Como ejemplo, se describen a continuación la fabricación de platos compuestos por PFC (FC-70) al 10% v/v, catalizador al 20% v/v y silicona al 70% v/v: Se fabrica un volumen inicial de PFC/Silicona como anteriormente. Asumiendo un volumen inicial de 110 ml de material de membrana, el peso ideal de la mezcla en cualquier plato individual sería igual a:

$$V_{\text{mezcla (ml)}} \times (0{,}7 \times \rho_{\text{silicona}} + 0{,}2 \times \rho_{\text{catalizador}} + 0{,}1 \times \rho_{\text{PFC}}) \qquad (2)$$

En un plato que contenía 295 µl de la mezcla mencionada al 10% (inserto de cultivo circular de 2,4 cm de diámetro), el peso ideal sería: 0,295 x (0,7 x 1,0132 + 0,2 x 0,9918 + 0,1 x 1,9243) o 0,3245 g. A medida que se fabrica cada plato, se registra el peso de cada plato individual/marco parafilm y, a continuación, se registra el peso de cada plato/marco parafilm con el PFC/Silicona de 295 µl. A partir de este peso, en relación con el peso ideal, se calcula el volumen de PFC en cada plato. Los promedios, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación se tabulan para cada lote.

Resultados: La producción temprana de lotes y la fabricación de la mezcla dieron lugar a incorporaciones de porcentaje de volumen más variable. Variables importantes como la temperatura, la potencia de sonicación, el tiempo de sonicación y las repeticiones de sonicación se encontraron como los más importantes en la reproducibilidad. La técnica de pipeteado al aplicar la mezcla al marco también resultó ser muy importante. Los primeros lotes presentaron coeficientes de variación del 7 al 15%, pero el protocolo de fabricación anterior ha dado como resultado una reproducibilidad mucho mejor con coeficientes de variación <1%.

En las Tablas 8-10 se detallan las mediciones tomadas en un lote de PFC al 13,82% v/v, PFC al 10% v/v y platos PFC al 5% v/v después de la fabricación.

Tabla 8

Plataformas de cultivo de PFC de 13,82% v/v

Plato 295uL PFC Si 13.82%	Tiempo 0 peso plato + parafilm	plato + parafilm + PFCSi	PFC Si solo	pPFC Si solo	volumen PFC por 295 µl	PFC peso por 295 µl	volumen % PFC
IDEAL (perf. homogéneo)			0.335	1.1366	40.77	0.0785	13.82%
A1	2.9699	2.9029	0.333	1.12861	40.53	0.0780	13.74%
A2	2.9837	2.922	0.3383	1.14676	41.17	0.0792	13.96%
A3	2.9725	2.9099	0.3374	1.14373	41.06	0.0790	13.92%
A4	2.9661	2.9042	0.3381	1.14610	41.15	0.0792	13.95%
A5	2.9565	2.8892	0.3337	1.13119	40.61	0.0781	13.77%
A6	2.9628	2.9019	0.3391	1.14949	41.27	0.0794	13.99%
B1	2.9885	2.9043	0.3378	1.1451	41.11	0.0791	13.94%
B2	2.9346	2.8736	0.3388	1.1485	41.23	0.0793	13.98%
B3	2.9831	2.887	0.3339	1.1319	40.64	0.0782	13.77%
B4	2.9781	2.9093	0.3312	1.1227	40.31	0.0775	13.66%
B5	2.9782	2.912	0.3338	1.1318	40.62	0.0782	13.77%
B6	2.9584	2.8947	0.3363	1.1400	40.93	0.0788	13.87%
MEDIA					40.89	0.0787	13.86%
DE					0.33	0.0006	0.11%
CV					1%	1%	0.80%

Tabla 9

Plataformas de cultivo de PFC al 10% v/v

Plato 295uL PFC SI 10%	Tiempo 0 peso plato + parafilm	plato + parafilm + PFCSi	PFC Si solo	pPFC Si solo	volumen PFC por 295 µl	PFC peso por 295 µl	volumen % PFC
IDEAL (perf. homogéneo)			0.3245	1.09989	29.5	0.0568	10.00%
A1	2.5549	2.8749	0.3200	1.08475	29.1	0.0560	9.86%
A2	2.5748	2.8977	0.3229	1.09458	29.4	0.0565	9.95%
A3	2.5497	2.8734	0.3237	1.09729	29.4	0.0566	9.98%
A4	2.558	2.8818	0.3238	1.09763	29.4	0.0566	9.98%
A5	2.5994	2.9233	0.3239	1.09797	29.4	0.0567	9.98%
A6	2.5533	2.8766	0.3253	1.10271	29.6	0.0569	10.02%
B1	2.5638	2.8874	0.3236	1.09695	29.4	0.0566	9.97%
B2	2.5521	2.8763	0.3242	1.09899	29.5	0.0567	9.99%
B3	2.5745	2.8983	0.3238	1.09763	29.4	0.0566	9.98%
B4	2.565	2.8885	0.3235	1.09661	29.4	0.0566	9.97%
B5	2.5649	2.8907	0.3258	1.10441	29.6	0.0570	10.04%
B6	2.567	2.8911	0.3241	1.09864	29.5	0.0567	9.99%
C1	2.5336	2.8589	0.3253	1.10271	29.6	0.0569	10.02%
C2	2.5447	2.8681	0.3234	1.09627	29.4	0.0566	9.97%
C3	2.5277	2.8520	0.3243	1.09932	29.5	0.0567	9.99%
C4	2.5451	2.8699	0.3248	1.10102	29.5	0.0568	10.01%
C5	2.5421	2.8680	0.3239	1.09797	29.4	0.0567	9.98%
C6	2.5721	2.8943	0.3222	1.09220	29.3	0.0564	9.93%
D1	2.5207	2.8445	0.3238	1.09763	29.4	0.0566	9.98%
D2	2.5675	2.8926	0.3251	1.10203	29.5	0.0569	10.02%
D3	2.5729	2.8968	0.3239	1.09797	29.4	0.0567	9.98%
D4	2.547	2.8713	0.3243	1.09932	29.5	0.0567	9.99%
D5	2.5514	2.8757	0.3243	1.09932	29.5	0.0567	9.99%
D6	2.5406	2.8653	0.3247	1.10068	29.5	0.0568	10.01%
MEDIA			0.3239		29.45	0.0567	9.98%
DE			0.0012		0.1050	0.0002	0.04%
CV			0.36%		0.36%	0.36%	0.36%

TABLA 10 Plataformas de cultivo de PFC al 5% v/v

5% 295uL PFC SI	peso plato + parafilm	plato + parafilm + PFCSi	PFC Si solo	pPFC Si solo	PFC por 295 µl	por 295 µl	PFC
IDEAL (perf. homogéneo)			0.312	1.056	14.86	0.0286	5.04%
C1	2.5631	2.8658	0.3037	1.029491525	14.49	0.0279	4.91%
C2	2.5855	2.8927	0.3072	1.041355932	14.65	0.0282	4.97%
C3	2.61	2.9222	0.3122	1.058305085	14.89	0.0287	5.05%
C4	2.5636	2.874	0.3104	1.05220339	14.80	0.0285	5.02%
C5	2.5472	2.8567	0.3095	1.049152542	14.76	0.0284	5.00%
C6	2.5624	2.8631	0.3107	1.053220339	14.82	0.0285	5.02%
D1	2.5702	2.882	0.3118	1.056949153	14.87	0.0286	5.04%
D2	2.5524	2.863	0.3106	1.052881356	14.81	0.0285	5.02%
D3	2.5462	2.8581	0.3119	1.057288136	14.88	0.0286	5.04%
D4	2.5559	2.8682	0.3123	1.058644068	14.90	0.0287	5.05%
D5	2.5524	2.8644	0.312	1.057627119	14.88	0.0286	5.04%
D6	2.5696	2.8815	0.3119	1.057288136	14.88	0.0286	5.04%
E2	2.5486	2.8606	0.312	1.057627119	14.88	0.0286	5.04%
E3	2.5594	2.8713	0.3119	1.057288136	14.88	0.0286	5.04%
E4	2.5693	2.88	0.3107	1.053220339	14.82	0.0285	5.02%
E5	2.5539	2.875	0.3111	1.054576271	14.84	0.0286	5.03%
MEDIA					14.82	0.03	5.022%
DE					0.11	0.0002	0.0365%
CV					0.727%	0.727%	0.727%

Discusión: Las plataformas de lotes anteriores exhiben la baja variación observada utilizando el actual protocolo de fabricación independientemente del v/v% de perfluorocarbono añadido a la matriz. Es evidente que estos datos demuestran que la fabricación de este material se presta a protocolos de producción en masa y puede ampliarse fácilmente con un sistema automatizado.

Ejemplo 5: Estudios de Volatilidad de PFC-Determinación de perfluorocarbono óptimo

El componente más importante de las plataformas de cultivo en relación con el aumento de la transferencia de oxígeno es el perfluorocarbono utilizado. Los perfluorocarbonos son líquidos extremadamente densos y químicamente inertes que tienen una alta solubilidad para el oxígeno y, además, tienen características de transferencia de oxígeno similares, a menudo superiores a la hemoglobina (lineal frente a las curvas de unión/liberación). Sin embargo, los perfluorocarbonos también son típicamente volátiles, vaporizándose a temperaturas y presiones normalizadas. La velocidad de vaporización depende del punto de ebullición y de la presión de vapor de los PFC individuales y adicionalmente de la temperatura. La presión de vapor es una indicación de la tasa de evaporación del líquido. Se refiere a la tendencia de moléculas y átomos a escapar de un líquido o un sólido. Una sustancia con una alta presión de vapor a temperaturas normales se refiere a menudo como a un volátil. Cuanto mayor sea la presión de vapor de un material a una temperatura dada, menor será el punto de ebullición.

La presión de vapor de cualquier sustancia aumenta no linealmente con la temperatura según la relación de Clausius-Clapeyron:

$$\frac{dP}{dT} = \frac{L}{T\Delta V}$$

donde P es la presión, T es la temperatura, L es el calor latente de la sustancia y ΔV es el cambio de volumen de la transición de fase de líquido a gas. A medida que la temperatura aumenta, la presión de vapor también aumenta y, por lo tanto, la volatilidad también aumenta. Los inventores hemos probado un PFC de grado clínico, perfluorodecalina, y dos perfluorocarbonos utilizados en emulsiones de sangre artificial FC-43 y FC-70, caracterizados por bajas presiones de vapor y altos puntos de ebullición.

Determinación de la volatilidad de PFC: Efecto de la temperatura, del punto de ebullición y de la presión de vapor:

Materiales: Perfluorodecalina, FC-43, FC-70 líquido Fluorinert y placas de Petri de 35 mm.

Para estos estudios, una placa de Petri de 35 mm fue marcada y pesada vacía con la tapa. A continuación, se añadió 1 ml de PFC a cada plato por cada PFC anterior en cuadruplicado y se pesó con la tapa. Se registraron los pesos iniciales del plato y plato + PFC. La diferencia se registró como el peso de T0 PFC. Como se utilizó 1 mL para todas las mediciones, el porcentaje de pérdida de volumen se determinó posteriormente mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta\%V = (\Delta peso \quad / T_0 peso \quad) \times 1mL$$

A continuación, los platos se almacenaron durante la noche a diversas temperaturas (50ºC, 37ºC y 25ºC).

De los tres perfluorocarbonos probados, la perfluorodecalina tiene el punto de ebullición más bajo y la presión de vapor más alta y por lo tanto, se esperaba que tuviera la tasa más alta de vaporización. Después de 24 horas, toda la perfluorodecalina se había evaporado en las condiciones de 50ºC y 37ºC con aproximadamente un 5% de volumen restante a temperatura ambiente. Como se esperaba de las propiedades de perfluorocarbono, el FC-70 con un punto de ebullición más alto (215ºC vs. 174° C) y una presión de vapor más baja (0,1125 mmHg vs. 1,44 mmHg) tuvo el menor porcentaje de pérdida en volumen mientras que el FC-43 fue ligeramente superior en algunas condiciones (50ºC: 0,9% por hora vs. 0,80% por hora) y notablemente mayor en otros (37ºC y 25ºC 0,2% vs. 0,05% a 37ºC y 0,1% frente a 0,01% a 25ºC). Como era de esperar, la pérdida se relacionó directamente con la temperatura, con mayores pérdidas a temperaturas más altas, y también se relacionó con la humedad, ya que los platos en las incubadoras humidificadas experimentaron menos pérdidas que los de la estufa de curado (37ºC). El FC-70 era el PFC óptimo con respecto a la volatilidad. El FC-70 era más estable, más inerte químicamente, tenía datos de seguridad de material similares, y adicionalmente, tenía mayor solubilidad de oxígeno y características de transferencia.

Volatilidad de PFC en plataformas de cultivo de matriz de PFC/Silicona: Estos estudios se realizaron para evaluar la estabilidad del FC-70 dentro de la matriz de silicona durante el curado y el almacenamiento, el efecto de la pérdida en la transferencia de oxígeno y para desarrollar medios de almacenamiento a largo plazo para minimizar la pérdida de PFC. En estos estudios, se fabricaron platos de diferentes porcentajes en volumen FC-70 (5%, 13,86% y 10%). Para cada lote de platos fabricados, se utilizaron mediciones gravimétricas para determinar el porcentaje en volumen de PFC en cada plato individual fabricado con respecto al ideal calculado a partir de las adiciones en volumen conocidas de cada componente de la matriz.

Como ejemplo, se describen a continuación la fabricación de platos compuestos por PFC (FC-70) al 10% v/v, catalizador al 20% v/v y silicona al 70% v/v: Se fabrica un volumen inicial de PFC/Silicona como anteriormente.

Asumiendo un volumen inicial de 10 ml de material de membrana, el peso ideal de la mezcla en cualquier plato individual sería igual a:

$$V_{mezcla\ (ml)} \times (0{,}7 \times \rho_{silicona} + 0{,}2 \times \rho_{catalizador} + 0{,}1 \times \rho_{PFC}) \qquad (2)$$

En un plato que contenía 295 µl de la mencionada mezcla al 10% (inserto de cultivo circular de 2,4 cm de diámetro), el peso ideal sería: 0,295 x (0,7 x 1,0132 + 0,2 x 0,9918 + 0,1 x 1,9243) o 0,3245 g. A medida que se fabrica cada plato, se registra el peso de cada plato individual/marco de parafilm y entonces se registra el peso de cada plato/marco de parafilm con el PFC/Silicona de 295 µl. A partir de este peso, en relación con el peso ideal, se calcula el volumen de PFC en cada plato. Los promedios, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación se tabulan para cada lote.

Los platos se rompieron en igual n en base al número total fabricado y almacenado en diversas condiciones después del curado inicial a 37ºC (25ºC, -20ºC, 25ºC con 2 ml de etanol al 70% y 25ºC con 2 ml de medio de cultivo). Estos estudios eran diferentes de los anteriores estudios de volatilidad de PFC, ya que ahora había dos superficies (ambos lados de la membrana expuestas al aire o al medio, no plásticas) y, por tanto, el doble de superficie del que el FC-70 podría evaporarse. Los pesos de los platos se tomaron cada 24 horas y se registraron y del Δ peso, se pudo tabular el porcentaje de pérdida de PFC, ya que los estudios de control anteriores con silicona sola demostraron que toda la pérdida de peso observada durante el curado era debida a la vaporización de PFC y no se observaron cambios de peso en las placas de silicona/catalizador fabricadas de la misma manera.

Resultados: En todos los grupos, hubo una pérdida gradual de PFC en todos los platos que siguieron un patrón no lineal de volatilidad según lo dictado por las características del equilibrio de la presión de vapor. La tasa de pérdida dependía de la concentración inicial en v/v% (mayor concentración, mayor tasa de pérdida), temperatura (mayor temperatura, mayor tasa de pérdida), humedad (no humidificado, mayor pérdida) y volumen de exposición ambiental (al aire libre frente a placa cubierta, mayor pérdida al aire libre). Los platos almacenados a -20ºC tuvieron la tasa de pérdida más baja pero los almacenados a 25ºC con 2 ml de etanol al 70% en una placa cubierta tuvieron diferencias no estadísticamente significativas en la tasa de pérdida. Sin embargo, la utilización del etanol como medio de almacenamiento no se presta al envasado o embalaje, pero es el medio preferido de esterilización de las plataformas antes de su utilización en cultivo en el laboratorio de los inventores.

Discusión: Utilizando las tasas de pérdida y el límite de la mezcla de PFC en la silicona (aproximadamente 20% v/v), los cálculos teóricos muestran que la pérdida total de PFC podría ocurrir en el orden de 54 días. Esto significa que se tendrán que desarrollar diferentes medios de almacenamiento, o bien los platos tendrán que ser utilizados como productos descartables a corto plazo. Los experimentos de transferencia de oxígeno, sin embargo, demostraron que las capacidades de transferencia de oxígeno no fueron muy afectadas por la pérdida a lo largo del tiempo en el corto plazo, de hecho mejoraron. Se están llevando a cabo experimentos en curso para determinar el efecto de otros medios de almacenamiento en paquetes sellados con menos exposición al aire ambiental, reduciendo así la evaporación inducida por equilibrado. Se están llevando a cabo experimentos adicionales para evaluar la pérdida en el ambiente de cultivo humidificado y los efectos de esta pérdida en la transferencia a largo plazo del oxígeno (> 7 días).

Ejemplo 6: La oxigenación mejorada promueve la diferenciación de las células beta in vitro

Los inventores probaron la hipótesis de que un modo más fisiológico del sistema de suministro de O_2 daría lugar a mayores tasas de diferenciación endocrina. Se ha observado una muy importante sobre-regulación de todos los genes de diferenciación pancreática en el grupo experimental en comparación con los controles cultivados en condiciones estándar. Las relaciones de diferenciación endocrina a exocrina y β a α también fueron significativamente mayores, no sólo en comparación con los controles in vitro, sino también con el correspondiente estado de desarrollo in vivo. Mientras que el alto O_2 aumentó la proliferación de tipos de células epiteliales tanto en las plataformas estándar como en PFC/Si, el efecto positivo sobre la diferenciación endocrina sólo se observó en el último. Los posibles mecanismos moleculares subyacentes a estos efectos se discuten en el contexto de la definición de estrategias para mejorar el rendimiento y la funcionalidad de las células β de las células madre y/o progenitoras in vitro.

Materiales y métodos

Fabricación de platos PFC/Si: Para la fabricación de membranas de silicona se utilizaron silicona RTV de grado biomédico/eléctrico (RTV-615A) y el correspondiente catalizador de vulcanización (RTV-615B), ambos con una densidad de 1,1 g/cm^3 (Dow Chemical, Co., Marietta, Ga.). Se utilizó perfluorotributilamina, FC-43, con una densidad de 1,9 g/cm^3 como el resto de oxígeno de perfluorocarbono en las membranas (3M Inc., St. Paul, Minn.). Mezclas de PFC/silicona al 20% se sonicaron durante 3 minutos a 20 W y luego se colocaron en una cámara de vacío (45 minutos) para extraer las burbujas de gas. Las membranas de Teflon se retiraron de los insertos de Millipore CM y el Parafilm™ (Sigma-Aldrich Inc., St-Louis, Mo.) fue cuidadosamente colocado a lo largo de toda la superficie inferior para proporcionar un fondo plano y rígido para que la silicona curara. Se añadieron 35 µl de la mezcla a cada inserto y se curaron a 40ºC durante 2-3 h. El espesor final de las membranas, una vez que el parafilm fue pelado, fue de 450 µm, lo que resultó ser el mejor compromiso entre la optimización de la difusión y la integridad de la membrana.

Ensayos de PCR en tiempo real: Los ensayos utilizados fueron: PCNA (Mm00448100_g1) Carboxipeptidasa A (Mm00465942_m1); Amilasa (Mm02342487_g1); Insulina 1 (Mm01259683_g1); Insulina 2 (Mm00731595_gH); Glucagon (Mm00801712_m1); Ptfla (p48) (Mm00479622_m1); Pdx1 (Mm00435565_ml); Isl-1 (Mm00627860_ml); Ngn3 (Mm00437606_s1); Pax4 (Mm01159035_g1); Glut-2 (Mm00446224_m1); Pax6 (Mm00443072_m1); y Arx (Mm00545903_m1). Los niveles de expresión se normalizaron contra 18S rRNA (Hs99999901_s1).

Análisis Ratiométrico: Además de la cuantificación relativa de los genes individuales, también se examinó la expresión diferencial de genes endocrinos versus exocrinos, así como de genes de células beta vs células alfa en cada grupo (análisis ratiométrico). Primero se calculó el promedio de los pocillos triplicados para el gen numerador y denominador de interés. En este caso, las relaciones génicas se calcularon dentro de los grupos individuales. A partir de los valores medios de los genes (Ct), se sustrajo el valor promedio del gen de limpieza (18S). El número resultante es dCt. A continuación, el promedio de los ciclos del numerador ajustados se restó de los ciclos del denominador ajustados. Finalmente, dado que cada ciclo representa una duplicación del producto de reacción, la diferencia del pliegue se calculó mediante la siguiente fórmula:

Cambio de plegado = 2^{-n}

donde n es igual a la diferencia media de números de ciclos entre los genes numerador y denominador. Una vez que estas proporciones se calcularon para cada combinación de genes en el grupo de control y experimental, respectivamente, se determinó la relación entre el valor experimental y el valor de control. De esta manera, se pudo examinar las diferencias ratiométricas dentro de cada grupo y luego entre los grupos. Un ejemplo ilustrativo del método se proporciona a continuación para una relación de gen A/gen B.

Grupo: PFC/Si

	Ct	18S	dCt(Ct-18S)		
Gen A	20	12	8		
Gen B	30	14	16	8-16 = -8	$2^{-(-8)}$= 256

Por tanto, la relación del gen A con respecto al gen B en el grupo PFC/Si es 256. Cálculos similares resultaron en relaciones de 32 en el control estándar. Se puede concluir, por lo tanto, que la relación del gen A/gen B es 256/32 = 8 veces mayor en el PFC/Si que en el grupo de control estándar.

Consumo de oxigeno: Los brotes pancreáticos se colocaron en un sistema de microcámaras agitado (OCR) de velocidad de consumo de oxígeno, controlado con la temperatura, con sensores de oxígeno ópticos de fibra de rutenio (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, Pa.). Este sistema mide la disminución de la concentración de oxígeno (ΔcO_2) con el tiempo. Las sondas se calibraron utilizando aire ambiente, (210 µM de oxígeno) y sulfito de sodio 100 mM ($NaSO^{3-}$) (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Mo.), que consume todo el oxígeno en el sistema a través de la unión química con el azufre. Esto se realizó utilizando cinco cosechas consecutivas de brotes precursores. Se realizaron duplicaciones de 3 brotes por cámara en tres cosechas y una de 6 brotes en la cuarta y quinta cosecha. Todas las mediciones se realizaron en medio de cultivo completo. El sistema se agitó continuamente, manteniendo así el equilibrio de oxígeno dentro de la cámara. Dado que el volumen de la cámara es conocido, el consumo de oxígeno podía determinarse a partir de la pendiente lineal del ΔcO2. La pendiente (expresada en µM) se multiplicó por el volumen de la cámara (250 µl) para obtener los moles de oxígeno consumido. Este valor, expresado en mol/min, se dividió por 60 para obtener los moles de oxígeno consumido por segundo.

Medidas del oxígeno del microelectrodo polarográfico: Al día siguiente de la cosecha, se utilizaron brotes pancreáticos murinos de las condiciones de cultivo de control y PFC/Si para la medición de gradientes de oxígeno de tejido. 3 brotes pancreáticos de cada grupo se transfirieron a un plato de cultivo de 35 mm, ya sea con un fondo de plástico estándar o con un fondo de matriz de perfluorocarbono-silicona (3,36 ml de medio de cultivo). Cada plato se colocó secuencialmente en una microincubadora (Harvard Apparatus, Boston, Mass.) fijada a la etapa de un microscopio invertido Zeiss, con 3,36 ml de medio de cultivo fresco sin bicarbonato sódico. La microincubadora mantuvo la temperatura a 37ºC durante la duración de las mediciones. En ausencia de bicarbonato, el pH del medio se mantuvo mediante tampón HEPES 25 mM. La evaporación durante las mediciones fue mínima (<2% del volumen total). Los microelectrodos de oxígeno utilizados (Diamond General Inc, Ann Arbor, MI) tenían un diámetro de punta promedio de 8 µm. Cada sonda se sometió a una calibración de dos puntos, primero en nitrógeno disuelto en medio de cultivo (0%) y luego por aire ambiente en el medio de cultivo (20,9%). Las calibraciones se realizaron a 37ºC para mantener la consistencia térmica.

Para cada medición, un brote pancreático individual se fijó a una punta de pipeta de vidrio en un lado de la etapa del microscopio mediante la técnica de la pinza de parche al vacío. Los brotes se dejaron equilibrar durante 105 minutos, que es el tiempo de equilibrado calculado del sistema - el cuadrado de la longitud de la trayectoria de difusión (altura media) dividido por la difusión

Coeficiente de oxígeno a través del medio ($2{,}1E^{-0{,}5}cm^2/s$). El microelectrodo de oxígeno fue fijado al otro lado de la etapa del microscopio en un micromanipulador robótico (Eppendorf) capaz de movimientos de precisión en los planos x, y y z hasta una resolución de 0,2 μm. Todos los datos de electrodo y temperatura se registraron a través de un panel de recopilación de datos analógicos en interfaz con un PC de laboratorio a través de una conexión RS-232. Se utilizó el software de recogida de datos (DASYLab) para transformar las señales analógicas de tensión en lecturas digitales para la evaluación de las concentraciones de oxígeno dentro de los brotes pancreáticos.

Las mediciones de oxígeno se recogieron durante intervalos de dos minutos guiando el electrodo normal a la superficie en el tejido. Se realizó una medida inicial a -250 μm con respecto a la superficie con mediciones internas realizadas a intervalos de 10 μm desde la superficie hasta el núcleo del brote pancreático (aproximadamente 260 μm). Se realizaron tres mediciones individuales por brote y se utilizaron tres brotes por grupo para las mediciones de oxígeno.

Cuantificación de la inmunotinción: Se utilizó el software de imágenes Metamorph® (Molecular Devices Inc., Downington, Pa.) para cuantificar las cantidades relativas de tinción de insulina y glucagón en cada sección. Este paquete de imágenes permite la cuantificación precisa de la señal fluorescente en cualquier sección de tejido biológico. Las áreas positivas se calcularon como porcentajes dividiendo el número de píxeles positivos/sección por el número de píxeles totales/sección. Se calcularon entonces los porcentajes de volumen positivos totales/brote para todas las secciones de cualquier brote dado, de acuerdo con la ecuación:

$$\frac{\sum_{1}^{n} P+}{\sum_{1}^{n} Pt}$$

Donde n es el número de secciones, Pt, es el total de píxeles y P+ es el número de píxeles positivos para cada hormona específica. Los porcentajes medios se calcularon a partir de los valores porcentuales individuales de cada grupo.

Adquisición y cultivo de los tejidos: Los brotes pancreáticos de embriones e9.5-e16.5 CBA × B6 (mediodía del día se encuentra un tapón vaginal se considera 0,5 días de gestación) fueron aislados y microdiseccionados. El medio de cultivo fue GMEM (Invitrogen) suplementado con aminoácidos no esenciales de MEM 0,1 mM (Invitrogen), piruvato de sodio, suero bovino de recién nacido al 5% (v/v), suero fetal de ternera al 5% (v/v), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100 μg/ml) y L-glutamina (250 μM) (Invitrogen). Los controles se colocaron en insertos de Millicell de 12 mm, 0,4 μM (típicamente 2 brotes/inserto) y se incubaron a 37ºC y 5% de CO2, ya sea a 21% o 35% de O_2. Los brotes asignados al grupo experimental se sembraron en insertos de placas de cultivo de PFC/Si (véanse las Figuras 5A-5B) y se incubaron a 37ºC y 5% de CO_2 y 35% de O_2.

Inmunotinción y análisis de imágenes: Los explantes se cultivaron como antes durante 3 días y luego se fijaron con paraformaldehído al 4% (30 minutos), se lavaron con PBS (30 min) y se congelaron en compuesto O.C.T. (Sakura). Los rudimentos pancreáticos se seccionaron en su totalidad (5 μm) y se montaron con DAPI-vectashield (Vector). Se utilizaron anticuerpos anti-insulina de conejo de indias y anticuerpos anti-glucagón de conejo (BioGenex, solución lista para usar) para doble tinción. Se añadió BrdU (Sigma) al medio de cultivo a una concentración final de 10 μM y se mantuvo durante la noche (y se añadió recién preparado cada día) antes de la fijación. Se utilizaron anticuerpos anti-bromodesoxiuridina (BrdU) de rata (dilución exacta 1: 100) y hipoxipropo conjugado con FITC (Chemicon, dilución 1: 100) para la detección de células proliferantes e hipoxia, respectivamente. Se obtuvieron anticuerpos de conejo contra amilasa (1: 200), carboxipeptidasa (1: 200), E-cadherina (1: 100) y Nestin (1: 100) de Santa Cruz, Sigma, Zymed y Covance, respectivamente. Todos los anticuerpos secundarios se adquirieron de Molecular Probes (Invitrogen). Se utilizó el software METAMORPH® para cuantificar la tinción con insulina y glucagón

qRT-PCR a tiempo real. El ARN total se purificó usando kits Qiagen (QIAShredder, RNeasy y libre de ADNasa). El sistema First-Strand (Roche) se utilizó para generar ADNc (oligómeros aleatorios). La expresión génica relativa se calculó usando ensayos de Taqman en un ciclador de PCR Fast Real Time 7500 (Applied Biosystems, ABI). El método ΔCt para la cuantificación relativa se consideró óptimo para esta aplicación. Todos los ensayos (ABI) fueron diseñados para abarcar las uniones exón-exón, eliminando así la posibilidad de contaminación del ADN genómico. Los resultados de qRT-PCR son el promedio de varios experimentos independientes, como se indica en la sección Resultados. Además, en cada experimento cada marcador se analizó por triplicado. Los números de ensayo específicos se proporcionan como información complementaria. La expresión génica se normalizó contra 18S rRNA. Este control endógeno ha sido validado en el sistema de los inventores y ha demostrado ser extremadamente estable y más exacto sobre las concentraciones de O_2 variables que otros estándares.

Análisis estadístico. Los análisis de ANOVA se utilizaron para analizar la varianza entre las medias de los diferentes grupos ($P < 0{,}05$). Cuando se comparan más de dos grupos, las pruebas t de Student emparejadas generalmente resultan en una mayor probabilidad de errores de tipo I (es decir, cuando la hipótesis nula es rechazada aunque sea verdadera), de ahí el uso de ANOVA. Se utilizó un error estándar de los medios (S.E.M) para todos los análisis.

Modelado de difusión de O_2: El modelo teórico de difusión/reacción 3D se realizó sobre permutaciones de sistemas de control y de cultivo experimental utilizando el software de análisis de elementos finitos COMSOL v.3.2. Las soluciones iterativas para perfiles de concentración se determinaron utilizando el solucionador dependiente del tiempo. El modelo permitió a los inventores examinar el efecto de múltiples variables, incluyendo altura media, proximidad de tejido, fracción de volumen de perfluorocarbono y concentración externa de O_2. Los cálculos de los inventores se basaron en los coeficientes de difusión publicados para el tejido y el medio de cultivo, así como las dimensiones medidas y las tasas de consumo de O_2 (OCR) de brotes pancreáticos de ratón. La validez de los modelos fue confirmada por las lecturas directas de O_2 de brotes pancreáticos in vitro, utilizando técnicas basadas en microelectrodos polarográficos.

Medición de la insulina: La proteína total se extrajo de grupos de 6-8 brotes pancreáticos, y el contenido de insulina se midió usando kits Mercodia de ELISA.

Resultados.

Los dispositivos PFC/Si aseguran altos niveles de oxigenación en brotes pancreáticos e13.5: Se utilizaron brotes pancreáticos dorsales explantados en e13.5 como el modelo primario de diferenciación in vitro. Este punto está dentro del período de máxima especificación celular β en el ratón en desarrollo, y el efecto de las intervenciones en su desarrollo espontáneo in vitro puede ser fácilmente cuantificado. 30 brotes pancreáticos dorsales agrupados de embriones e13.5 (6 hembras C57 embarazadas) fueron microdiseccionados y medidos. Sus dimensiones medias eran 449,7 +/- 78,5 µm × 649,8 +/- 79,3 µm × 450,1 +/- 79,1 µm. La tasa media de consumo de O_2 fue de 8,95 +/- 0,75 x 10-3 mol/m^3. La variabilidad entre muestras fue <10%, a pesar de utilizar tejido de diferentes cosechas.

El cultivo tradicional de los brotes pancreáticos se realiza en insertos donde el tejido descansa encima de una membrana permeable, apenas bañada con el medio debajo. Estas condiciones de "interfaz medio/aire" garantizan niveles de oxigenación aceptables, pero la difusión de nutrientes es subóptima, el crecimiento es limitado y el medio necesita ser reabastecido con frecuencia para evitar la desecación. Se trata de un sistema de cultivo engorroso y muy especializado con pocos usos, si los hay, fuera del área de estudios de desarrollo de pequeños explantes. La diferenciación de células madre, en particular para aplicaciones terapéuticas a gran escala, requerirá sistemas de expansión estándar donde las células se sumergen adecuadamente en el medio de cultivo.

Con el fin de replicar las restricciones de transferencia de aire de los métodos estándar de cultivo de células madre, al tiempo que se satisfacen las necesidades especiales del modelo biológico de los inventores (que requiere una membrana basal para mantener la integridad morfológica de los brotes), se han modificado las condiciones basales de control para que los brotes pancreáticos se asienten sobre una membrana permeable y el medio de cultivo los bañe enteramente (hasta 1 mm por encima de las células, véase la figura 5A). Como se podría argumentar que el nivel de oxigenación en este sistema "híbrido" sería menor que en los ajustes convencionales, se añadió un segundo control donde la concentración de O_2 se incrementa a 35% en la incubadora. El modelado matemático y las mediciones directas in vitro demuestran que este ajuste da como resultado niveles de oxigenación comparables a los de las condiciones de "interfaz medio/aire", manteniendo una altura media adecuada para ayudar a la nutrición, la expansión y la diferenciación. Así, los inventores modelaron tres plataformas de cultivo: (a) Control estándar (insertos Millipore Teflon cultivados en concentración convencional de O_2 en una incubadora de aire ambiente al 95%/CO_2 al 5%); (b) Alto control de O_2 (el sistema anterior cultivado en presencia de O_2 al 35%); (c) PFC/Si (donde la parte inferior de los insertos de Millipore fue reemplazada por una membrana de silicona de 450 µm de grosor/20% de perfluorocarbono), también cultivadas a 35% de O_2. En ambos controles, las muestras reposan en la parte superior de las membranas de Teflón permeables a los líquidos que las suspenden por encima del fondo de plástico, de modo que sus regiones apical y basal se bañan con el medio de cultivo (Figura 5A, parte superior). Las membranas PFC/Si, por el contrario, son impermeables a los líquidos. Al descansar encima de estas membranas, las muestras son bañadas por medio justo desde la parte superior, mientras que están directamente expuestas al O_2 ambiental desde el fondo (Figura 5A, parte inferior). La velocidad de transferencia de masa del O_2 a las células se incrementa en gran medida en este sistema, ya que no está limitada por la difusividad a través del medio de cultivo.

El modelado de elementos finitos de los parámetros de difusión/reacción de cada entorno de cultivo se realizó utilizando el software COMSOL v3.2. Estos cálculos fueron validados por mediciones experimentales de O_2 en todo el tejido.

Al comienzo del cultivo (día 0), los brotes pancreáticos cultivados en condiciones de control estándar (figura 5B, parte superior) tienen niveles de oxigenación totales por debajo de 100 mm Hg, con grandes áreas (representadas en blanco) por debajo de 0,1 mm Hg. Esto se considera generalmente el umbral de la anoxia. El aumento de la concentración de O_2 del 21 al 35% en el sistema de cultivo estándar (figura 5B, medio) previene la anoxia y mejora la oxigenación, aunque no tanto como en los dispositivos PFC/Si (figura 5B, parte inferior).

Alto O_2 promueve el crecimiento de los brotes pancreáticos en ajustes PFC/Si sin hipoxia: Se explantaron brotes pancreáticos dorsales E13.5 y se cultivaron en condiciones normales (control estándar n = 13), 35% de O_2 (alto control de O2, n = 14) y membranas de PFC/Si a 35% de O_2 (grupo experimental; n = 14). Se observó un crecimiento máximo de los explantes a las 72 h de cultivo. Períodos más largos (hasta 1 semana) no resultaron en expansión adicional. Los brotes del grupo experimental triplicaron su volumen durante el período de cultivo de 3

días. Los explantes mantenidos a alto O_2 solo también se expandieron significativamente, pero no tanto (2 veces). Las brotes en condiciones estándar, finalmente, mostraron el menor incremento de tamaño (1,1 veces) (Figuras 6A y 6B, columna izquierda). Los cálculos teóricos de los inventores, ajustados por el aumento del tamaño de los brotes a las 72 h, indican que este crecimiento se acompaña de una disminución de la difusión de O_2 a través del tejido. Esto fue confirmado por el uso de una sonda histológica para la hipoxia en muestras fijadas después de 3 días en cultivo. El Hipoxyprobe se une a los aductos proteicos formados cuando el tejido se expone a presiones parciales de O_2 <10 mm Hg 58. Las secciones de punto medio de muestras representativas de cada grupo muestran grandes áreas hipóxicas en brotes cultivados tanto en condiciones estándar como altas de O_2, pero no en aquellas colocadas en dispositivos PFC/Si (Figura 6B, columna derecha). En conclusión, los estudios de los inventores confirman que las plataformas de PFC/Si previenen la hipoxia y aseguran altos niveles de oxigenación en el sistema de prueba de los inventores.

El crecimiento inducido por PFC/Si se debe a la replicación de células epiteliales indiferenciadas. Con el fin de determinar la naturaleza de las células responsables de la proliferación observada durante el cultivo, se añadió bromodeoxiuridina (BrdU) al medio de cultivo durante toda la duración del experimento (72 h), y a continuación se fijaron, seccionaron e inmunotiñeron las muestras. La coexpresión de BrdU y los marcadores de diferenciación terminal (insulina, glucagón, amilasa y carboxipeptidasa A) fue rara en todos los grupos, como se muestra en la FIG. 7. Esta observación indica que no hay replicación significativa de las células epiteliales maduras. Se sabe que las células mesenquimales E-caderina/Nestin+ se entremezclan con células epiteliales en esta etapa del desarrollo. Estas células, sin embargo, resultaron ser escasas y en gran medida BrdU-negativas en todos los grupos. Se encontró que la mayor parte de la incorporación de BrdU se localizaba en células marcadoras de E-caderina +/diferenciación (Figura 7, fila inferior). En resumen, los resultados de los inventores indican que la proliferación ocurre preferentemente en células epiteliales indiferenciadas que no maduran durante el curso del experimento.

La diferenciación es muy mejorada en los dispositivos PFC/Si comparado con los controles estándar y altos de O_2: Se recolectaron brotes pancreáticas dorsales e13.5 y se cultivaron como anteriormente. El día 3, los explantes fueron lisados para el aislamiento de ARN y la extracción de proteínas, o fueron fijados para el análisis inmunohistoquímico. Un panel de genes implicados en la progresión de la diferenciación pancreática y la maduración de las células β se probó por qRT-PCR en 7 experimentos independientes (2-3 brotes/grupo). Como se muestra en la FIG. 8A, todos los genes examinados son sobrerregulados en el grupo PFC/Si en comparación con el control estándar: Insulina 1 (30 veces), Insulina 2 (34 veces), Glucagon (8 veces), Pdx1 (2 veces), Ngn3 (8 veces), Isl1 (4 veces), Pax4 (14 veces), Pax6 (3,5 veces), Arx (15 veces), P48 (4,5 veces), Carboxipeptidasa A (9 veces), Amilasa (5 veces) y Glut-2 (4 veces). Sorprendentemente, los valores observados en el alto control de O_2 eran apenas superiores a los del control estándar, y en algunos casos incluso más bajos.

Las diferencias entre el grupo PFC/Si y los controles fueron estadísticamente significativas para la insulina 1 (P = 0,025) y 2 (P = 0,025), Glucagón (P = 0,020), Ngn3 (P = 0,017), Pax4 (P = 0,039) Pax6 (P = 0.037) y Glut-2 (P = 0,025), pero no para los marcadores endocrinos pancreáticos Pdx1 (P = 0,07), Isl1 (P = 0,06) y Arx (P = 0,09) ni los marcadores exocrinos P48 = 0,45), carboxipeptidasa A (P = 0,43) y amilasa (P = 0,34). El análisis de Metamorph® de brotes marcados con inmunofluorescencia (n = 5 experimentos independientes, 3 brotes/grupo) confirmó la regulación positiva de la Insulina y el Glucagón, las dos hormonas endocrinas principales observadas en este punto de desarrollo. Como se representa en la FIG. 8B, la tinción de insulina+ en los brotes de PFC/Si es casi 10 veces la de los controles estándar (2,5 veces la de los controles de alto O_2). De manera similar, la señal de Glucagon+ fue 5 veces más abundante en el grupo experimental que en los ajustes convencionales (3 veces la de los controles de alto O_2). Los análisis de ANOVA muestran que las diferencias entre el PFC/Si y el grupo de control estándar (P = 0,01 y 0,001 para la insulina y el glucagón, respectivamente), pero no entre los dos grupos de control, son estadísticamente significativas. Las secciones representativas de brotes cultivados en cada condición, mostradas en la FIG. 8C, muestran que los grupos de células productoras de insulina y glucagón eran más gruesos y densos en PFC/Si que en los brotes de control.

Dado que la mayoría de estas nuevas células endocrinas y exocrinas que se diferenciaron durante el cultivo in vitro surgieron a partir de células progenitoras posmitóticas (Figura 7), se pudo concluir que las mayores tasas de crecimiento y diferenciación son dos efectos distintos del cultivo en dispositivos PFC/Si. Los inventores buscaron pruebas adicionales mediante el examen de la diferenciación inducida por PFC/Si en ausencia de proliferación. Antes del cultivo en cada condición, se trataron brotes e13.5 recién microdiseccionados con mitomicina C (MMC), un potente inhibidor de la división celular. Incluso si no tan dramáticamente como antes, la diferenciación era todavía significativamente mayor (de 2 a 6 veces para los marcadores de células endocrinas) en el grupo experimental en comparación con ambos controles. Esta observación confirma que el aumento de la diferenciación endocrina en los brotes cultivados con PFC/Si es independiente del aumento paralelo en su capacidad proliferativa.

La maduración in vitro en dispositivos PFC/Si imita de cerca el desarrollo in vivo: Para evaluar la medida en que los brotes cultivados en PFC/Si se aproximan a los niveles de diferenciación in vivo, los brotes pancreáticos obtenidos en e16,5 (un tiempo correspondiente a brotes e13.5 + 3 días de desarrollo ex vivo) se lisaron para el ARN y la extracción de proteínas (n = 4 experimentos independientes). Estos valores se compararon con los obtenidos previamente de brotes cultivados con PFC/Si. El contenido total de insulina de los brotes cultivados durante 3 días en PFC/Si fue casi el 80% de los brotes e16.5 recién explantados, comparado con el 30% y el 15% en los grupos de alto O_2 y estándar, respectivamente (Figura 9A). Esta observación fue confirmada y ampliada por qRT-PCR, donde

el anterior grupo de genes se ejecutó en las cosechas e16.5 y en comparación con los 7 experimentos in vitro de PFC/Si. La figura 9B presenta los perfiles de expresión génica del grupo PFC/Si expresados como un porcentaje del determinado para e16.5. La mayoría de las diferencias entre el grupo PFC/Si y e16,5 son estadísticamente insignificantes (P> 0,05), lo que sugiere que la maduración in vitro se produjo a tasas in vivo.

PFC/Si promueve la diferenciación endocrina sobre la exocrina y las células β sobre α: Una interpretación posible de los resultados anteriores es que un mejor método de liberación de O_2 simplemente promueve la diferenciación global. Sin embargo, la hipótesis de que el método de los inventores mejoraba la oxigenación preferentemente induciría la especificación de las células endocrinas, ya que sus demandas de O_2 superan en gran medida las del tejido exocrino. Para probar esta hipótesis, y sobre la base de los datos de qRT-PCR presentados anteriormente, se calcularon las proporciones de diferenciación endocrina frente a exocrina y de células β frente a α. Como se muestra en la FIG. 10, estas proporciones son consistentemente mayores en el grupo PFC/Si que en los dos controles in vitro (hasta 30 veces para endocrino/exocrino y 2-3 veces para las proporciones de células β a α) e incluso los brotes pancreáticos e16.5 (2-3 veces para ambos tipos de relaciones).

Discusión: El éxito en la diferenciación eficiente del tejido endocrino pancreático de una fuente renovable de células podría tener aplicaciones terapéuticas inmediatas para el tratamiento de la diabetes tipo I. Sin embargo, los métodos actuales para la especificación in vitro de células β son todavía ineficientes. Se plantea la hipótesis de que una mejor recapitulación del entorno fisiológico de las células β (de la cual la oxigenación es un componente clave) puede ser conducente a mayores rendimientos de diferenciación.

Los resultados de los inventores confirmaron la hipótesis anterior en un modelo de ratón de desarrollo pancreático, pero sólo cuando el aire se entregó en una forma basal-apical. El aumento de la concentración de O_2 en la incubadora en condiciones de cultivo estándar no dio lugar a ninguna sobre-regulación positiva significativa de la diferenciación endocrina. Si bien el efecto "sándwich de oxígeno" también podría conseguirse con membranas hechas de silicona sola, las que incluían PFC en su composición demostraron ser superiores en los experimentos preliminares. La expresión de marcadores endocrinos (Glucagón, Insulina 1, Insulina 2 y Pax4) fue entre 2 y 5 veces mayor en PFC/Si que en el grupo de silicona sola, sin diferencias significativas en la diferenciación de genes exocrinos o marcadores de proliferación. Las ventajas de PFC/Si sobre la silicona sola en términos de difusión de O_2 se confirmaron adicionalmente mediante mediciones directas utilizando biosensores ópticos O_2 no invasivos. Por lo tanto, se optó por dispositivos PFC/Si para todos los experimentos posteriores.

Los datos de los inventores muestran un aumento inequívoco de la diferenciación endocrina, con niveles de expresión de insulina 1 y 2 superior a 30 veces los de los brotes cultivados en condiciones estándar, ya sea a 21% o 35% de O_2. Todos los marcadores de diferenciación endocrina también fueron sobre-regulados, incluyendo Ngn3 (un marcador de tipos de células pro-endocrinas), Glucagon y Pax-6 (células α), Isl1 (células endocrinas), Pax4 (células pro-β), Glut-2 y Pdx1 (células β) y Pax6 (células pro-β). Aunque el aumento de los niveles de Pdx1 observados en los brotes cultivados con PFC/Si sobre el control estándar fue unas 2, aparentemente modestas, veces (6 veces superior al control alto de O_2), debe observarse que, con excepción de todo el epitelio del conducto, la expresión de este gen recién comienza a reaparecer alrededor de este tiempo en las células β que surgen.

Se podría argumentar que los resultados de los inventores son meramente un reflejo de mejores condiciones de cultivo, en lugar de un efecto preferencial de una mayor oxigenación sobre la diferenciación endocrina. Sin embargo, la observación de la sobre-regulación de los marcadores exocrinos en el brote de PFC/Si cultivado fue estadísticamente insignificante. La hipótesis anterior se refutó aún más mediante el cálculo de los cocientes entre los marcadores endocrinos (Insulina 1 y 2) y exocrinos (Carboxipeptidasa A, Amilasa y p48). Dentro de las células endocrinas, también se determinó las relaciones insulina/Glucagon, Pax4/Pax6 y Pax4/Arx. Se ha demostrado que este último es importante en la encrucijada entre la segregación celular α y β a partir de una célula progenitora común (el exceso de Pax4 sobre Arx dará como resultado una diferenciación celular α, mientras que lo contrario conducirá a la generación de células α). Del mismo modo, la expresión de Pax6, pero no de Pax4, está normalmente asociada a una especificación celular α en esta etapa del desarrollo. En todos los experimentos realizados, el grupo PFC/Si mostró invariablemente una mayor diferenciación endocrina frente a exocrina y de células β a α que los dos controles in vitro. Sorprendentemente, fueron incluso mayores que en brotes pancreáticos e16.5 recién explantados, que representan un valioso control de la diferenciación in vivo.

También se observó una mayor tasa de crecimiento cuando se utilizaron dispositivos PFC/Si. Los estudios de la incorporación de BrdU muestran que la mayoría de las células recién generadas eran epiteliales (E-caderina$^+$). Sin embargo, se observó muy pocas veces BrdU en células terminalmente diferenciadas (Amilasa$^+$, Carboxipeptidasa$^+$, Insulina$^+$ o Glucagón$^+$). Esto indica que la mayoría de las células endocrinas o exocrinas recién diferenciadas surgieron de progenitores que ya estaban inactivos al comienzo del experimento. Los datos de los inventores, por lo tanto, apoyan la idea de que las matrices PFC/Si tienen dos efectos distintos sobre los brotes pancreáticos e13.5: (a) una mayor proliferación de células epiteliales que no se diferencian durante el curso del experimento; y (b) una diferenciación endocrina mejorada de una subpoblación posmitótica de células progenitoras. La independencia entre la proliferación y la diferenciación fue confirmada por experimentos en los que, a pesar de una detención inducida por mitomicina C de la proliferación, la diferenciación endocrina aún fue mejorada. Entre las vías de diferenciación directamente influenciadas por la tensión de O_2, Notch es de máxima importancia para el desarrollo pancreático. Esta vía está generalmente implicada en el mantenimiento de un estado indiferenciado, y su des-regulación es clave

para el inicio de la cascada de diferenciación endocrina. Bajo condiciones hipóxicas, el factor inducible de hipoxia 1α (HIF-1α) se estabiliza e interactúa con el dominio intracelular de Notch, activando esta cascada de señalización. En este contexto, se deduce que una mayor oxigenación desestabilizaría HIF-1α, que a su vez inhibiría la señalización de Notch, promoviendo la diferenciación endocrina. Esto sería coherente con la observación de que la segunda y más significativa onda de especificación de células β (transición secundaria) es simultánea con el inicio del flujo sanguíneo dentro de los brotes pancreáticos, mucho tiempo después de que las células endoteliales aparezcan por primera vez en el tejido.

Sin embargo (como también se ve en el modelo in vitro de los inventores), una mayor oxigenación también puede inducir la proliferación de tipos de células no endocrinas, un comportamiento que no puede explicarse por la vía HIF-1/Notch. Esto ocurre típicamente a través de la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS), que se ha demostrado que participan como transductores de señal en numerosos procesos biológicos.

Un modelo que se ajusta a la evidencia experimental se presenta en la FIG. 11. Las condiciones hipóxicas presentes hasta e13.5 teóricamente favorecerían la proliferación Notch-dependiente de progenitores pancreáticos. Dado que estas condiciones también promueven la angiogénesis de una manera dependiente de HIF-1, el inicio del flujo sanguíneo y la subsiguiente oxigenación: (a) detienen la señalización Notch en células progenitoras endocrinas (permitiendo así una onda masiva de diferenciación endocrina alrededor de ese tiempo); y (b) activan la señalización Wnt/β-catenina en células progenitoras exocrinas (desencadenando así una proliferación celular acinar sostenida). Según esta hipótesis, los dispositivos PFC/Si (pero no las condiciones de control hipóxico), en cierta medida, imitarían los dos efectos independientes de la angiogénesis en diferentes subconjuntos celulares del páncreas en desarrollo. La prueba de esta hipótesis es actualmente objeto de varias líneas de investigación en el laboratorio de los inventores.

La observación de que las altas concentraciones de O_2 per se no aumentan la diferenciación sobre los niveles basales demuestra que los métodos estándar de suministro de aire son inadecuados para mantener el crecimiento y la diferenciación de los agregados celulares. Después de tres días en cultivo, los brotes cultivados en alto O_2 tuvieron una incidencia muy significativa de hipoxia, que no se observó en los explantes cultivados con PFC/Si. En particular, la liberación de O_2 mejorada no fue acompañada por el estrés inducido por el oxígeno. Los análisis de multiplex preliminares muestran la activación diferencial de la fosforilación de AKT (señal de supervivencia) y la supresión de c-jun, NF-kB y ERK (quinasas activadas por estrés) en el grupo PFC/Si comparado con ambos controles.

Conclusiones: Hasta la fecha, la mayoría de los intentos de diferenciar los islotes de las células madre se han centrado sólo en su entorno molecular. Los resultados de los inventores hacen hincapié en la importancia de proporcionar células progenitoras en desarrollo con el ambiente fisiológico adecuado, abriendo una nueva vía de investigación que complementa oportunamente avances paralelos en el campo. En resumen, este trabajo: (1) presenta evidencias de una relación directa entre la oxigenación y la diferenciación de células endocrinas pancreáticas, cuyo mecanismo molecular está actualmente en estudio; y (2) describe una nueva herramienta de cultivo celular diseñada para suministrar O_2 de un modo fisiológico, que podría ser de uso inmediato en el desarrollo de protocolos de diferenciación de islotes más eficaces a partir de células madre adultas y/o embrionarias.

Ejemplo 7: Efecto de las condiciones PFC/Si en el cultivo de cuerpos embrionarios derivados de células madre embrionarias humanas (huES)

Objetivo: Evaluar la influencia de la oxigenación mejorada (como la proporcionan los dispositivos PFC/Si) sobre la expresión de marcadores endocrinos pancreáticos en cuerpos embrioides derivados de células huES.

Las células HuES se organizan en cuerpos embrioides cuando se cultivan en condiciones que no favorecen su fijación (tales como gotas colgantes o placas Petri bacterianas). Estos cuerpos embrioides (EBs) dan lugar a una variedad de tejidos de las tres capas embrionarias, a saber endodermo, ectodermo y mesodermo. Se han detectado células positivas a la insulina, incluso en un porcentaje bajo, en EBs espontáneamente diferenciados durante aproximadamente 3 semanas. El objetivo de este experimento fue determinar si el cultivo en platos PFC/Si resultaría en mayores niveles de expresión de genes endocrinos pancreáticos.

Métodos: Se trypsinizó un matraz T180 confluente de células H10 huES en el paso 30 y se permitió que las células formaran EBs en condiciones libres de suero durante 20 días. Se tomaron muestras de ARN en ese momento para establecer una línea de base. Los EBs se distribuyeron a continuación en cuatro grupos: control (placas de Petri regulares), control de oxígeno alto (el mismo pero al 35% de O_2), PFC/Si (placas de 10 cm de PFC/Silicona) y oxígeno alto de PFC/Si (lo mismo pero al 35% de O_2). Estos se cultivaron durante 5 días más, momento en el que se tomaron muestras de ARN para su análisis de qRT-PCR.

Resultados: Los resultados de este experimento preliminar pueden resumirse como sigue:

1. Después de 3 días en cultivo, la expresión génica del glucagón es más alta en el grupo de oxígeno alto de PFC/Si (5 veces durante el día 20), seguido de PFC/Si (4 veces). Los controles y controles de oxígeno alto tienen incrementos de 2,734 y 3,2 veces, respectivamente.

2. La expresión de glucagón no puede detectarse en ningún grupo después de 5 días en cultivo, con la excepción del oxígeno alto de PFC/Si (aumento de 11 veces durante el día 20). Por lo tanto, sólo las plataformas de PFC/Si son permisivas para la expresión a largo plazo de glucagón en este sistema biológico particular.

3. La expresión de la insulina no puede detectarse ya sea en la línea de base del día 20 o después de 3 días de cultivo (en cualquier condición). Lo mismo se aplica a 5 días de cultivo con la excepción de PFC/Si oxígeno alto. Este es el único grupo donde se puede detectar la expresión de insulina (promedio Ct de 3 muestras = 34,88). Considerando que el umbral de detección es Ct = 40, en el escenario menos optimista la amplificación observada correspondería a 40-34.88 = 5.12; $2^{5,12}$ = 34 veces sobre cualquier otra condición.

4. Mientras que los niveles de expresión de Pdx1 son comparables en los cuatro grupos después de 3 días en cultivo (1,5-2,8 veces en los niveles del día 20), el día 5 sólo puede detectarse en el grupo de alto O_2 PFC/Si, con un aumento de 6,35 veces respecto al día 20.

En resumen, las condiciones de PFC/Si, especialmente a alto O_2, parecen ser más permisivas para la expresión espontánea de genes de desarrollo endocrino pancreático en EBs. Esto es consistente con la hipótesis de trabajo, ya postulada en el cuerpo principal de esta solicitud, que la diferenciación endocrina pancreática es altamente promovida por una oxigenación mejorada. Los experimentos dirigidos a probar esto en dos protocolos de diferenciación de células huES dirigidos están actualmente en marcha.

Ejemplo 8: Efecto de las condiciones de PFC/Si en el cultivo de hepatocitos primarios no humanos de primates

Para evaluar el nivel de expresión de albúmina, un marcador de diferenciación de hepatocitos, en hepatocitos de primates no humanos cultivados en condiciones regulares vs. dispositivos de PFC/Silicona.

Diseño experimental: Se cultivaron células hepáticas de NHP en el paso 3 en placas de 6 pocillos (100.000 células en medio de 2 ml) o en placas de PFC/Si (51.000 células colocadas en 1 ml de medio), ambas pretratadas con fibronectina. En ambas condiciones de cultivo, las placas se incubaron ya sea en concentraciones regulares (21%) o altas (35%) de O_2. Se tomaron muestras de ARN el día 5 del cultivo y se midió la expresión de albúmina por qRT-PCR (Applied Biosystems).

Resultados: Después de 5 días en cultivo, los hepatocitos cultivados en dispositivos PFC/Si tendieron a asociarse en agregados celulares unidos a la superficie. Las células de control, en contraste, permanecieron en una monocapa.

Discusión: Aunque preliminares, los resultados anteriores parecen indicar que el cultivo en dispositivos PFC/Si mejora la expresión de un marcador (albúmina) asociado con el mantenimiento de un fenotipo de hepatocitos. Este resultado sería de gran importancia para el campo de la expansión in vitro de los hepatocitos, ya que un efecto común observado en los hepatocitos cultivados es su pérdida de marcadores de diferenciación con el tiempo. Curiosamente, el alto contenido de oxígeno no dio lugar a una mejor expresión de albúmina cuando se usaron matrices PFC, lo que sugiere que, mientras que el PFC tiene un efecto generalmente positivo del cultivo de tejidos metabólicamente exigentes (especialmente agregados 3D), la concentración específica de O2 que dará los mejores resultados necesita ser ajustada caso por caso.

Ejemplo 9: Efecto del cultivo de neuroesferas de ratón en dispositivos PFC/Si

Las neuroesferas son agregados 3D flotantes generados por células madre neurales (NSCs) in vitro. Estas son células auto-renovables, multipotentes con la capacidad de diferenciarse en todas las poblaciones neurales (Bez A, et al., Brain Res. Dic. 12 2003; 993 (1-2): 18-29). Este es el método de cultivo de elección para expandir las células madre neurales antes de su diferenciación, y una herramienta para el estudio de la biología neural y el desarrollo (Campos L S. J Neurosci Res. Dic. 15, 2004; 78 (6): 761 - 769). Como cualquier otro agregado de células 3D, las neurosferas están sujetas a limitaciones de transferencia de masa, especialmente relacionadas con la difusión de oxígeno (Plotnikov E Y, et al., Bull Exp Biol Med. Enero de 2006; 141 (1): 142 - 146). Cuando alcanzan un tamaño crítico, deben ser desagregados y pasados para evitar efectos relacionados con la hipoxia en su viabilidad y tasa de proliferación. Basado en la experiencia de los inventores con brotes embrionarios de páncreas, se pusieron a prueba para probar la hipótesis de que el cultivo de neuroesferas en dispositivos PFC/Si resultaría en una mayor tasa de proliferación.

Métodos: Las neurosferas murinas se cultivaron en medio DMEM/F-12 suplementado con B27, penicilina/estreptomicina, bFGF y EGF. En estas condiciones, los agregados crecen hasta 150-250 µm, después de lo cual las velocidades de transferencia de masa se vuelven limitantes. Neuroesferas a este tamaño medio indican típicamente una necesidad de tripsinización. Las neurosferas de control se colocaron en placas de 6 pocillos en una incubadora de O_2 bajo (5%) regular (21%) o alto (35%); Las condiciones experimentales fueron similares, pero las neurosferas se colocaron en placas de PFC/Si. El cultivo se llevó a cabo durante 48 h. Se añadió un pulso de BrdU al comienzo del experimento para estudiar la proliferación.

Resultados: Las neurosferas cultivadas en placas de PFC/Si, tanto en concentraciones regulares como altas de O_2, se expandieron volumetricamente hasta 10 veces más que los controles relevantes (hasta 1 mm de diámetro) en un

período de 48 h. Se confirmaron tasas de proliferación más altas mediante tinción con BrdU (Figuras 2A-2D). La proliferación fue mínima en ambos grupos a baja O_2.

Discusión: Los platos de PFC/Si aumentan drásticamente la proliferación de células madre neurales en neurosferas. Los estudios de incorporación de BrdU muestran que la mayor parte de la actividad proliferativa se detecta superficialmente en agregados de control (Figura 2C). Esto concuerda con la hipótesis de que, siendo dependiente del oxígeno, la proliferación ocurrirá rara vez en el núcleo hipóxico de las neurosferas. El cultivo de PFC/Si, por el contrario, permite el crecimiento continuo de las neurosferas sin limitaciones de difusión de oxígeno hasta un umbral más alto. A diferencia de los del grupo de control, la proliferación también puede observarse en el núcleo de las neurosferas cultivadas en PFC/Si (Figura 2D). En resumen, el sistema de cultivo evita las limitaciones de transferencia de oxígeno inherentes a los métodos convencionales, y permite un aumento drástico de la tasa de proliferación de células madre neurales in vitro.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato de cultivo de células y de tejidos que comprende:

un dispositivo de cultivo de tejidos que contiene una barrera de membrana permeable a los gases e impermeable a los líquidos que comprende una composición de silicona impregnada o mezclada con perfluorocarbonos;

miembros de soporte que se extienden desde la parte inferior, lateral o superior del dispositivo de cultivo de tejidos para elevar el dispositivo de cultivo de tejidos para permitir el flujo de aire; y

una bandeja o matraz de cultivo que comprende el dispositivo de cultivo de tejidos,

en el que la barrera de membrana impermeable a los líquidos define una superficie continua del dispositivo de cultivo de tejidos y permite la oxigenación y minimización de la hipoxia en las células en reposo sobre la misma.

2. El aparato de cultivo de células y tejidos de la reivindicación 1, en el que el aparato de cultivo de tejido comprende una abertura superior e inferior; y en el que la barrera define una superficie inferior continua del dispositivo de cultivo de tejidos.

3. El aparato de cultivo de células y tejido de la reivindicación 1, en el que la barrera de la membrana impermeable a los líquidos comprende además al menos un material seleccionado a partir de cerámicas, polímeros, sustratos tejidos, sustratos no tejidos, poliamida, poliéster, poliuretano, polímeros de fluorocarbono, polietileno, polipropileno, alcohol de polivinilo, poliestireno, vinilo, plásticos, metales, aleaciones, minerales, minerales no metálicos, madera, fibras, tela, vidrio, e hidrogeles.

4. El aparato de cultivo de células y tejidos de la reivindicación 1, en donde la composición de perfluorocarbono y de silicona tiene una proporción de entre aproximadamente 0,001% v/v de perfluorocarbono por ml de composición hasta 80% v/v de perfluorocarbono por ml de composición de silicona.

5. El aparato de cultivo de células y tejidos de la reivindicación 4, en donde la composición de perfluorocarbono y de silicona tiene una relación de aproximadamente 1% a 20% v/v de perfluorocarbono por ml de composición de silicona.

6. El aparato de cultivo de células y tejidos de la reivindicación 1, en el que la bandeja está hecha de al menos un material que comprende cerámicas, polímeros, sustratos tejidos, sustratos no tejidos, poliamida, poliéster, poliuretano, polímeros de fluorocarbono, polietileno, polipropileno, perfluorocarbonos, alcohol de polivinilo, poliestireno, vinilo, plásticos, metales, aleaciones, minerales, minerales no metálicos, madera, fibras, tela, vidrio, hidrogeles y silicona.

7. El aparato de cultivo de células y tejidos de la reivindicación 1, en donde la bandeja comprende una pluralidad de dispositivos de cultivo de tejidos.

8. El aparato de cultivo de células y tejidos de la reivindicación 1, en donde la bandeja comprende una tapa que permite el intercambio gaseoso.

9. El aparato de cultivo de células y tejidos de la reivindicación 1, en el que la oxigenación y la minimización de la hipoxia aumenta la proliferación de las células.

10. El aparato de cultivo de células y tejidos de la reivindicación 1, en el que la oxigenación y la minimización de la hipoxia aumenta la diferenciación de las células.

11. El aparato de cultivo de células y tejidos de la reivindicación 1, en el que las células se seleccionan del grupo que consiste en: células madre neurales, células beta y hepatocitos.

12. El aparato de cultivo de células y tejido de la reivindicación 1, en el que los perfluorocarbonos están homogéneamente dispersados por toda la composición de silicona.

13. Un aparato para el transporte de células, tejidos y órganos, que comprende:

un dispositivo de cultivo que contiene un barrera de membrana permeable a los gases e impermeable a los líquidos para permitir el flujo de aire, comprendiendo la membrana permeable a los gases e impermeable a los líquidos una composición de silicona impregnada o mezclada con perfluorocarbonos,

en donde la barrera de la membrana impermeable a los líquidos define una superficie continua de al menos un lado del dispositivo de cultivo y permite la oxigenación y minimización de la hipoxia en las células en reposo sobre ésta;

el dispositivo de cultivo que comprende miembros de soporte que se extienden desde la parte inferior, lateral o superior del dispositivo de cultivo de tejidos para elevar el dispositivo de cultivo de tejidos; y,

un recipiente que alberga al dispositivo de cultivo.

14. El aparato de la reivindicación 13, en el que el dispositivo de cultivo comprende una abertura superior e inferior; y en el que la barrera define una superficie inferior continua del dispositivo de cultivo.

15. El aparato de la reivindicación 13, en el que la barrera de membrana impermeable a los líquidos comprende además al menos un material seleccionado de cerámicas, polímeros, sustratos tejidos, sustratos no tejidos, poliamida, poliéster, poliuretano, polímeros de fluorocarbono, polietileno, polipropileno, alcohol polivinílico, e hidrogeles.

16. El aparato de la reivindicación 13, en donde la composición de perfluorocarbono y de silicona tiene una proporción de entre aproximadamente 0,001% v/v de perfluorocarbono por ml de composición de silicona hasta un 80% v/v de perfluorocarbono por ml de composición de silicona.

17. El aparato de la reivindicación 16, en donde la composición de perfluorocarbono y de silicona tiene una relación de aproximadamente 1% a 20% v/v de perfluorocarbono por ml de composición de silicona.

18. El aparato de la reivindicación 13, en el que el dispositivo de cultivo y el recipiente están hechos de al menos un material que comprende cerámicas, polímeros, sustratos tejidos, sustratos no tejidos, poliamida, poliéster, poliuretano, polímeros de fluorocarbono, polietileno, polipropileno, perfluorocarbonos, alcohol de polivinilo, poliestireno, vinilo, plásticos, metales, aleaciones, minerales, minerales no metálicos, madera, fibras, tela, vidrio, hidrogeles y silicona.

19. El aparato de la reivindicación 13, en el que la oxigenación y la minimización de la hipoxia aumenta la proliferación de las células.

20. El aparato de la reivindicación 13, en el que la oxigenación y la minimización de la hipoxia aumenta la diferenciación de las células.

21. El aparato de la reivindicación 13, en el que las células se seleccionan del grupo que consiste en: células madre neurales, células beta y hepatocitos.

22. El aparato de la reivindicación 13, en el que los perfluorocarbonos están homogéneamente dispersados por toda la composición de silicona.

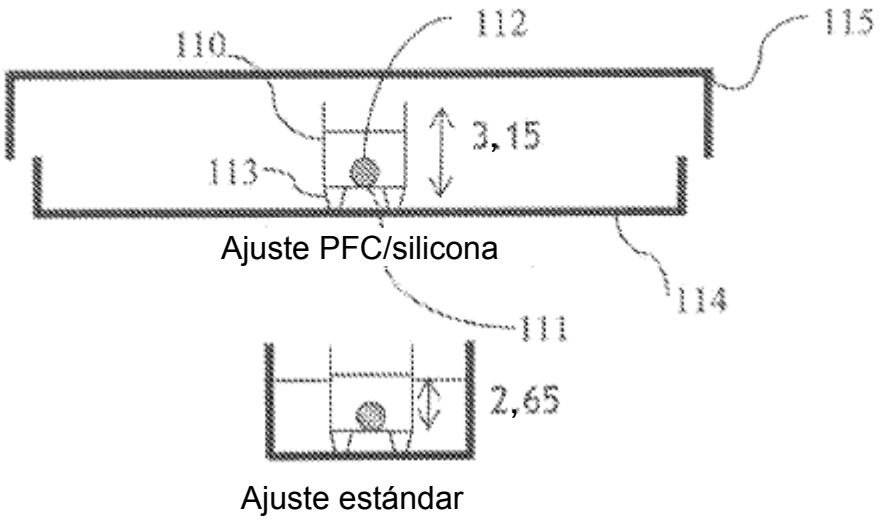
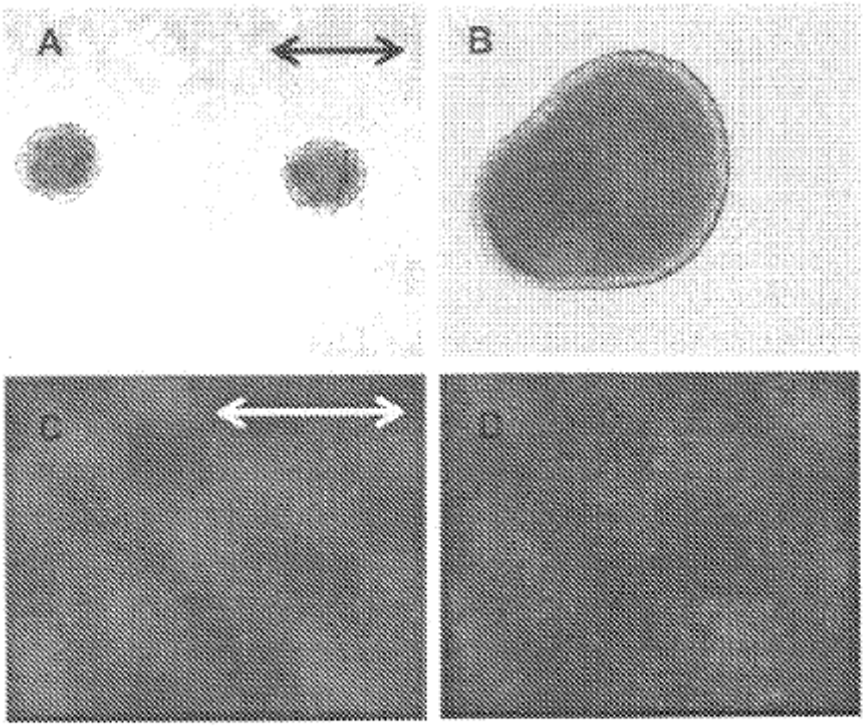

110
112
115
3,15
113
Ajuste PFC/silicona
114
111
2,65
Ajuste estándar

FIGURA 1



FIGURAS 2A-D

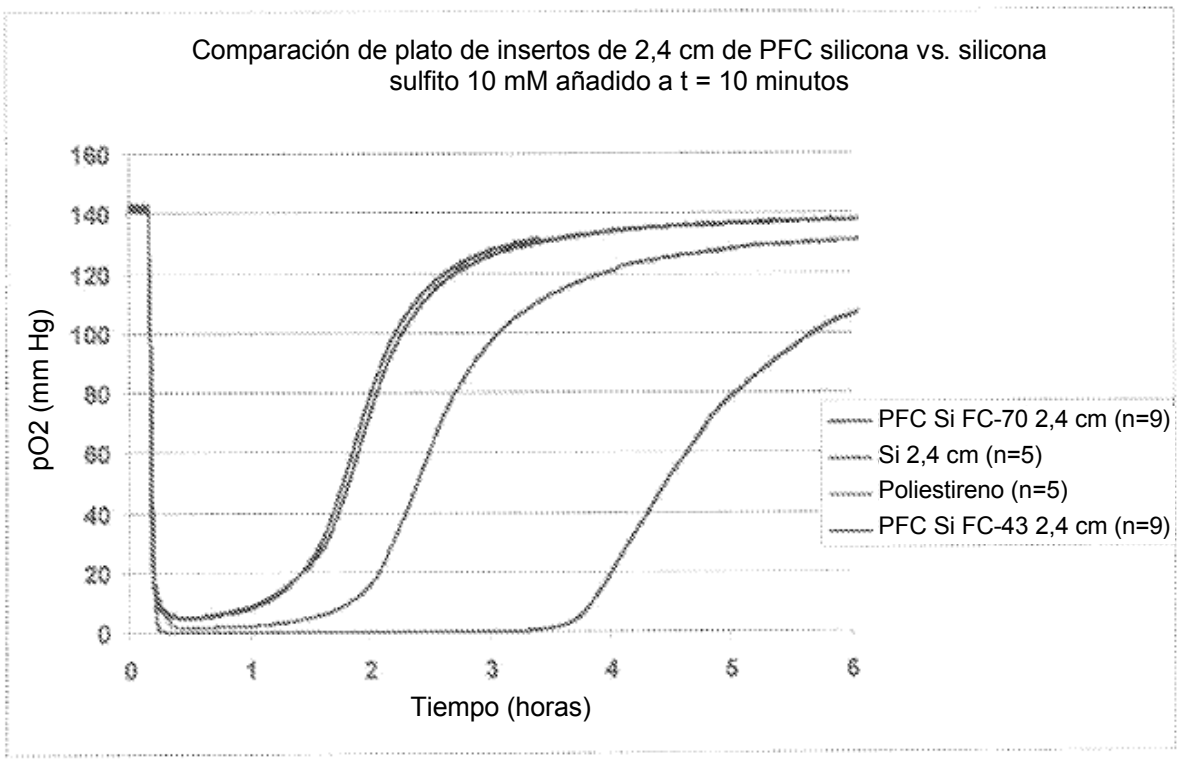

Comparación de plato de insertos de 2,4 cm de PFC silicona vs. silicona
sulfito 10 mM añadido a t = 10 minutos
pO2 (mm Hg)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
Tiempo (horas)
PFC Si FC-70 2,4 cm (n=9)
Si 2,4 cm (n=5)
Poliestireno (n=5)
PFC Si FC-43 2,4 cm (n=9)

FIGURA 3

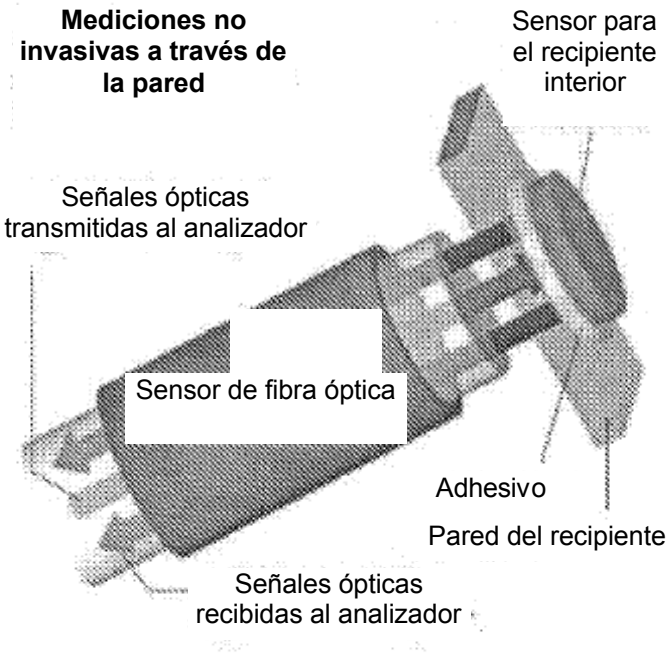
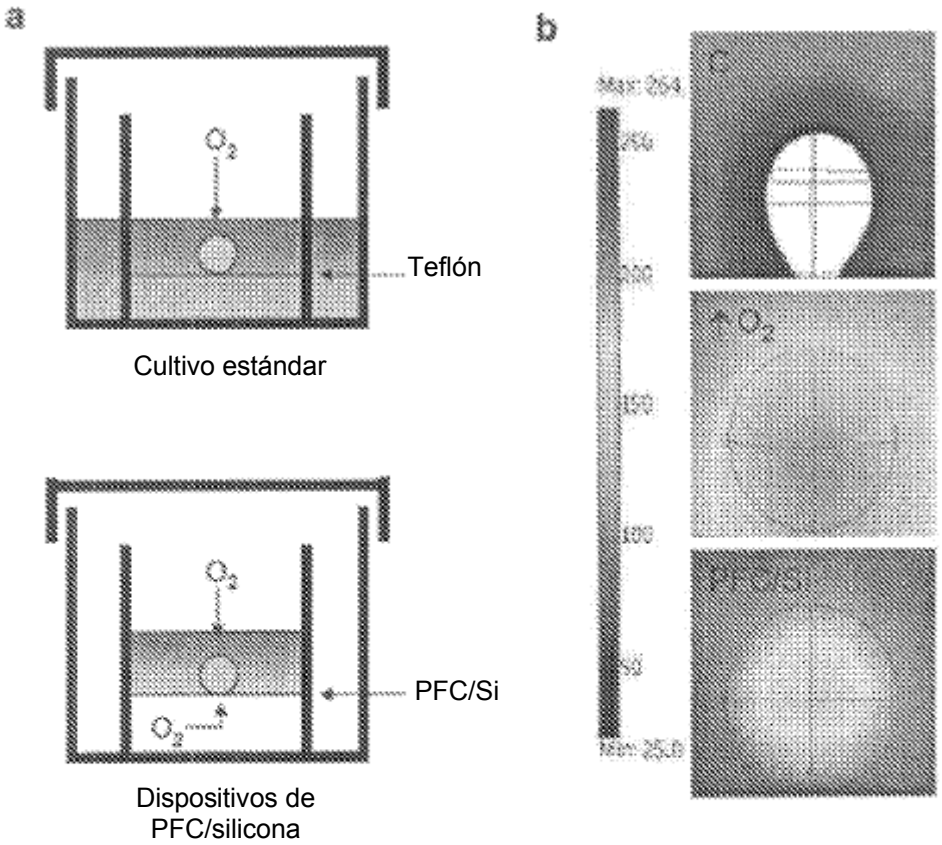
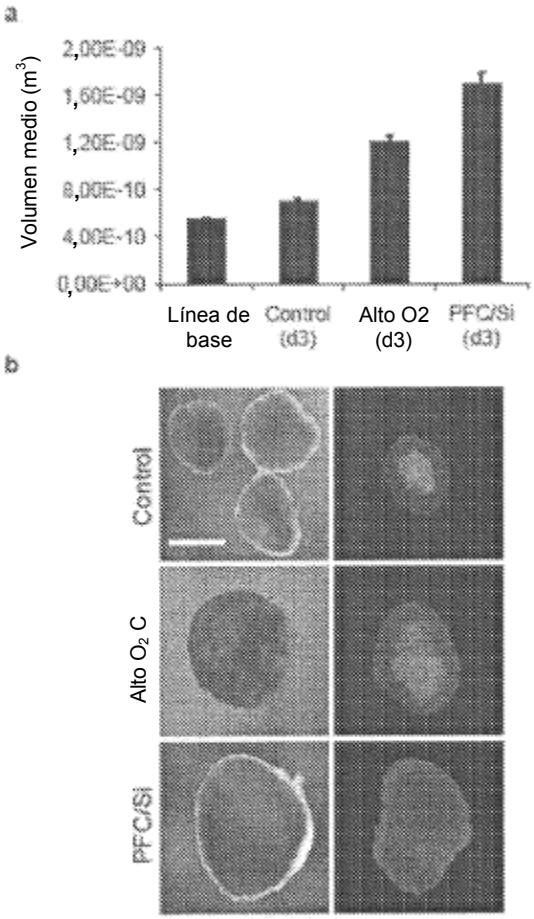

Mediciones no invasivas a través de la pared
Sensor para el recipiente interior
Señales ópticas transmitidas al analizador
Sensor de fibra óptica
Adhesivo
Pared del recipiente
Señales ópticas recibidas al analizador

FIGURA 4



FIGURAS 5A-5B



FIGURAS 6A-6B

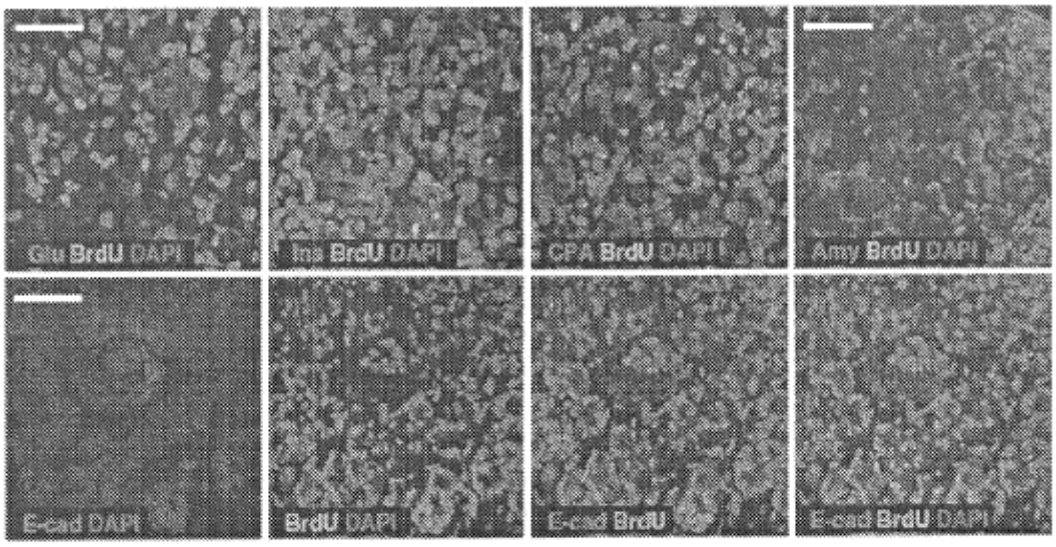
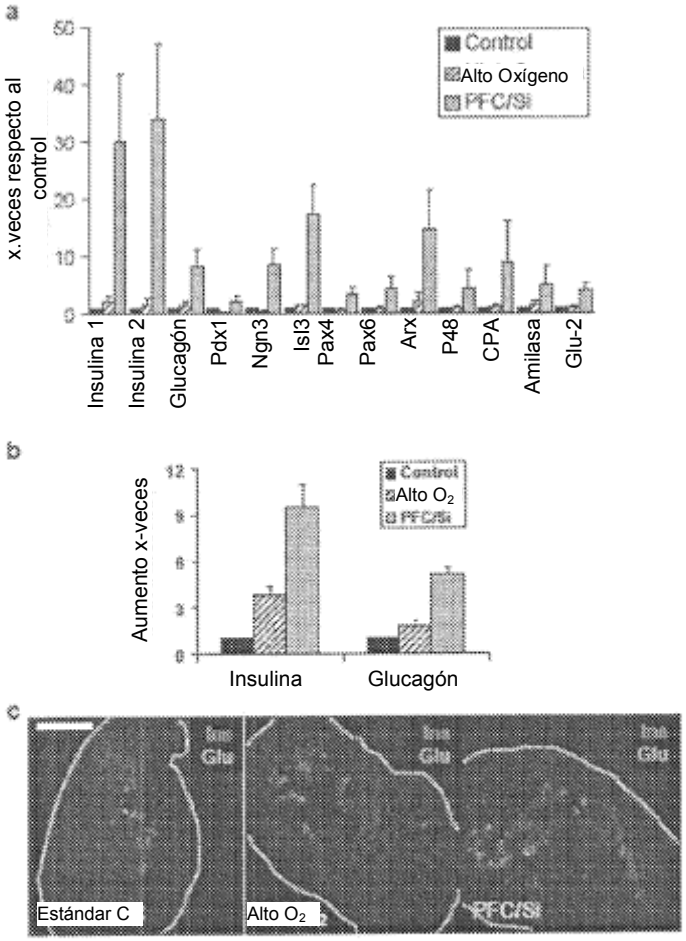
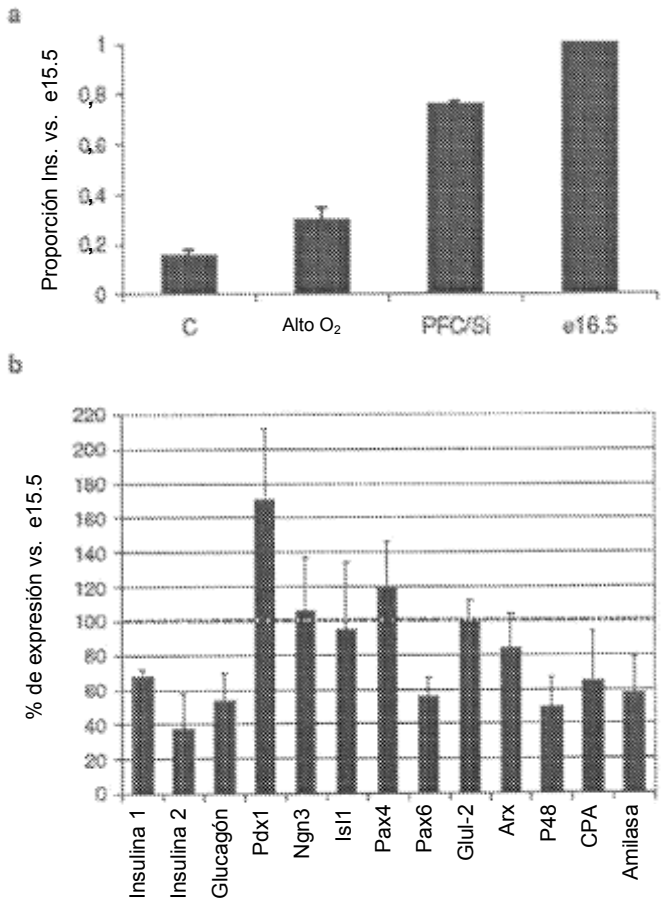

Glu BrdU DAPI
Ins BrdU DAPI
CPA BrdU DAPI
Amy BrdU DAPI
E-cad DAPI
BrdU DAPI
E-cad BrdU
E-cad BrdU DAPI

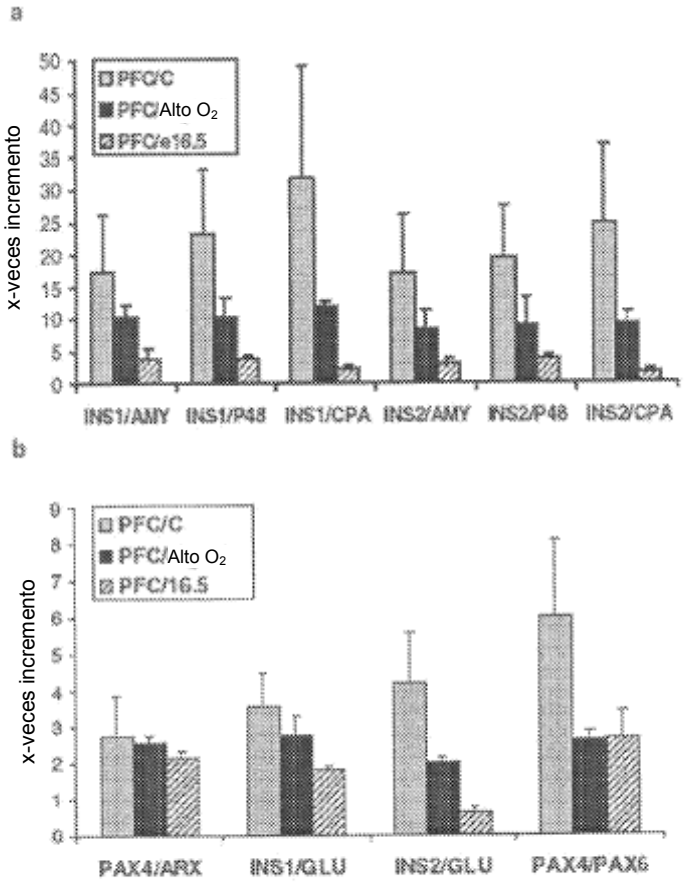
FIGURA 7



FIGURAS 8A-8C



FIGURAS 9A-9B



FIGURAS 10A-10B

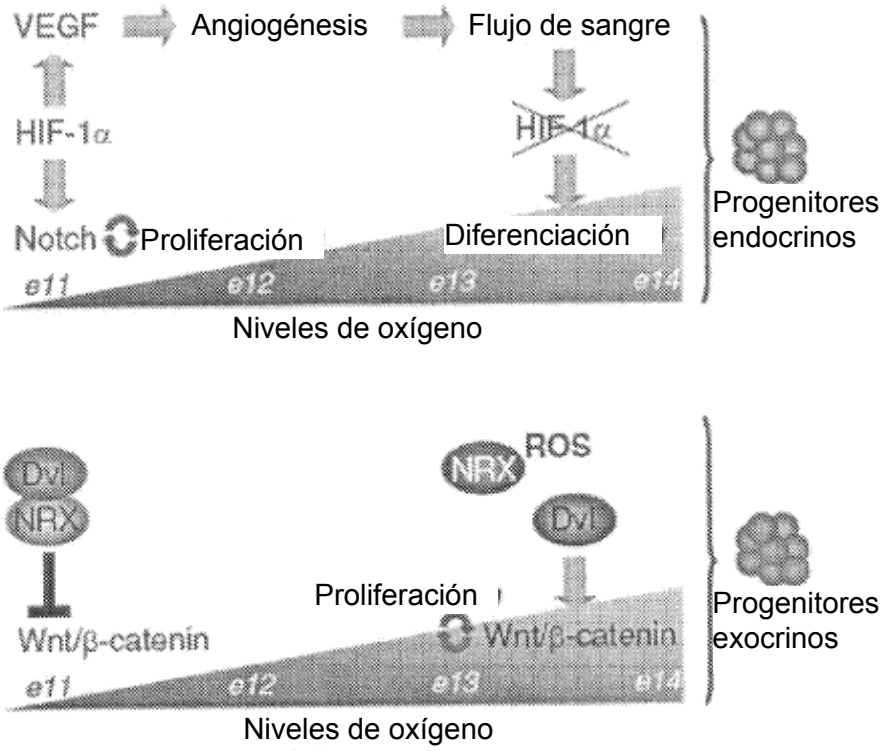

VEGF
Angiogénesis
Flujo de sangre
HIF-1α
HIF-1α
Notch
Proliferación
Diferenciación
e11
e12
e13
e14
Niveles de oxígeno
Progenitores endocrinos
Dvl
NRX
ROS
NRX
Dvl
Proliferación
Wnt/β-catenin
Wnt/β-catenin
e11
e12
e13
e14
Niveles de oxígeno
Progenitores exocrinos

FIGURA 11