



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**Tratamiento de lesiones de cartílago difusas
mediante la preparación de esferoides celulares
con biopolímeros tipo elastina**

Autor/a:

D.^a Araceli Viñuela Rojo

Tutor/a:

D.^a Mercedes Santos García

D.^a Desiré Venegas Bustos

Valladolid, 16 de septiembre de 2023

TÍTULO:	Título del Trabajo de Fin de Grado
AUTOR/A:	D.ª Araceli Viñuela Rojo
TUTOR/A:	D.ª Mercedes Santos García D.ª Desiré Venegas Bustos
DEPARTAMENTO:	Departamento de Química Orgánica

TRIBUNAL

PRESIDENTE:	D.ª Mercedes Santos García
SECRETARIO:	D.ª Ana Testera Gorgojo
VOCAL:	D. Israel González de Torre
SUPLENTE 1:	D.ª Mª Teresa Martín Gómez
SUPLENTE 2:	D.ª Matilde Alonso Rodrigo

FECHA:

CALIFICACIÓN:

AGRADECIMIENTOS

Únicamente quería dedicar una pequeña sección a agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y han formado parte de este TFG.

Dar las gracias a BioForge por la increíble oportunidad de trabajar con ellos y desarrollar mis capacidades en su laboratorio, pero sobre todo agradecer a mis tutoras, Mercedes Santos y Desiré Venegas por su ayuda y dedicación a lo largo de estos meses de formación y preparación de este trabajo.

Hacer una mención a mis amigos del colegio y de la carrera que me han ayudado a superar momentos difíciles y de estrés con una sonrisa de oreja a oreja.

Por último, agradecer a mi familia, a mi madre Isolina y mi hermana Elsa por su apoyo y confianza en mí a lo largo de estos 4 años que han hecho más fácil y ameno el camino.

Aunque el trayecto hasta aquí no haya sido fácil lo hemos conseguido gracias a todos los que me habéis apoyado y animado siempre.

Gracias.

ÍNDICE

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. INTRODUCCIÓN.....	13
3.1 REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO	13
3.2 POLÍMEROS RECOMBINANTES TIPO ELASTINA (ELRs)	16
3.3 ESFEROIDES MULTICELULARES.....	18
3.4 TÉCNICA LAYER BY LAYER	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1 MATERIALES	23
4.1.1 APARATOS UTILIZADOS.....	23
4.1.2 MATERIALES UTILIZADOS EN LAS MODIFICACIONES QUÍMICAS.....	23
4.1.3 MATERIALES UTILIZADOS EN LA BIOLOGÍA MOLECULAR	25
4.1.4 MATERIALES UTILIZADOS EN EL CULTIVO CELULAR Y FORMACIÓN DE ESFEROIDES.....	27
4.1.5 MATERIALES PARA LA EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	27
4.2 MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	28
4.2.1 BIOLOGÍA MOLECULAR.....	28
4.2.1.1 Transformación a Competent Cells.....	28
4.2.1.2 Digestión con enzimas de restricción	28
4.2.1.3 Electroforesis.....	29
4.2.1.4 Purificación del fragmento de ADN del gel de agarosa (Agarosa Out)	29
4.2.1.5 Ligación.....	29
4.2.1.6 Purificación de plásmido (Protocolo MINIS).....	29
4.2.1.7 Linealización y desfosforilación del plásmido o vector de expresión	29
4.2.2 TÉCNICAS UTILIZADAS.....	30
4.2.2.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [21], [22].....	30
4.2.2.2 Espectrometría de Masas (MALDI-ToF)	31
4.2.2.3 Espectroscopía de Infrarrojos (FTIR)	32
4.2.2.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	33
4.2.2.5 Electroforesis.....	35
4.2.2.6 Activación con plasma.....	37

4.2.2.7	Ángulo de contacto.....	38
4.2.2.8	Microscopía de fluorescencia.....	39
4.2.3	MODIFICACIONES QUÍMICAS	40
4.2.3.1	Modificación química de HRGD ₆ con azidas.....	40
4.2.3.2	Modificación química GTAR con ciclooctinos	41
4.2.3.3	Modificación química del biopolímero HRGD ₆ -N ₃ con el fluoróforo NHS- Fluoresceína.....	42
4.2.3.4	Modificación química del biopolímero GTAR-CC con fluoróforo Cy5-NHS	42
4.2.4	RECUBRIMIENTO SUPERFICIAL LAYER BY LAYER.....	43
4.2.5	ESFEROIDES	44
4.2.5.1	Cultivo celular	44
4.2.5.2	Esferoides	45
4.2.5.3	Viabilidad celular	46
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
5.1	DISEÑO MOLECULAR	48
5.2	MODIFICACIÓN QUÍMICA DE BIOPOLÍMERO TIPO ELASTINA.....	52
5.2.1	Modificación química HRGD ₆ con azidas	52
5.2.2	Modificación química GTAR con ciclooctinos	52
5.2.3	Modificación química HRGD ₆ -N ₃ con fluoróforo NHS-Fluoresceína	53
5.2.4	Modificación química GTAR-CC con fluoróforo Cy5.....	53
5.3	CARACTERIZACIÓN DE LOS ELRs.....	53
5.4	LAYER BY LAYER.....	56
5.5	FORMACIÓN DE ESFEROIDES	60
5.6	VIABILIDAD.....	61
6.	CONCLUSIÓN.....	63
7.	LÍNEAS FUTURAS.....	65
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	66
9.	ANEXO I: RESULTADOS	69
9.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS ELRs	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferencia entre articulación sana y articulación dañada	13
Figura 2. Composición de la matriz extracelular del cartílago.....	14
Figura 3. Terapias de regeneración de cartílago: terapias clínicas (a la izquierda) y terapias basadas en la utilización de MSCs (a la derecha)	16
Figura 4. Código de aminoácidos.....	17
Figura 5. Esquema de la transición de los polímeros tipo elastina en función de la temperatura: a bajas temperaturas las cadenas del polímero interaccionan con el agua y se disuelve, mientras que a alta temperatura las cadenas se pliegan y el polímero transiciona a un estado sólido.	18
Figura 6. Formación y estructura de los esferoides.....	19
Figura 7. Métodos de formación de esferoides con MSCs. (A) Gota colgante o “hanging-drop”. (B) Cultivo en superficie no-adherente o “liquid overlay”. (C) Técnicas de micromoldeado. (D) Cultivo en agitadores. (E) Sistema de cultivo rotatorio. (F) Autoensamblaje en placas de cultivo Primaria. (G) Scaffolds 3D porosos. (H) Uso de láminas celulares basadas en PNIPAAm. (I) Cultivo del pellet por centrifugación. (J) Mejora de la agregación celular mediante fuerza eléctrica, magnética o acústica. (K) Crecimiento monoclonal de esferoides tumorales. (L) Quistes epiteliales polarizados.....	19
Figura 8. Proceso de formación de un esferoide mediante la técnica de gota colgante o “hanging drop”	20
Figura 9. Formación de esferoides mediante la técnica de superficie no adherente o “liquid overlay”	21
Figura 10. Química Click: reacción química entre azida y ciclooctino para dar un anillo triazol (figura hecha con ChremDraw)	22
Figura 11. Aparato de RMN Agilent Technologies	31
Figura 12. Esquema de las fases que tienen lugar en el análisis de MALDI-ToF	32
Figura 13. Imágenes tomadas del aparato de FTIR-ATR utilizado	33
Figura 14. Aparato de DSC utilizado para realizar las pruebas junto con una imagen (a la derecha) de los espacios reservado para colocar la muestra y la referencia.....	35
Figura 15. Esquema de los dos tipos de electroforesis.....	36
Figura 16. Equipo Gel Doc EZ Imager de la casa BIO-RAD, para analizar los geles de electroforesis	37
Figura 17. Aparato Harrick Plasma Cleaner PDC-002	38
Figura 18. Equipo completo utilizado para la activación de superficies: Harrick Plasma Cleaner PDC-002, bomba y bombonas de los gases.....	38
Figura 19. Contact Angle System OCA de la empresa Dataphysics.....	39
Figura 20. Microscopio invertido de fluorescencia, Nikon ECLIPSE Ti.....	40
Figura 21. Modificación química del polímero con grupo azida (figura hecha con ChremDraw).....	41
Figura 22. Modificación química del polímero con grupos ciclooctino (figura hecha con ChemDraw)	42
Figura 23. Modificación química del polímero-azida con el fluoróforo NHS-Fluoresceína (figura hecha con ChremDraw)	42
Figura 24. Modificación química del polímero-ciclooctino con el fluoróforo Cy5-NHS (figura hecha con ChremDraw).....	43
Figura 25. Cámara de Neubauer vista en el microscopio. Se representan marcados con letras los cuadrantes en los que hay que contar las células.....	45

Figura 26. Microscopio confocal Leica DMi8 con la “cage incubator” de la empresa Okolab	47
Figura 27. (A) Esquema de la obtención del inserto. (B) Imagen del gel de electroforesis preparativa después de la digestión con EarI. (C) Imagen del gel de electroforesis preparativa después de cortar la banda que se corresponde al inserto.	48
Figura 28. Esquema e la primera ligación del inserto al pDrive	48
Figura 29. Gel de electroforesis analítica del pDrive + Inserto	49
Figura 30. (A) Esquema de la linealización y desfosforilación del pDrive + Inserto. (B) Imagen del gel de electroforesis preparativa del pDrive linealizado + Inserto.....	49
Figura 31. Esquema de la segunda ligación del inserto inicial con el pDrive+Inserto linealizado	50
Figura 32: Gel de electroforesis analítica del pDrive + Inserto x2.....	50
Figura 33. (A) Imagen del gel de electroforesis preparativa después de la digestión con EarI. (B) Imagen del gel de electroforesis preparativa después de cortar la banda que se corresponde al inserto x2.	50
Figura 34. Esquema de la ligación del inserto final al p7 linealizado.....	51
Figura 35. (A) Imagen del gel de electroforesis analítica del p7+Insertox2. (B) Imagen del gel de electroforesis SDS-PAGE	51
Figura 36. Modificación química del polímero con grupo azida (figura hecha con ChremDraw).....	52
Figura 37. Modificación química del polímero con grupos ciclooctino (figura hecha con ChemDraw)	52
Figura 38. Modificación química del polímero-azida con el fluoróforo NHS-Fluoreceína (figura hecha con ChremDraw)	53
Figura 39. Modificación química del polímero-ciclooctino con el fluoróforo Cy5-NHS (figura hecha con ChremDraw).....	53
Figura 40. Espectro RMN del polímero HRGD ₆ -N ₃ modificado químicamente.....	54
Figura 41. Electroforesis SDS-PAGE del polímero modificado químicamente HRGD ₆ -N ₃ y a la derecha el Marker utilizado con los valores de referencia.....	55
Figura 42. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) de HRGD ₆ -N ₃	55
Figura 43. Espectro infrarrojo de HRGD ₆ -N ₃ modificado químicamente.....	56
Figura 44. Imágenes obtenidas en el ángulo de contacto sobre el cubreobjetos antes y después de activar la superficie con plasma	57
Figura 45. Representación esquemática del proceso seguido para el recubrimiento de bicapas Layer By Layer	58
Figura 46. Imágenes tomadas de los esferoides a las 48 horas de haber sembrado las células	61
Figura 47. Esferoides después de Live and Dead para observar la viabilidad.....	62
Figura 48. Espectro RMN del polímero HRGD ₆ bioproducido	69
Figura 49. Electroforesis SDS-PAGE del polímero HRGD ₆	70
Figura 50. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del HRGD ₆	70
Figura 51. Espectro infrarrojo del polímero HRGD ₆	71
Figura 52. Termograma DSC del polímero HRGD ₆ en MQ a pH=6,84.....	71
Figura 53. Espectro RMN del polímero GTAR bioproducido	72
Figura 54. Electroforesis SDS-PAGE del polímero GTAR.....	73
Figura 55. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del GTAR.....	73
Figura 56. Espectro infrarrojo del polímero GTAR.....	74
Figura 57. Termograma DSC del polímero GTAR.....	74
Figura 58. Espectro RMN del polímero GTAR-CC modificado químicamente	75

Figura 59. Electroforesis SDS-PAGE del polímero GTAR-CC.....	76
Figura 60. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del GTAR-CC.....	76
Figura 61. Espectro infrarrojo del polímero GTAR-CC.....	77
Figura 62. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del HRGD6-N3-F.....	78
Figura 63. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del GTAR-CC-Cy5.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aparatos utilizados a lo largo de los experimentos.....	23
Tabla 2: Reactivos utilizados en el proceso de las modificaciones químicas.....	24
Tabla 3. Disolventes utilizados en el proceso de las modificaciones químicas	24
Tabla 4. Abreviaturas de las moléculas, utilizadas para representar gráficamente las modificaciones químicas que se realizan.....	25
Tabla 5. Enzimas utilizadas en el proceso de biología molecular y sus correspondientes buffers.....	26
Tabla 6. Medios de cultivo utilizados en el proceso de biología molecular	26
Tabla 7. Otros elementos utilizados en el proceso de biología molecular	26
Tabla 8. Buffers utilizados en el proceso de biología molecular.....	27
Tabla 9. Materiales utilizados para el cultivo celular y la formación de esferodios.....	27
Tabla 10. Composición de los geles para electroforesis de proteínas.....	36
Tabla 11. Polímeros de partida utilizados en las modificaciones químicas y acrónimos de los polímeros tras ser modificados	40
Tabla 12. Ángulos medidos antes y después de la activación de superficie	57
Tabla 13. Imágenes tomadas de los cubreobjetos después de la primera prueba de recubrimiento	59
Tabla 14. Imágenes tomadas de los cubreobjetos después del recubrimiento LbL cuando se utiliza la mezcla 1:100 del polímero con Cy5-NHS	60

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación para calcular el número total de células en la dilución.....	45
Ecuación 2: Cálculo del número de lisinas modificadas en HRGD ₆ -N ₃	56
Ecuación 3: Cálculo del número de lisinas modificadas GTAR-CC.....	76

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

RESUMEN

En el presente trabajo Fin de Grado se ha llevado a cabo la preparación de esferoides de células madre mesenquimales, capaces de diferenciarse a condrocitos, para la regeneración de cartílago en lesiones difusas. Asimismo, se ha puesto a punto un método de recubrimiento superficial, Layer-by-Layer, con polímeros tipo elastina, que permitirá un posterior recubrimiento de los esferoides con objeto de hacerlos más estables y robustos. Otro aspecto abordado en este trabajo fue el diseño y producción de un recombinámero tipo elastina (ELR) con una secuencia de adhesión a colágeno tipo II, uno de los componentes principales de la matriz extracelular del cartílago, que permitirá la unión específica al cartílago articular del esferoide recubierto con este biopolímero.

De entre las técnicas utilizadas para la preparación de esferoides, se ha utilizado la técnica de "Liquid Overlay" basada en el autoensamblado de las células al no poder adherirse al sustrato donde son sembradas. De esta manera, se han obtenido esferoides de tamaños diferentes en función de la concentración de células de partida utilizada.

Como método de recubrimiento de los esferoides se podrá utilizar la tecnología Layer By Layer, por lo que se ha llevado a cabo en este trabajo la optimización de dicha tecnología en modelos esféricos y en superficies planas. De entre las interacciones para formar las bicapas de LbL, se ha elegido la conocida "Química Click", por unión entre grupos azido y grupos ciclooctinilo, por lo que se ha llevado a cabo la preparación de los polímeros tipo elastina modificados químicamente, respectivamente, con dichos grupos funcionales.

Asimismo, se ha llevado a cabo la modificación química de los polímeros tipo elastina para su marcaje con grupos fluoróforos, lo que nos ha permitido analizar la viabilidad de las etapas de recubrimiento y, de esta manera, optimizar el método de recubrimiento de las superficies mediante la técnica LbL.

En este trabajo, por tanto, se han preparado los esferoides y optimizado el método de recubrimiento LbL, poniendo así las bases para la investigación posterior conducente a la obtención de dichos esferoides recubiertos con los polímeros tipo elastina para su aplicación posterior en la regeneración de cartílago.

PALABRAS CLAVES

Recombinámeros tipo elastina, esferoides, "Química Click", Layer By Layer, células mesenquimales

ABSTRACT

The present project has carried out the formation of spheroids from mesenchymal stem cells which are capable of differentiating into chondrocytes, for the regeneration of cartilage in diffuse lesions. Moreover, it has been optimized a surface coating method, Layer-by-Layer, using elastin recombinamers which will allow us a subsequent coating of the spheroids in order to make them more stable and robust. The design and production of an elastin-like recombinamer (ELR) with an adhesion sequence to type II collagen, which is one of the main components of the extracellular matrix of cartilage, will allow specific binding of the spheroid coated with this biopolymer to the articular cartilage.

Among the techniques used for the preparation of the spheroids, the “Liquid Overlay Technique” has been used based on the cells’ ability of self-assembly since they cannot stick to the substrate where they are seeded. In this way, spheroids of different sizes have been obtained. depending on the starting cell concentration used.

Layer By Layer technology can be used as a coating method for the spheroids, which is why in this project the optimization of this technology has been carried out in spherical models and on flat surfaces. Among the interactions to form the LbL bilayers, the well-known “Click Chemistry” has been chosen, due to the junction between azido groups and cyclooctyne groups, for which the preparation of chemically modified elastin-type polymers has been carried out, respectively, with these functional groups.

Likewise, the chemical modification of the elastin-type polymers has been carried out for their labeling with fluorophores, which has allowed us to analyze the viability of the coating stages and, in this way, optimize the method of coating the surfaces using the LbL technique.

Therefore, in this project the spheroids have been prepared and the LbL coating method has been optimized, laying the foundations for future research leading to the obtaining of these spheroids coated with elastin-type polymers for their subsequent application in cartilage regeneration.

KEYWORDS

Elastin-type recombinamer, spheroids, “Click Chemistry”, Layer By Layer, mesenchymal stem cells.

2. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Grado forma parte de la investigación llevada a cabo en el grupo de investigación Bioforge encaminada a la regeneración de cartílago en lesiones difusas. El objetivo general de este TFG se centra en la regeneración de cartílago mediante la utilización de esferoides de células madre mesenquimales, por su capacidad de diferenciarse a condrocitos, y el posterior recubrimiento de estos esferoides con biopolímeros recombinantes tipo elastina (ELRs) diseñados para la unión específica al cartílago articular. Este recubrimiento superficial posterior con polímeros tipo elastina se realiza con el fin de hacerlos estables y robustos y, además, capaces de dirigirse al cartílago debido a la introducción de una secuencia de adhesión a colágeno tipo II en la estructura del biopolímero.

El objetivo específico de este TFG es la optimización de la tecnología “Layer By Layer” ya que es el método elegido para el recubrimiento de la superficie de los esferoides y que utiliza polímeros tipo elastina en las diferentes capas unidas covalentemente mediante “Química Click”.

Como consecuencia de la elección de la “Química Click” como protagonista de las interacciones químicas necesarias para la formación de las “bicapas”, nuestro objetivo específico en este TFG fue la preparación de los polímeros tipo elastina modificados químicamente para portar sendos grupos azido y ciclooctinilo, respectivamente.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO

Cartílago

El cartílago es un tejido que recubre y protege los extremos de los huesos en las articulaciones y, además, da forma a algunas estructuras como las orejas o la nariz. (Figura 1)

Las principales funciones del cartílago son: proporcionar una superficie de baja fricción facilitando el movimiento entre huesos y evitando rozamientos; y actuar como amortiguador de choques. [1]

Las lesiones de cartílago suelen producirse por un traumatismo, desgaste por rozamiento y sobrecarga y enfermedades autoinmunes. Este tejido, a diferencia del resto, no es capaz de regenerarse debido a la carencia de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. [1]

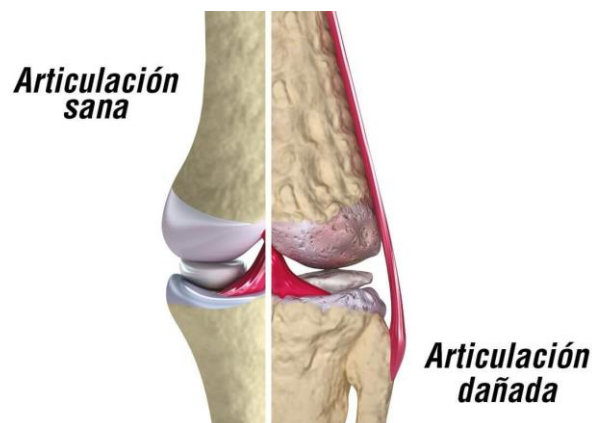


Figura 1. Diferencia entre articulación sana y articulación dañada

La matriz extracelular (MEC) es una compleja red de componentes que se encuentra rodeando a las células de los distintos tejidos. Su composición varía en función del tejido e incluso dentro del mismo tejido pueden darse pequeñas variaciones.

El tejido cartilaginoso se divide en 3 tipos dependiendo de la composición de la MEC: hialino, elástico y fibroso. El cartílago articular es un tipo especial de cartílago hialino que se encuentra alrededor de las articulaciones y es en el que nos vamos a centrar en este trabajo.[1]

La MEC del cartílago posee funciones como: actuar como soporte de las células inmersas en ella y regular procesos celulares incluyendo crecimiento, diferenciación, migración, homeostasis y morfogénesis. [2]

Composición de la matriz extracelular (MEC)

La MEC del cartílago articular está formado por agua, colágeno, proteoglicanos, condrocitos y elastina, entre otros. (Figura 2)

- Colágeno: es la proteína más abundante de la MEC y tiene distintos tipos de entre los cuales el tipo II es el más abundante y forma una gran estructura de red junto con otros tipos de colágeno.
- Condrocitos: son células especializadas cuya función es elaborar los componentes de la matriz extracelular del cartílago y, en un adulto, constituyen aproximadamente el 1% del volumen total de la matriz.
- Proteoglicanos: están formados por una parte proteica y por uno o varios glucosaminoglicanos. Los producen los condrocitos y lo secretan a la matriz. Las concentraciones de estas moléculas disminuyen en función de la edad, lesiones o enfermedades debido a un progresivo deterioro de la matriz. [2], [3]

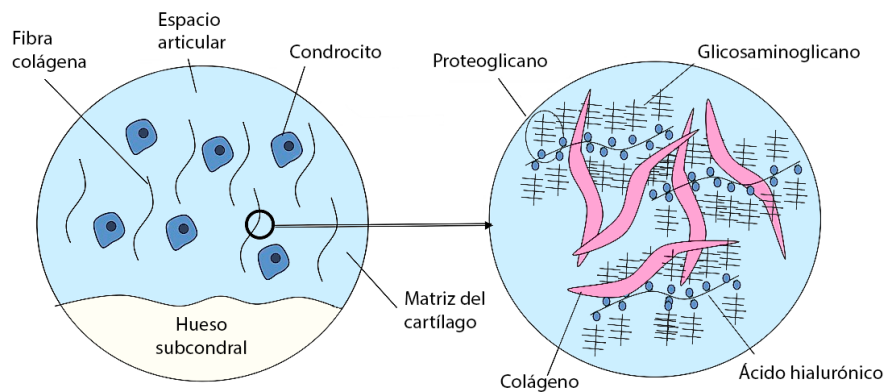


Figura 2. Composición de la matriz extracelular del cartílago

La distinta proporción de los componentes de la matriz determina las propiedades de dicha MEC y, por tanto, del tejido.

Regeneración de cartílago

La regeneración de cartílago consiste en la formación de tejido nuevo que sea indistinguible del tejido original. Por lo general, todos los tejidos poseen una cascada de procesos que los lleva a reparar el tejido dañado por nuevo tejido igual que el que se había dañado. Sin embargo, el cartílago es un tejido avascular, por lo que todos los nutrientes o moléculas necesarias para la regeneración de tejido, que habitualmente llegan a través de la sangre, en este tejido no están accesibles. Esto hace que este tejido tenga una capacidad de reparación muy baja.

Existen dos posibles clasificaciones de las lesiones de cartílago:

La primera permite agrupar las lesiones según la composición de tejido que se ve afectado:[1]

- Lesión en la que se ve afectada la MEC, pero no se dañan las células. Si la lesión es pequeña y la pérdida de componentes es menor que la capacidad de los condrocitos de producirlos, se podrá recuperar el cartílago.
- Lesión que destruye la MEC y parte de las células. La reparación en este caso depende de numerosos factores como la profundidad del daño, el tamaño, la edad o el trauma, entre otros.

La segunda depende de la proporción de tejido cartilaginoso dañado: [4], [5]

- Lesión local: es aquella que está localizada en un área concreta del cartílago y que no se ha extendido, es decir, hay zonas del tejido cartilaginoso que permanecen sanas.
- Lesión difusa: se considera difusa cuando la zona de lesión no se limita a una zona en específico. Pueden estar afectadas muchas áreas o todo el tejido cartilaginoso.

Las lesiones difusas son más difíciles de tratar ya que en muchas ocasiones, como la osteoartritis, presentan un cartílago totalmente dañado, por lo que las técnicas existentes para lesiones localizadas no son lo suficientemente eficientes. La reparación del cartílago depende en gran medida de la cantidad de tejido sano que rodea a la lesión. En una lesión difusa la cantidad de cartílago sano es muy pequeña o inexistente por lo que resulta un gran reto su reparación, y las convierte en un importante desafío en la investigación. [5]

Existen numerosos tratamientos quirúrgicos entre ellos podemos destacar: la mosaicoplastia, consistente en reparar la lesión con cartílago de otra parte del cuerpo; los implantes de fibras de carbono que actúan como scaffolds para dirigir la regeneración de cartílago; los grafts pericondriales para tratar la lesión; la osteotomía que consiste en redistribuir quirúrgicamente las cargas soportadas por la articulación reduciendo así la degeneración del cartílago; o los autoimplantes de condrocitos consiste en coger una pequeña pieza de cartílago de una zona de la articulación que no soporte mucho peso y ponerlo donde está el defecto. [1]

Como se muestra en la Figura 3, entre los tratamientos de regeneración de cartílago destacan las terapias clínicas y las terapias basadas en la utilización de células madre mesenquimales (MSCs). Las células madre mesenquimales son un tipo celular que se encuentran en numerosos tejidos del cuerpo humano. Son células multipotentes, por lo que se pueden diferenciar a distintos tipos celulares, entre ellas a células óseas y cartilaginosas. Las MSCs son muy utilizadas en medicina regenerativa y terapias celulares gracias a su importante capacidad de autorrenovación y diferenciación. Se trata de células sencillas de conseguir, de fácil diferenciación a células cartilaginosas mediante la aplicación de factores condrogénicos y ayudan a la reparación del cartílago. Estas células se introducen en la zona de la lesión de forma que creen un microambiente adecuado para que se pueda regenerar el tejido.

El implante de estas células se puede combinar ya sea con estímulos bioquímicos externos o con la utilización de scaffolds. [6] (Figura 3)

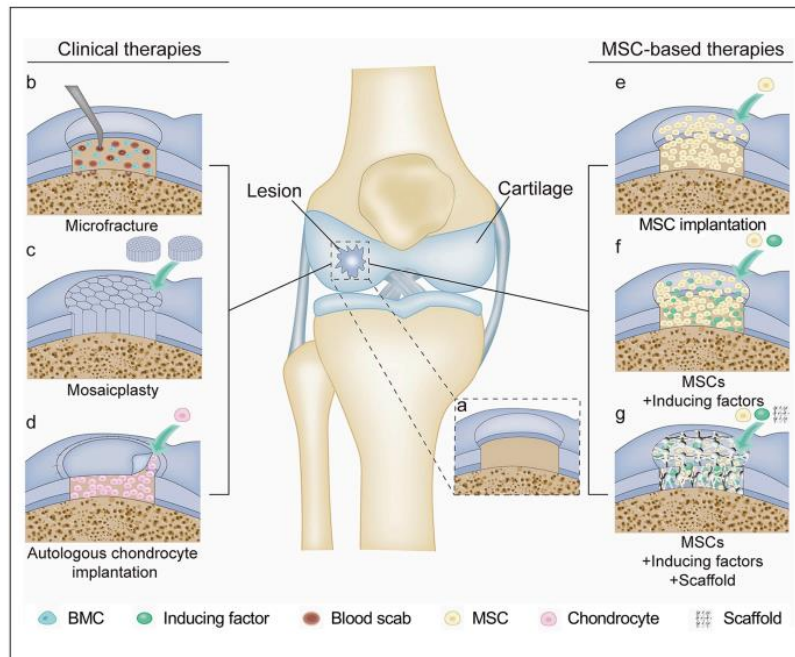


Figura 3. Terapias de regeneración de cartílago: terapias clínicas (a la izquierda) y terapias basadas en la utilización de MSCs (a la derecha)

A pesar de que estas técnicas producen buenos resultados, aún no se ha encontrado un tratamiento que permita regenerar un cartílago igual al que produce el propio cuerpo. Las terapias que utilizan células mesenquimales, hasta ahora, sólo posponen el deterioro del cartílago, pero no consiguen su regeneración. [6]

3.2 POLÍMEROS RECOMBINANTES TIPO ELASTINA (ELRs)

La elastina natural es una de las proteínas más abundante en el cuerpo humano. Se encuentra en la matriz extracelular y es la que proporciona elasticidad a los tejidos. La elastina posee una larga secuencia de aminoácidos entre las que se encuentran distintos motivos que son los que regulan el comportamiento de las células como la adhesión o proliferación, pero también las características y composición de la matriz extracelular. [7]

Los recombinámeros tipo elastina (ELRs) son polímeros proteicos obtenidos por técnicas de ingeniería genética y cuya secuencia se inspira en la de la elastina natural. A lo largo de toda la secuencia de la elastina aparecen numerosos motivos repetidos: VPGVG, IPGVG, VPGG, VGVAPG. De todos estos motivos el utilizado para sintetizar los recombinámeros es VPGXG (siendo V=Valina, P=Prolina, G=Glicina, ver código de aminoácidos Figura 4). La X de la secuencia representa cualquier aminoácido natural excepto la Prolina. La estructura de los recombinámeros suele

ser poli(VPGXG). Dependiendo de cuál sea este aminoácido, el recombinámero tendrá unas propiedades físico-químicas u otras. [8]

Aminoácido	Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1 letra)
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Figura 4. Código de aminoácidos

Una de las características más destacables de los ELRs es que, al contrario que la mayoría de los polímeros, poseen una Transición Inversa con la Temperatura (TIT). Esta propiedad hace referencia a su comportamiento con la temperatura. En una gran mayoría de los casos cuanto mayor es la temperatura, más fácil es disolver una sustancia y, concretamente, las proteínas tienden a desnaturalizarse. Estos polímeros tienen una temperatura crítica, llamada temperatura de transición (T_t). Por debajo de la T_t , el polímero es soluble dando lugar a una disolución de aspecto transparente y líquido. Esta solubilidad se debe a que la cadena se encuentra rodeada de agua, las moléculas de agua rodean los restos apolares de los aminoácidos que forman la secuencia, dando lugar a unas estructuras llamadas clatratos.

Por encima de la T_t , los clatratos se rompen y la cadena se pliega en forma de espiral β dejando los restos polares hacia el interior y los apolares hacia el exterior en contacto con el agua, dando lugar a una agregación de las cadenas y posterior segregación de la disolución [9] (Figura 5)

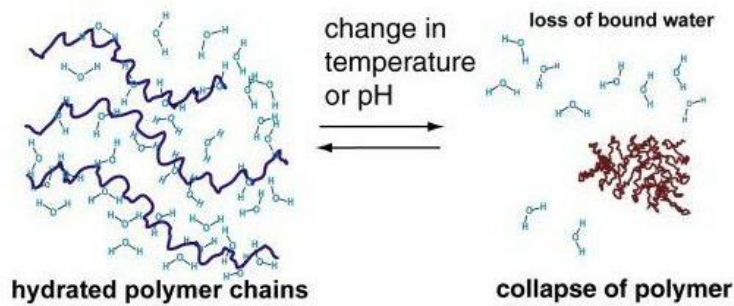


Figura 5. Esquema de la transición de los polímeros tipo elastina en función de la temperatura: a bajas temperaturas las cadenas del polímero interactúan con el agua y se disuelven, mientras que a alta temperatura las cadenas se pliegan y el polímero transiciona a un estado sólido.

3.3 ESFEROIDES MULTICELULARES

Los esferoides son agregados celulares 3D que se pueden obtener en condiciones in vitro mediante el auto-ensamblaje. En el proceso de auto-ensamblaje intervienen las proteínas de la matriz extracelular que servirán de unión entre las células. [10],[11]

A lo largo del proceso de formación del esferoide se pueden diferenciar tres fases:

1. Adhesión inicial: comienza la formación del agregado gracias a la unión integrina-matriz extracelular.
2. Agregación: Aparecen las cadherinas que se acumulan en la membrana plasmática. Las cadherinas son glucoproteínas transmembranales responsables de la unión célula-célula.
3. Se produce la compactación del esferoide: las uniones entre cadherinas de células contiguas permiten tensar las conexiones y que se forme el esferoide. [12], [13]

La formación del esferoide dependerá, por tanto, de las cadherinas y la compactación del esferoide dependerá del citoesqueleto de actina-miosina.

Una vez formado el esferoide se pueden diferenciar dos zonas: la zona externa y la zona interna. Las células que se encuentran en la zona interna están sometidas a unas condiciones más desfavorables que las que se encuentran en la zona más externa, ya que cuanto más cerca están las células del núcleo del esferoide tienen un menor acceso a nutrientes y oxígeno, a los que acceden por difusión desde el exterior del esferoide. Por este motivo, la probabilidad de que se produzca necrosis celular es mayor en la zona interna. [10], [12] (Figura 6)

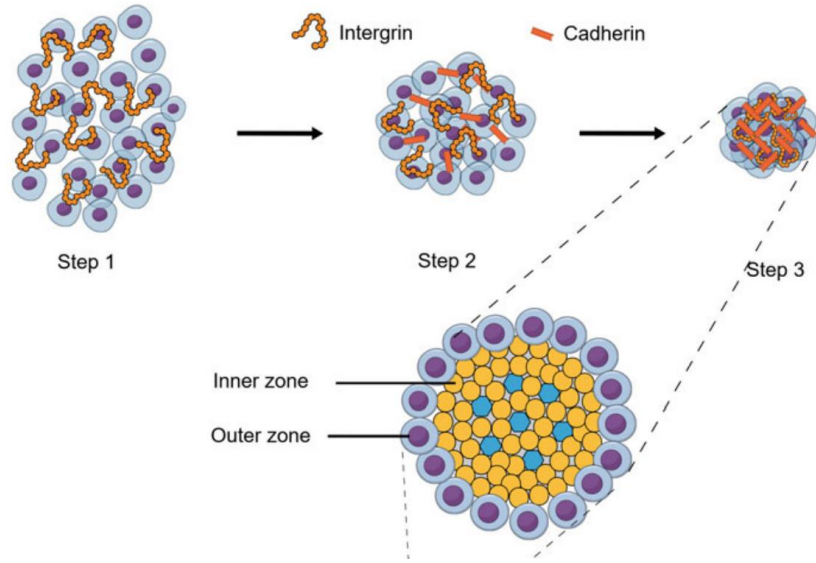


Figura 6. Formación y estructura de los esferoides

En la Figura 7 se muestran los diferentes métodos para la formación de esferoides que comprenden: cultivo de esferoides con células en suspensión, método de la gota colgante, mediante la utilización de scaffolds, o mediante centrifugado, entre otros. [10], [13] [14]

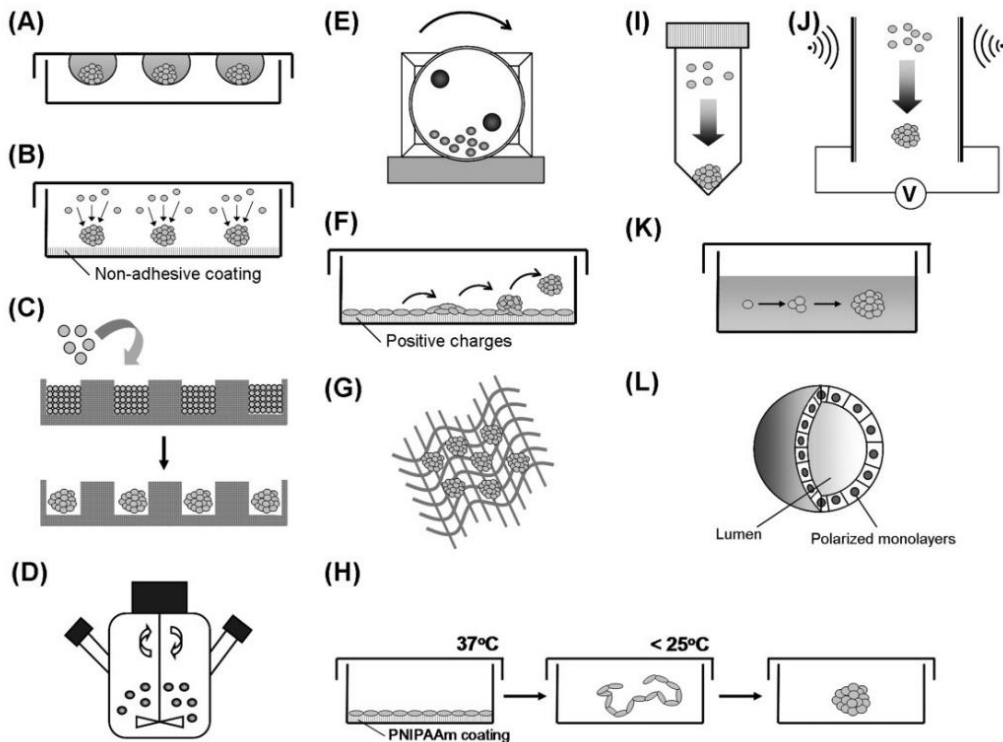


Figura 7. Métodos de formación de esferoides con MSCs. (A) Gota colgante o "hanging-drop". (B) Cultivo en superficie no-adherente o "liquid overlay". (C) Técnicas de micromoldeado. (D) Cultivo en agitadores. (E) Sistema de cultivo rotatorio. (F) Autoensamblaje en placas de cultivo Primaria. (G) Scaffolds 3D porosos. (H) Uso de láminas celulares basadas en PNIPAAm. (I) Cultivo del pellet por centrifugación. (J)

Mejora de la agregación celular mediante fuerza eléctrica, magnética o acústica. (K) Crecimiento monoclonal de esferoides tumorales. (L) Quistes epiteliales polarizados

De todos ellos, nos vamos a centrar en las dos técnicas más utilizadas en la preparación de esferoides: técnica de la gota colgante y técnica de superficie no adherente.

Técnica de la gota colgante o “hanging drop” [15], [16]

Este método surge como una adaptación de la técnica que utilizaban los embriólogos para cultivar cuerpos embrioides.

La técnica consiste en depositar gotas de suspensión celular en la tapa de una placa de Petri. Al poner la tapa en la placa (cerrando la placa), las gotas quedan colgando por la tensión superficial. La gravedad y el ambiente en el que se cultivan, llevan a que las células se condensen y formen los esferoides. (Figura 8)

Se trata de una técnica eficiente, barata y que nos permite controlar el tamaño y el número de células que componen el esferoide. Según los diversos protocolos estudiados, esta técnica requiere de tiempos largos para la formación del esferoide por lo que finalmente nos decidimos a llevar a cabo la formación experimental de los esferoides según la técnica explicada a continuación.

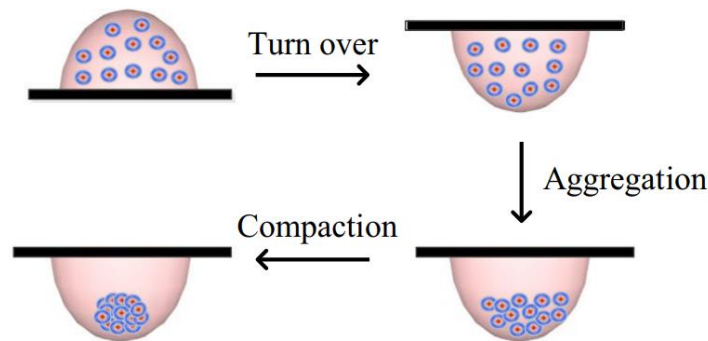


Figura 8. Proceso de formación de un esferoide mediante la técnica de gota colgante o “hanging drop”

Técnica del cultivo en superficie no adherente o “liquid overlay”

Esta técnica se basa en la inhibición de la adhesión de las células a la superficie donde se van a sembrar. Estas superficies tienen un fondo con propiedades no adherentes, lo que favorece la interacción entre las células y, por tanto, la formación de los esferoides. [17]

Este método consiste en poner las células en suspensión en, por ejemplo, los pocillos de una placa de microtitulación que tenga la superficie del fondo de los pocillos modificada para que sea no adherente, y que las células queden en suspensión y totalmente sumergidas en el medio. [15](Figura 9)

Se trata de una técnica eficiente, sencilla, barata y fácil de realizar a gran escala. Sin embargo, la principal desventaja encontrada en la literatura es que el tamaño de esferoides que se obtiene es variable. [15], [16]

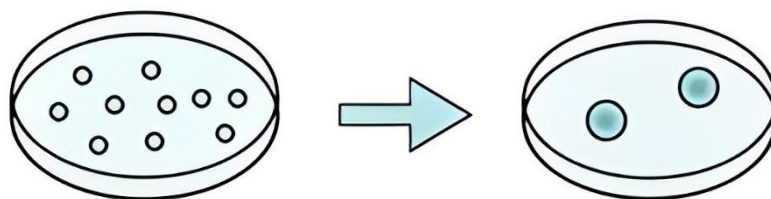


Figura 9. Formación de esferoides mediante la técnica de superficie no adherente o "liquid overlay"

Nos centramos en esta última técnica ya que según la bibliografía consultada es la más reproducible y permite formar esferoides a gran escala.

3.4 TÉCNICA LAYER BY LAYER

Layer By Layer (LBL) es una técnica que permite recubrir superficies de distintas geometrías por inmersión sucesiva de las mismas en disoluciones de diferente composición. El material adsorbido a la superficie en la primera inmersión, o capa, es capaz de interactuar con el siguiente recubrimiento generado al sumergir en la siguiente disolución, generando la unión entre las capas y formando lo que se denomina bicapa. La tecnología LbL más común utiliza sistemas de polielectrolitos. El mecanismo de unión entre capas se basa en las interacciones intermoleculares de van der Waals. Asimismo, pueden estar presentes fuerzas no electroestáticas como los puentes de hidrógeno. La metodología consiste en depositar polielectrolitos en disolución con cargas opuestas, de manera alternativa, sobre la superficie a cubrir. Las bicapas LbL se ensamblan mediante interacción de los componentes con cargas opuestas.

En este TFG, sin embargo, hemos utilizado esta metodología para el recubrimiento final de los esferoides celulares, si bien, utilizando polímeros modificados químicamente capaces de reaccionar entre sí, enlazándose covalentemente y permaneciendo unidos recubriendo las superficies. Los polímeros utilizados son ELRs modificados químicamente de manera que porten grupos complementarios capaces de reaccionar mediante la conocida "Química Click".[18]

La cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre azidas y alquinos para formar triazoles, es una de las reacciones que engloba la "Química Click" (Figura 10). Gracias a su estabilidad en los sistemas biológicos es una reacción utilizada en numerosas aplicaciones biomédicas como en el etiquetado de superficies celulares, funcionalización de superficies celulares o de implantes con ELRs, o en la investigación de fármacos. Originalmente, esta técnica necesitaba la presencia de un ión metálico, generalmente Cu^{1+} , que actuase como catalizador. Sin embargo, el avance de las investigaciones permitió la realización de dicha cicloadición 1,3-

dipolar en ausencia de iones metálicos por medio de la utilización de grupos ciclooctinilo y grupos azido, lo que constituyó la técnica conocida como “catalyst-free cycloaddition”.[19] Este tipo de reacción se caracteriza por formar enlaces covalentes de forma altamente específica sin la necesidad de un catalizador. Además, poseen otras ventajas: son rápidas, eficientes y confiables. [20]

La ventaja de “catalyst-free click” frente a la cicloadición 1,3-dipolar de la química click convencional, es que al no ser necesario el catalizador de cobre, no provoca posibles problemas de citotoxicidad, característica muy relevante en la investigación biomédica.

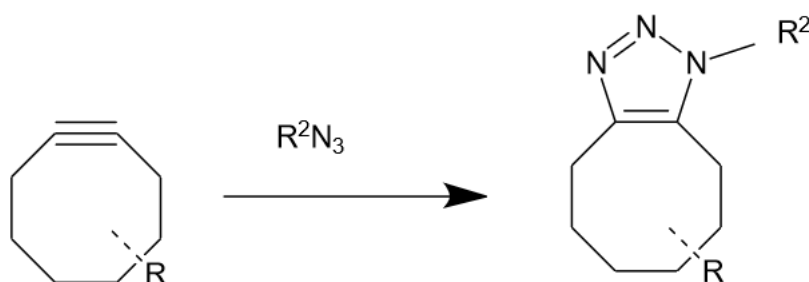


Figura 10. Química Click: reacción química entre azida y ciclooctino para dar un anillo triazol (figura hecha con ChremDraw)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Aparatos utilizados

En la Tabla 1, podemos ver todos los aparatos utilizados a lo largo de los experimentos realizados para el TFG.

APARATO	CASA COMERCIAL
Agitador termomagnético	IKA
Ángulo de contacto	Dataphysics
Balanza	Mettler Toledo
Baño de agua	Fisher Scientific Polytest 8
Campana de flujo laminar	Telstar
Centrífuga	Thermo Scientific
Contador celular automático	Life Technologies
Cubeta electroforética	GE Healthcare
Espectrofotómetro	Molecular Devices
Estufa	Memmert
Incubadora	Braun Biotech
Lector del gel	BIO-RAD
Microscopio confocal	Leica
Microscopio de fluorescencia	Nikon
Microscopio óptico	Leica
Plasma Cleaner	Harrick Plasma
Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Termobloque	Eppendorf

Tabla 1. Aparatos utilizados a lo largo de los experimentos

Además, se ha utilizado frigorífico y congelador, agua destilada y agua ultrapura (MQ), así como Etanol 70% para limpiar los aparatos y mantener la esterilidad

4.1.2 Materiales utilizados en las modificaciones químicas

En las tablas, Tabla 2 y Tabla 3, vemos los reactivos y disolventes utilizados durante las modificaciones químicas.

REACTIVO	PROVEEDOR
2-(Azidoetil)(2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato	Galchimia
(1R, 8S, 9S)-biciclo (6.1.0.) non-4-yn-9-ilmetil succidimil carbonato	Galchimia




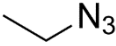

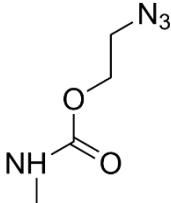

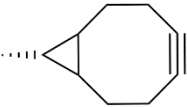
NHS-FLUORESCÉINA 5/6-carboxifluoresceína succinimidil ester (NHS-Fluoresceína)	Thermo Fisher Scientific
Cy5-NHS	Thermo Fisher Scientific

Tabla 2: Reactivos utilizados en el proceso de las modificaciones químicas

DISOLVENTE	PROVEEDOR
Acetona 99%	Scharlau
Agua destilada	BioForge
Agua ultrapura (miliQ)	BioForge
Dietil éter	Thermo Scientific Chemicals
Dimetilformamida	Scharlau
Dimetil sulfóxido duterado (DMSO)	Sigma-Aldrich
Etanol	Scharlau

Tabla 3. Disolventes utilizados en el proceso de las modificaciones químicas

En la Tabla 4 se representa las distintas abreviaturas que se utilizan para representar las modificaciones químicas que se llevan a cabo.

Abreviatura	Molécula
	HRGD ₆ : MGSSHHHHHSSGLVPRGSH-MESLLP- {[(VPGIG)2(VPGKG)(VPGIG)2]2-AVTGRGDSPASS- [(VPGIG)2(VPGKG)(VPGIG)2]2}6-V
	GTAR: MESLLP-[(VPGIG)2(VPGKG)(VPGIG)2]2-YAVTG GTAR SASPASSA- [(VPGIG)2(VPGKG)(VPGIG)2]2}6-V
	Grupo azido 
	
	Grupo ciclooctinilo 


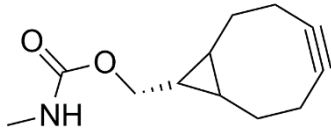

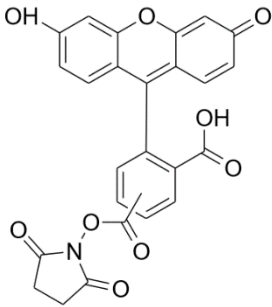

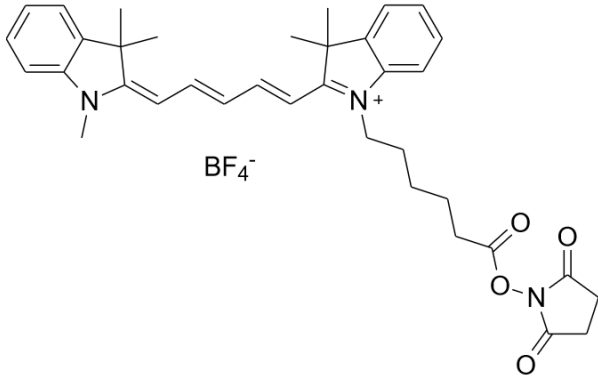
	
	<p>NHS-Fluoresceína</p> 
	<p>Cy5-NHS</p> 

Tabla 4. Abreviaturas de las moléculas, utilizadas para representar gráficamente las modificaciones químicas que se realizan

4.1.3 Materiales utilizados en la biología molecular

Para obtener el polímero que queremos (adhesión a colágeno tipo II), necesitamos obtener la siguiente secuencia de aminoácidos: ((VPGIG)2VPGVP(VPGIG)2WYRGRL(VPGIG)2VPGKG(VPGIG)2)6.

Además, en la Tabla 5, se indican todas las enzimas utilizadas a lo largo de todo el proceso junto con sus correspondientes Buffers.

ENZIMA	BUFFER
Ear1	El buffer dependerá de si la digestión es de 15 minutos o de toda la noche (O/N): - 15 min: FD Green Buffer - O/N: Buffer Tango
Sap1	
Dpn1	
XbaI	
XhoI	
SAP	Buffer SAP
T4 DNA Ligasa	Buffer T4 DNA Ligasa
FastAP	Buffer FastAP

Tabla 5. Enzimas utilizadas en el proceso de biología molecular y sus correspondientes buffers

También se han empleado distintos medios de cultivo (Tabla 6).

MEDIO DE CULTIVO	COMPOSICIÓN (preparar 1 L de medio)
LB	25 g de LB + 1L de Agua destilada
TB	55,85 g de TB + 1L de Agua destilada + 8mL de glicerol + 100µL de antiespumante
LB-agar	25 g de LB + 1L de Agua destilada + 15 g de Agar + 1mL de antibiótico + glucosa 20%

Tabla 6. Medios de cultivo utilizados en el proceso de biología molecular

Por último, en la Tabla 7 se representan otros elementos también empleados en el proceso de biología molecular.

TIPO	MATERIAL/ORGANISMO
Bacteria	Escherichia Coli
Células bacterianas	Competent Cells
	Subcloning Competent Cells
Vectores de clonación y de expresión	Plásmido pUC57
	Plásmido pDrive
	Plásmido p7

Tabla 7. Otros elementos utilizados en el proceso de biología molecular

En la Tabla 8 se representan los distintos buffers utilizados en las electroforesis.

BUFFER	
TAE 1x	Utilizado para el gel de la electroforesis de ácidos nucleicos
Running Buffer	Utilizado para la electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

DNA loading buffer	Utilizado para la electroforesis de ácidos nucleicos, da color a las muestras para poder seguir la electroforesis
Protein loading buffer	Utilizado para la electroforesis SDS-PAGE

Tabla 8. Buffers utilizados en el proceso de biología molecular

4.1.4 Materiales utilizados en el cultivo celular y formación de esferoides

Las células utilizadas para hacer los esferoides y que ha habido que cultivar han sido células madre mesenquimales humanas (hMSCs)

En la Tabla 9, encontramos una lista de los materiales utilizados para poder realizar el cultivo celular y los esferoides.

TIPO DE MATERIAL	MATERIAL	PROVEEDOR
Placas de microtitulación	Placas 96 pocillos	Corning Costar
	Placas 96 pocillos ultra low attachment	faCellitate
Flask de cultivo de células	Flask T25	Thermo Fisher Scientific
	Flask T75	
	Flask T175	
Pipetas	Pipetas 2, 5, 10 y 25 mL	Thermo Fisher Scientific
	Micropipetas	
	Pipetas Pasteur	
Medio cultivo celular	DMEM 1g/L glucosa	Corning
	FBS (Suero Bovino Fetal)	Thermo Fisher Scientific
Enzima	Tripsina	Corning
Antibiótico	Penicilina/Estreptomina	Thermo Fisher Scientific
Tampón	PBS	Thermo Fisher Scientific

Tabla 9. Materiales utilizados para el cultivo celular y la formación de esferoides

4.1.5 Materiales para la evaluación de la viabilidad celular

Para realizar la curva patrón, se utilizarán células mesenquimales, iguales a las que se utiliza para hacer los esferoides, placas de microtitulación de 96 pocillos. Además, se necesita un kit del reactivo Alamar Blue, Tripán Blue y Live and Dead que nos permitirá medir la viabilidad de las células y esferoides.

4.2 MÉTODOS Y TÉCNICAS

4.2.1 BIOLOGÍA MOLECULAR

La biología molecular es una rama de la biología que engloba numerosas técnicas con el fin de entender los mecanismos moleculares que hay detrás de los procesos celulares.

En este caso cuando hablamos de biología molecular, nos referimos concretamente al conjunto de técnicas y herramientas que nos permiten obtener la secuencia de aminoácidos que nos interesa y que posteriormente podremos llevar a bioproducción para obtener el polímero.

4.2.1.1 Transformación a Competent Cells

- Transformación a XL1-Blue Subcloning-Grade Competent Cells

Una vez recibido el plásmido con la secuencia de interés, se realiza esta transformación ya que permite clonar de forma rápida dicho plásmido que contiene la secuencia del polímero. El plásmido de partida es pUC57. Estas Competent Cells poseen una eficiencia de $\geq 10^6$ cfu/ μ g, siendo cfu las unidades formadoras de colonias. Para llevar a cabo la transformación, se debe seguir el protocolo proporcionado por el proveedor.

- Transformación a XL1-Blue Competent Cells

Una vez realizada la ligación se realiza esta transformación ya que permite clonar de forma rápida dicho plásmido que contiene la secuencia del polímero. El plásmido de partida es pUC57. Estas Competent Cells poseen una eficiencia de $\geq 10^8$ cfu/ μ g, siendo cfu las unidades formadoras de colonias. Para llevar a cabo la transformación, se debe seguir el protocolo proporcionado por el proveedor.

- Transformación a BLR Competent Cells

Una vez que tenemos el inserto en el plásmido p7, se hace la transformación a BLR para posteriormente comenzar la bioproducción del polímero. Las BLR son células bacterianas recA- derivadas de BL21 que mejoran la producción de proteínas a partir de secuencias altamente repetitivas. Se trata de una variante de Escherichia Coli que permite introducir ADN y reproducirlo de forma más rápida.

4.2.1.2 Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción van a cortar el plásmido en distintos puntos al reconocer secuencias diana, dejando un fragmento de ADN que contiene el segmento de interés y van variando en función de cual sea el objetivo de la digestión: clonación,

linealización u obtención del inserto. Posterior a la digestión se realiza la electroforesis.

4.2.1.3 Electroforesis

Electroforesis de agarosa: se utiliza para separar fragmentos de ADN después de una digestión enzimática. Esta electroforesis puede ser analítica o preparativa.

- Electroforesis analítica se utiliza después de las ligaciones y extracción del ADN plasmídico a partir de distintas colonias para asegurarnos de que el plásmido ha introducido el inserto de interés. Para la formación del gel, mezclamos TAE 1x y Agarosa y calentamos para ayudar a que se disuelva la agarosa. Vertimos la mezcla en un molde y esperamos a que gelifique.
- Electroforesis preparativa se utiliza para obtener el ADN de interés. La formación del gel se lleva a cabo como en la etapa anterior.

Electroforesis de poliacrilamida o SDS-PAGE: se utiliza para separar la mezcla de proteínas. Permite comprobar que la bacteria ha introducido el plásmido con el gen de interés y, además, que se está sintetizando nuestra proteína. Para llevar a cabo este proceso, se sigue el protocolo indicado por el fabricante,

4.2.1.4 Purificación del fragmento de ADN del gel de agarosa (Agarosa Out)

Después de hacer una electroforesis preparativa, obtenemos un fragmento del gel que contiene el ADN que queremos. Este fragmento hay que purificarlo para obtener únicamente el ADN y eliminar los restos del gel. Se hace a través de un kit de purificación, como el PureLink Quick Gel Extraction Kit (Agarosa Out). Para llevar a cabo esta purificación hay que seguir las instrucciones que indica el fabricante.

4.2.1.5 Ligación

Reacción que permite que el inserto se una a un plásmido linealizado (pDrive o p7). Se utiliza la enzima T4 DNA Ligasa con su correspondiente buffer y se deja que actúe la enzima 1 hora a 22°C.

4.2.1.6 Purificación de plásmido (Protocolo MINIS)

Nos permite obtener y purificar el ADN plasmídico a partir de un cultivo bacteriano. Se utilizan kits como NucleoSpin Plasmid (Protocolo MINIS).

4.2.1.7 Linealización y desfosforilación del plásmido o vector de expresión

La linealización consiste en hacer un solo corte (enzima SapI) en el plásmido de forma que adquiera un aspecto lineal y poder hacer a continuación la desfosforilación de los grupos fosfatos que aparecen en los extremos del plásmido linealizado, evitando su recircularización

4.2.2 TÉCNICAS UTILIZADAS

Se lleva a cabo la caracterización de los polímeros bioproducidos o modificados. La caracterización incluye las siguientes técnicas: resonancia magnética nuclear, espectroscopía de masas, espectroscopía de infrarrojos, electroforesis y calorimetría diferencial de barrido.

4.2.2.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [21], [22]

Es una técnica que nos permite conocer la estructura y composición de las moléculas. Se basa en la propiedad de algunos núcleos atómicos de actuar como pequeños imanes y se utiliza para estudiar aquellos núcleos que tengan un número de protones impar: ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se disponen al azar. Sin embargo, ante la presencia de un campo magnético externo, se excita a los protones provocando que los espines positivos se orienten en la misma dirección y mismo sentido que el campo magnético vibrando a un nivel de energía inferior; y que los espines negativos se orienten en misma dirección y sentido contrario al campo magnético vibrando a un nivel de energía superior. La diferencia de energía entre estos dos niveles depende del campo magnético. Cuando estos protones vuelven a su estado original emiten una señal que es la que detecta la ^1H -RMN y cuya frecuencia depende de la diferencia entre los niveles de energía.

Este análisis no lo realizamos nosotros directamente, sino que preparamos la muestra (disolviendo 6 mg del polímero en 0,6 mL de DMSO deuterado) y se realiza en los servicios del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid. Como resultado de la prueba se obtiene un espectro que analizamos con el programa MestreNova. El equipo utilizado para realizar esta prueba es un espectrómetro de Agilent Technologies (Figura 11)



Figura 11. Aparato de RMN Agilent Technologies

4.2.2.2 Espectrometría de Masas (MALDI-ToF)

La espectrometría de masas o MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight) es una técnica de caracterización que tiene por principal objetivo obtener el peso molecular del polímero.

El proceso de desorción con láser y asistida por matriz es el que nos permite medir pesos moleculares tan altos.

La muestra se encuentra embebida en una matriz que va a absorber la energía del láser y va a transformar la muestra a estado gas sin someterlo a estrés mecánico debido a la temperatura. [23]

Esta matriz en la que va a estar embebida la muestra tiene que tener unas determinadas características:

- Alta absorción electrónica a la longitud de onda que se vaya a utilizar
- Buena estabilidad en vacío
- Buena solubilidad en disolventes orgánicos que permitan que la muestra se disuelva
- Buena miscibilidad con la muestra en estado sólido

Existen numerosas matrices, sin embargo, no hay un protocolo para decidir qué matriz es la más adecuada para cada polímero.

Generalmente, los iones se producen al someter a la muestra a un láser de nitrógeno que hace que se forme una nube de partículas. De esta nube, se extraen y aceleran

los iones mediante un campo eléctrico. Estos iones tendrán distinta velocidad en función de su relación masa-carga. Cuanto mayor sea el peso molecular menos tiempo de vuelo tiene la molécula y antes se deposita. [24] (Figura 12)

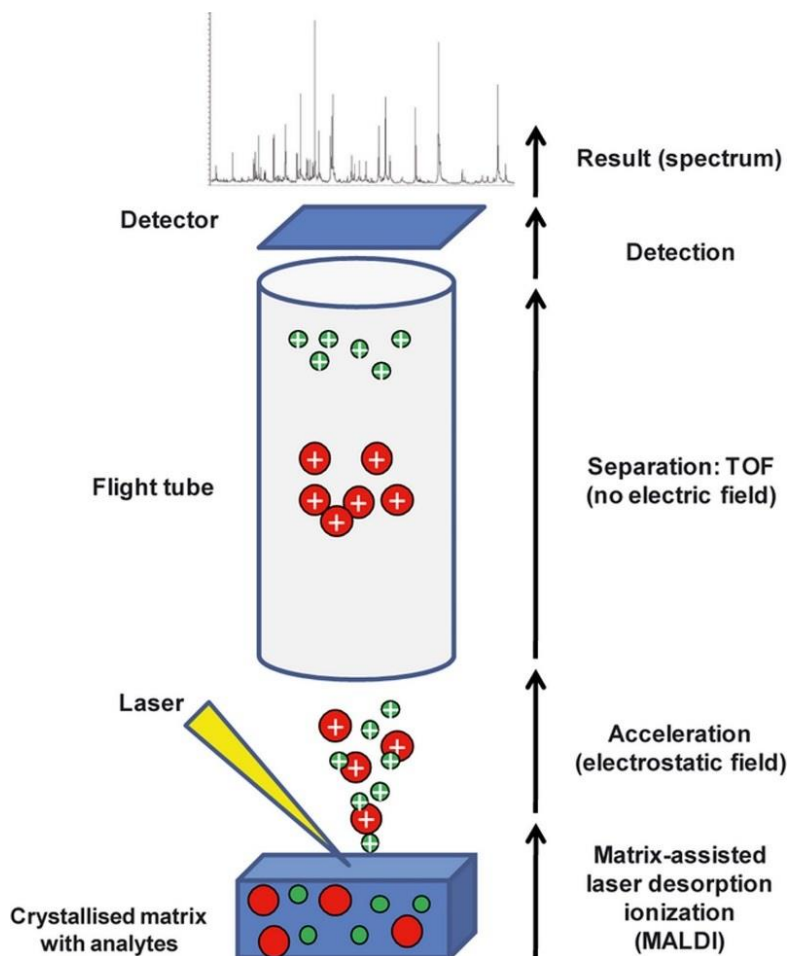


Figura 12. Esquema de las fases que tienen lugar en el análisis de MALDI-ToF

Se trata de una técnica que tiene numerosas ventajas: puede calcular el peso molecular independientemente de la estructura del polímero, es una técnica corta y que no necesita grandes cantidades de polímero para su realización.

El análisis MALDI-ToF se realiza en los servicios del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid.

4.2.2.3 Espectroscopía de Infrarrojos (FTIR)

FTIR es una técnica que nos permite obtener información sobre la estructura molecular del polímero.

Esta técnica se basa en la capacidad que tiene el material, en este caso el polímero, para absorber energía procedente de un haz de luz infrarroja. Este haz produce una vibración en los átomos de las moléculas a una frecuencia determinada, de forma que cuando la frecuencia del haz de luz es igual al de vibración del enlace, es cuando

se produce la absorción de energía. Las frecuencias de vibración de los enlaces dependen del tipo de enlace y la frecuencia a la que absorben energía los grupos funcionales es proporcional a la fortaleza del enlace. [25], [26]

El resultado de esta prueba es un espectro. Cada muestra tiene un espectro de infrarrojos único a partir del cual se puede analizar su estructura química.

Existen distintos tipos de FTIR: transmisión, reflectancia especular, reflectancia difusa, y ATR. La que utilizamos nosotros es ATR (Reflexión Total Atenuada). Es un accesorio que hace que el haz de infrarrojos se refleje en varios espejos y acabe incidiendo en un cristal que está en contacto con la muestra.[25]

Se trata de una técnica rápida, sencilla y exacta. En el caso de los polímeros, una característica muy relevante de esta prueba es que no se destruye la cantidad de polímero que utilizamos, es decir, una vez finalizada la prueba. [26] (Figura 13)

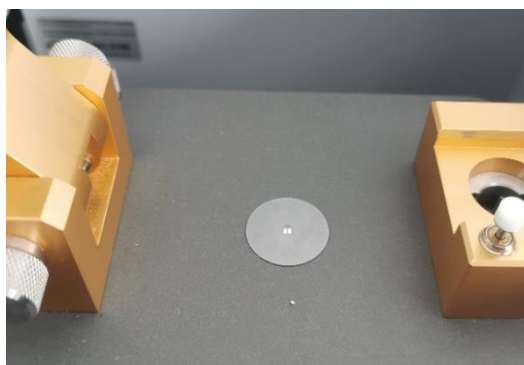
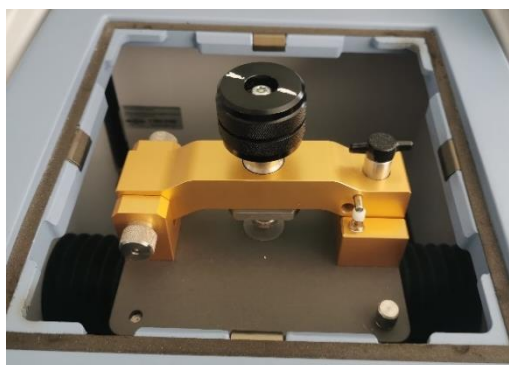


Figura 13. Imágenes tomadas del aparato de FTIR-ATR utilizado

4.2.2.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) es una técnica que nos permite caracterizar el comportamiento térmico del material, determinando la temperatura

de transición de nuestro polímero. Es una técnica con una gran sensibilidad y relativamente corta.

Las siglas DSC, hacen referencia tanto a la técnica, Calorimetría Diferencial de Barrido, como al aparato que permite realizar la prueba, Calorímetro Diferencial de Barrido.

Se basa en la medición de la diferencia de flujo de calor entre la muestra y la referencia necesaria para mantenerlos a la misma temperatura. Esta diferencia puede indicar un proceso endotérmico, es decir, la muestra absorbe más energía que la referencia; o un proceso exotérmico en cuyo caso la muestra necesitará menos energía. [27]

Actualmente, existen dos tipos de instrumentos de DSC: [27], [28]

- Flujo de calor o “heat flux”: consiste en una celda en la cual hay dos soportes donde se colocan tanto la muestra como la referencia separados por un puente. Ambas, muestra y referencia, son sometidas a un programa de temperatura controlada. La diferencia entre el comportamiento de la muestra y la referencia permite determinar las propiedades térmicas de la muestra. Se mide directamente la diferencia de flujo de calor.
- Compensación de potencia o “power compensation: consiste en dos celdas separadas, una para la muestra y otra para la referencia. En este caso se mantienen la muestra y la referencia a una potencia constante y lo que se mide es la diferencia de temperatura entre ellas.

Ambas pruebas originan resultados muy similares. En el laboratorio el aparato disponible es Mettler Toledo 822, que es del tipo flujo de calor. (Figura 14)

Una vez finalizada la prueba obtendremos una gráfica en la que determinamos tanto la temperatura de transición como la variación de entalpía del proceso. La entalpía se calcula integrando el área bajo el pico obtenido y la T_t corresponde al punto más bajo del pico de la gráfica.



Figura 14. Aparato de DSC utilizado para realizar las pruebas junto con una imagen (a la derecha) de los espacios reservados para colocar la muestra y la referencia.

Para preparar la muestra de DSC, se disuelve la cantidad necesaria del polímero en agua miliQ, agua destilada o PBS, para obtener una concentración de 50 mg/ml.

Como vemos en la imagen, tanto la muestra como la referencia se cargan en unas lentejillas y se colocan dentro de la máquina.

4.2.2.5 Electroforesis

La electroforesis es una técnica que permite separar moléculas cargadas. Consta de un gel, que actúa como matriz, el cual se somete a una corriente eléctrica, permitiendo el movimiento de las moléculas. Cuanto más grandes sean y menos cargadas estén estas moléculas, más lentamente se desplazarán a lo largo de los canales del gel. [29], [30]

Existen dos tipos de electroforesis: [29]–[31] (Figura 15)

- Gel de electroforesis para proteínas o SDS-PAGE: se utiliza para separar proteínas dependiendo de las diferencias en las cargas y tamaños. Para formar el gel final, hay 2 pasos, primero se hace el “stacking gel” y a continuación el “resolving gel”. Dependiendo del tamaño de la proteína que se quiera analizar se hace un gel a un porcentaje de entrecruzamiento u otro (Tabla 10). Cuanto más pequeña sea el peso molecular, más alto tendrá que ser el porcentaje de entrecruzamiento del gel.

	RESOLVING GEL			STACKING GEL	
	7,5%	10%	12%	15%	4%
Agua MQ	4,10 mL	3,63 mL	3,25 mL	2,69 mL	1,585 mL
Tris 1,5M pH=8,8	1,88 mL	1,88 mL	1,88 mL	1,88 mL	-
Tris 0,5M pH=6,8	-	-	-	-	625 μ L
Acrilamida 40%	1,4 mL	1,875 mL	2,25 mL	2,81 mL	250 μ L
SDS 10%	75 μ L	75 μ L	75 μ L	75 μ L	18,75 μ L
Persulfato 10%	37,5 μ L	37,5 μ L	37,5 μ L	37,5 μ L	18,75 μ L
TEMED	3,75 μ L	3,75 μ L	3,75 μ L	3,75 μ L	2,35 μ L

Tabla 10. Composición de los geles para electroforesis de proteínas

- Gel de electroforesis para ácidos nucleicos: se utiliza para separar fragmentos de ADN o ARN. Se trata de un gel de agarosa más rápido y fácil de formar que el anterior.

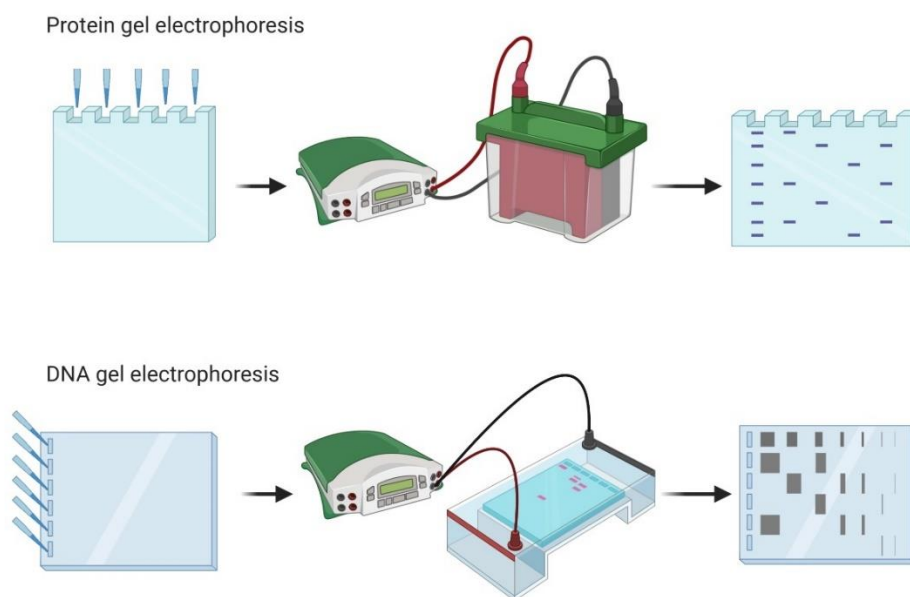


Figura 15. Esquema de los dos tipos de electroforesis

En este caso al tratarse de una caracterización de polímeros, la electroforesis realizada es SDS-PAGE o electroforesis de proteínas o poliacrilamida. Se hace el gel del 12% y cuando se pone la cubeta ponemos una corriente constante de 25 mA y un tiempo de 80 minutos. Si en la cubeta se colocan dos geles de electroforesis se pone una intensidad constante de 50 mA. [31]

Una vez finalizada, extraemos el gel y lo teñimos con una disolución de cobre (para SDS-PAGE) o de SYBR Safe (para el de agarosa) y los dejamos unos 15 minutos. Finalmente se analiza en el ordenador utilizando el aparato Gel Doc EZ Imager, BIO-RAD. (Figura 16)



Figura 16. Equipo Gel Doc EZ Imager de la casa BIO-RAD, para analizar los geles de electroforesis

A continuación, se describen las técnicas utilizadas en los pasos previos a la realización de los recubrimientos y para la evaluación de dichos recubrimientos.

4.2.2.6 Activación con plasma

La activación mediante plasma es un proceso que permite limpiar las superficies de impurezas y, así mismo, modificar dicha superficie. Tras la activación hay un aumento de la cantidad de grupos hidroxilo (-OH) en dicha superficie, haciéndola más hidrofílica y, por tanto, mejorando la capacidad para recubrirlas con polímero.[32], [33]

Para llevar a cabo esta técnica, se ha utilizado gas Argón y gas Oxígeno. El primer paso a realizar consiste en la obtención de un plasma estable, para lo cual necesitamos regular adecuadamente tanto la presión como el flujo del gas. del plasma de argón posee color morado y el de oxígeno es de un color blanco más difícil de observar.

El aparato utilizado es el Harrick Plasma Cleaner PDC-002 junto con dos bombonas de oxígeno y argón y una bomba. (Figura 17 y Figura 18)Figura 17. Aparato Harrick Plasma Cleaner PDC-002



Figura 17. Aparato Harrick Plasma Cleaner PDC-002



Figura 18. Equipo completo utilizado para la activación de superficies: Harrick Plasma Cleaner PDC-002, bomba y bombonas de los gases

Para comprobar que se ha activado la superficie correctamente realizamos medidas del ángulo de contacto.

4.2.2.7 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto es el ángulo que forma un líquido al entrar en contacto con una superficie sólida. Se evalúa a través de una gota de líquido, en nuestro caso agua, y se diferencia entre superficies hidrofílicas, superhidrofílicas, hidrofóbicas o superhidrofóbicas. Las diferencias entre unas superficies y otra se debe a la fuerzas adhesivas y cohesivas que existen entre el líquido y el sólido y dentro del propio

líquido, respectivamente. Ante fuerzas de adherencia altas, el líquido es atraído por el sólido por lo que la gota se extenderá, hablamos de una superficie hidrofílica. Si por el contrario las fuerzas de adhesión son débiles, el líquido se verá repelido y veremos una gota redonda casi perfecta sobre la superficie, hablamos de una superficie hidrofóbica. En cuanto a los valores de los ángulos de contacto, las superficies hidrofílicas tienen ángulos menores de 90° y las superficies hidrofóbicas tienen ángulos mayores de 90° . [34]

Para realizar estas medidas se ha utilizado el aparato Contact Angle System OCA de Dataphysics. (Figura 19)



Figura 19. Contact Angle System OCA de la empresa Dataphysics

4.2.2.8 Microscopía de fluorescencia

Después de haber hecho el recubrimiento mediante la tecnología Layer By Layer, necesitamos comprobar que los polímeros se han adherido adecuadamente. Para ello, llevamos las muestras al microscopio invertido de fluorescencia Nikon ECLIPSE Ti (Figura 20), donde se debería observar un aumento de la fluorescencia a medida que aumenta el número de bicapas. Esta fluorescencia se debe a la utilización de polímeros modificados químicamente con un fluoróforo.

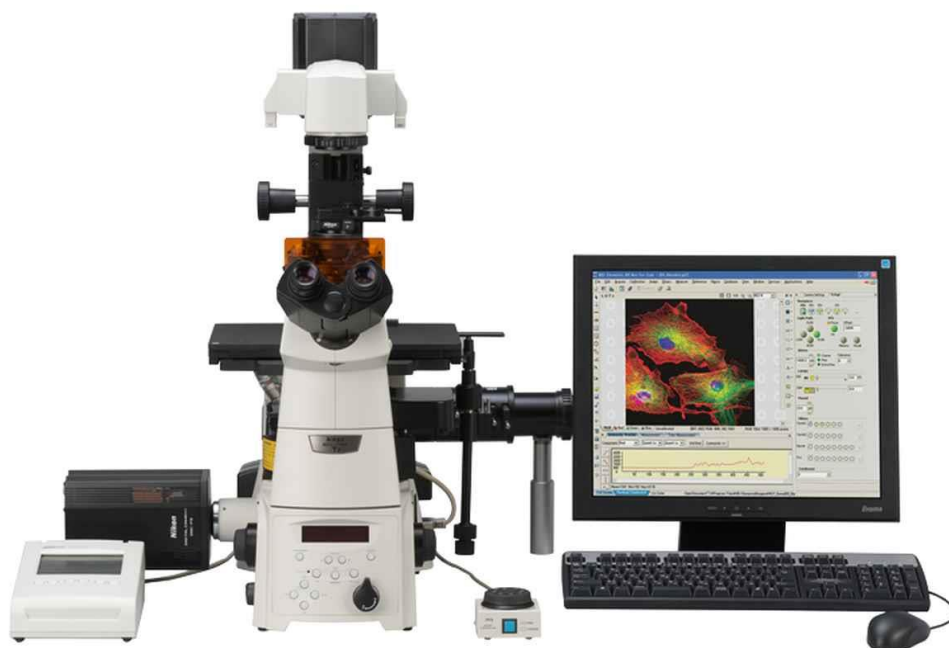


Figura 20. Microscopio invertido de fluorescencia, Nikon ECLIPSE Ti

4.2.3 MODIFICACIONES QUÍMICAS

Se han realizado un total de 4 modificaciones químicas distintas que se puede observar en la Tabla 11:

POLÍMEROS ORIGINALES	POLÍMEROS MODIFICADOS
HRGD6	HRGD6-N3
RGTAR	RGTAR-CC
HRGD6-N3	HRGD6-N3-F
RGTAR-CC	RGTAR-CC-Cy5

Tabla 11. Polímeros de partida utilizados en las modificaciones químicas y acrónimos de los polímeros tras ser modificados

4.2.3.1 Modificación química de HRGD₆ con azidas

En un matraz disolvemos el polímero HRGD₆ (2650,4 mg, 0,044 mmol, PM 60661) en DMF (53 mL), en atmósfera inerte (purgando el aire del matraz con N₂) y a temperatura ambiente. Este ELR posee 24 lisinas de las cuales se van a modificar el 60% por los que el número máximo de lisinas modificadas que se podrían obtener serían 14. Para ello, disolvemos 2-(Azidoetil)(2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (143,6 mg, 0,63mmol, 0,6 eq, PM 228,17) en DMF (1mL) y lo añadimos a través de una aguja y jeringa a la disolución del polímero. Dejamos agitando la mezcla durante 48 horas.

Después de este tiempo se deposita la disolución en falcons (7-10mL). Se añade Et₂O hasta un máximo de 45 mL, apareciendo un precipitado blanco. Se centrifuga a 15000 G durante 40 minutos. El sobrenadante se elimina y el sólido se lava con acetona y se centrifuga a 17500 G durante 30 minutos (3x).

Eliminado el sobrenadante, se seca a presión reducida (0/N) y al día siguiente se redissuelve en agua Mili-Q a 4°C. Por último, se dializa frente a agua destilada (2x25 L) y frente a agua Mili-Q (2x25 L) y se congela y liofiliza obteniendo así el polímero modificado.

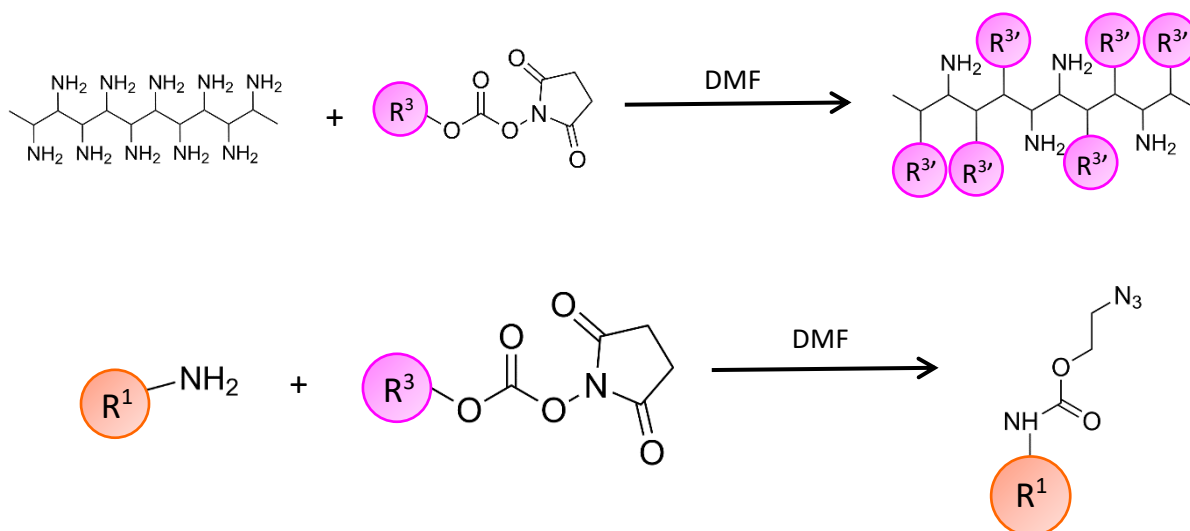


Figura 21. Modificación química del polímero con grupo azida (figura hecha con ChremDraw)

4.2.3.2 Modificación química GTAR con ciclooctinos

En un matraz disolvemos el polímero GTAR (2650,4 mg, 0,061 mmol, PM 43181) en DMF (53 mL), en atmósfera inerte (purgando el aire del matraz con N₂) y a temperatura ambiente. Este ELR posee 24 lisinas de las cuales se van a modificar el 60% por lo que el número máximo de lisinas modificadas que se podrían obtener serían 14. Por ello, disolvemos (1R-8S-9S)-biciclo (6.1.0.) non-4-yn-9-ilmethylsuccinimidil carbonato (143,6 mg) en DMF (1mL) y lo añadimos a través de una aguja y jeringa a la disolución del polímero. Dejamos agitando la mezcla durante 48 horas.

El resto del proceso se realiza de la misma forma que en el apartado 40404.2.3.1

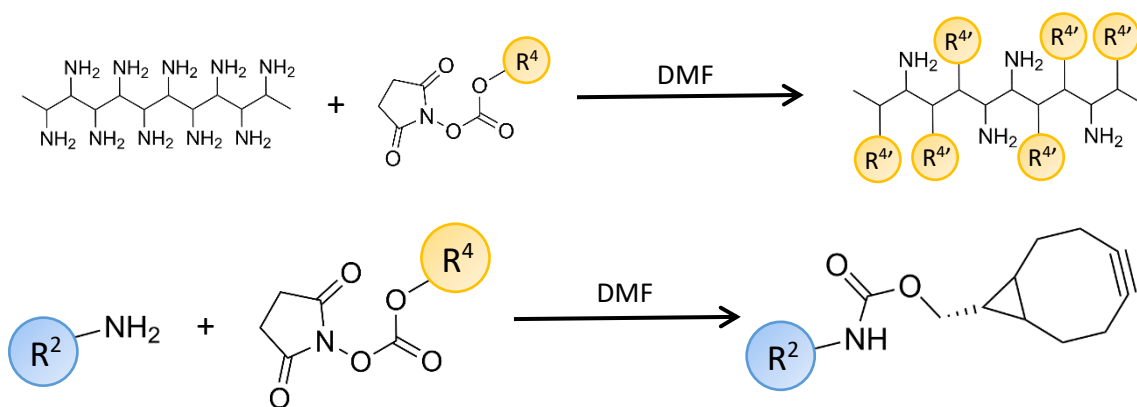


Figura 22. Modificación química del polímero con grupos ciclooctino (figura hecha con ChemDraw)

4.2.3.3 Modificación química del biopolímero HRGD₆-N₃ con el fluoróforo NHS-Fluoresceína

Para hacer esta modificación debemos tener en cuenta que la relación entre el polímero modificado y el fluoróforo es de 1:1, es decir, por cada mol de polímero que queramos modificar tenemos que echar 1 mol de fluoróforo.

En un matraz disolvemos el polímero HRGD₆-N₃ (250 mg, 0,004 mmol, PM 62243) en DMF (5mL), en atmósfera inerte (purgando el aire del matraz con N₂) y a temperatura ambiente. A continuación, disolvemos el fluoróforo (1,90 mg, 0,004mmol, PM 473,4) en DMF (0,5 mL) y se añade a través de una aguja y jeringa a la solución del polímero en DMF. Debido a la presencia del fluoróforo, la reacción se lleva a cabo en oscuridad tapando el matraz de reacción con papel de aluminio. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 48 horas.

El resto del proceso se realiza de la misma forma que en el apartado 40404.2.3.1.40

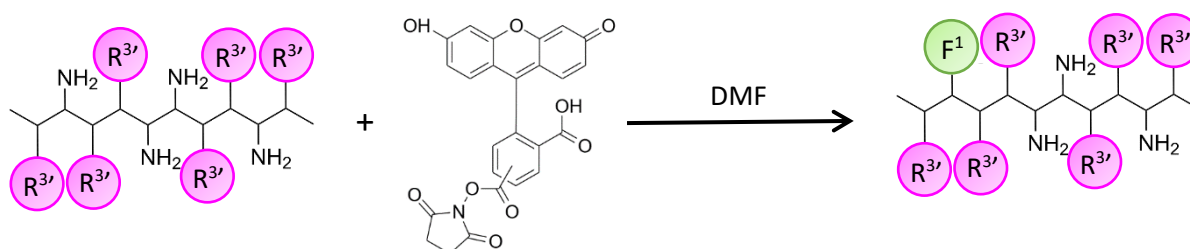


Figura 23. Modificación química del polímero-azida con el fluoróforo NHS-Fluoresceína (figura hecha con ChremDraw)

4.2.3.4 Modificación química del biopolímero GTAR-CC con fluoróforo Cy5-NHS

Para hacer esta modificación química debemos tener en cuenta que la relación molar entre el polímero modificado y el fluoróforo Cy5-NHS es de 1:1, al igual que la modificación anterior.

En un matraz disolvemos el polímero GTAR-CC (250 mg, 0,0058 mmol, PM 43181) en DMF (7,5mL) y DMSO (3mL) en atmósfera inerte (purgando el aire del matraz con N₂) y a temperatura ambiente. A continuación, disolvemos el fluoróforo (3,87 mg, 0,0058mmol, PM 667,54) en DMF (0,5 mL) y se añade vía jeringa a la disolución del polímero en DMF. Como estamos trabajando con fluoróforo debemos tapar el matraz con papel de aluminio. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 48 horas.

El resto del proceso se realiza de la misma forma que en el apartado 40404.2.3.1.

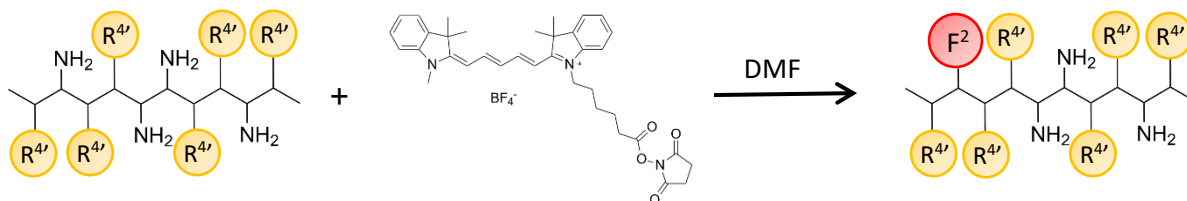


Figura 24. Modificación química del polímero-ciclooctino con el fluoróforo Cy5-NHS (figura hecha con ChremDraw)

4.2.4 RECUBRIMIENTO SUPERFICIAL LAYER BY LAYER

Layer By Layer (LBL) es una técnica que permite recubrir superficies de distintas geometrías utilizando polímeros modificados químicamente capaces de reaccionar entre sí, enlazándose y quedándose pegados recubriendo las superficies.

Inicialmente se lleva a cabo la optimización de esta técnica, se utilizan cubreobjetos que necesitan ser activados con plasma, evaluados mediante el ángulo de contacto y comprobado al microscopio que se han adherido adecuadamente todas las capas.

Una bicapa hace referencia a dos capas unidas entre sí y depositadas secuencialmente sobre la superficie. En este caso, una bicapa estará formada por una capa de polímero modificado con azida y otra capa de polímero modificado con ciclooctino.

Antes de empezar con el recubrimiento, medimos el ángulo de contacto de la superficie y la preparamos activándola con plasma. Colocamos la superficie que deseamos activar en la cámara y aplicamos argón durante 10 minutos y posteriormente aplicamos oxígeno durante otros 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, sacamos la superficie, medimos el ángulo de contacto comprobando que se ha activado correctamente y comenzamos el recubrimiento.

Esta técnica de Layer By Layer, se lleva a cabo por inmersión de la superficie a recubrir en una disolución de los polímeros modificados, primero en una disolución de polímero modificado con azida (HRGD₆-N₃-F) y a continuación en la disolución de polímero modificado con ciclooctino (GTAR-CC-Cy5) y así sucesivamente hasta alcanzar el número de bicapas deseado. Los tiempos de inmersión son de 20

minutos para el primer polímero de la primera bicapa y 5 minutos para el resto de las inmersiones. Se realiza un lavado rápido entre cada inmersión en polímero para eliminar los posibles restos de polímero que no se hayan pegado. Para realizar el lavado se utiliza el mismo disolvente en que se haya disuelto el polímero. Para observar si se han formado bien las bicapas, observamos nuestras superficies al microscopio.

Las bicapas que nos interesa evaluar son la bicapa 1, bicapa 3 y bicapa 5, por lo que al llegar a la bicapa que corresponde observamos el recubrimiento a través del microscopio con un tiempo de exposición de 1 segundo y con una ganancia de 4X y además, medimos el ángulo de contacto.

4.2.5 ESFEROIDES

4.2.5.1 Cultivo celular

En nuestro caso el cultivo celular comienza al descongelar las células mesenquimales (hMSCs) y cultivarlas en flasks proporcionándolas un medio con nutrientes y dejándolas en una incubadora a 37°C, 5% CO₂. Las células se incuban y se dejan crecer hasta conseguir el número adecuado para poder preparar esferoides con ellas.

Se han realizado:

- Cambios de medio: consiste en cambiar el medio a las células cada 3-4 días permitiendo que sigan creciendo y proliferando.
- Pase celular: puesto que las células se adhieren a la superficie de los flasks, para poder utilizarlas o cambiarlas a otro flask en caso de que hayan alcanzado confluencia, es necesario despegarlas utilizando una enzima llamada tripsina. Estas células se centrifugan y resuspenden en medio DMEM, dando lugar a una suspensión celular.
- Conteo de células: nos permite obtener un cálculo aproximado de la cantidad de células que tenemos en una suspensión celular. Para contar las células hemos utilizado la cámara de Neubauer y la tinción Tripán Blue.
 - Tripán Blue: es un colorante que permite teñir las células para evaluar su viabilidad. Las células muertas se teñirán de azul mientras que las vivas se verán brillantes. Esta técnica permite de forma fácil y rápida diferenciar entre células vivas y muertas. El Tripán Blue es una tinción tóxica por lo que no se pueden recuperar las células una vez que se ha finalizado el conteo celular [35]. La relación entre Tripán Blue y la dilución es de 1:1, se mezclan 10µL de Tripán Blue y 10µL de la suspensión celular y se cuentan manualmente en el microscopio utilizando la cámara de Neubauer.

- Cámara de Neubauer: permite contar el número de células que hay y haciendo un simple cálculo podemos saber el número de células que tenemos en nuestra suspensión celular. Si lo vemos en el microscopio vemos algo muy similar a la Figura 25. Los cuadrantes marcados son en los que tenemos que contar las células y posteriormente se hace una operación para calcular la cantidad total de células (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.25**).

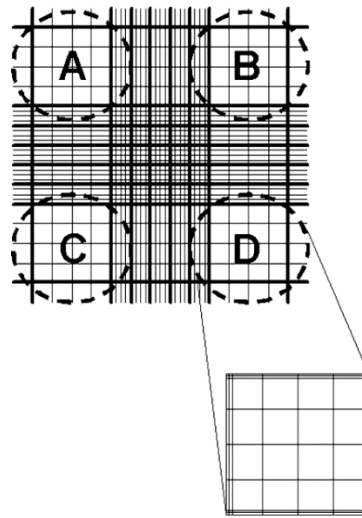


Figura 25. Cámara de Neubauer vista en el microscopio. Se representan marcados con letras los cuadrantes en los que hay que contar las células

$$\begin{aligned} & \text{Number of cells (viable or nonviable)} \\ & = \frac{(A + B + C + D)}{4} \times 10^4 \times 2 \times \text{sample dilution} \end{aligned}$$

Ecuación 1. Ecuación para calcular el número total de células en la dilución

4.2.5.2 Esferoides

De todas las técnicas mencionadas en el apartado 3.3, hemos realizado los esferoides siguiendo la técnica de liquid overlay. De acuerdo con diversos artículos se trata de una técnica sencilla, rápida y a pesar de que existe una diferencia de tamaños entre los esferoides, esta no es muy grande y, por tanto, no resulta significativa ni nos impide seguir con el experimento.

Para ello necesitamos una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo redondo y tratada para evitar la adhesión celular, obligando así a las células a autoensamblarse.

El experimento se basa en optimizar cual es la concentración más adecuada para hacer nuestros esferoides debido a que lo que nos interesa es que las células que forman el agregado estén vivas. Por ello, basándonos en distintos artículos,

decidimos hacer un cribado a concentraciones celulares de 625, 1250, 2500, 5000, 10000 y 20000 células/pocillo.

Para sembrar los esferoides, lo primero que hay que hacer es levantar con la enzima tripsina las células que hemos estado cultivando, y contarlas utilizando la tinción de Tripán Blue y la cámara de Neubauer explicadas en el apartado 4.2.5.1., de esta forma podemos controlar la concentración de los esferoides que vamos a sembrar.

Como las concentraciones que vamos a utilizar para los esferoides son la mitad del anterior, para evitar errores de pipeteo decidimos que lo más sencillo es hacer una dilución seriada 1:2. Para cada serie que hagamos (entendemos por serie un esferoide de cada una de las 6 concentraciones), llenamos 7 pocillos de una placa de microtitulación especial, tratada para ser anti-adherente (6 para esferoides + 1 para el blanco) con 100µL de medio DMEM. A continuación, una vez contadas las células y sabiendo que queremos hacer 3 series sabemos que vamos a necesitar partir de una concentración de 40000 células para cada serie. Como vamos a hacer 3 series lo que hacemos es mezclar los µL correspondientes a 120000 células de la suspensión celular y llevamos el volumen a 300 µL (100 µL para cada serie).

Empezamos con la primera serie: cogemos 100 µL de la mezcla y lo llevamos al primer pocillo, resuspendemos bien y cogemos 100 µL de este primer pocillo que nos llevaremos al segundo pocillo, resuspendemos bien y cogemos 100 µL que nos llevaremos al tercer pocillo y así sucesivamente hasta que lleguemos al último pocillo del cual volveremos a coger 100 µL que se descartarán. De esta manera lo que hemos hecho ha sido ir diluyendo nuestra concentración inicial de 40000 células a la mitad en cada pocillo.

Para la segunda y tercera serie haría igual que la primera.

Una vez sembradas las células, metemos la placa de microtitulación en la incubadora a 37°C y 5% CO₂ durante 48 horas.

4.2.5.3 Viabilidad celular

Live and Dead [36]

La viabilidad celular se va a medir mediante un ensayo de dos colores empleando el kit de citotoxicidad/viabilidad Live and Dead (Invitrogen Thermo Fisher Scientific). Este ensayo discrimina rápidamente las células vivas de las muertas mediante la tinción simultánea con calceína AM (verde fluorescente) para indicar actividad de esterasa intracelular y homodímero-1 de etidio (rojo fluorescente) para indicar la pérdida de integridad de la membrana plasmática.

Se realizan 2 lavados de PBS y se sumergen los esferoides en la disolución, empleando 2µM calceína y 4 µM homodímero-1 de etidio. Se incuba, 40 minutos a 37°C. Una vez pasado ese tiempo se visualizan las células con ayuda del microscopio confocal (Leica TCS SP8). (Figura 26)

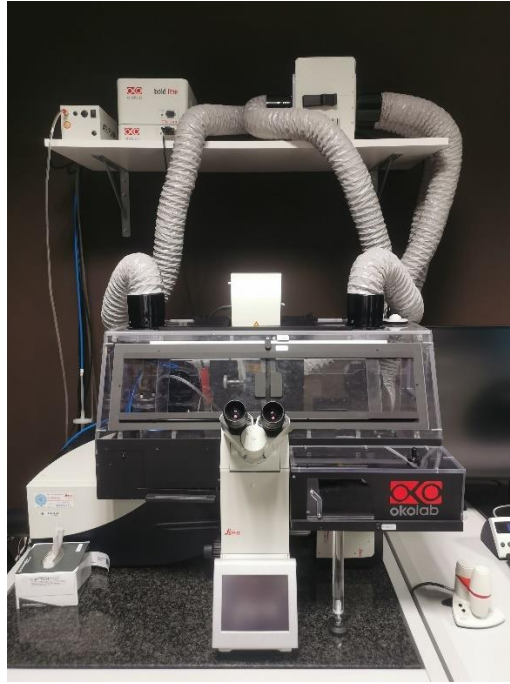


Figura 26. Microscopio confocal Leica DMI8 con la “cage incubator” de la empresa Okolab

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DISEÑO MOLECULAR

Para poder bioproducir el polímero hay que seguir los distintos procesos explicados en el apartado 4.2.1.

El proceso a seguir es el siguiente:

Se recibe un plásmido pUC57 con el inserto que nos interesa, el cual se transforma en las Subcloning Competent Cells siguiendo el protocolo, con el fin de amplificar la cantidad de dicho plásmido. Se realiza la extracción del ADN plasmídico amplificado y se digiere empleando la enzima de restricción *EarI*. Tras la electroforesis preparativa de la digestión anterior, se corta la banda del gel correspondiente al inserto y seguimos el protocolo de Agarosa Out. (Figura 27)

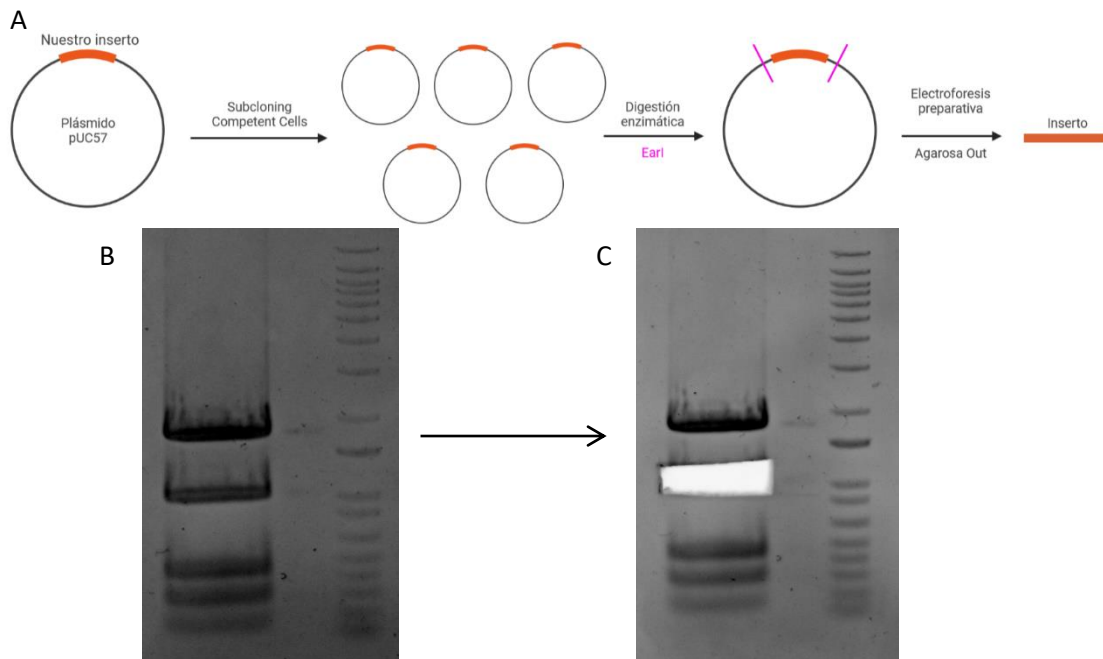


Figura 27. (A) Esquema de la obtención del inserto. (B) Imagen del gel de electroforesis preparativa después de la digestión con *EarI*. (C) Imagen del gel de electroforesis preparativa después de cortar la banda que se corresponde al inserto.

Nuestra secuencia de polímero es dos veces el inserto que hemos recibido. Primero se hace una ligación utilizando la enzima DNA ligasa, para unirlo a un plásmido linealizado, pDrive. (Figura 28)

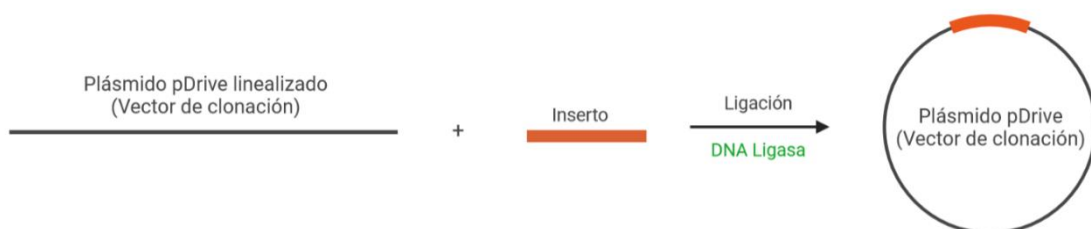


Figura 28. Esquema e la primera ligación del inserto al pDrive

Se comprueba que se ha unido el inserto al pDrive: haciendo la transformación a Competent Cells siguiendo el protocolo MINIS y finalmente haciendo la electroforesis analítica. (Figura 29)

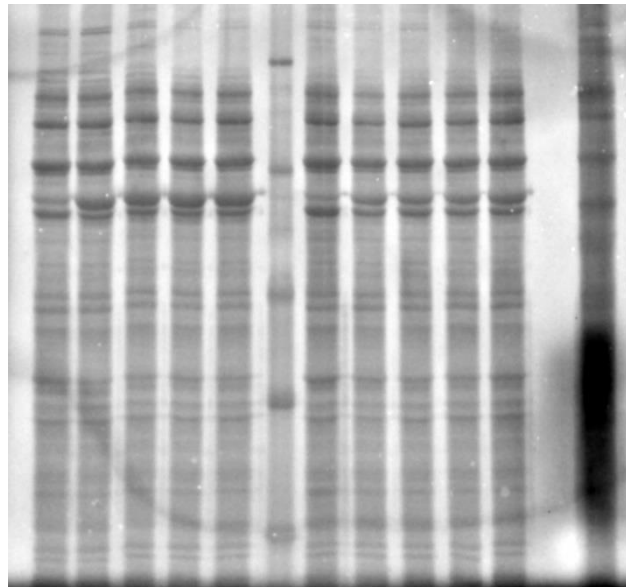


Figura 29. Gel de electroforesis analítica del pDrive + Inserto

Una vez comprobado que está el inserto, tenemos que linealizar el plásmido (pDrive + Inserto) utilizando la enzima SspI que realiza un único corte en el extremo izquierdo del inserto. Después de linealizar hay que desfosforilar los grupos fosfato que aparecen en los extremos del plásmido linealizado utilizando la enzima FastAP y hacemos una electroforesis preparativa. Se vuelve a cortar el trozo del gel donde está la banda que nos interesa y seguimos el protocolo de Agarosa Out. (Figura 30)

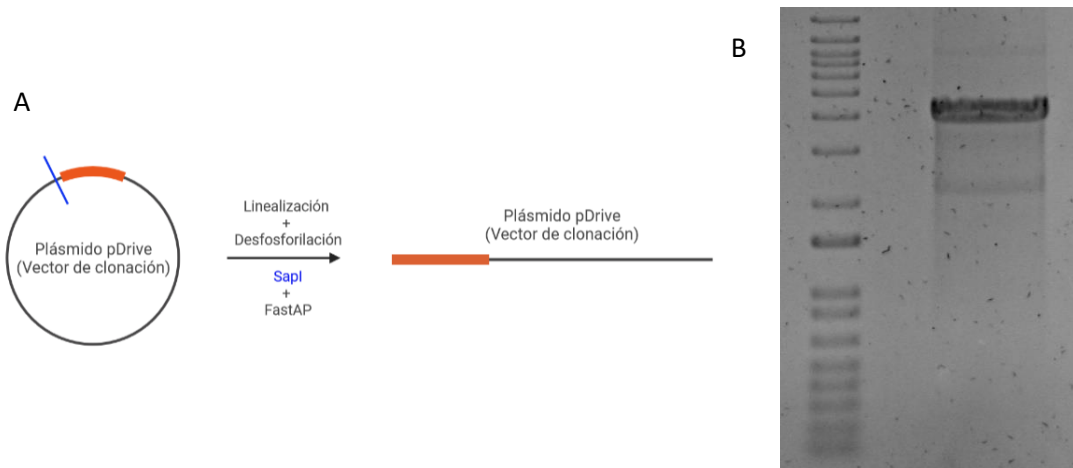


Figura 30. (A) Esquema de la linealización y desfosforilación del pDrive + Inserto. (B) Imagen del gel de electroforesis preparativa del pDrive linealizado + Inserto.

Hacemos una segunda ligación con la enzima DNA ligasa, uniendo el plásmido que acabamos de linealizar con el inserto del principio. (Figura 31)



Figura 31. Esquema de la segunda ligación del inserto inicial con el pDrive+Inserto linealizado

Se comprueba que se ha unido el inserto: haciendo la transformación a Competent Cells siguiendo el protocolo MINIS y finalmente haciendo la electroforesis analítica. (Figura 32)

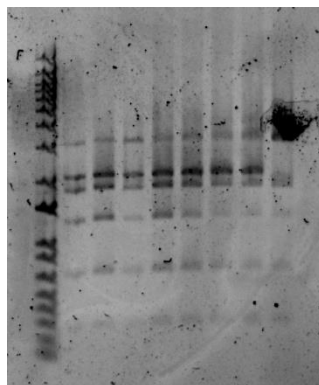


Figura 32: Gel de electroforesis analítica del pDrive + Inserto x2

Una vez comprobado que está el inserto dos veces en el pDrive se hace una electroforesis preparativa utilizando la enzima Ear1 para obtener el inserto. Se vuelve a cortar el trozo del gel donde está la banda que nos interesa y seguimos el protocolo de Agarosa Out. (Figura 33)

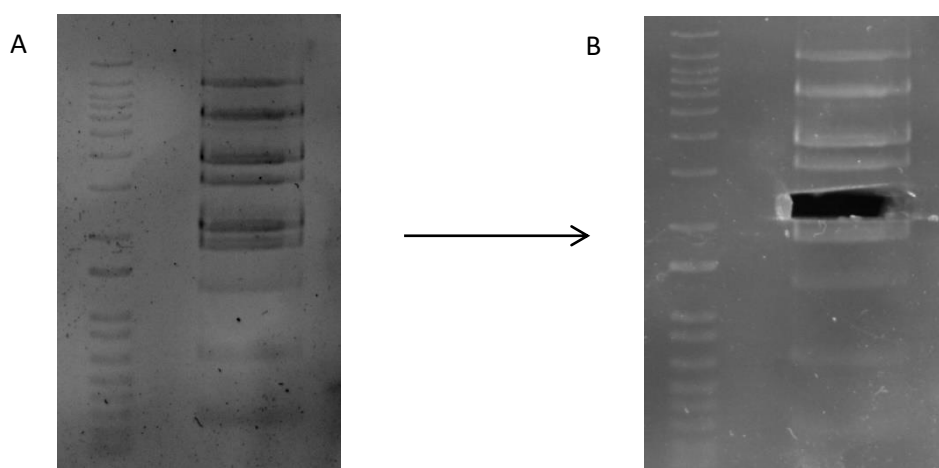


Figura 33. (A) Imagen del gel de electroforesis preparativa después de la digestión con Ear1. (B) Imagen del gel de electroforesis preparativa después de cortar la banda que se corresponde al inserto x2.

Hacemos una ligación entre el inserto que hemos obtenido en el paso anterior y el plásmido p7 linealizado. (Figura 34)



Figura 34. Esquema de la ligación del inserto final al p7 linealizado

Se comprueba que se ha unido el inserto: haciendo la transformación a Competent Cells siguiendo el protocolo MINIS y finalmente haciendo la electroforesis analítica. Se hace la transformación a BLR siguiendo el protocolo y se hace una electroforesis de poliacrilamida (SDS-Page). (Figura 35)

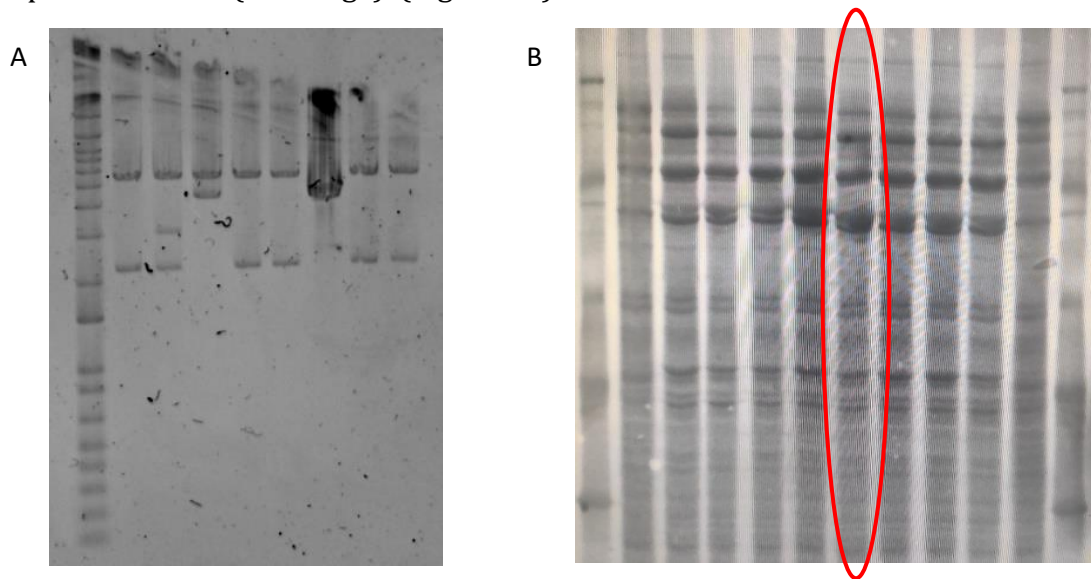


Figura 35. (A) Imagen del gel de electroforesis analítica del p7+Insertox2. (B) Imagen del gel de electroforesis SDS-PAGE

La colonia rodeada en rojo representa la colonia elegida para bioproducir el polímero.

A pesar de haber comprobado que el inserto obtenido está bien, al bioproducirlo no se produce adecuadamente obteniendo muy muy poca cantidad en comparación con la bioproducción del resto de polímeros.

Se pretende realizar el mismo proceso para la obtención del biopolímero de adhesión a condroitín sulfato.

5.2 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE BIOPOLÍMERO TIPO ELASTINA

5.2.1 Modificación química HRGD₆ con azidas

El polímero HRGD₆ ha sufrido una modificación química sustituyendo los grupos aminos de las lisinas por grupos azido. Para ello se modifica el polímero con 0,6 equivalentes de 2-(Azidoetil)(2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (ver Figura 36), siguiendo el protocolo explicado en el apartado 404.2.3.1. Se obtiene un rendimiento químico del 80%.

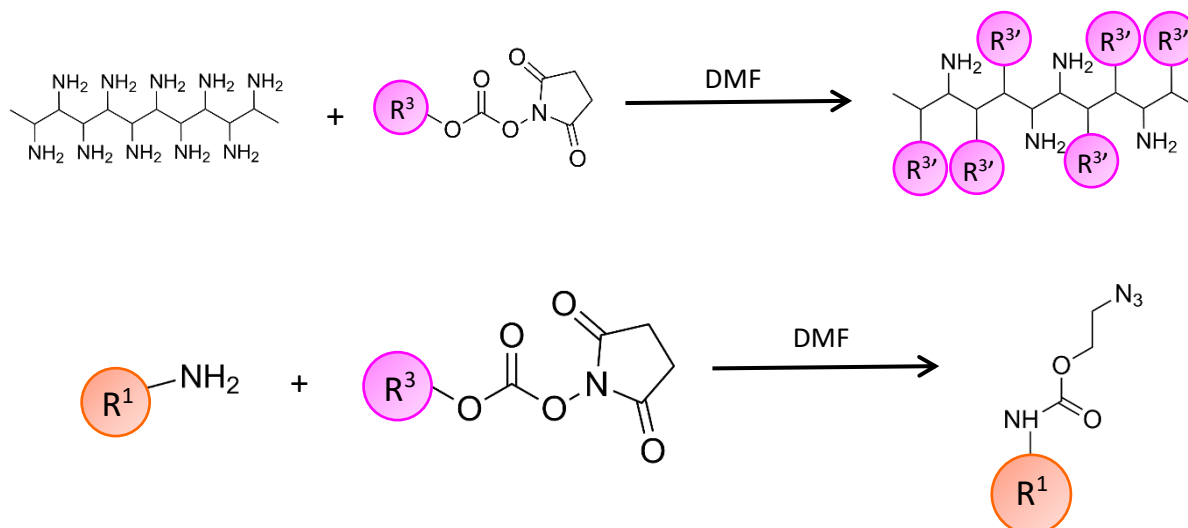


Figura 36. Modificación química del polímero con grupo azida (figura hecha con ChremDraw)

5.2.2 Modificación química GTAR con ciclooctinos

El polímero GTAR ha sufrido una modificación química sustituyendo los grupos aminos de las lisinas por grupos ciclooctino. Para ello se modifica el polímero con 0,6 equivalentes de (1R, 8S, 9S)-bicyclo (6.1.0.) non-4-in-9-ilmetil succinidimil carbonato (ver Figura 37), siguiendo el protocolo explicado en el apartado 4.2.3.2. Se obtiene un rendimiento químico del 76%.

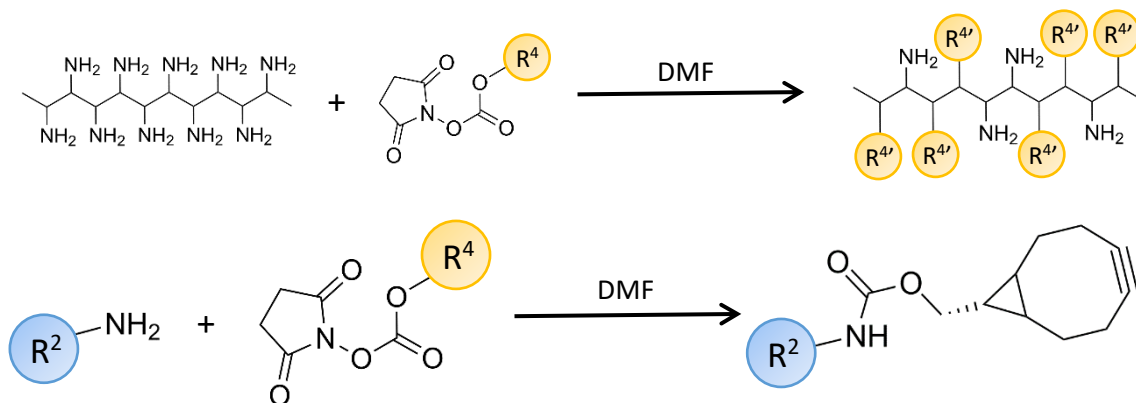


Figura 37. Modificación química del polímero con grupos ciclooctino (figura hecha con ChemDraw)

5.2.3 Modificación química HRGD₆-N₃ con fluoróforo NHS-Fluoresceína

El polímero HRGD₆-N₃ ha sufrido una modificación química añadiendo en algunas de las lisinas moléculas de fluoróforo. Para ello se modifica el polímero con el fluoróforo NHS-Fluoresceína (ver Figura 38), siguiendo el protocolo explicado en el apartado 4.2.3.340. Se obtiene un rendimiento químico del 67%.

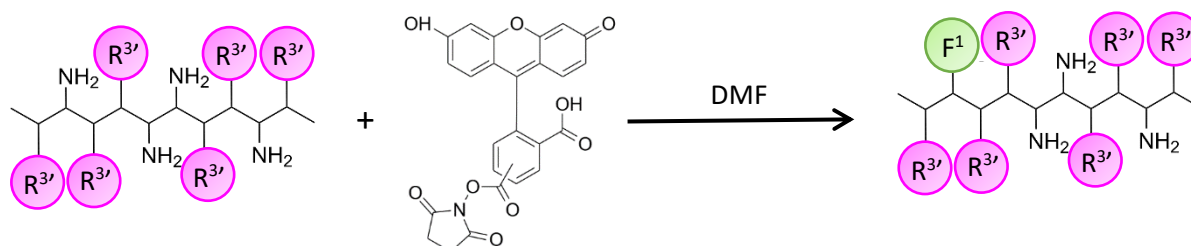


Figura 38. Modificación química del polímero-azida con el fluoróforo NHS-Fluoreceína (figura hecha con ChremDraw)

5.2.4 Modificación química GTAR-CC con fluoróforo Cy5

El polímero GTAR-CC ha sufrido una modificación química añadiendo en algunas de las lisinas moléculas de fluoróforo. Para ello se modifica el polímero con el fluoróforo Cyanine5-NHS (ver Figura 39), siguiendo el protocolo explicado en el apartado 4.2.3.4. Se obtiene un rendimiento químico del 55%.

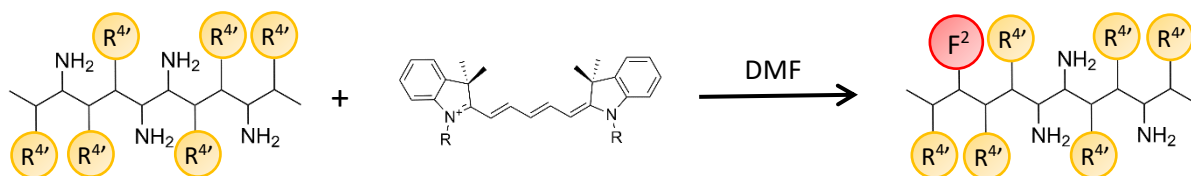


Figura 39. Modificación química del polímero-ciclooctino con el fluoróforo Cy5-NHS (figura hecha con ChremDraw)

5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS ELRs

Una vez obtenido el biopolímero en bioproducción y realizadas las modificaciones químicas de los biopolímeros, se lleva a cabo la caracterización de los polímeros con las 5 técnicas mencionadas en el apartado ***¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.*** Estos polímeros son HRGD₆, GTAR, HRGD₆-N₃, GTAR-CC, HRGD₆-N₃-F, GTAR-CC-Cy5. En este apartado se muestra únicamente la caracterización del HRGD₆-N₃. El resto de las caracterizaciones se muestran en el Anexo I.

- RMN

La Resonancia Magnética Nuclear de Protón os permite analizar la estructura de los polímeros. Los valores de las integrales que obtenemos después de pasar el espectro por el programa MestreNova, coinciden aproximadamente con el número de protones que tiene el polímero en su estructura.

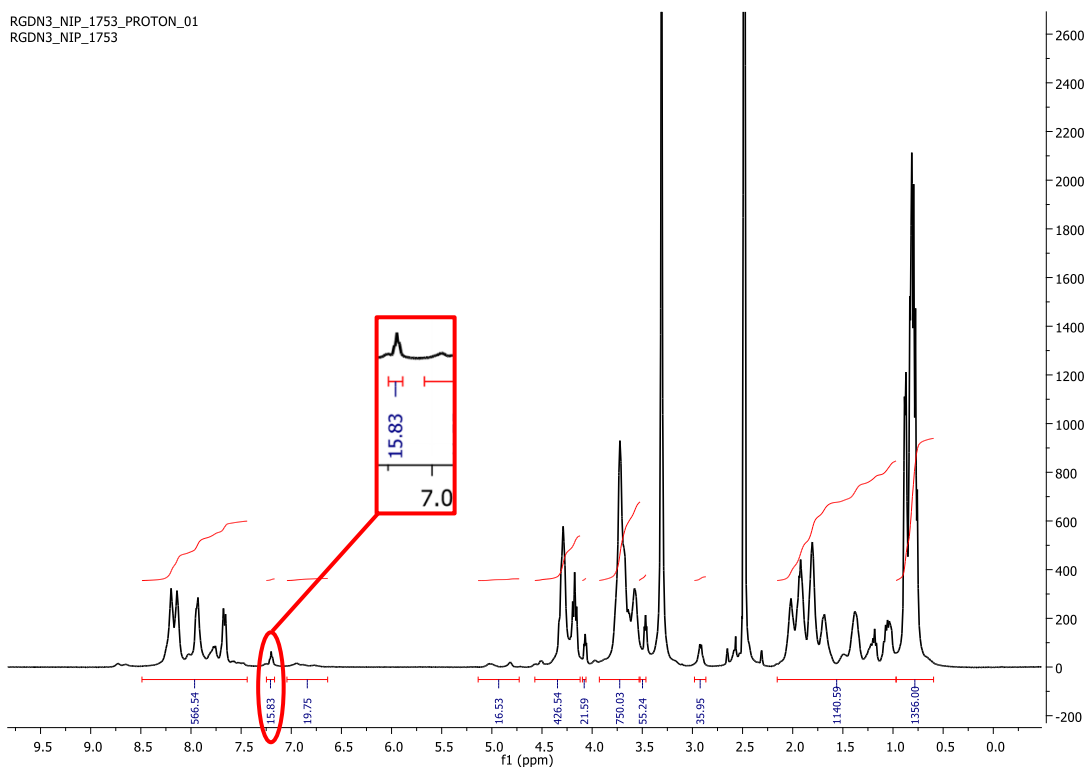


Figura 40. Espectro RMN del polímero HRGD₆-N₃ modificado químicamente

Se observa que en comparación con el espectro del polímero original HRGD₆, aparece una señal en torno a 7,2 ppm con un valor de 15,83, este valor nos indica que se han modificado 16 lisinas. Como nuestro objetivo era modificar 14 lisinas de las 24 que tiene este polímero, podemos decir que la conversión ha sido del 67%, es decir, que se han modificado más lisinas de las que deberían.

- Electroforesis

La electroforesis nos permite conocer de forma cualitativa el peso molecular del polímero. Aunque para un valor exacto la prueba de MALDI-ToF es mucho más precisa.

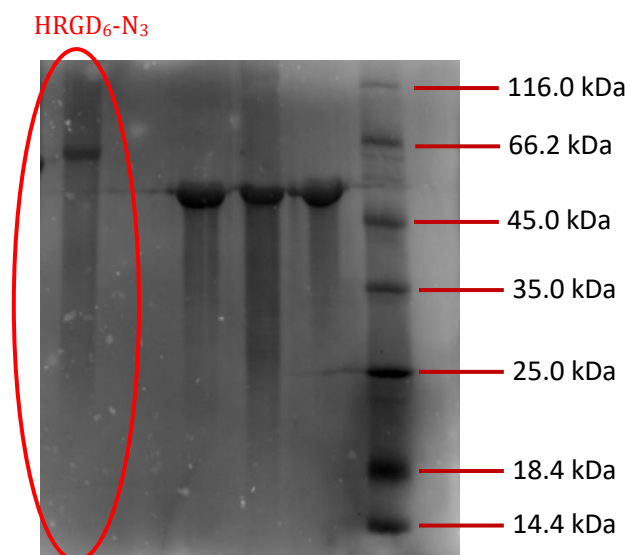


Figura 41. Electroforesis SDS-PAGE del polímero modificado químicamente HRGD₆-N₃ y a la derecha el Marker utilizado con los valores de referencia

- MALDI-ToF

La espectrometría nos permite observar la diferencia del peso molecular entre el polímero original, HRGD₆ y el modificado con grupos azida, HRGD₆-N₃.

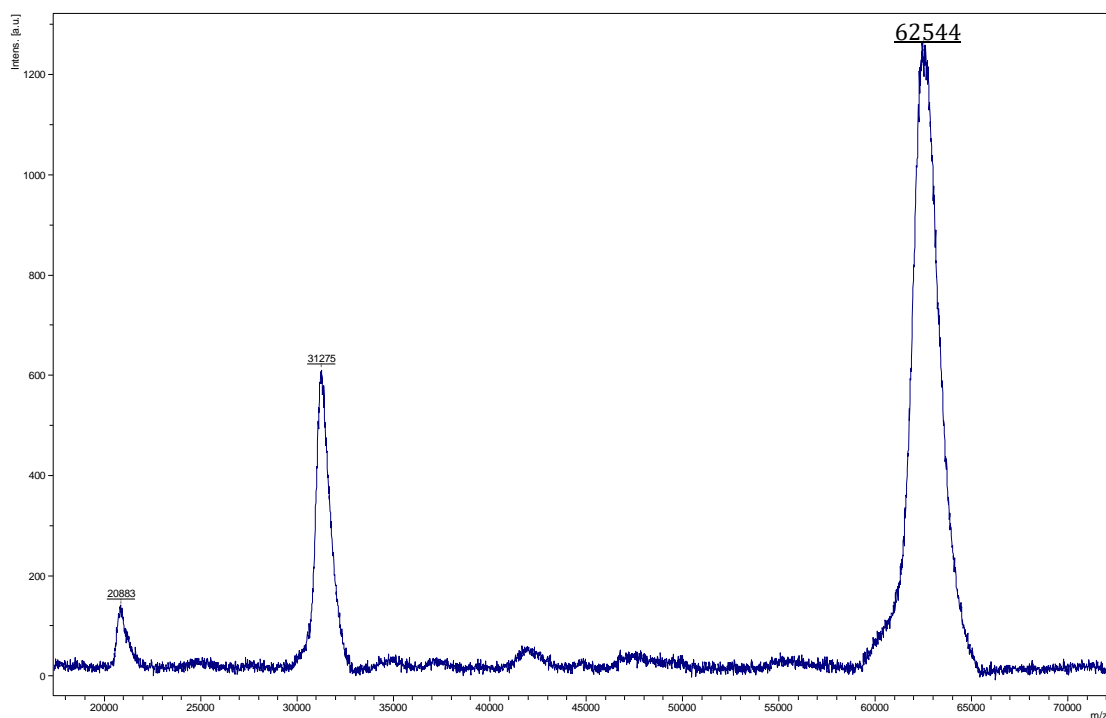


Figura 42. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) de HRGD₆-N₃

Con esta diferencia en la variación de peso, podemos determinar el número de lisinas modificadas, mediante la siguiente ecuación:

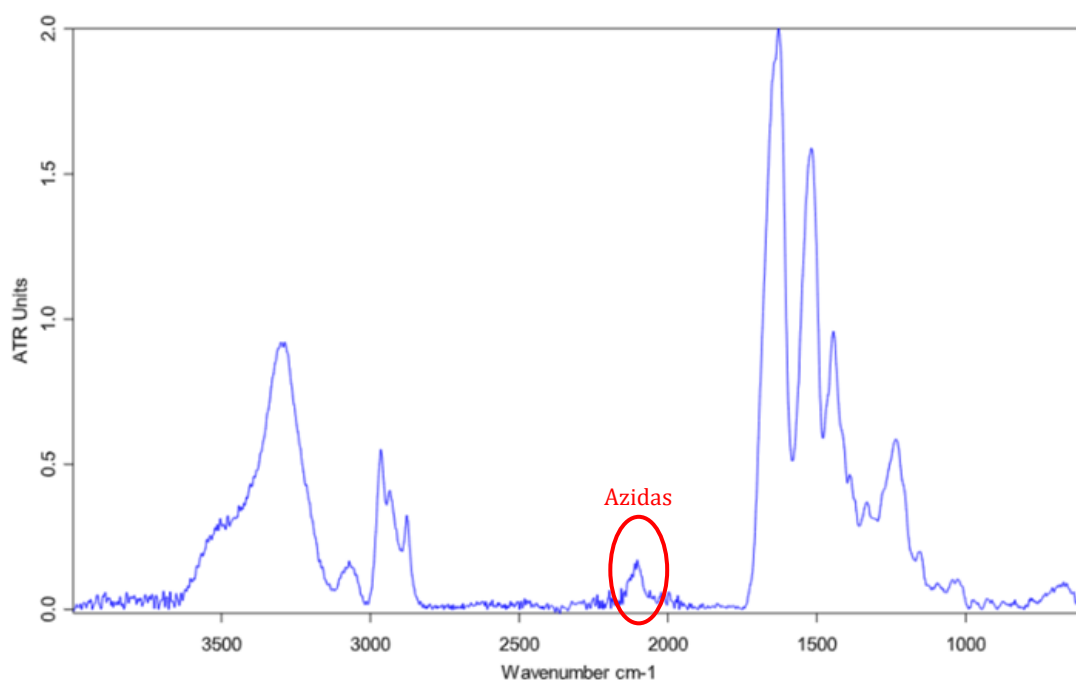
$$lys^* = \frac{\Delta PM}{113 Da} = \frac{62544 - 60598}{113 Da} = 17,2 lys *$$

Ecuación 2: Cálculo del número de lisinas modificadas en HRGD₆-N₃

- FTIR

Al comparar los resultados de la espectroscopía de infrarrojos entre el polímero original, HRGD₆ y el modificado con grupos azida, HRGD₆-N₃, se observa que aparece una nueva señal alrededor de 2100 cm⁻¹, característica del grupo azido.

Figura 43. Espectro infrarrojo de HRGD₆-N₃ modificado químicamente



5.4 LAYER BY LAYER

Layer By Layer (LBL) es una técnica que permite recubrir superficies de distintas geometrías por inmersión de estas superficies primero en una disolución de polímero y luego en otra de forma secuencial y tantas veces como sea necesario hasta alcanzar el número de bicapas deseado.

Empezamos haciendo recubrimientos de 1, 3 y 5 bicapas. Se entiende por bicapa la unión de dos capas, una capa de un polímero modificado con azida y otra capa de polímero modificado con ciclooctino.

En un inicio hicimos las pruebas sobre unas pequeñas esferas de Affigel y conseguimos observar que había un cierto recubrimiento. Debido a algunas dificultades para visualizar correctamente las esferas en el microscopio, decidimos empezar a utilizar una superficie más grande, los cubreobjetos, pero utilizando los polímeros finales.

Los cubreobjetos tienen una superficie hidrofóbica, por lo que antes de empezar con los recubrimientos, lo primero que hay que hacer es activar la superficie utilizando Plasma.

Para saber si se había realizado correctamente la activación, medimos el ángulo de contacto antes y después de pasarlo por el Plasma Cleaner (ver Tabla 12), obteniendo unos resultados evidentes de que la superficie se ha activado correctamente.

	Antes de plasma		Después de plasma	
	IZQUIERDA	DERECHA	IZQUIERDA	DERECHA
Medida 1	90,7	90,4	9,2	9,2
Medida 2	81,8	80,8	9,8	9,1
Medida 3	85,7	83,3	9,6	9,5
Media	86,07	84,83	9,53	9,27
	85,45		9,4	

Tabla 12. Ángulos medidos antes y después de la activación de superficie

Podemos observar, según los datos, que la superficie del cubreobjetos se ha activado correctamente, ya que se ha vuelto más hidrofílica (ver Figura 44), como consecuencia de la aparición de los grupos hidroxilo mencionados en el apartado 0.

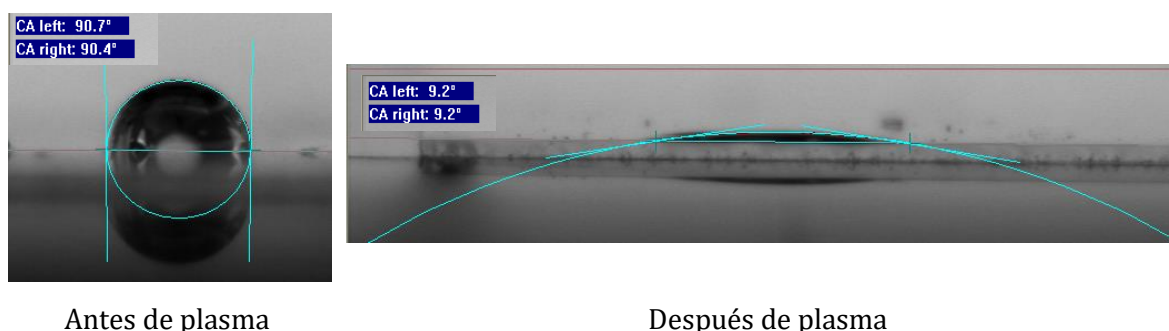


Figura 44. Imágenes obtenidas en el ángulo de contacto sobre el cubreobjetos antes y después de activar la superficie con plasma

Una vez activada correctamente la superficie, comenzamos con los recubrimientos. Para los recubrimientos utilizamos la técnica de Layer By Layer por inmersión de la superficie en una disolución de los polímeros modificados, HRGD₆-N₃-F y GTAR-CC-Cy5. Se ha elegido el HRGD₆ para que las bicapas de polímero se adhieran a las células del esferoide al hacer el recubrimiento y el GTAR para que una vez que se coloquen los esferoides sobre la lesión, el recubrimiento se degrade liberando las células.

Se sumerge en las disoluciones de forma alternativa tantas veces como bicapas queramos formar. Se realiza un lavado rápido entre cada inmersión en polímero para eliminar los posibles restos de polímero que no se hayan pegado. Para realizar el lavado se utiliza el mismo disolvente en que se haya disuelto el polímero. Para

observar si se han formado correctamente las bicapas, observamos nuestras superficies al microscopio.

Debido a algunos inconvenientes a la hora de visualizar el recubrimiento en el microscopio y puesto que los que queremos observar es si se produce la unión de las capas y que el polímero se está adheriendo correctamente, decidimos depositar la disolución del polímero sobre la superficie siguiendo el mismo protocolo con los mismos tiempos. (ver Figura 45). Los tiempos de inmersión son de 20 minutos para el primer polímero de la primera bicapa y 5 minutos para el resto de capas. Se realiza un lavado rápido entre cada polímero para eliminar los posibles restos que no se hayan adherido.

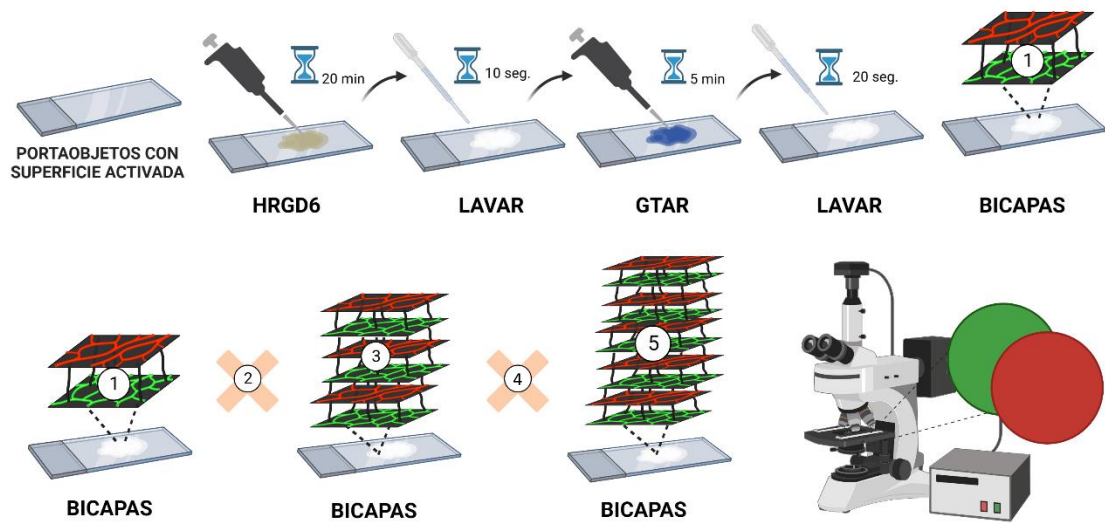


Figura 45. Representación esquemática del proceso seguido para el recubrimiento de bicapas Layer By Layer

En la Tabla 13 se representan las imágenes obtenidas para las distintas bicapas:

	BF	FITC 1s 4x	Cy5 1s 4x
Control			
1BL			

3BL			
5BL			

Tabla 13. Imágenes tomadas de los cubreobjetos después de la primera prueba de recubrimiento

Después de hacer la primera prueba podemos observar que el color verde va aumentando en intensidad a medida que aumentamos el número de capas. Sin embargo, el rojo no, sino que se ve a una gran intensidad desde la primera bicapa, por lo que no nos permitió deducir si el recubrimiento era correcto. Puesto que una de las posibles causas de la saturación de la fluorescencia para el fluoróforo Cy5-NHS, podría estar en la concentración excesiva en el recubrimiento con 1 equivalente utilizado, decidimos realizar nuevas pruebas con diluciones más diluidas del biopolímero con fluoróforo Cy5-NHS.

Para diluir la concentración del fluoróforo, lo que hacemos es mezclar el polímero “frío”, que es el que solo está modificado con ciclooctino y no posee fluoróforo Cy5, con el polímero modificado con ciclooctino y Cy5-NHS. Empezamos haciendo tres diluciones 1:2, 1:10 y 1:50. Al ver que los resultados siguen apareciendo saturados probamos tres diluciones más, 1:100, 1:200 y 1:300 y en vez de sumergir el cubreobjetos, lo que hacemos es echar la disolución sobre el lado que se ha activado con plasma.

En vista de los resultados (Tabla 14) obtenidos, decidimos que la dilución adecuada es 1:100.

Se observa un leve cambio en la coloración roja del fluoróforo Cy5-NHS. Sin embargo, podemos observar un claro cambio en la intensidad del color verde a medida que aumenta el número de bicapas.


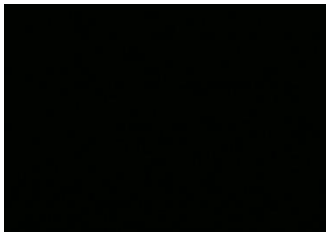


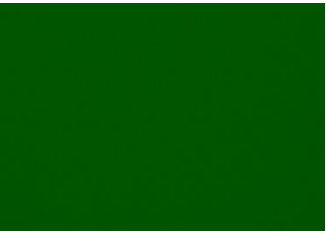
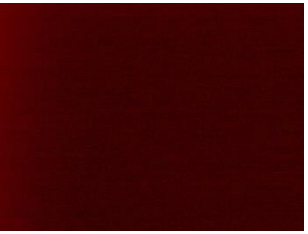

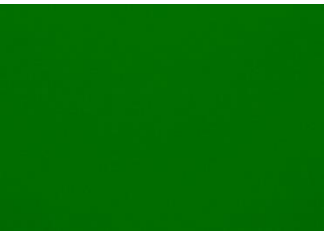
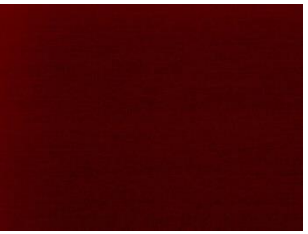

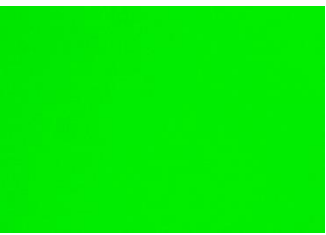
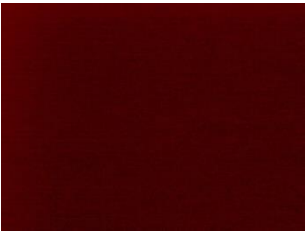
	BF	FITC	Cy5
Control			
1BL			
3BL			
5BL			

Tabla 14. Imágenes tomadas de los cubreobjetos después del recubrimiento LbL cuando se utiliza la mezcla 1:100 del polímero con Cy5-NHS

A pesar de que el cambio progresivo en el color rojo sea muy leve, el aumento de la intensidad del color verde debida a la presencia del fluoróforo nos permite deducir que se produce el recubrimiento de manera correcta, y que se van uniendo los polímeros “capa a capa”.

5.5 FORMACIÓN DE ESFEROIDES

Para la formación de esferoides utilizamos la técnica de “Liquid Overlay” explicada en el apartado 3.3. con el fin de elegir qué tamaño es el más adecuado atendiendo a la viabilidad de las células.

Para este primer experimento, hacemos esferoides con concentraciones celulares de: 625, 1250, 2500, 5000, 10000 y 20000 células/pocillo.

Se lleva a cabo el protocolo explicado en el apartado 4.2.5.2.

Después de dejar la placa las 48 horas de incubación a 37°C, observamos al microscopio la formación de los esferoides y el tamaño de los mismos obteniendo las imágenes representadas en la Figura 46.

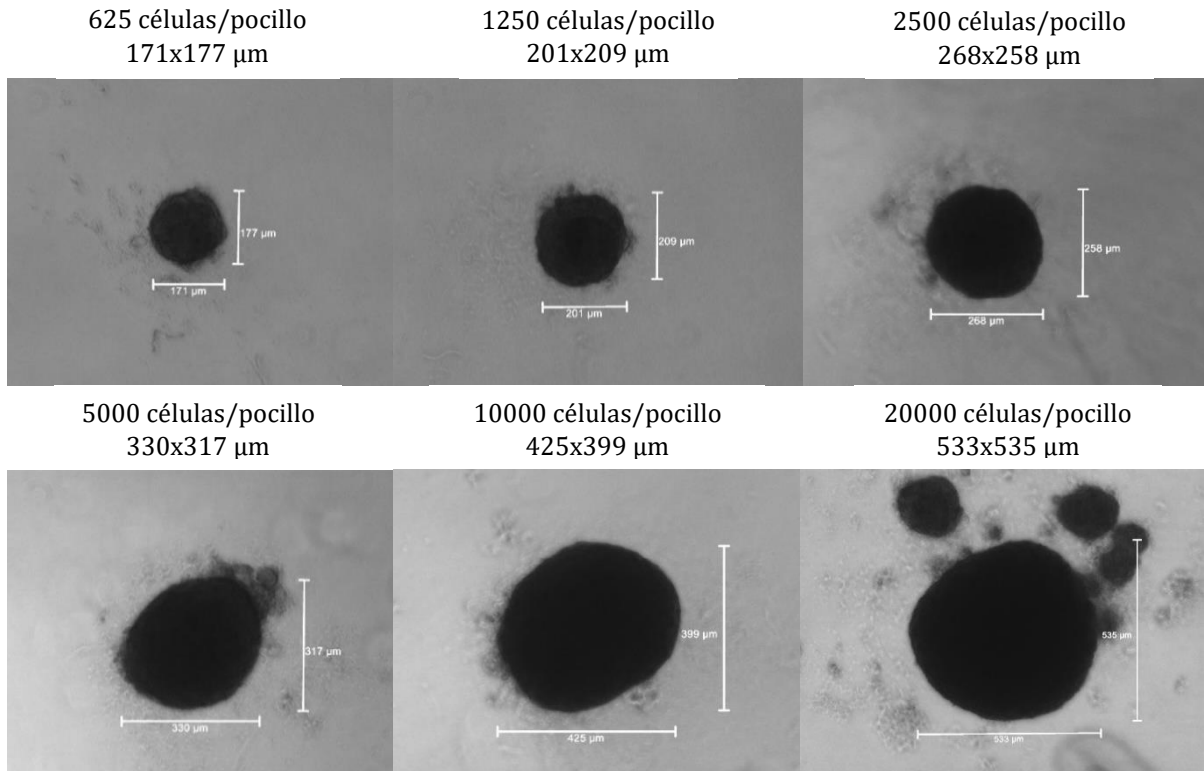


Figura 46. Imágenes tomadas de los esferoides a las 48 horas de haber sembrado las células

Podemos observar que se han formado esferoides a todas las concentraciones y que sus tamaños van aumentando a medida que aumenta la concentración celular utilizada. Sin embargo, observamos que, para la concentración celular más alta, el esferoide se ha disgregado. En principio, a todas las concentraciones se forman esferoides por lo que para tomar una decisión final acerca de la concentración óptima el parámetro fundamental es la viabilidad.

5.6 VIABILIDAD

Para medir la viabilidad de los esferoides formados, se utiliza el método de Live and Dead explicado anteriormente en el apartado 4.2.5.3. Para ello, lo primero que se hace es retirar el medio en el que se encuentran los esferoides con cuidado de no absorber el esferoide y hacer 2 lavados con PBS. Una vez lavado se prepara la tinción Live and Dead, se mezcla PBS (90µL por pocillo) con una concentración de 2µM de Calceína y con una concentración de 4 µM de Etidium. Se echa 90 µL de la mezcla en cada pocillo y se deja en la incubadora a 37°C y 5% CO₂, durante 50 minutos. Una

vez pasado ese tiempo observamos los esferoides en el microscopio confocal obteniendo las imágenes que se observan en la Figura 47.

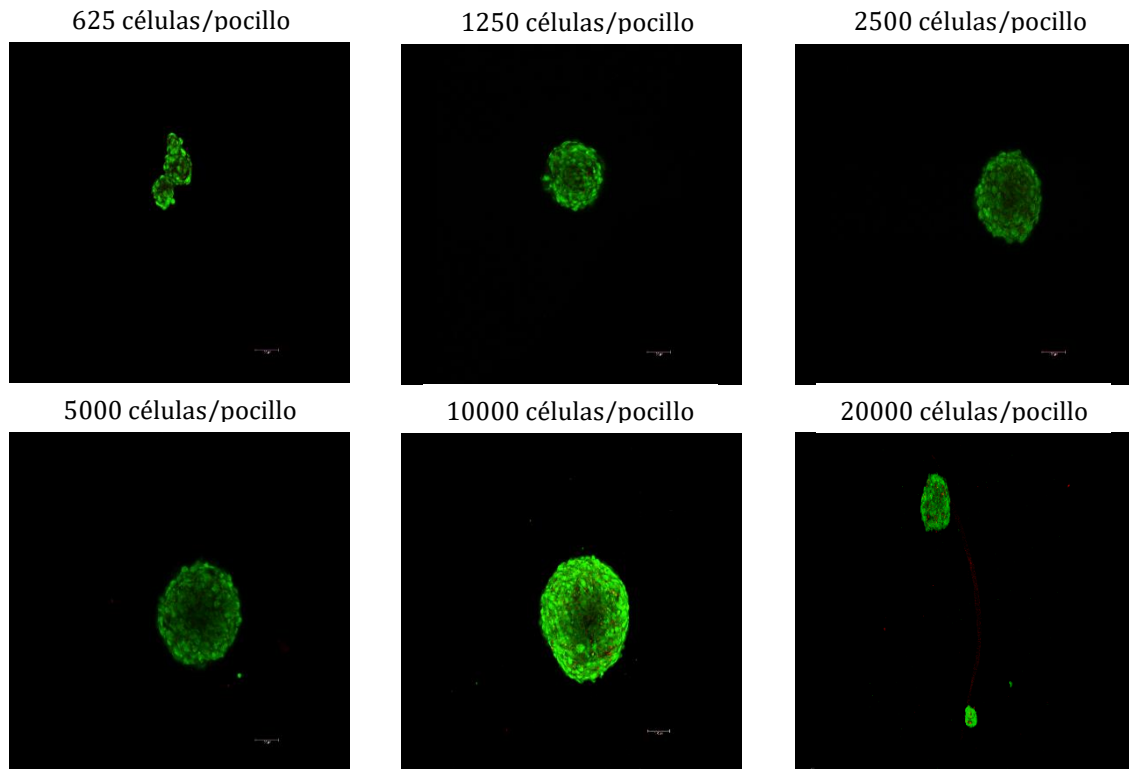


Figura 47. Esferoides después de Live and Dead para observar la viabilidad

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que la viabilidad de todos los esferoides independientemente de su concentración celular es bastante buena. De cara a escoger una concentración, se podría elegir cualquiera de ellas. Sin embargo, podemos observar que, a menor concentración celular, peor es la formación de los esferoides, y que, si la concentración es demasiado grande, es muy posible que en el manejo del propio esferoide durante los lavados y el cambio de placa, los esferoides más grandes se disgreguen. Quizá la mejor opción sería escoger el punto medio, es decir, 5000 células por pocillo. Sin embargo, contando únicamente con estos resultados cualquier concentración celular es válida y deberían hacerse más pruebas para poder determinar cuál es la mejor.

Existen artículos que demuestran la posibilidad de obtener esferoides a concentraciones mucho mayores bien sea por esta técnica u otras de las mencionadas anteriormente. Sin olvidarnos de que la elección de una concentración u otra depende también del tamaño que se busque en el esferoide ya que, a mayor concentración, de mayor tamaño será el esferoide.[37]-[40]

6. CONCLUSIÓN

A lo largo de este Trabajo Fin de Grado se ha conseguido formar esferoides de distintos tamaños, a partir de suspensiones celulares de diferente concentración, siguiendo la técnica de Liquid Overlay. Asimismo, se han modificado químicamente los polímeros que, posteriormente, se utilizarán para el recubrimiento de los esferoides mediante la técnica Layer By Layer, si bien se ha optimizado y puesto a punto la técnica de recubrimiento LbL con dichos polímeros modificados en modelos de superficie plana.

1. Se han caracterizado los polímeros bioproducidos en BioForge, HRGD₆ y GTAR, mediante las técnicas de Electroforesis, Resonancia Magnética Nuclear, MALDI-ToF, Espectroscopía de Infrarrojos y Calorimetría Diferencial de Barrido. Estas técnicas nos confirman que el polímero se ha producido correctamente.
2. Se ha modificado químicamente el polímero HRGD₆ con grupos azido en aproximadamente el 60% de las Lisinas. La caracterización del polímero HRGD₆-N₃, se realiza mediante las técnicas de Electroforesis, Resonancia Magnética Nuclear, MALDI-ToF y Espectroscopía de Infrarrojos.
3. Se ha modificado químicamente el polímero GTAR con grupos cicloctinilo en aproximadamente el 60% de sus Lisinas. La caracterización del polímero GTAR-CC, se realiza mediante las técnicas de Electroforesis, Resonancia Magnética Nuclear, MALDI-ToF y Espectroscopía de Infrarrojos.
4. Se ha modificado químicamente el polímero HRGD₆-N₃, con un grupo fluoróforo, NHS-Fluoresceína. La caracterización del polímero HRGD₆-N₃-F se realiza mediante las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear y MALDI-ToF. Además de observar un claro cambio de color a amarillo, estas técnicas nos han permitido comprobar que el fluoróforo se ha introducido correctamente.
5. Se ha modificado químicamente el polímero GTAR-CC, con un grupo fluoróforo, Cy5-NHS. La caracterización del polímero GTAR-CC-Cy5 se realiza mediante las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear y MALDI-ToF. Además de observar un claro cambio de color a azul, estas técnicas nos han permitido comprobar que el fluoróforo se ha introducido correctamente.
6. Se ha conseguido mediante los procesos de biología molecular, introducir correctamente el inserto que contiene la secuencia para producir el polímero de adhesión a colágeno tipo II. Sin embargo, su producción no ha resultado tan exitosa como se esperaba.
7. Se ha puesto a punto la técnica de recubrimiento "Layer by Layer" y, a través de la "Química Click" entre los polímeros HRGD₆-N₃-F y GTAR-CC-Cy5, se ha conseguido realizar hasta 5 bicapas de recubrimiento de superficies.

8. Se ha conseguido la formación de esferoides de células madre mesenquimales a distintas concentraciones celulares y se ha comprobado que se han formado a las 48 horas de sembrar las células y que presentan una alta viabilidad celular medida a través de la técnica Live and Dead.

7. LÍNEAS FUTURAS

Este trabajo como una pequeña parte de una tesis doctoral, tiene sus límites por lo que puede que haya técnicas que se seguirán estudiando y poniendo a punto una vez finalizado este TFG.

El objetivo final de este trabajo es la regeneración de cartílago en lesiones difusas.

Para ello se necesita poner a punto los esferoides y determinar la viabilidad de los mismos no solo una vez formados, sino también después de haber sido recubiertos, asegurándonos de que los nutrientes difunden adecuadamente permitiendo a las células mantenerse vivas.

Por otra parte, es necesario conseguir que los esferoides tengan en su capa más externa el polímero que va a producir esa unión específica a cartílago, en este caso se trata de dos polímeros: polímero de adhesión a colágeno tipo II y polímero de adhesión a condroitín sulfato. Como se comentado antes está habiendo ciertos problemas en la bioproducción por lo que es una técnica que hay que seguir estudiando y mejorando.

Además de la investigación que se está realizando con células madre mesenquimales, se valora la posibilidad de diferenciar estas células madre hacia distintos linajes como condrocitos.

Lo ideal sería conseguir unos esferoides recubiertos con polímero que pudieran adherirse por uniones específicas a la zona dañada ayudando en su reparación.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. M. Bhosale and J. B. Richardson, "Articular cartilage: Structure, injuries and review of management," *British Medical Bulletin*, vol. 87, no. 1. pp. 77–95, Sep. 2008. doi: 10.1093/bmb/ldn025.
- [2] Z. Peng *et al.*, "The regulation of cartilage extracellular matrix homeostasis in joint cartilage degeneration and regeneration," *Biomaterials*, vol. 268. Elsevier Ltd, Jan. 01, 2021. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120555.
- [3] J. A. ; Buckwalter and H. J. Mankin, "Articular cartilage: Part I," 1997.
- [4] M. E. Hantes, G. K. Basdekis, A. H. Zibis, A. H. Karantanas, and K. N. Malizos, "Localized pigmented villonodular synovitis in the anteromedial compartment of the knee associated with cartilage lesions of the medial femoral condyle: Report of a case and review of the literature," *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, vol. 13, no. 3. pp. 209–212, Apr. 2005. doi: 10.1007/s00167-003-0448-6.
- [5] M. Brittberg, A. H. Gomoll, J. A. Canseco, J. Far, M. Lind, and J. Hui, "Cartilage repair in the degenerative ageing knee: A narrative review and analysis," *Acta Orthop*, vol. 87, pp. 26–38, Dec. 2016, doi: 10.1080/17453674.2016.1265877.
- [6] H. Le, W. Xu, X. Zhuang, F. Chang, Y. Wang, and J. Ding, "Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration," *Journal of Tissue Engineering*, vol. 11. SAGE Publications Ltd, 2020. doi: 10.1177/2041731420943839.
- [7] J. C. Rodríguez-Cabello, L. Martín, M. Alonso, F. J. Arias, and A. M. Testera, "'Recombinamers' as advanced materials for the post-oil age," *Polymer*, vol. 50, no. 22. Elsevier BV, pp. 5159–5169, Oct. 20, 2009. doi: 10.1016/j.polymer.2009.08.032.
- [8] A. Girotti, D. Orbanic, A. Ibáñez-Fonseca, C. Gonzalez-Obeso, and J. C. Rodríguez-Cabello, "Recombinant Technology in the Development of Materials and Systems for Soft-Tissue Repair," *Adv Healthc Mater*, vol. 4, no. 16, pp. 2423–2455, Nov. 2015, doi: 10.1002/adhm.201500152.
- [9] R. Herrero-Vanrell, A. C. Rincón, M. Alonso, V. Rebotó, I. T. Molina-Martinez, and J. C. Rodríguez-Cabello, "Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release," *Journal of Controlled Release*, vol. 102, no. 1, pp. 113–122, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.jconrel.2004.10.001.
- [10] N. B. Vu and P. Van Pham, "Production and Application of Mesenchymal Stem Cell Spheroids for Cartilage and Bone Regeneration," 2022, pp. 137–153. doi: 10.1007/978-3-030-93056-1_7.
- [11] A. Jauković *et al.*, "Specificity of 3D MSC Spheroids Microenvironment: Impact on MSC Behavior and Properties," *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 16, no. 5. Springer, pp. 853–875, Oct. 01, 2020. doi: 10.1007/s12015-020-10006-9.
- [12] Z. Cesarz and K. Tamama, "Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells," *Stem Cells International*, vol. 2016. Hindawi Publishing Corporation, 2016. doi: 10.1155/2016/9176357.
- [13] K. Białkowska, P. Komorowski, M. Bryszewska, and K. Miłowska, "Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the

- most important application," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 17. MDPI AG, pp. 1–17, Sep. 01, 2020. doi: 10.3390/ijms21176225.
- [14] E. Fennema, N. Rivron, J. Rouwkema, C. van Blitterswijk, and J. De Boer, "Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues," *Trends in Biotechnology*, vol. 31, no. 2. pp. 108–115, Feb. 2013. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.003.
- [15] R. Z. Lin and H. Y. Chang, "Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research," *Biotechnology Journal*, vol. 3, no. 9–10. Wiley-VCH Verlag, pp. 1172–1184, 2008. doi: 10.1002/biot.200700228.
- [16] C. Shao, J. Chi, H. Zhang, Q. Fan, Y. Zhao, and F. Ye, "Development of Cell Spheroids by Advanced Technologies," *Advanced Materials Technologies*, vol. 5, no. 9. Wiley-Blackwell, Sep. 01, 2020. doi: 10.1002/admt.202000183.
- [17] E. C. Costa, D. de Melo-Diogo, A. F. Moreira, M. P. Carvalho, and I. J. Correia, "Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches," *Biotechnology Journal*, vol. 13, no. 1. Wiley-VCH Verlag, Jan. 01, 2018. doi: 10.1002/biot.201700417.
- [18] M. P. Sousa, I. Gonzalez de Torre, M. B. Oliveira, J. C. Rodríguez-Cabello, and J. F. Mano, "Biomimetic click assembled multilayer coatings exhibiting responsive properties," *Mater Today Chem*, vol. 4, pp. 150–163, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.mtchem.2017.04.001.
- [19] I. González De Torre, M. Santos, L. Quintanilla, A. Testera, M. Alonso, and J. C. Rodríguez Cabello, "Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties," *Acta Biomater*, vol. 10, no. 6, pp. 2495–2505, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.006.
- [20] C. J. Huang, "Advanced surface modification technologies for biosensors," in *Chemical, Gas, and Biosensors for Internet of Things and Related Applications*, Elsevier, 2019, pp. 65–86. doi: 10.1016/B978-0-12-815409-0.00005-X.
- [21] S. Luis Laurella, "Resonancia magnética nuclear Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares."
- [22] J. P. Valcárcel, H. González, and D. H. Valcárcel, "Espectroscopia. fundamento de la resonancia magnética nuclear," *Entornos*, no. 21, pp. 89–94, 2008.
- [23] H. J. Räder and I. K. Scirepp, "MALDI-TOF mass spectrometry in the analysis of synthetic polymers," *Acta Polymerica*, vol. 49, no. 6, pp. 272–293, 1998, doi: 10.1002/(sici)1521-4044(199806)49:6<272::aid-apol272>3.0.co;2-1.
- [24] C. Jurinke, P. Oeth, and D. Van Den Boom, "MOLECULAR BIOTECHNOLOGY MALDI-TOF Mass Spectrometry 147 REVIEW 147 MALDI-TOF Mass Spectrometry A Versatile Tool for High-Performance DNA Analysis," 2004.
- [25] J. R. Velandia Cabra, "Identificación de polímeros por espectroscopía infrarroja," *Revista Ontare*, vol. 5, Sep. 2018, doi: 10.21158/23823399.v5.n0.2017.2005.
- [26] A. V. División De Espectroscopía, "Sistemas FTIR para la caracterización de polímeros: control de calidad y análisis estructural."
- [27] "THERMAL ANALYSIS OF POLYMERS - Fundamentals and Applications."

- [28] C. Schick, "Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 395, no. 6, pp. 1589–1611, Nov. 2009. doi: 10.1007/s00216-009-3169-y.
- [29] S. Mesapogu, C. M. Jillepalli, and D. K. Arora, "Agarose Gel Electrophoresis and Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Methods and Principles," in *Analyzing Microbes: Manual of Molecular Biology Techniques*, D. K. Arora, S. Das, and M. Sukumar, Eds., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 73–91. doi: 10.1007/978-3-642-34410-7_5.
- [30] B. J. Smith, "SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins," in *Proteins*, J. M. Walker, Ed., Totowa, NJ: Humana Press, 1984, pp. 41–55. doi: 10.1385/0-89603-062-8:41.
- [31] S. R. Gallagher, "SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) OVERVIEW AND PRINCIPLES." [Online]. Available: <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/1948/index.html>
- [32] K. Terpilowski and D. Rymuszka, "Surface properties of glass plates activated by air, oxygen, nitrogen and argon plasma," *Glass Physics and Chemistry*, vol. 42, no. 6, pp. 535–541, Nov. 2016, doi: 10.1134/S1087659616060195.
- [33] P. K. Chu, J. Y. Chen, L. P. Wang, and N. Huang, "Plasma-surface modification of biomaterials."
- [34] Á. Rodríguez García-Cebadera, "Estudio del ángulo de contacto y de la mojabilidad a alta temperatura de fases líquidas en la sinterización de metales," Oct. 2010, Accessed: Jul. 08, 2023. [Online]. Available: <https://e-archivo.uc3m.es/handle/10016/10046>
- [35] K. S. Louis and A. C. Siegel, "Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods," in *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*, M. J. Stoddart, Ed., Totowa, NJ: Humana Press, 2011, pp. 7–12. doi: 10.1007/978-1-61779-108-6_2.
- [36] "MP 03224 LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit Product Information." [Online]. Available: www.omegafilters.com
- [37] Y. Yamaguchi, J. Ohno, A. Sato, H. Kido, and T. Fukushima, "Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential," *BMC Biotechnol*, vol. 14, no. 1, Dec. 2014, doi: 10.1186/s12896-014-0105-9.
- [38] N. E. Timmins and L. K. Nielsen, "Generation of Multicellular Tumor Spheroids by the Hanging-Drop Method."
- [39] K. C. Murphy, S. Y. Fang, and J. K. Leach, "Human mesenchymal stem cell spheroids in fibrin hydrogels exhibit improved cell survival and potential for bone healing," *Cell Tissue Res*, vol. 357, no. 1, pp. 91–99, 2014, doi: 10.1007/s00441-014-1830-z.
- [40] D. Del Duca, T. Werbowetski, and R. F. Del Maestro, "Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion," 2004.

9. ANEXO I: RESULTADOS

9.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS ELRs

Según lo indicado en el apartado 5.3. En este apartado se muestra la caracterización del resto de los polímeros: HRGD₆, RGTAR, RGTAR-CC, HRGD₆-N₃-F, RGTAR-CC-Cy5.

HRGD₆

- RMN

La Resonancia Magnética Nuclear de Protón, nos permite analizar la estructura de los polímeros. Los valores de las integrales que obtenemos después de pasar el espectro por el programa MestreNova, son parecidos a los protones que tiene el polímero en su estructura.

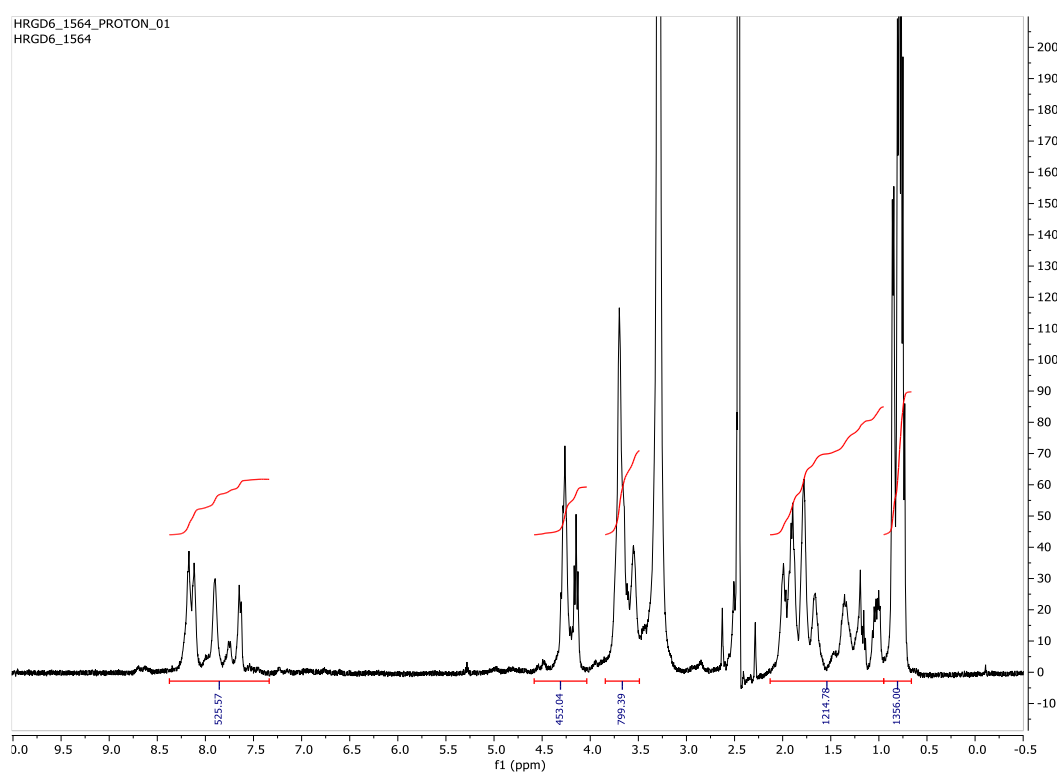


Figura 48. Espectro RMN del polímero HRGD₆ bioproducido

- Electroforesis

La electroforesis nos permite conocer de forma cualitativa el peso molecular del polímero. Aunque para un valor exacto la prueba de MALDI-ToF es mucho más precisa.

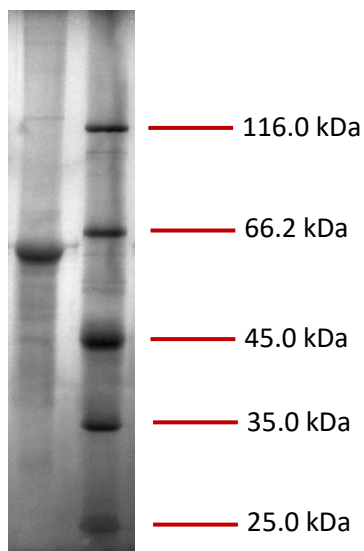


Figura 49. Electroforesis SDS-PAGE del polímero HRGD₆

- MALDI-ToF

La espectrometría nos permite observar el peso molecular del polímero HRGD₆.

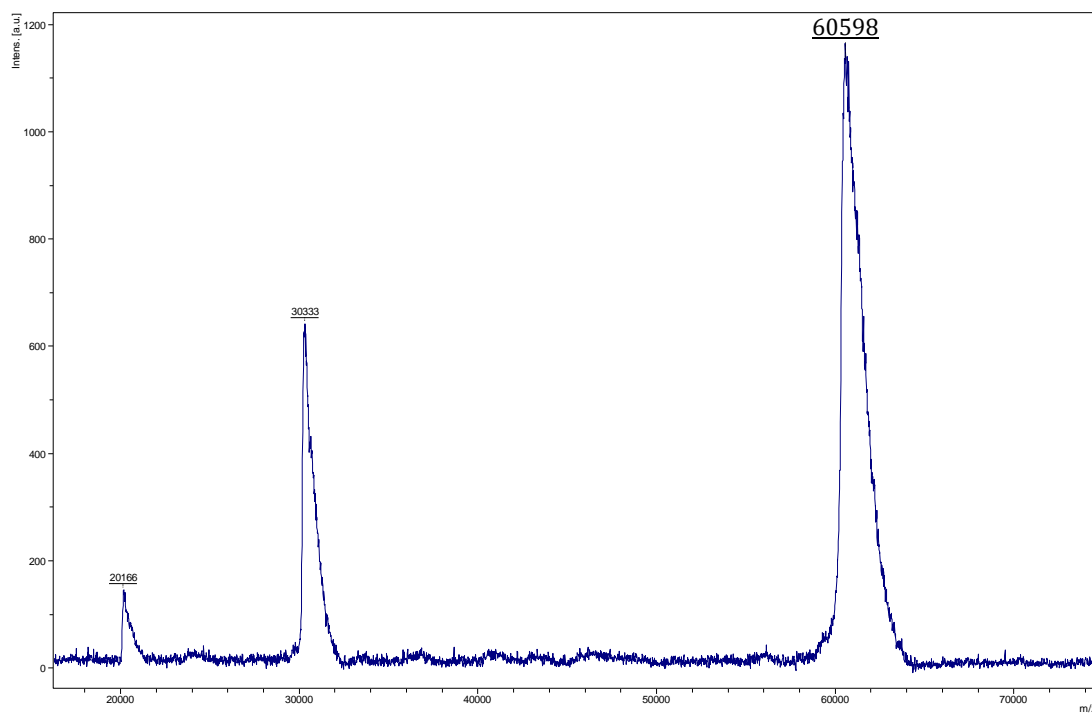


Figura 50. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del HRGD₆

- FTIR

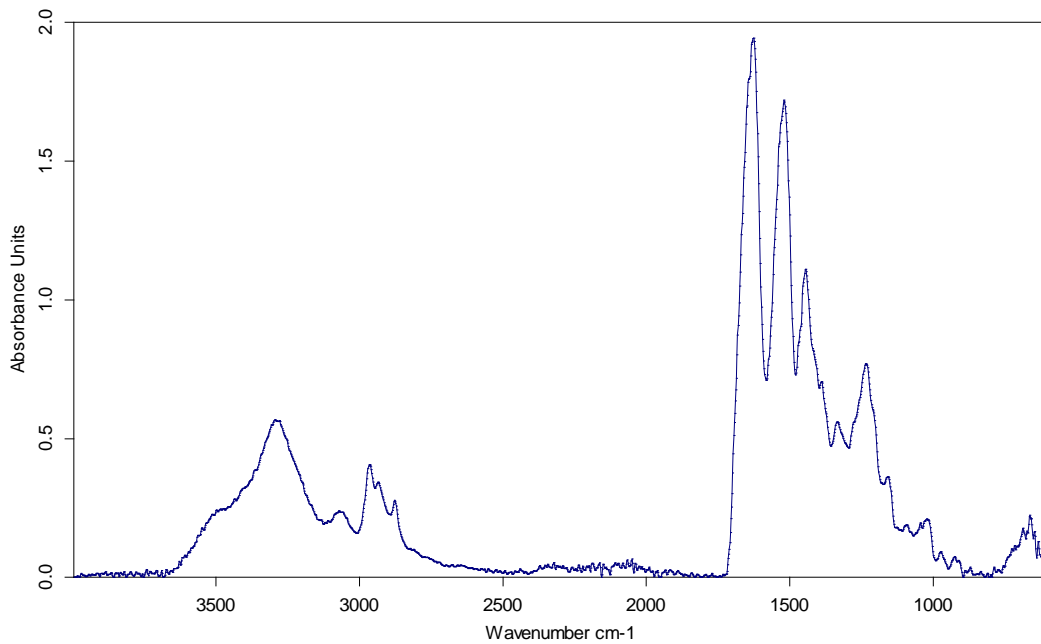


Figura 51. Espectro infrarrojo del polímero HRGD₆

- DSC

El DSC nos permite determinar la temperatura de transición inversa del polímero y la variación de entalpía del proceso.

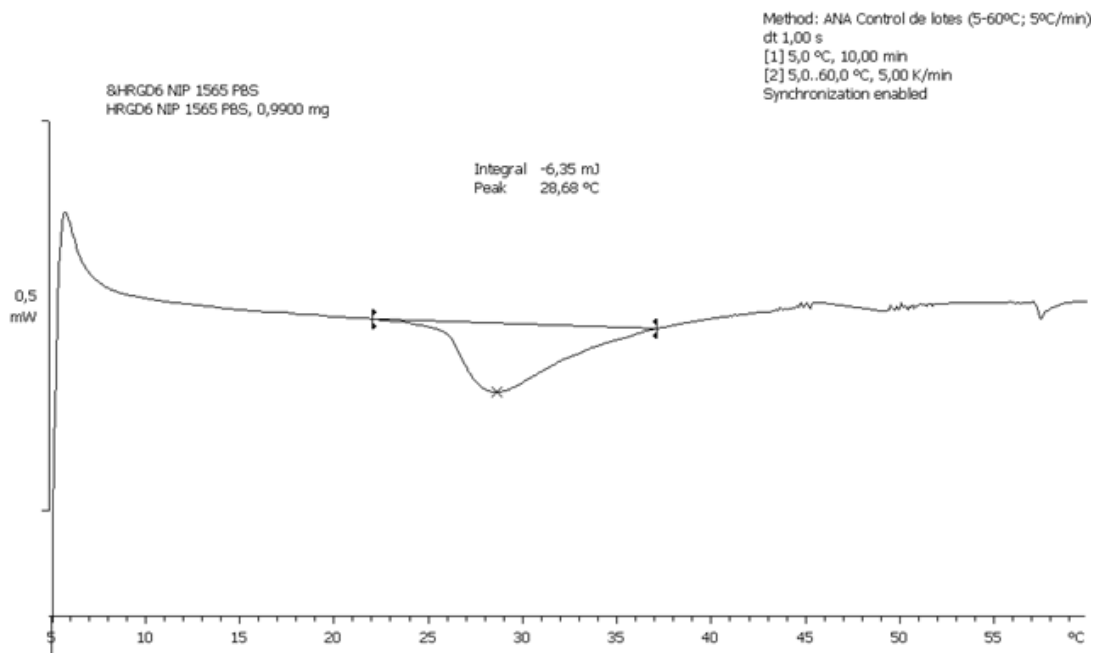


Figura 52. Termograma DSC del polímero HRGD₆ en MQ a pH=6,84

GTAR

- RMN

La Resonancia Magnética Nuclear de Protón, nos permite analizar la estructura de los polímeros. Los valores de las integrales que obtenemos después de pasar el espectro por el programa MestreNova, son parecidos a los protones que tiene el polímero en su estructura.

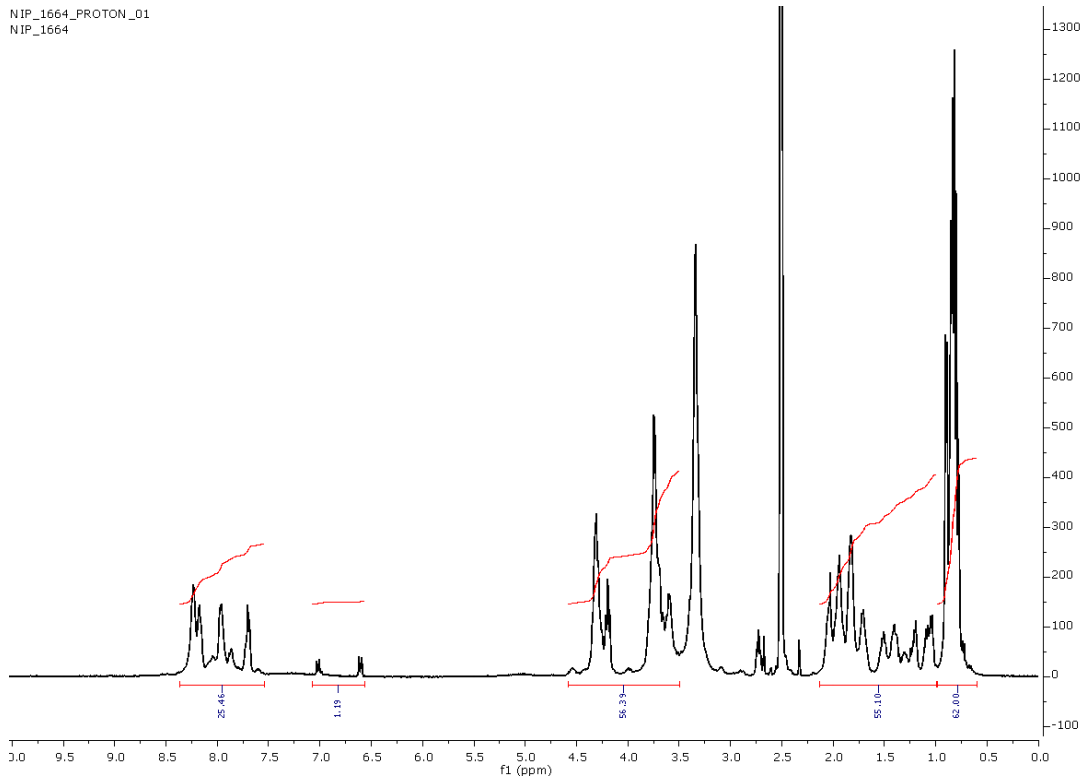


Figura 53. Espectro RMN del polímero GTAR biproducido

- Electroforesis

La electroforesis nos permite conocer de forma cualitativa el peso molecular del polímero. Aunque para un valor exacto la prueba de MALDI-ToF es mucho más precisa.

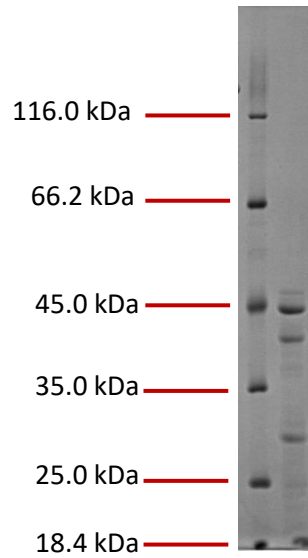


Figura 54. Electroforesis SDS-PAGE del polímero GTAR

- MALDI-ToF

La espectrometría nos permite observar el peso molecular del polímero GTAR.

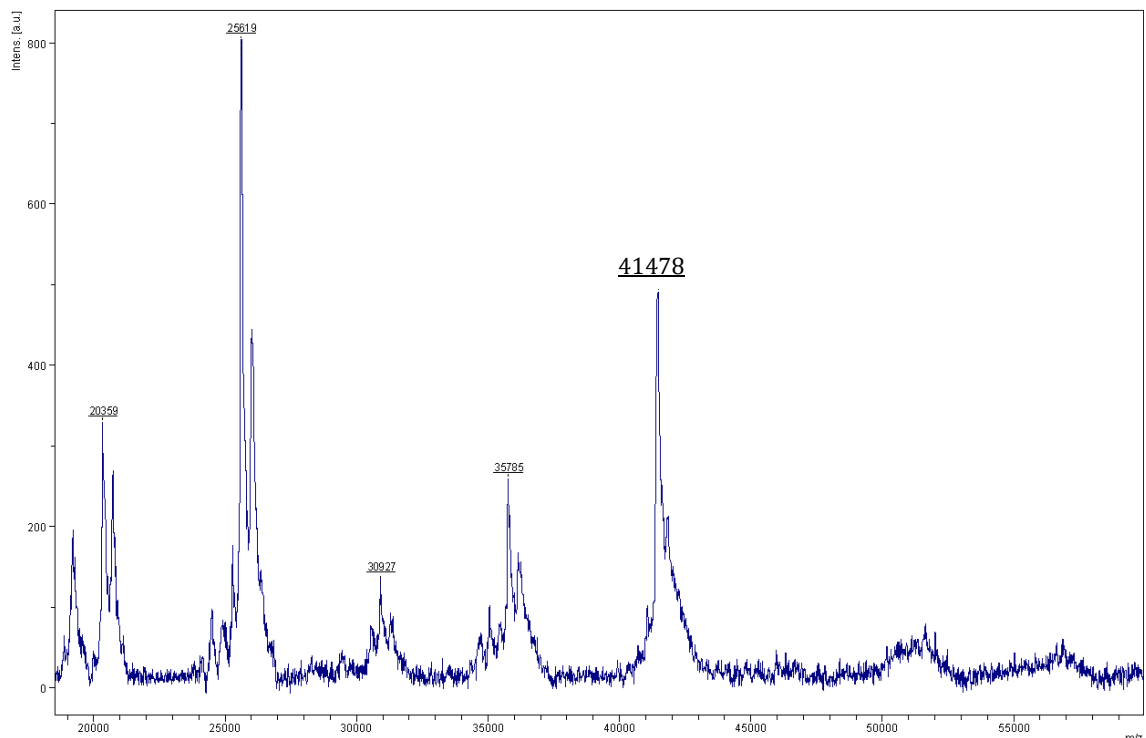


Figura 55. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del GTAR

- FTIR

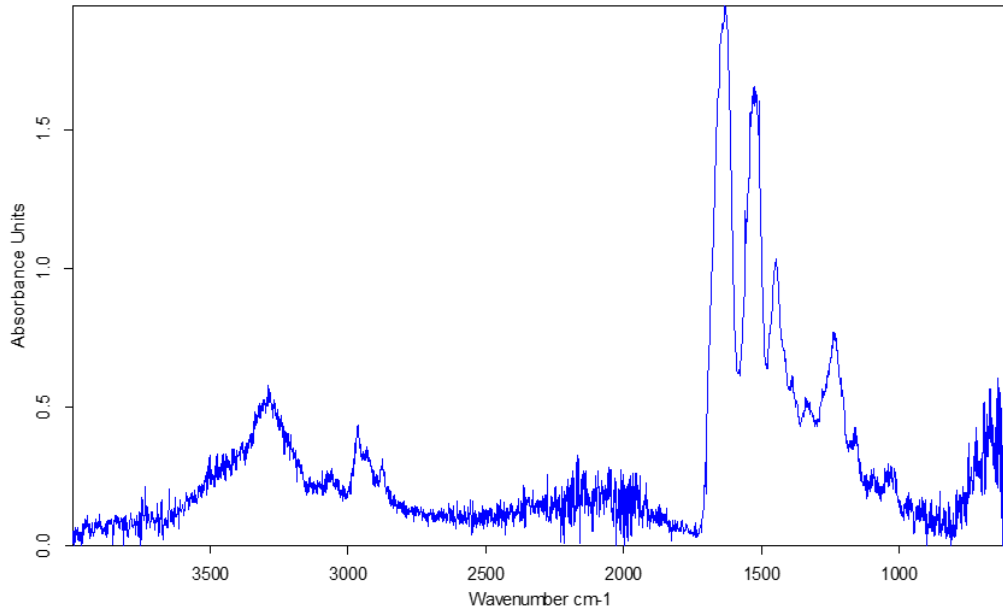


Figura 56. Espectro infrarrojo del polímero GTAR

- DSC

El DSC nos permite determinar la temperatura de transición inversa del polímero.

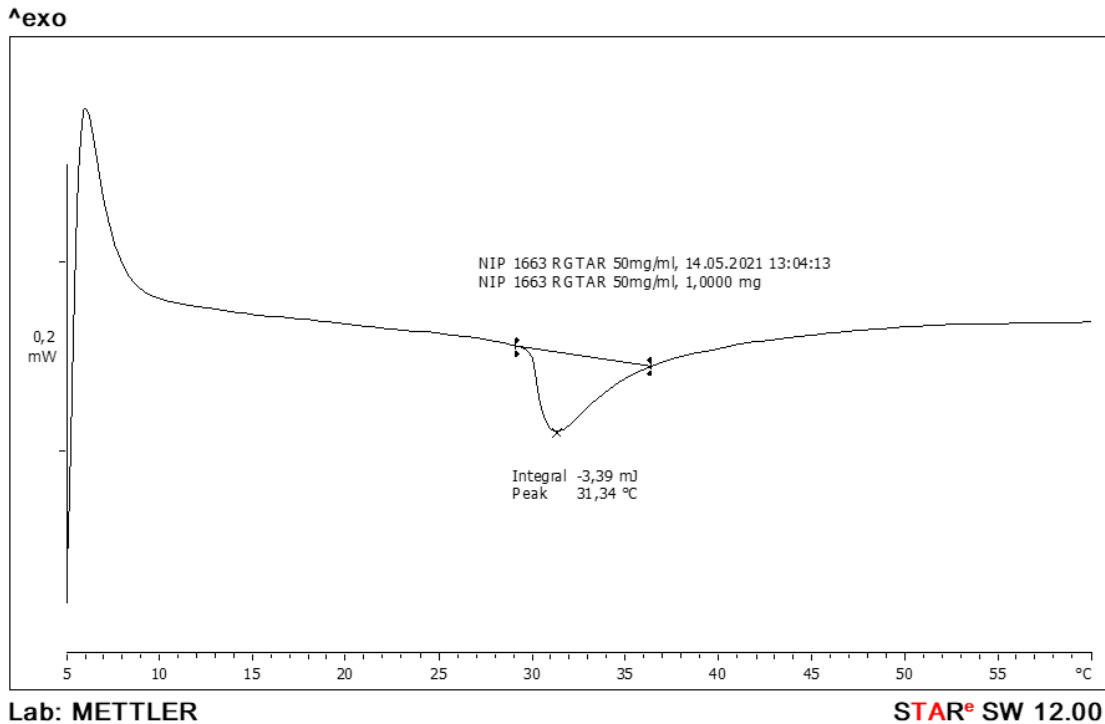


Figura 57. Termograma DSC del polímero GTAR

GTAR-CC

- RMN

La Resonancia Magnética Nuclear de Protón, nos permite analizar la estructura de los polímeros. Los valores de las integrales que obtenemos después de pasar el espectro por el programa MestreNova, son parecidos a los protones que tiene el polímero en su estructura.

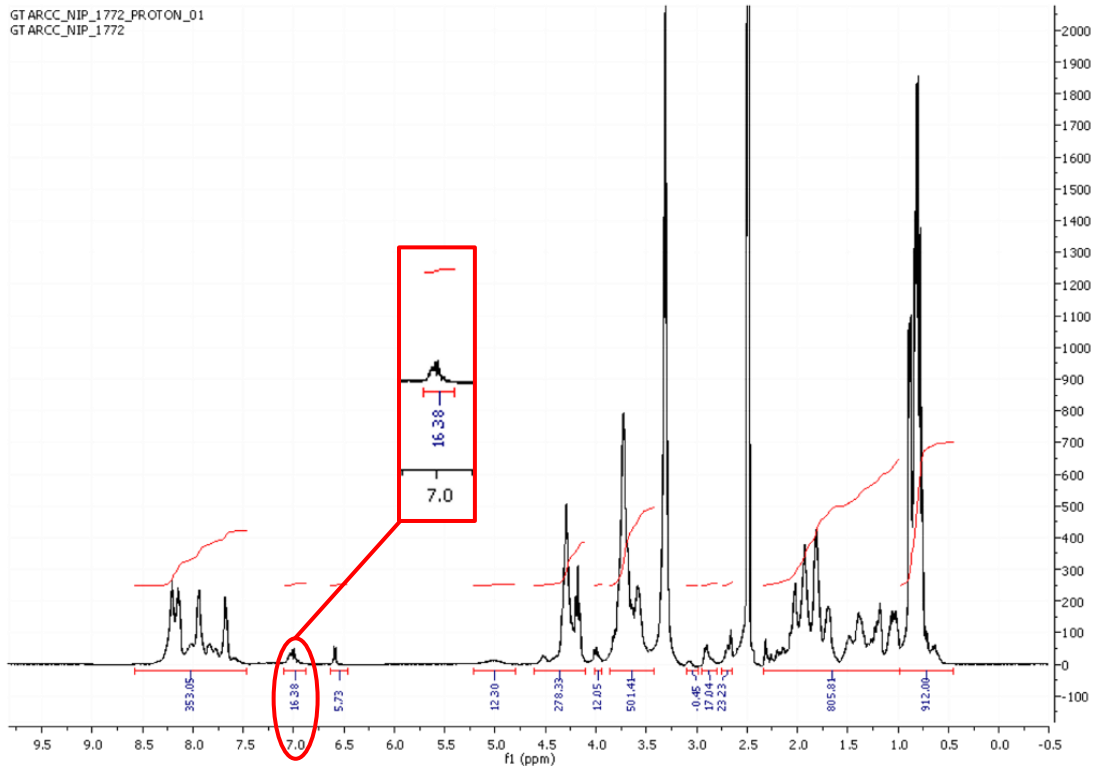


Figura 58. Espectro RMN del polímero GTAR-CC modificado químicamente

Se observa que en comparación con el espectro del polímero original HRGD6, aparece una señal en torno a 7 ppm con un valor de 16,38, este valor nos indica que se han modificado 16 lisinas. Como nuestro objetivo era modificar 10 lisinas de las 16 que tiene este polímero, podemos decir que la conversión bastante grande ya que modificar 16 lisinas implica que se han modificado el 100% de las lisinas del polímero.

- Electroforesis

La electroforesis nos permite conocer de forma cualitativa el peso molecular del polímero. Aunque para un valor exacto la prueba de MALDI-ToF es mucho más precisa.

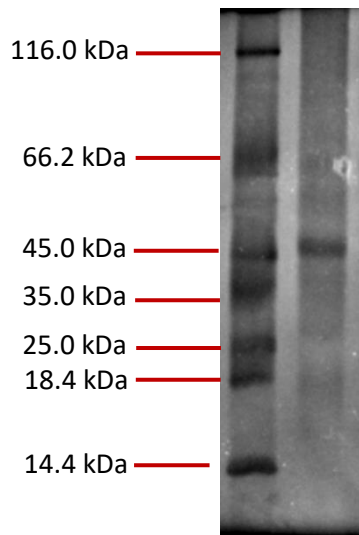


Figura 59. Electroforesis SDS-PAGE del polímero GTAR-CC

- MALDI-ToF

La espectrometría nos permite observar la diferencia del peso molecular entre el polímero original, GTAR y el modificado con grupos ciclotino, GTAR-CC.

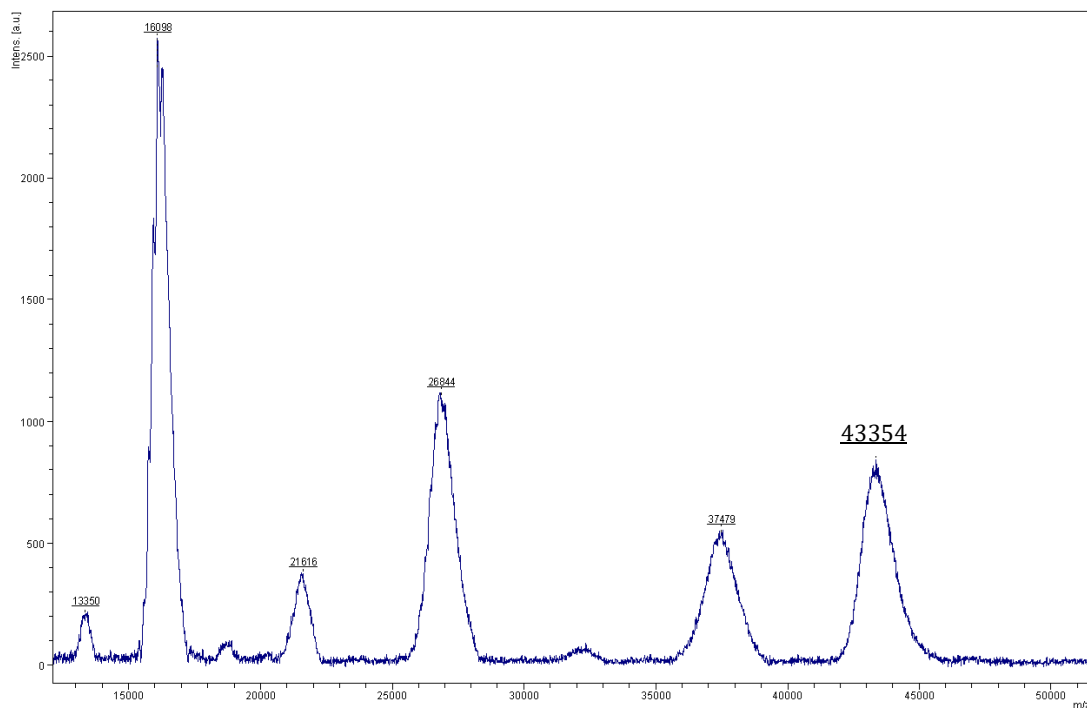


Figura 60. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del GTAR-CC

Con esta diferencia en la variación, podemos determinar el número de lisinas modificadas, mediante la siguiente ecuación:

$$lys^* = \frac{\Delta PM}{176 Da} = \frac{43354 - 41478}{176 Da} = 10,66 lys^*$$

Ecuación 3: Cálculo del número de lisinas modificadas GTAR-CC

- FTIR

Al comparar este espectro de infrarrojos con el espectro de infrarrojos del GTAR, no se aprecian diferencias significativas por lo que se puede concluir que el FTIR no es útil para caracterizar esta modificación en concreto.

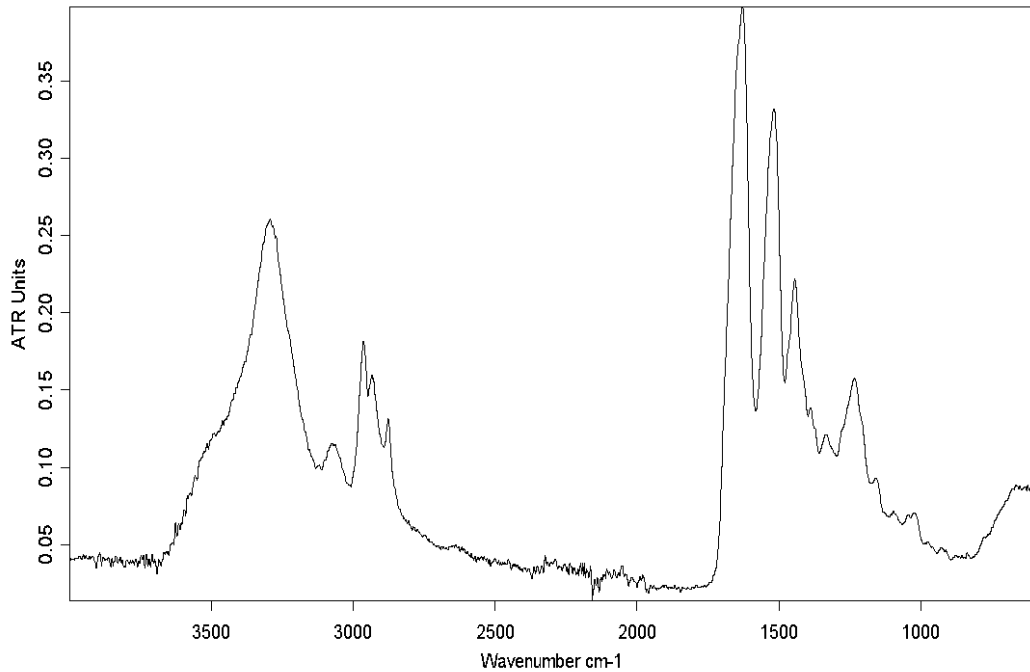


Figura 61. Espectro infrarrojo del polímero GTAR-CC

HRGD₆-N₃-F

- MALDI-ToF

La espectrometría nos permite observar la diferencia del peso molecular entre el polímero modificado con grupos azida, HRGD₆-N₃ y el polímero modificado con el fluoróforo NHS-Fluoresceína, HRGD₆-N₃-F.

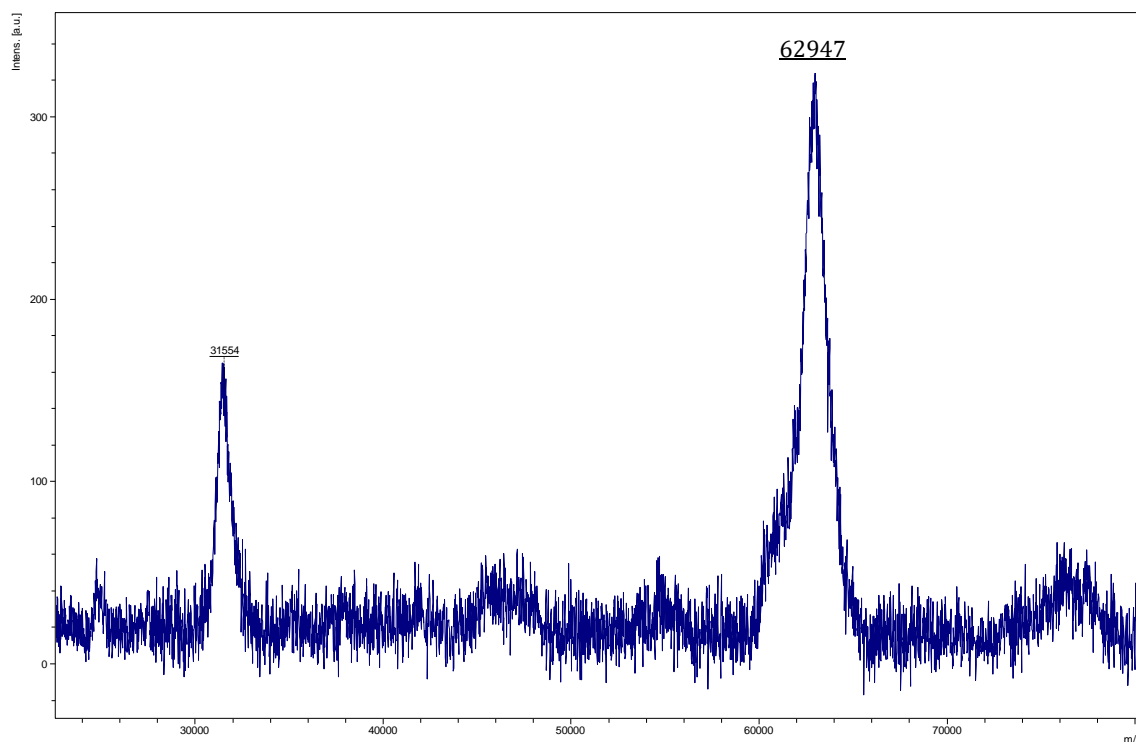


Figura 62. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del HRGD₆-N₃-F

Si comparamos el peso molecular obtenido en el MALDI-ToF del HRGD₆-N₃, 62544 y el peso molecular obtenido ahora, vemos que hay un aumento debido a la presencia del fluoróforo NHS-Floureceína.

GTAR-CC-Cy5

- MALDI-ToF

La espectrometría nos permite observar la diferencia del peso molecular entre el polímero modificado con grupos ciclooctino, GTAR-CC y el polímero modificado con el fluoróforo Cy5-NHS, GTAR-CC-Cy5.

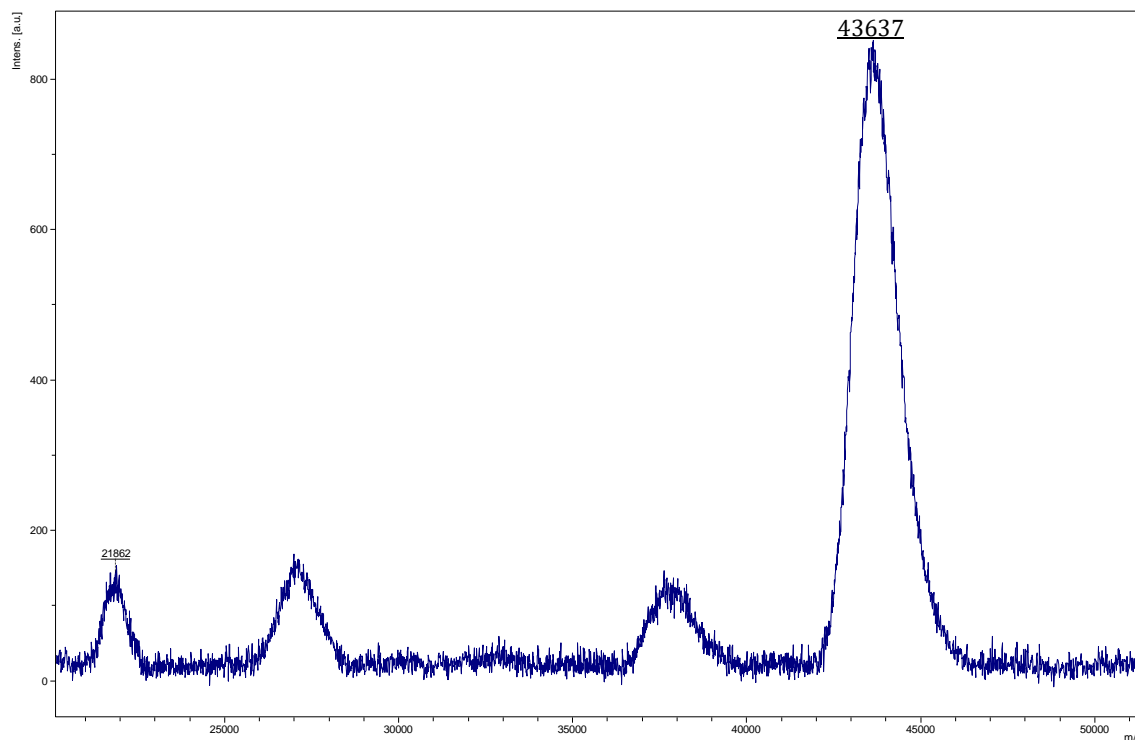


Figura 63. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del GTAR-CC-Cy5

Si comparamos el peso molecular obtenido en el MALDI-ToF del GTAR-CC, 43354, y el peso molecular obtenido ahora, vemos que hay un aumento debido a la presencia del fluoróforo Cyanine5-NHS.