

UVa



Universidad de Valladolid
FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y
Control de Calidad Químicos.

Bio-impresión 3D y ELR's aplicada a la regeneración de cartílagos.

Autor: Jhon Stivens Galarza García

Tutores: Dr. José Carlos Rodríguez Cabello

Dra. Mercedes Santos García

Año 2023



BIOFORGE
Universidad de Valladolid

«Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica:
la voluntad.»

Albert Einstein (1879-1955)

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quisiera agradecer a mis padres por todo el apoyo que me brindaron.

También quisiera agradecer a todos los profesores que tuve a lo largo de este Máster por todos los conocimientos transmitidos en cada asignatura, por la paciencia que me demostraron, por los buenos consejos que me han dado y por su dedicación a la enseñanza, en especial quisiera agradecer a mis tutores la Dra. Matilde Alonso Rodrigo, la Dra. Mercedes Santos García y José Carlos Rodríguez Cabello por permitirme realizar este Trabajo de Fin de Grado en su grupo de investigación y guiarme en todo momento. Agradecer también al grupo de investigación G.I.R Bioforge por brindarme la oportunidad de realizar este Trabajo de Fin de Máster en sus instalaciones.

Agradezco a los integrantes del grupo de investigación G.I.R Bioforge por enseñarme a usar los equipos de sus laboratorios los cuales fueron esenciales para el desarrollo de este TFM al igual que por el tiempo que me dedicaron durante este proceso de aprendizaje.

Por último, agradezco a todos mis compañeros de la universidad y del laboratorio por el apoyo brindado. A todos los amigos y familiares muchas gracias.

RESUMEN

La ingeniería de tejidos cartilagosos es un campo altamente interdisciplinario que se enfoca en desarrollar injertos o implantes de tejido capaces de reemplazar, reparar o mejorar el tejido dañado o ausente en el cuerpo humano [1]; [2]. Tradicionalmente, los injertos o implantes se obtienen de fuentes alogénicas (de otro individuo), sintéticas o autólogas (del propio paciente). Sin embargo, estos enfoques tienen limitaciones importantes. Los injertos alogénicos conllevan riesgos de rechazo inmunológico, transmisión de enfermedades y reabsorción por el cuerpo. Los materiales sintéticos pueden desencadenar respuestas inmunitarias, causar infecciones o incluso resultar en la expulsión del implante [1]; [2].

Una solución prometedora involucra el diseño de injertos sintéticos utilizando componentes que se encuentran en la matriz extracelular. Dentro de esta línea de investigación, el grupo de investigación conocido como G.I.R. Bioforge está desarrollando biopolímeros llamados recombinámeros tipo elastina, conocidos como "ELR's". Los ELR presentan una excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad y bioactividad, además de tener propiedades mecánicas ajustables [3].

La bio-impresión 3D ofrece una solución ideal para crear prótesis e injertos que imiten la estructura de los tejidos naturales. Los biopolímeros ELR's, al compartir similitudes bioquímicas y metabólicas con la matriz extracelular del cartílago, permiten la creación de injertos bio-sintéticos de alta calidad.

En este Trabajo de Fin de Máster se ha utilizado la bio-tinta "ZS-EI-ELR" cargada con condrocitos de conejo para imprimir andamios, previamente diseñados mediante programas CAD, los cuales tendrán posibles aplicaciones en regeneración de cartílago. A través de técnicas de expansión celular, se han generado cantidades significativas de condrocitos, los cuales fueron mezclados con el biopolímero y, así, obtuvimos la bio-tinta. De esta manera, hemos podido evaluar la viabilidad celular en un entorno tridimensional.

Además, en este proyecto se ha iniciado la investigación de un nuevo proceso de lisis celular, etapa crucial en la producción de los biopolímeros "ELR". Este nuevo proceso de lisis celular se plantea con el propósito de proporcionar información sobre la escalabilidad del proceso, lo que podría ser fundamental para futuras aplicaciones industriales. En este sentido, se investigó un proceso de congelación rápida inducida por nitrógeno líquido como método alternativo para la ruptura celular de las bacterias responsables de la producción del bio-polímero. Se llevó a cabo pruebas en paralelo para comparar el rendimiento obtenido con los métodos convencionales utilizados en la bio-producción de estos polímeros y el nuevo método propuesto.

Palabras Clave:

Bio-impresión 3D, Regeneración de Tejidos, Condrocitos, Tejido osteocondral, Condrocitos, ingeniería de tejidos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTO.....	I
RESUMEN	II
ÍNDICE.....	III
1. OBJETIVOS.....	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Bio-impresión 3D.	3
2.2. La bio-impresión en la regeneración de tejidos.	3
2.3. Principales aplicaciones de la bio-impresión.	4
2.4. Tipos de tintas y bio-tintas	5
2.5. Regeneración de tejidos usando condrocitos.	10
2.6. Polímeros recombinantes tipo elastina ELR's.	12
2.7. Bio-tinta.	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1. Materiales.	18
3.1.1. Reactivos.	18
3.1.2. Bio-impresora y otros equipos.	19
3.1.3. Biológicos.	21
3.2. Métodos.	21
3.2.1. Producción y purificación de los ELR's.	21
3.2.2. Ruptura celular mediante congelación ultrarrápida usando nitrógeno líquido. 24	
3.2.3. Caracterización de los ELR's.	25
3.2.4. cultivo celular.	28
3.2.5. Impresión 3D.	29
3.2.6. Citotoxicidad y proliferación celular.	32
3.2.7. Obtención de imágenes mediante microscopia confocal.	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
4.1. Lisis celular.	35
4.2. Caracterización de los ELR's.	43
4.3. Cultivo celular.	44
4.4. Bio-impresión 3D.	46
4.5. viabilidad celular	50
5. CONCLUSIONES	57
6. Bibliografía.....	58

7. Anexos	65
8. ABREVIATURAS	76
9. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	78

1. OBJETIVOS.

El objetivo principal de este TFM es realizar la bio-impresión de andamios utilizando un ELR como "bio-tinta" que esté cargada con condrocitos, con el propósito de evaluar la viabilidad celular en los andamios impresos. Esta evaluación busca determinar si la bio-tinta es adecuada para su posible aplicación en ingeniería de tejidos, es decir, si los andamios impresos no solo proporcionan soporte estructural sino también un entorno propicio para el crecimiento y desarrollo de los condrocitos.

Los objetivos específicos previstos para este trabajo de fin de Máster son los siguientes:

- Optimización de los parámetros de Bio-impresión:
Uno de los objetivos del presente TFM se fundamenta en la investigación previa llevada a cabo en el grupo de investigación Bioforge, la cual se plasmó en una tesis doctoral. En este contexto, nuestro propósito consiste en optimizar los parámetros requeridos para la Bio-impresión de andamios 3D previamente diseñados. A través de este enfoque, buscamos mejorar y perfeccionar el proceso de bio-impresión, permitiendo así una fabricación más eficiente y precisa de estructuras 3D las cuales se pretenden usar en la regeneración de tejidos, específicamente la regeneración de cartílagos. Al aprovechar el conocimiento previo obtenido en el grupo de investigación, aspiramos a avanzar significativamente en esta área de estudio y contribuir al desarrollo y aplicaciones de tecnología dentro de la ingeniería de tejidos.
- Impresión de andamios 3D:
El siguiente objetivo de este TFM consiste en llevar a cabo la impresión de andamios 3D utilizando una bio-tinta desarrollada por el grupo de investigación Bioforge. Esta bio-tinta estará cargada con células, en concreto condrocitos, que son células especializadas en el tejido cartilaginoso. Una vez que hayamos optimizado los parámetros de bio-impresión previamente mencionados, procederemos a implementar esta técnica avanzada para imprimir andamios que contengan las células mencionadas. El propósito de esta fase de estudio es lograr la creación de andamios tridimensionales que sean capaces de albergar y mantener la viabilidad de los condrocitos, sentando así la base para futuras aplicaciones en la regeneración de tejido cartilaginoso y potencialmente en otros campos de la ingeniería de tejidos
- Optimización de un proceso de disrupción celular:
El siguiente objetivo de este TFM se centra en la producción de biopolímeros tipo elastina o recombinámeros tipo elastina ELR's. Reconociendo que una de las etapas cruciales en este proceso es la disrupción celular, proponemos una aplicación industrial mediante la implementación de un método de disrupción celular basada en el uso de nitrógeno líquido. En este sentido, llevaremos a cabo ciclos de congelación y descongelación de las células "Escherichia coli" con el fin

de lograr la ruptura celular efectiva y obtener los bio-polímeros necesarios para nuestro Trabajo de Fin de Máster.

Mediante este enfoque, pretendemos desarrollar una técnica eficiente y escalable para la producción de bio-polímero tipo elastina o recombinámero tipo elastina ELR's, que son de gran interés en la ingeniería de tejidos y otras aplicaciones biomédicas. Al utilizar nitrógeno líquido como método de disrupción celular, esperamos obtener rendimientos comparables al método utilizado en el laboratorio y de igual pureza de los bio-polímeros deseados, allanando el camino hacia su potencial aplicación industrial y contribuir al avance en la fabricación de biomateriales con propiedades mecánicas y funcionales específicos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Bio-impresión 3D.

La bio-impresión 3D es una tecnología prometedora en medicina regenerativa y biotecnología que permite crear estructuras tridimensionales utilizando biomateriales y células vivas. Ofrece ventajas como la personalización y precisión en la fabricación de tejidos, superando desafíos en la medicina, como la escasez de donantes y el rechazo inmunológico. Esta técnica se centra en la impresión de células y tejidos, lo que tiene aplicaciones en la regeneración de la piel y la creación de órganos funcionales como corazones, riñones y huesos. La bio-impresión 3D es una herramienta poderosa en constante evolución con un gran potencial en la ciencia y la medicina [4]; [5]; [6]; [7].

2.2. La bio-impresión en la regeneración de tejidos.

La evolución de la bio-impresión 3D ha sido significativa desde sus inicios en la década de 1980, cuando se desarrollaron las primeras técnicas de impresión 3D. En la década de 1990, se comenzaron a utilizar materiales biocompatibles para la impresión, en la década de 2000, se desarrollaron técnicas de impresión más avanzadas, como la impresión por chorro de tinta y la impresión por deposición fundida. En la década de los 2010 se produjo un gran avance en la bio-impresión 3D de tejidos y órganos, y se comenzaron a utilizar células vivas para imprimir estructuras biológicas complejas. En la actualidad la bio-impresión 3D se considera una tecnología prometedora para la fabricación de tejidos y órganos para su uso en medicina regenerativa y trasplantes [7].

A lo largo de los años, la bio-impresión 3D ha experimentado avances significativos:

En 2001, se enfatizó la importancia de analizar la estructura de superficies de polímeros para andamios en ingeniería de tejidos [7]. En 2003, se logró la impresión de tejido vivo de cartílago [7]. En 2006, se logró la bio-impresión con encapsulación de células hepáticas en hidrogeles [7]; [8]. En 2008, se aumentó el interés en la conexión entre la bio-impresión 3D y la regeneración ósea mediante el uso de hidroxiapatita en andamios [9]. En 2011, se desarrolló una bio-impresora 3D similar a las impresoras de inyección de tinta [10]. En 2015, se logró emular las propiedades biomecánicas del tejido cartilaginoso y se desarrolló una bio-tinta adecuada para la bio-impresión de tejido cartilaginoso [11]; [12]. En 2016, se descubrió la importancia de la geometría de los poros en los andamios utilizados para la creación de tejidos [13]; [14]. En 2019, se demostró que la bio-impresión de andamios con matriz extracelular de cartílago y exosomas podría ser eficaz para tratar la osteoartritis [15]. En 2020, se logró crear un menisco artificial apto para implantación [16].

2.3. Principales aplicaciones de la bio-impresión.

REGENERACION DE TEJIDOS.

La bio-impresión 3D se considera una solución innovadora para enfrentar la escasez de órganos y tejidos disponibles para trasplantes. Esta técnica permite crear tejidos y órganos utilizando las células del propio paciente, eliminando la necesidad de donantes y reduciendo los riesgos asociados con los medicamentos inmunosupresores. Se basa en tres enfoques principales: biomimética, autoensamblaje autónomo y construcciones de bloques de microtejidos, todos destinados a crear estructuras tridimensionales que imiten tejidos y órganos naturales. La bio-impresión ofrece una perspectiva prometedora en la medicina regenerativa y los trasplantes, ofreciendo una solución potencialmente más segura y efectiva para abordar la creciente demanda de órganos y tejidos [7]; [17].

ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS

La bio-impresión 3D tiene el potencial de revolucionar la industria farmacéutica al agilizar el desarrollo y las pruebas de medicamentos [7]; [18]. Al incorporar modelos de tejidos bio-impresos en 3D para realizar pruebas de drogas de alto rendimiento [7]; [19], se pueden simular respuestas precisas a la administración de medicamentos en órganos específicos. Esto acelera el proceso de evaluación, reduce los costos y mejora la comprensión de cómo interactúan los fármacos con los tejidos y órganos. En última instancia, esto podría llevar a un desarrollo de medicamentos más eficiente y a una mejor capacidad para prever los resultados de los ensayos clínicos antes de avanzar a etapas posteriores [7].

ESTUDIO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

Tradicionalmente, las enfermedades infecciosas se han tratado con medicamentos cuando el sistema inmunológico del paciente no puede combatir la infección por sí solo. Para comprender mejor cómo los patógenos interactúan con el sistema inmunológico, se han utilizado cultivos 2D. Sin embargo, estos cultivos no reflejan con precisión lo que ocurre en el cuerpo. Los modelos en 3D ofrecen una plataforma más efectiva para el desarrollo de medicamentos y vacunas, ya que simulan de manera más realista el entorno de los tejidos humanos. Esto permite un mejor estudio de las interacciones entre patógenos y el sistema inmunológico, lo que podría mejorar nuestra comprensión de las infecciones y la evaluación de nuevos tratamientos [7].

ESTUDIO DE TUMORES

Actualmente, el desarrollo de terapias contra el cáncer implica evaluaciones en cultivos 2D y estudios en animales [7]. Sin embargo, la bio-impresión 3D ofrece una alternativa avanzada al permitir la creación de modelos tumorales que replican las condiciones reales del tumor, incluyendo presión hidrostática, el esfuerzo cortante y la compresión, el estrés de las fuerzas [7]. Esto facilita la comprensión de los mecanismos

detrás del cáncer y la resistencia a tratamientos. La tecnología de bio-impresión 3D podría revolucionar la forma en que se desarrollan terapias antitumorales al ofrecer un enfoque más preciso y relevante para la investigación y desarrollo de nuevos tratamientos [7].

En cuanto a las problemáticas actuales de la bio-impresión 3D, incluyen el tiempo de procesamiento largo para imprimir estructuras, la necesidad de mantener condiciones específicas para la supervivencia celular y la incapacidad para crear estructuras dinámicas similares a los tejidos vivos. Estos desafíos requieren investigación continua en hidrogeles, formulaciones y condiciones para garantizar buenas propiedades mecánicas y alta viabilidad celular [7].

2.4. Tipos de tintas y bio-tintas

El enfoque convencional para tratar defectos óseos segmentarios extensos en entornos clínicos suele implicar procedimientos quirúrgicos repetidos y dependen de la disponibilidad de donantes para la obtención de tejidos. En este contexto, la tecnología de bio-impresión 3D surge como una promisorio herramienta terapéutica. No obstante, el desafío persiste en la implantación exitosa de la bio-impresión 3D directamente en el lugar de la lesión, lo que se conoce como bio-impresión in situ [20].

La tecnología de bio-impresión 3D ofrece la posibilidad de diseñar andamios con características morfológicas altamente precisas, adaptados para diversos tipos de tejidos, entre ellos los tejidos musculoesqueléticos como el cartílago y el hueso. Mediante la integración de imágenes de tomografía computarizada "TC" con el proceso de bio-impresión 3D, se ha logrado la fabricación de andamios personalizados a escala anatómica para la regeneración ósea, este enfoque permite la creación de estructuras que se ajustan específicamente a las dimensiones y forma del paciente, lo que potencialmente contribuye a un mejor resultado en los procedimientos de regeneración ósea [21].

Resulta esencial investigar de manera detallada el impacto del material seleccionado, la bio-tinta, así como los parámetros empleados en el proceso de bio-impresión, ya que estos factores influyen directamente en el resultado final obtenido. La noción de "capacidad de impresión" de una bio-tinta resalta su aptitud para ser utilizada en el proceso de bio-impresión 3D. en este contexto, los hidrogeles emergen como una elección sobresaliente debido a su compatibilidad con tejidos biológicos. Sin embargo, la imprimibilidad "printabilidad" de estos hidrogeles se convierte en un aspecto crítico para aprovechar al máximo sus propiedades y garantizar una precisión óptima en la impresión de estructuras tridimensionales [22].

Definición de tintas biológica o bio-tintas

El concepto de bio-tinta hace referencia a la disposición tridimensional de células o agregados celulares, ya sea en el interior de biomateriales o en un entorno en tres dimensiones [23]; [24].

Recientemente, se ha propuesto una clasificación del término “bio-tinta” en cuatro subcategorías: bio-tintas de soporte, bio-tintas fugitivas, bio-tintas estructurales y bio-tintas funcionales [25]. Esta división se basa en distinciones específicas entre estas categorías:

Bio-tintas de soporte: Estos materiales están diseñados para sostener y respaldar poblaciones celulares durante la fase de impresión, actuando como una matriz extracelular artificial conforme las células se multiplican [25]; [26].

Bio-tintas fugitivas: se refieren a materiales temporales a de sacrificio que pueden ser eliminados de manera rápida, permitiendo la formación de huecos o canales internos dentro de estructuras impresas, especialmente utilizados para bio-impresiones 3D vasculares [25]; [26].

Bio-tintas estructurales: Estos materiales se emplean para brindar integridad mecánica a las estructuras bio-impresas. Pueden ser temporales, pero su duración en el tiempo es relativamente más prolongada (por ejemplo, termoplásticos como la policaprolactona) [25]; [26].

Bio-tintas funcionales: estas bio-tintas proporcionan señales bioquímicas, mecánicas o eléctricas destinadas a influir en el comportamiento celular después de la impresión de una estructura [25]; [26].

La distinción propuesta entre estas diferentes categorías tiene en cuenta los roles específicos que desempeñan en el proceso de bio-impresión y en la función final de los construcciones impresas [25]; [26].

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, una bio-tinta se refiere a una composición celular formulada de manera adecuada para ser procesada mediante tecnologías automatizadas de bio-fabricación. Estas tintas pueden incorporar componentes biológicamente activos y biomateriales. Los constituyentes biológicos pueden variar en su disposición y conformación, tales como células individuales, agregados celulares en forma de esferoides o bastones, organización en minitejidos u órganos, y células revestidas por capas delgadas de materiales. También pueden incluir células encapsuladas en microambientes coloidales personalizados o cargados en microportadores. Además, las bio-tintas tienen la capacidad, aunque no es obligatoria, de contener moléculas bioactivas como factores de crecimiento, ADN, miARN, citocinas, exosomas y diversos biomateriales. Esta definición de bio-tintas no depende de la tecnología específica de bio-fabricación empleada, abarcando métodos como transferencia directa por láser, microfluídica, ensamblaje, inyección de tinta, dispensación trazada y enfoques litográficos [23]; [24]; [26].

En el ámbito de la bio-impresión 3D, es esencial establecer una diferencia entre las bio-tintas, que están compuestas por células incorporadas, y las tintas de biomateriales, que carecen de células. Por consiguiente, los biomateriales que conforman las biotintas deben desempeñar la función de vehículo para el transporte de células durante el proceso de formulación y bio-impresión. En contraste, las tintas de

biomateriales pueden ser impresos, pero solo se les puede incorporar células después de que el proceso de bio-impresión haya concluido [23], [27]. En consecuencia, las tintas de bio-materiales no se consideran como bio-tintas, dado que normalmente las células se introducen en la estructura del biomaterial impreso por separado, en una etapa de siembra distinta [23].

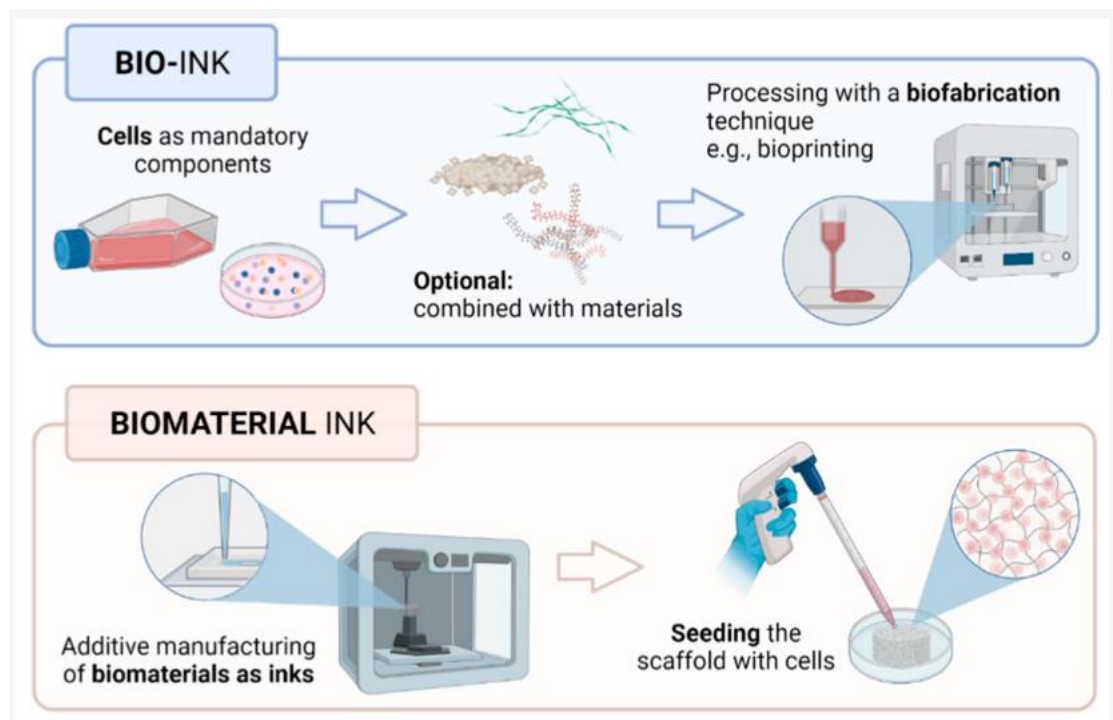


Figura 1: Diferencia entre una bio-tinta “cargado con células” y una tinta de biomaterial “sin células”. En el caso de las bio-tintas “ilustradas arriba”, las células son elementos intrínsecos de la formulación de bio-impresiones 3D, ya sea incorporadas en microportadores, encapsulados en microgeles, integradas en un hidrogel físico o compuestas con precursores de hidrogel. Por otro lado, en las tintas de biomateriales “representados abajo”, las células se introducen en la estructura del biomaterial impreso en 3D, lo que reduce las restricciones biológicas de las tintas (creado con Biorender.com adaptado de [23]; [26]).

Los materiales de hidrogel son los más comúnmente empleados en la creación de bio-tintas; sin embargo, es importante destacar que las bio-tintas no se limitan únicamente a soluciones moleculares de precursores de hidrogel [23]; [28]. Las bio-tintas también pueden abarcar microportadores [23]; [29], nano partículas que actúan como plataformas de liberación de fármacos [23]; [30], o nanofibras, que mejoran las propiedades reológicas y mecánicas [31]. Además, los microgeles que contienen células [32] o microesferas [33] pueden ser incorporados como componentes en bio-tintas, otorgándoles funcionalidades adicionales [23].

Hidrogeles e Ingeniería de Tejidos

Las técnicas de ingeniería de tejidos se centran en el cultivo de células vivas dentro de una estructura tridimensional. Estas técnicas se basan en tres requisitos esenciales: (1) contar con una matriz adecuada para el trasplante y el mantenimiento de las células; (2) promover la reparación de células que contribuyan a la formación de una matriz funcional; (3) disponer de moléculas biológicas activas, como citocinas y factores de crecimiento, que faciliten la generación de nuevos tejidos [23].

La matriz sintética desempeña un papel fundamental al proporcionar la estructura sobre la cual se desarrolla la arquitectura tisular. Las células son esenciales, ya sean las propias del hospedador que se multiplicarán in vivo dentro de la matriz sintética, o células del hospedador cultivadas previamente in vitro en la matriz y luego reintroducidas en el paciente. Estas células son responsables de regenerar nuevo tejido mediante la síntesis de nueva matriz extracelular. Mientras tanto, la estructura sintética sirve como almacén, brindando estabilidad mecánica y dirección para el crecimiento celular en un entorno tridimensional. La interacción entre las células y el hidrogel es de suma importancia para el éxito de las aplicaciones en ingeniería de tejidos [23].

Los hidrogeles son definidos como polímeros que son hidrofílicos y están entrecruzados, lo que les permite absorber agua y fluidos biológicos, y convertirse en redes 3D insolubles. Estos hidrogeles pueden ser derivados de diversos materiales que son solubles en agua, incluyendo tanto polímeros naturales como sintéticos, así como proteínas y otras moléculas. Su estructura se forma principalmente a través de un proceso de reticulación, en el cual se establece una red tridimensional que no es soluble en fluidos biológicos. Además, esta red se mantiene en equilibrio dentro de un ambiente acuoso debido a un balance entre las fuerzas elásticas del polímero reticulado y las fuerzas osmóticas originadas en el líquido circundante [23].

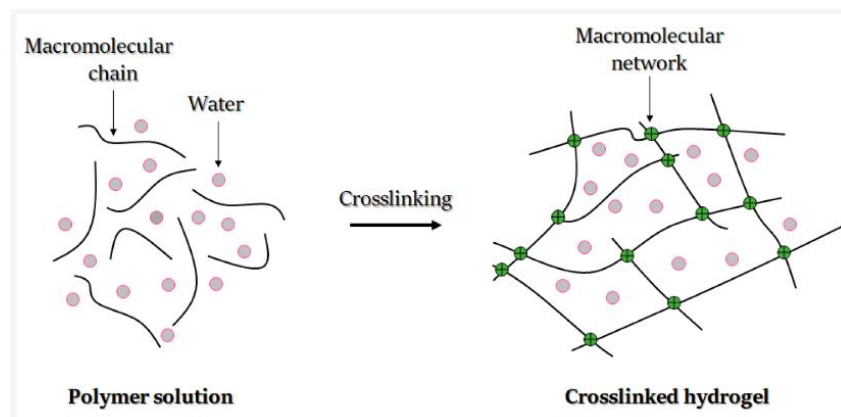


Figura 2: Principio de la formación de hidrogeles [23]; [26].

Los cuatro criterios de diseño de Wichterle son los siguientes [23]; [34]:

1. Evitar la solubilización de moléculas de hidrogel en bio-fluidos
2. Formar una estructura química y bioquímica estable.
3. Lograr una alta permeabilidad de nutrientes y residuos biológicos.
4. Reconstruir características físicas similares a los tejidos biológicos nativos

En el campo de la ingeniería de tejidos, ciertos hidrogeles tienen la capacidad de entrecruzarse in situ, permitiendo procedimientos menos invasivos y evitando la necesidad de cirugía abierta [23]; [35]. Además, es posible entrecruzar hidrogeles en diversas condiciones, siempre y cuando las células embebidas sean capaces de sobrevivir a las transiciones químicas o físicas asociadas con el proceso de gelificación [23]; [36].

Tintas biológicas a base de hidrogel natural

Tintas biológicas a base de proteínas

Colágeno:

El colágeno es ampliamente reconocido como uno de los biopolímeros más prominentes en la investigación biomédica y en los estudios de cultivo celular. Sin duda alguna, constituye el componente más esencial de la Matriz Extracelular en la mayoría de los tipos de tejidos. El colágeno, un polímero catiónico flexible, es considerado la proteína estructural clave en vertebrados, compuesta mayormente por motivos peptídicos hidrofóbicos. Los métodos de aislamiento y purificación del colágeno, especialmente del tipo I, están bien establecidos en la comunidad científica [23]; [37]; [38].

El colágeno es un material que permite la formación de hidrogeles 3D robustos y biodegradables debido a su estructura de triple hélice y su baja antigenicidad. Presenta una excelente biocompatibilidad, mínimas reacciones inmunológicas, una clara interacción con otras moléculas biológicas y un comportamiento polielectrolítico [23]; [39]; [40]; [41]. Los andamios de hidrogel basados en colágeno han demostrado ser valiosos en diversas aplicaciones biomédicas, como sustitutos de la córnea, cicatrización de heridas, ingeniería de tejido óseo y la bio-impresión 3D de estructuras [23]; [35]; [42]; [43]; [44].

El colágeno tipo I, que pertenece a la subfamilia de colágenos formadores de fibrillas y se caracteriza por sus tres hélices alfa [23]; [45]; [46]. A pesar de la favorable biocompatibilidad del colágeno, su aplicación en la bio-impresión 3D directa enfrenta desafíos, como la limitada estabilidad mecánica, especialmente al combinarse con células o esferoides tisulares, y una gelificación lenta a temperaturas fisiológicas [23]; [43].

Gelatina:

La gelatina es una proteína soluble en agua obtenida por hidrólisis parcial de colágeno de animales como el ganado vacuno y cerdos. Puede ser de tipo A o B, según el proceso de hidrólisis ácida o básica utilizado. La gelatina tiene la capacidad de formar geles a bajas temperaturas, pero su punto de fusión "30°C a 35°C" limita su uso a temperaturas fisiológicas o superiores [23]. Para superar esta limitación, se requieren modificaciones químicas, otros polímeros o proteínas en aplicaciones 3D [23]; [47].

Los hidrogeles de gelatina se utilizan en la regeneración de tejido nervioso [23]; [48], reconstrucción de tejidos blandos [23]; [49], reparación ósea [23]; [50] y bio-impresión 3D con células incorporadas [23]. A pesar de su biocompatibilidad y capacidad degradante, la baja capacidad de impresión de la gelatina limita su uso, para abordar este problema se emplean agentes de reticulación y mezclas con otros componentes [23]; [51]. La metacrilación de la gelatina es común para crear biopolímeros derivados de la matriz extracelular, permitiendo su entrecruzamiento químico [23]; [52]; [53].

En resumen, la gelatina es un material valioso en aplicaciones biomédicas, pero su capacidad de impresión limitada se ha mejorado mediante modificaciones y mezclas.

Fibrina:

La fibrina, una proteína fibrosa, desempeña un papel en la coagulación sanguínea. Se forma a partir de monómeros de fibrinógeno que se polimerizan de manera espontánea cuando interactúan con la trombina, y se entrecruzan mediante la actividad de la transglutaminasa del factor de coagulación XIII-A [23]; [54]. Desempeña un papel crucial en la cicatrización de heridas y se ha utilizado en aplicaciones médicas como agentes hemostáticos y adhesivos quirúrgicos [23]; [55]. Los hidrogeles de fibrina se utilizan en la ingeniería de tejidos y han demostrado ser efectivos en la regeneración de tejido óseo y nervioso [23]; [56]; [57]; [58].

La fibrina también se utiliza en la bio-impresión 3D debido a su elasticidad y capacidad para facilitar la interacción celular [23]; [45]. Se ha empleado en la creación de tejido cardíaco funcional y sustitutos de piel [23]; [59]; [60]. Sin embargo, tiene limitaciones en cuanto a sus propiedades mecánicas y viscosidad [23]; [61]. Además, la alta viscosidad de la fibrina en su forma pre-polímero puede dificultar la extrusión precisa de la tinta y la preservación de la fidelidad de la forma [23]; [61].

Para superar estos desafíos, se han explorado estrategias como combinar fibrina con otros materiales como gelatina [23]; [62] o GelMA para mejorar la imprimibilidad y la estabilidad de las bio-tintas. Estas combinaciones han demostrado producir construcciones celulares más sólidas y estables, lo que las hace prometedoras en aplicaciones de bio-impresión 3D [23]; [63].

Seda:

La seda, una proteína fibrosa insoluble, producida por arañas y gusanos de seda [23]; [64], tiene propiedades únicas debido a su estructura química con regiones hidrofílicas e hidrofóbicas alternas. Esto le permite formar diversas estructuras, como fibras y geles, con propiedades mecánicas favorables. Estas presentan una combinación de resistencia, elasticidad y propiedades hipoalérgicas favorables [23]; [64].

Estos hidrogeles se han utilizado en la bioingeniería de tejidos [23]; [65]; [66] cicatrización de heridas [67], regeneración ósea [68] y cartílago, liberación controlada de fármacos [69] y bio-impresión 3D con células [70]; [71]; [72]; [73]; [74]. Una bio-tinta a base de seda, fibroína y gelatina ha demostrado ser eficaz en la impresión de un andamio de menisco 3D [23], lo que sugiere su potencial en la creación de estructuras complejas de tejido con células, sin afectar negativamente su funcionalidad.

2.5. Regeneración de tejidos usando condrocitos.

La condrogénesis es el proceso mediante el cual se forma el cartílago a partir de células madre mesenquimales. Los condrocitos, células especializadas en cartílago, tienen una alta diferenciación y una capacidad limitada de proliferación. Su nutrición se basa en la difusión de nutrientes desde el líquido sinovial [1]; [2].

El condrón, que consta de la matriz extracelular (MEC) pericelular, la matriz extracelular territorial y un condrocito, es la unidad funcional y estructural del cartílago. Estas matrices cumplen funciones metabólicas y brindan protección celular contra deformaciones [1]; [2].

Es importante destacar que la morfología y función de los condrocitos varían según la capa en la que se ubiquen. A pesar de su limitada capacidad regenerativa, los condrocitos desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la matriz [1]; [2].

De acuerdo con los objetivos de este TFM, es relevante destacar las diversas técnicas actualmente disponibles para la regeneración de tejidos osteocondral. Estas técnicas incluyen:

Las microfracturas implican la perforación de la lámina calcificada del hueso con el propósito de estimular la formación de fibrocartílago, principalmente compuesto por colágeno tipo I. Este proceso involucra la interacción de células madre mesenquimales presentes en la médula ósea junto con factores de crecimiento. Sin embargo, es importante señalar que el fibrocartílago resultante no posee las mismas características que el cartílago articular, que se compone principalmente de colágeno tipo II [1]; [2].

La mosaicoplastia es un procedimiento que implica la extracción de uno o varios injertos osteocondrales de una región de tejido sano para su posterior colocación en la zona afectada. Estos injertos se pueden dividir en dos categorías según su origen. Los injertos autólogos se obtienen del mismo individuo que presenta el problema en el cartílago, lo que tiene ventajas como la biocompatibilidad y una recuperación más rápida. Sin embargo, su disponibilidad es limitada y la extracción puede causar molestias. Por otro lado, los injertos alogénicos provienen de donantes humanos y, aunque ofrecen ciertas facilidades en cuanto a obtención, presentan riesgos de transmisión de enfermedades al receptor. A pesar de esto, esta técnica permite la implantación de cartílago hialino en la zona afectada, aunque es posible que el espacio dejado por estos injertos sea ocupado por fibrocartílago [1]; [2].

El desbridamiento artroscópico implica un lavado de la región dañada seguido de la eliminación de las partes deformadas o afectadas como resultado de la lesión. Si bien no es adecuado para lesiones extensas, este tratamiento estimula la formación de fibrocartílago [1]; [2].

La artroplastia por abrasión se basa en la creación de una superficie rugosa para estimular la coagulación sanguínea en la zona de interés. Sin embargo, este procedimiento no involucra el hueso subcondral, lo que significa que no hay interacción con las células madre mesenquimales de la médula ósea en la lesión. Como resultado, este tratamiento favorece la formación de fibrocartílago [1]; [2].

La condroplastia se vale de la tecnología láser o de radiofrecuencia para eliminar las áreas dañadas por la lesión. Sin embargo, una desventaja significativa es que estas fuentes de energía pueden dañar los condrocitos. Además, este enfoque tiende a generar fibrocartílago en la zona lesionada [1]; [2].

El trasplante autólogo de condrocitos (ACI) se basa en la extracción de condrocitos del propio individuo, preferentemente de regiones menos sometidas a esfuerzo mecánico. Estos condrocitos se cultivan en el laboratorio para aumentar su cantidad y luego se implantan en el paciente. Este enfoque tiene ventajas como una baja respuesta inmunológica y un bajo riesgo de enfermedades transmitidas. Sin embargo, presenta limitaciones, como el tiempo necesario para obtener suficientes condrocitos, problemas de desdiferenciación, la invasividad del procedimiento de recolección y la implantación en la zona afectada [1]; [2].

La cirugía de prótesis articular total, conocida como artroplastia total, es considerada como la última alternativa terapéutica. Implica la implantación de una prótesis en la articulación dañada como medida de último recurso [1]; [2].

2.6. Polímeros recombinantes tipo elastina ELR's.

Los seres vivos están compuestos por una amplia variedad de moléculas, algunas de las cuales son muy complejas desde el punto de vista estructural, mientras que otras son más simples. Estas moléculas, conocidas como biomoléculas orgánicas, se agrupan en cuatro categorías principales: hidratos de carbono, ácidos nucleicos, aminoácidos y lípidos. Cada una de estas biomoléculas cumple una serie de funciones esenciales en los organismos. Estas funciones incluyen [75]; [76]:

Función Estructural: Algunas biomoléculas, como las proteínas y los lípidos, desempeñan un papel crucial en la formación de estructuras celulares. Por ejemplo, las proteínas son componentes clave de las membranas celulares y los lípidos forman la bicapa lipídica que rodea a las células [75]; [76].

Función Metabólica: Las biomoléculas participan en numerosas reacciones químicas que ocurren dentro de las células. Los hidratos de carbono y los lípidos, por ejemplo, son fuentes de energía importantes para el metabolismo celular [75]; [76].

Función Reguladora: Los ácidos nucleicos, como el ADN y el ARN, almacenan y transmiten información genética que regula la síntesis de proteínas y otros procesos celulares. Las proteínas también actúan como enzimas, que son reguladores clave de las reacciones químicas en el cuerpo [75]; [76].

Función de Almacenamiento de Información: Los ácidos nucleicos, en particular el ADN, almacenan la información genética que se hereda de una generación a otra y que determina las características de un organismo [75]; [76].

En conjunto, estas biomoléculas trabajan en conjunto para mantener la estructura y la función de los seres vivos, permitiendo que los organismos crezcan, se desarrollen y respondan a su entorno de manera coordinada y eficiente [75]; [76].

Las proteínas son cadenas de aminoácidos que se encuentran unidos mediante enlaces peptídicos. En la naturaleza, existen un total de 20 aminoácidos **Tabla 15**. Esto significa que las proteínas pueden tener secuencias únicas, ya que están formadas por diferentes combinaciones de estos aminoácidos.

No es solo el tipo de aminoácido en una proteína lo que importa, sino también su posición específica en la cadena y la longitud total de la misma. Esto se debe a que las interacciones entre los aminoácidos, que pueden ser atractivas o repulsivas, influirán en la forma tridimensional que adoptará la proteína. Esta forma tridimensional, a su vez, determinará la función que la proteína llevará a cabo en el organismo.

En resumen, las proteínas son moléculas sumamente diversas y versátiles debido a las variaciones en los tipos, las secuencias y las configuraciones espaciales de los aminoácidos que las componen. Estas variaciones estructurales son esenciales para la amplia gama de funciones que las proteínas desempeñan en los organismos vivos [77].

La elastina es una proteína fundamental en la matriz extracelular de los tejidos, y su función principal es proporcionar elasticidad a estos tejidos. La secuencia aminoacídica de la elastina se caracteriza por la repetición frecuente del dominio VPGXG, donde X representa cualquier aminoácido excepto la prolina (P/Pro). Esta secuencia se puede representar de manera más detallada como Valina (Val), Prolina (Pro), Glicina (Gly), seguido nuevamente de otro aminoácido cualquiera y finalmente otra Glicina [78].

La elastina desempeña un papel crucial en la estructura de los tejidos, ya que su elasticidad y capacidad de recuperación le permiten adaptarse a una variedad de tejidos en el cuerpo. Además, la elastina puede formar enlaces cruzados, creando una red que interactúa con otras proteínas presentes en la matriz extracelular, así como con proteínas celulares. Esta interacción contribuye a la función y estabilidad de los tejidos en el organismo [78].

Los recombinámeros similares a la elastina (ELR) son una familia de polipéptidos que han sido genéticamente modificados y que se basan en la secuencia de elastina VPGXG, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Estas secuencias de ELR pueden ser ajustadas de manera significativa a través de la introducción de funcionalidades específicas mediante métodos de recombinación de ADN. Los polímeros que resultan de este proceso conservan propiedades similares a las de la elastina natural. Entre estas propiedades se encuentran la capacidad de autoensamblaje y el comportamiento termosensible. Estos polímeros experimentan una transición de fase reversible a nivel molecular por encima de una temperatura de transición característica (Tt) [79].

La síntesis de los genes poliméricos ELR puede lograrse mediante métodos iterativos-recursivos que aseguran una alta precisión en la obtención de la secuencia polimérica deseada a través de ligaciones unidireccionales controladas [79]; [80]. De esta manera, es posible diseñar ELR con secuencias de aminoácidos específicas para obtener las propiedades físicas deseadas. Esta ingeniería se puede lograr mediante tecnología de ADN y permitir la producción a gran escala utilizando cepas de *Escherichia coli* [79]; [81]. La tecnología de ADN recombinante permite un diseño preciso de la estructura de los ELR, lo que incluye ajustar su temperatura de transición (Tt) final. Esto presenta beneficios adicionales al permitir métodos simples de purificación basados en ciclos de temperatura por encima y por debajo de la Tt [79]; [82].

El diseño de los ELR juega un papel crucial en su aplicación final, ya que distintas bioactividades y funcionalidades químicas específicas pueden ser incorporadas en ubicaciones precisas a lo largo de su estructura. Esto permite ajustar propiedades particulares, como la biocompatibilidad y las propiedades mecánicas [79]; [83].

En entornos acuosos, los recombinámeros similares a la elastina siguen un proceso de autoensamblaje que se rige por interacciones electrostáticas. Esto lleva a una plegadura hidrofóbica y a la pérdida de las estructuras de clatrato de agua que mantienen disuelto al polipéptido a temperaturas bajas. En este nuevo estado, las cadenas poliméricas adoptan una disposición en forma de espiral β . La temperatura que define esta transición, conocida como temperatura de transición (T_t), depende principalmente de la secuencia de aminoácidos y la masa molecular del ELR [79]; [84].

La presencia de residuos polares en la posición X del pentámero mencionado previamente aumenta la hidrofiliidad en general y eleva la T_t , mientras que mayores pesos moleculares tienen el efecto contrario, disminuyendo considerablemente la T_t [79]; [84].

Los recombinámeros tipo elastina (ELR) ofrecen una solución valiosa en la regeneración de tejidos dañados, al formar parte de una matriz extracelular artificial [79]; [85]. Esta familia de polipéptidos tiene el potencial de brindar un soporte estructural a las células circundantes, fomentando un crecimiento celular natural y adecuado que facilite la completa integración del andamio en el tejido circundante. Es fundamental lograr una integración tridimensional efectiva en el trasplante de células, ya que actúa como sustituto de la matriz extracelular natural. En este contexto, los ELR personalizados, con dominios bioactivos apropiados en su estructura, se perfilan como candidatos ideales para desarrollar hidrogeles inspirados en la naturaleza, capaces de replicar el entorno natural. Esto proporcionaría un entorno propicio para que las células desarrollen sus funciones normales y contribuyan a la recuperación del tejido dañado [79]; [86].

2.7. Bio-tinta.

Las técnicas de bio-impresión 3D han demostrado una versatilidad excepcional en la creación de tejidos artificiales que se asemejan cada vez más a los tejidos naturales. Sin embargo, persisten desafíos en la búsqueda de bio-tintas novedosas que aborden la totalidad de los parámetros complejos requeridos por esta técnica. En un esfuerzo por materializar avances significativos, se ha introducido un nuevo material inteligente basado en recombinámeros similares a elastina (ELR), cuya secuencia molecular ha sido programada de manera específica para desencadenar un proceso de gelificación en tres etapas secuenciales. Esto confiere al material propiedades de impresión altamente mejoradas, marcando un importante avance en la capacidad de la bio-impresión 3D para producir estructuras de tejidos precisas y funcionalmente relevantes [87].

La propiedad de respuesta al calor de los ELR se emplea de manera efectiva para depositar fibras de manera precisa en una plataforma mantenida a una temperatura de

37 °C esta temperatura se encuentra dentro del rango de las temperaturas fisiológicas lo cual es ideal para su aplicación en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos. La naturaleza recombinante de estos materiales asegura una consistencia entre lotes y su adaptabilidad a un tejido específico deseado mediante la inserción de secuencias de aminoácidos bioactivas en su estructura molecular. Este enfoque permite una personalización precisa y la incorporación de características específicas para dirigir la interacción con el tejido objetivo [87].

La biocompatibilidad inherente de los ELR posibilita la impresión de células encapsuladas, al mismo tiempo que actúa como un entorno protector durante todo el proceso de impresión [87].

Seleccionar la bio-tinta adecuada es un aspecto crucial para lograr una producción exitosa de estructuras de tejido impresas que se asemejen a los tejidos naturales. No obstante, las demandas rigurosas de la técnica de impresión 3D en términos de su capacidad para ser impresa [88], sus aspectos biológicos [89], así como sus propiedades mecánicas y estructurales [90], imponen restricciones en las bio-tintas actuales. Estas limitaciones pueden limitar las posibles aplicaciones de esta técnica [91].

Las limitaciones principales en los materiales de origen natural desarrollados como bio-tintas, como el alginato, la gelatina, el colágeno, los péptidos RGD, la fibroína de seda o la fibrina, se encuentran en sus propiedades estructurales y mecánicas, a pesar de que generalmente ofrecen un entorno similar al de la matriz extracelular [92]. En contraste, los materiales sintéticos como el poli(ácido láctico co-glicólico) (PLGA) [93], el ácido plurónico [94]; [95], el poli(etilenglicol) (PEG), el poli(ácido L-láctico) (PLA) y la poli(ϵ -caprolactona) (PCL) ofrecen una mejor capacidad de impresión, pero no pueden proporcionar un entorno propicio para la proliferación celular [87].

Los recombinámeros similares a elastina (ELR) son polipéptidos cuya estructura de aminoácidos se inspira en la disposición de los dominios altamente repetitivos y bien conservados de la tropoelastina de los mamíferos [3]; [79]; [96]. El pentapéptido hidrofóbico VPGXG es una de las secuencias repetitivas más conocidas en la familia ELR, donde X se puede seleccionar para modular las propiedades finales del polímero [3]; [79]; [96].

La producción de ELR se realiza mediante tecnologías de ADN recombinante, lo que permite diseñar secuencias específicas para que muestren propiedades deseadas para una aplicación particular, con un control extremadamente preciso sobre la composición de aminoácidos.

Los ELR, al estar inspirados en la secuencia de la elastina, adquieren muchas de sus propiedades interesantes, lo que los convierte en candidatos útiles para aplicaciones biomédicas [3]; [79]; [96], destacándose por su excelente biocompatibilidad [3]; [79], biodegradabilidad y propiedades mecánicas ajustables. Para las aplicaciones de bio-impresión 3D, su comportamiento inteligente de termorespuesta, definido por la Transición Inversa con la Temperatura (ITT), es especialmente relevante. En soluciones acuosas y por debajo de la temperatura de transición (T_t) del recombinámero, las cadenas poliméricas permanecen solubles en una estructura aleatoria debido a la

hidratación hidrofóbica. Si la temperatura se eleva por encima de la T_t del polímero, ocurre un plegamiento hidrófobo [3]; [79]; [96], lo que resulta en la formación de un hidrogel cuando la concentración es alta. Esta transición de fase reversible se puede aprovechar para depositar ELR en matrices arquitectónicas 3D.

Teniendo en cuenta las ventajas de los ELR's dentro del grupo de investigación Bioforge se desarrolló un hidrogel ELR bio-imprimible que permite la creación de andamios impresos avanzados con estabilidad estructural a lo largo del tiempo. Esto se logró mediante una compleja transición sol-gel del ELR, dividida en tres etapas de gelificación consecutivas, cada una con un propósito específico:

Gelificación Rápida Primaria: Se indujo una gelificación rápida primaria basada en interacciones hidrofóbicas para obtener una respuesta rápida. Esto se logró mediante la ingeniería de la columna vertebral del ELR utilizando un hidrogel que contiene un recombinamero tetrabloque anfifílico previamente informado, conocido como EI [3]; [96]. Esta etapa aseguró una respuesta rápida durante la impresión.

Segunda Estabilización: Se introdujo una segunda etapa de estabilización que proporcionó estabilidad estructural durante la impresión. Esto se logró incorporando un dominio de cremallera de leucina tomado del dominio de dimerización del factor de leucemia hepática (HLF) [3]; [96]. Este dominio de cremallera de leucina (Z) se seleccionó debido a su capacidad para formar estructuras anfifílicas α -helicoidales que se asocian en un modelo de espiral. Esto evitó que las cadenas se deslizaran durante la impresión.

Tercera Estabilización Programada: Se programó una tercera etapa de estabilización para consolidar progresivamente las estructuras impresas. Esto se logró mediante la inclusión de una secuencia similar a la seda en combinación con el tetrabloque EI, combinando propiedades de elastina y seda [3]; [79]; [96]. Se utilizó un péptido de fibroína de Bombyx mori (GAGAGS)₅ de consenso, que tiene una tendencia a asociarse a través de láminas beta, lo que resultó en un endurecimiento de la estructura con el tiempo.

Bloque Bioactivo Terminal: Finalmente, se agregó un bloque bioactivo terminal ([VPGIG]₅-AVTGRGDSPASS)₆ que contenía el conocido tripéptido RGD de adhesión celular dependiente de integrina en el extremo C de la cadena polipeptídica final. Esto mejoró las interacciones célula-recombinamero, abordando las desventajas de las tintas sintéticas en términos de adhesión y proliferación celular [3]; [79]; [96].

A continuación, en la **Figura 3** se puede observar un esquema de la contribución a la gelificación de toda la molécula, proporcionada por cada bloque peptídico:

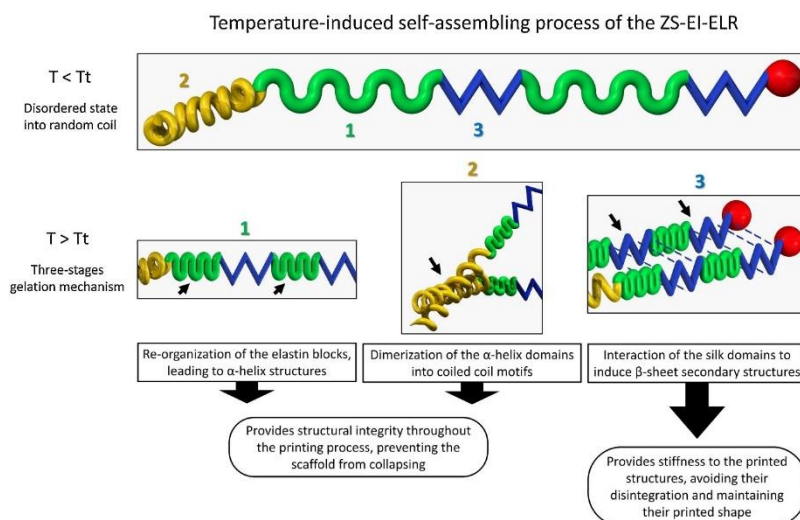


Figura 3: Esquema gráfico de los bloques peptídicos que constituyen la novedosa tinta ELR diseñada y su ensamblaje molecular de bloques que conduce a la estabilización.

Bio-tinta	Aminoácidos
ZS-EI-ELR	$\{[VGGGGKKNQIAIRASFLEKENSALRQEVADLRKELGKCKNILAKYEAGGGG]$ $([(VPGVG)_2 - (VPGEG) - (VPGVG)_2]_{10}[VGIPG]_{60}) - [V(GAGAGS)_{5G}]_2 -$ $([VPGIG]_5AVTGRGDSPASS)_6V$

Tabla 1: Secuencia aminoacídica del pentapéptido ZS-EI-ELR.

El proceso de gelificación secuencial del hidrogel mencionado anteriormente permitió la creación de una tinta que puede ser extruida con facilidad, lo que elimina la necesidad de utilizar algún agente de reticulación externo. Esto significa que la tinta es altamente imprimible, simplifica el proceso de impresión 3D y mejorando su eficiencia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Materiales.

3.1.1. Reactivos.

En la sección experimental de este estudio, es importante destacar que todos los reactivos utilizados fueron adquiridos de fuentes comerciales conocidas por ofrecer productos de calidad, específicamente reactivos de calidad síntesis o analítica.

Reactivos	Abreviación	Marca
<i>Acrilamida / Bis-acrilamida</i>		Sigma Aldrich
<i>Ampicilina</i>		Apolo Científico
<i>Hyclone™ Suero fetal bovino</i>	FBS	Ciencias biológicas de GE Healthcare
<i>Penicilina-Estreptomicina</i>		Lonza, Westburg, Leusden, NL
<i>Solución salina tamponada con fosfato</i>	PBS	Gibco
<i>Tripsina</i>		Sigma Aldrich
<i>Agua ultrapura (agua tipo I)</i>	MQ	Milipore
<i>Azul tripán</i>		Sigma Aldrich
<i>Tris(hidroximetil)aminometano</i>	Tris	Sigma Aldrich
<i>Dodecilsulfato de sodio</i>	SDS	Sigma Aldrich
<i>Tetrametiletilendiamina</i>	TEMED	Sigma Aldrich
<i>D(+)</i> Glucosa		Merck
<i>Antiespumante 204</i>		Sigma Aldrich
<i>Glicerol</i>		Sigma Aldrich
<i>Ácido ascórbico</i>		Sigma Aldrich

Tabla 2: Reactivos.

Reactivos	Abreviación	Descripción	Marca
<i>Calceína AM</i>	Componente A	Dos viales de 40 µL cada uno, 4mM en DMSO anhidro	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
<i>Homodimero-1 de etidio</i>	Componente B	Dos viales de 200 µL cada uno, 2mM de DMSO/H2O 1:4 (v/v).	

Tabla 3: Kit de viabilidad/citotoxicidad Live/Dead para células de mamíferos.

Medios de cultivos

A continuación, se enumeran los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y transformación de bacterias:

- Medio de cultivo Luria-Broth (LB) de Conda-Pronadisa. Se preparó reconstituyendo 20 gramos del medio en polvo en un litro de agua destilada, y

luego se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Antes de su uso, se le agregó un 1% (p/v) de glucosa estéril y ampicilina a una concentración de 100 µg/mL (o kanamicina a una concentración de 30 µg/mL cuando fue necesario).

- El medio Terrific Broth (TB) de Formedium se preparó reconstituyendo 55.85 gramos del medio en polvo en agua destilada por cada litro. Luego, se suplementó con 100 µg/mL de un agente antiespumante de SIGMA-ALDRICH, 8 mL/L de glicerol de Fisher Scientific y 100 µg/mL de ampicilina (o kanamicina en su lugar a una concentración de 30 µg/mL cuando fue necesario).
- El medio LB-Agar para placas de cultivo se preparó utilizando medio LB de Conda-Pronadisa a una concentración de 25 g/L y agar Bacto™ de BD/Difco a una concentración de 15 g/L. Estos componentes se reconstituyeron en agua destilada y se esterizaron mediante autoclave. Antes de verter el medio en las placas Petri, se añadió glucosa estéril al 1% (p/v) y ampicilina a una concentración de 100 µg/mL para asegurar la esterilidad del medio.
- Medio SOC I (Sigma Aldrich).

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de los condrocitos fue:

- DMEM (Modificación de Eagle del Medio Dulbecco) con alto contenido de glucosa, al que se le añadió penicilina y estreptomina al 1% (v/v) de Lonza, Westburg, Leusden, NL. Además, se suplementó con un 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS, Corning) y 50 µg/ml de ácido ascórbico de Sigma-Aldrich.

3.1.2. Bio-impresora y otros equipos.

Bio-impresora 3D REGEMAT

Se empleó una impresora 3D de bio-impresión de la marca REGEMAT 3D para la fabricación de andamios tridimensionales. Esta bio-impresora se caracteriza por su sistema de tornillos sin fin que permite mover un cabezal de impresión en tres direcciones espaciales (X, Y, Z), y su capacidad para extruir material mediante un émbolo en el cabezal de impresión "jeringa", lo que garantiza un control preciso en la deposición del material [3].

Es fundamental considerar la Temperatura de Transición (Tt) específica que rige el autoensamblaje de los recombinámeros similares a la elastina (ELR) para una correcta extrusión. Los ELR deben mantenerse a una temperatura baja dentro del depósito, pero al depositarse en el sustrato, deben experimentar un calentamiento controlado. Esto se debe a que el aumento rápido de la viscosidad del ELR a medida que se calienta favorece su autoensamblaje molecular [3].

Para adaptar la bio-impresora 3D REGEMAT a estas condiciones, se implementaron varias modificaciones. Se diseñó un cabezal de impresión especial con un canal hueco asistido por computadora y se produjo utilizando una impresora de estereolitografía. Este nuevo cabezal de impresión se acopló a la impresora 3D. Además, se incorporó un enfriador de recirculación con control de temperatura (Isotemp® 4100 R28, Fisher Scientific) al cabezal de impresión. Este enfriador permitió mantener la temperatura del depósito estable mediante la circulación de un fluido en el interior del

cabezal de impresión, todas estas modificaciones fueron hechas con anterioridad al TFM durante la realización de una tesis doctoral en el grupo de investigación Bioforge por la Dra. Soraya Salinas [3].

Gracias a este sistema, se pudo cargar la solución de ELR en una jeringa desechable y luego colocarla en el cabezal de impresión con enfriamiento para controlar eficazmente la temperatura del ELR durante el proceso de bio-impresión [3].



Figura 4: Bio-impresora 3D REGEMAT propiedad del grupo de investigación G.I.R Bioforge.

Componentes	Descripción	Comentarios
A	Cabezales de impresión	La bio-impresora REGEMAT 3D cuenta con 3 cabezales de impresión donde se pueden las jeringas compatibles que contenga la bio-tinta
B	Superficie de impresión "Cama calefactada"	
C	Encamisado para refrigeración	En trabajos previos del grupo G.I.R. Bioforge, se introdujeron modificaciones esenciales para la manipulación de los ELR's. Entre estas, se implementó un sistema de enfriamiento mediante un diseño propio de encamisado en la jeringa [3].
D	Botón de parada de emergencia.	
E	Conexiones al sistema de refrigeración.	La refrigeración de la jeringa se realiza mediante la circulación de agua fría provenientes de chiller.

Tabla 4: Componentes de la bio-impresora REGEMAT 3D.

Instrumental	Equipo	Marca
Electroforesis	Cubeta de electroforesis	
Resonancia magnética nuclear "RMN"	RMN 400	Agilent Technologies
Espectrometría "FTIR" infrarroja	Espectrofotómetro FT-IR Tensor 27	Bruker

Espectrometría de masas MALDI-TOF	Espectrómetro de masas Bruker Autoflex	Bruker
Centrifugas	Centrifuga frio	beCKMAN
	Centrifuga caliente	Sigma sK10
Disruptor GEA	Disruptor celular	GEA
Autoclave		Reypa
Bio-reactor		
Campanas de flujo laminar		Crumair
Incubadora		Fisher
Jeringa para Bio-impresión	Jeringa "BD de 3ml Regemat"	
Puntas cónicas Smooth Flow	Puntas de plástico diseñadas para dispensar materiales de viscosidad media a alta.	Fisnar
Termo bloque		Heidorlph
Baño maría		Grant jbal2

Tabla 5: Equipos e insumos requeridos.

3.1.3. Biológicos.

Cepas Bacterianas

Las cepas de *Escherichia coli* empleadas en este Trabajo de Fin de Master poseen los siguientes genotipos:

XL1-Blue Strain (Agilent Technologies): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIq ZΔM15 Tn10* (Tetr)].

BLR (DE3) (Novagen): F- *ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm Δ (srl-recA) 306::Tn10* (Tetr) (DE3).

Condrocitos

Los condrocitos utilizados en este Trabajo de Fin de Máster fueron proporcionados por la empresa "CITOSPIN" y se obtuvieron de las rodillas de conejos machos blancos de Nueva Zelanda.

3.2. Métodos.

3.2.1. Producción y purificación de los ELR's.

La bioproducción de los polímeros tipo elastina consta de varias etapas, las cuales se mencionan continuación.

Cultivo

En la producción de recombinámeros ELR's, se comienza con el cultivo de cepas genéticamente modificadas de *Escherichia coli*. Estas cepas se diseñan en el laboratorio de biología molecular, creando un gen sintético para la proteína deseada. Luego, se construye un gen multibloque y se inserta en un vector de expresión plasmídico. Estas

cepas se conservan en glicerol a -80°C . Para el cultivo, se siembran en un medio con antibiótico y glucosa, incubándolas durante 20 horas a 37°C en una campana de flujo laminar. El uso del antibiótico garantiza el crecimiento de la población de interés.

Screening de placa

Una vez que las cepas han crecido en la placa de cultivo, se eligen ocho colonias individuales y se transfieren a un tubo Falcon con 5ml TB y 5 μl de ampicilina. Luego, se incuban durante 20 horas a 37°C . Después se seleccionan las colonias más eficientes para la producción del polímero, previamente marcadas en la placa Petri para su identificación posterior.

Selección de colonia

Se realiza una electroforesis a las ocho colonias inoculadas durante el screening para seleccionar las dos colonias más productivas y eficientes. La elección se basa en la ausencia de degradación o contaminantes en las bandas de electroforesis. Las colonias con bandas difuminadas se descartan debido a problemas en la expresión génica o proteica. Estas dos colonias seleccionadas se utilizarán para la producción del polímero en el biorreactor.

Para llevar a cabo la electroforesis, se toma 1 ml de cada una de las ocho colonias incubadas durante el screening y se depositan en tubos Eppendorf. Luego, se separa la *Escherichia coli* del medio de cultivo mediante una centrifugación a 13400 rpm durante 45 segundos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descarta y las células de *Escherichia coli* se resuspenden en 1 ml de agua destilada (MQ) homogeneizándolo, usando un vórtex con la finalidad de eliminar todo el medio de cultivo.

Las ocho muestras se someten a una segunda centrifugación de 45 segundos a 13400 rpm a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y se agrega 100 μl de agua destilada (MQ). A continuación, se preparan ocho tubos Eppendorf adicionales con 5 μl de tampón de carga y se les agrega 20 μl de muestra de las colonias previamente preparadas. Estos tubos se hierven durante 5 minutos a 95°C en un termo bloque. Después de la ebullición, se centrifugan durante 45 segundos a 13400 rpm y temperatura ambiente.

Finalmente, se toman 4 μl de cada muestra utilizando una micropipeta y se cargan en los pocillos del gel de electroforesis. A partir de estos resultados, se seleccionan las dos colonias más productivas y eficientes mencionadas anteriormente.

Preparación del fermentador

Pre-inóculo: Para comenzar, se prepara un medio de cultivo en dos Falcon estériles. Cada uno contiene 5 ml de medio de cultivo LB, 250 μl de glucosa y 5 μl de antibiótico. Luego, se toman dos colonias seleccionadas y se colocan en estos medios de cultivo. Estos se incuban durante toda la noche.

Subcultivo: Observamos ambas muestras incubadas durante el preinóculo y seleccionamos la que muestra mayor turbidez, indicando mayor proliferación bacteriana. Esta se elige para preparar el subcultivo. Usamos Erlenmeyers y agregamos

30 ml de medio de cultivo LB, 1,5 ml de glucosa, 30 μ l de antibiótico "ampicilina" y 1 ml de la muestra del preinóculo. Esto se incuba durante 5-6 horas.

Preparación del inóculo para el biorreactor: En un Erlenmeyer, mezclamos 1 litro de medio de cultivo LB, 50 ml de glucosa y 1 ml de antibiótico "ampicilina". Luego, dividimos esta mezcla en dos Erlenmeyers. Agregamos 15 ml del subcultivo a cada uno y los incubamos. Esta división mejora el desarrollo de las cepas bacterianas gracias a una mejor oxigenación. Luego, combinamos el contenido de ambos Erlenmeyers y lo incubamos durante aproximadamente una hora antes de inocularlo en el biorreactor.

Para controlar el crecimiento bacteriano en el fermentador, tomamos dos muestras de 1 ml cada una en Eppendorfs. Una de estas muestras se utiliza para medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV, lo que nos indica cuándo ha finalizado la proliferación bacteriana. En una cubeta de espectrofotómetro, añadimos 1900 μ l de agua destilada y 100 μ l de la muestra. Para eliminar la señal de fondo correspondiente al medio de cultivo, usamos la segunda muestra de 1 ml, la centrifugamos y añadimos el sobrenadante en la misma cubeta de espectrofotómetro.

Muestra de control: Para monitorear el progreso de la cepa bacteriana en la fermentación, tomamos 1 ml del inóculo, que contiene 5 ml de medio de cultivo TB y 5 μ l de antibiótico. Medimos su absorbancia en un espectrofotómetro UV, utilizando una segunda muestra para medir la señal de fondo.

Fermentación: La producción del biopolímero se realiza en un reactor tipo tanque agitado de 15 litros. Preparamos 14 litros de medio de cultivo que incluye TB, LB, antiespumante y glicerol, y lo esterilizamos en un autoclave a 120°C. Luego, calibramos el reactor para agitación, temperatura, oxígeno y pH. Agregamos 1 litro de inóculo y antibiótico, luego fermentamos las cepas bacterianas durante aproximadamente 17 horas. Para determinar el final de la proliferación bacteriana, medimos la absorbancia en un espectrofotómetro UV. Si la señal deja de aumentar, las bacterias han alcanzado la meseta de crecimiento. Este proceso se basa en la turbidimetría, que permite el seguimiento en tiempo real del crecimiento de la colonia bacteriana mediante la medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm.

Lavado de células: Después de la fermentación, las bacterias se lavan para separarlas del medio de cultivo y obtener un precipitado para su purificación. Esto se hace mediante una centrifugación en frío a 4°C, a 3500 rpm durante 15 minutos. Luego, se descarta el líquido sobrante y el precipitado se resuspende en un tampón de lavado. Este proceso se repite una o dos veces hasta que la muestra salga de la centrífuga con un color claro y se haya eliminado todo el medio de cultivo.

Ruptura de las células en disruptor GEA: La ruptura de las células es esencial para liberar los recombinámeros tipo elastinas que están dentro de ellas debido a la expresión génica. Esto se logra mediante métodos mecánicos o físicos, como el uso de sonicadores de ultrasonido de alta frecuencia o prensas que aplican presión gradual a las células. El método se elige según el volumen a procesar.

Antes de la ruptura celular, el precipitado obtenido durante el lavado de células se suspende en un tampón de sonicación, cuya cantidad se calcula en función de la

absorbancia. La ruptura se realiza típicamente con un disruptor GEA, que utiliza alta presión y turbulencia generada por una rápida liberación de la presión para romper las células. Esta suspensión se pasa a través del disruptor 5 veces para asegurar que todas las células se rompan y que los polímeros estén disponibles para su purificación posterior.

Purificación: Para purificar los polímeros ELR, se aprovecha su temperatura de transición, que causa cambios estructurales y separa los polímeros del resto de componentes. Se realizan ciclos de centrifugación a bajas temperaturas (4°C, 14000rpm, 90min) y altas temperaturas (30°C, 7000rpm, 20min), seguidos de agitación a 4°C para obtener el polímero puro. El precipitado a bajas temperaturas contiene el polímero, mientras que el precipitado a altas temperaturas contiene restos de células rotas.

Para finalizar se procede a una realizar una diálisis, posterior filtración y liofilización

3.2.2. Ruptura celular mediante congelación ultrarrápida usando nitrógeno líquido.

Durante la producción de biopolímeros, se identificó un paso crítico relacionado con la lisis celular de las bacterias. Se utilizó un equipo de disrupción mecánica a nivel de planta piloto, que era económico y viable. Sin embargo, a escala industrial, esto podría convertirse en un cuello de botella importante para la producción a gran escala de los biopolímeros.

Se realizaron varios ciclos de congelación y descongelación utilizando muestras que representaban el 10% de la producción habitual, considerando el 90% restante como equivalente al 100% para los cálculos de referencia. Estos ciclos tenían como objetivo asegurar la ruptura de las membranas celulares de todas las bacterias. Inicialmente, se realizaron hasta 5 ciclos de congelación y descongelación. Para verificar si las bacterias liberaban el biopolímero, se realizaron electroforesis de poliacrilamida, seguida de la purificación y extracción de los biopolímeros para el control del proceso.

El proceso de lisis celular de las bacterias mediante nitrógeno se llevó a cabo de la siguiente manera **Tabla 16**:

- I. **Obtención de la muestra:** Se tomó una alícuota del fermentador, se inactivaron las proteasas (en el caso de He5), y se centrifugó para eliminar el tampón de sonicación.
- II. **Dilución de la muestra:** Se diluyeron las muestras para obtener un volumen específico.
- III. **Hinchado de la muestra:** Las muestras se almacenaron durante diferentes períodos de tiempo **Tabla 18**, con agitación continua en algunas.
- IV. **Congelación de la muestra:** Después del hinchado, las muestras se congelaron en nitrógeno y se descongelaron en un baño a 30°C, con un número variable de ciclos de congelación según las muestras **Tabla 19**.
- V. **Proceso de purificación:** Las muestras se sometieron al proceso estándar de purificación, diálisis y liofilización según el tipo de polímero.

Se recolectaron alícuotas en varios momentos para realizar electroforesis y verificar la eficacia del proceso de lisis celular.

Prueba de Hinchado y osmosis

La electroforesis de las purificaciones mostró que el polímero estaba presente en las muestras antes de la congelación con nitrógeno líquido, lo que sugiere que parte de las bacterias se rompe durante el proceso de hinchado, posiblemente debido a la ósmosis.

Se realizará un procedimiento similar, pero sin ciclos de congelación en nitrógeno líquido, para determinar cuánto polímero se produce durante la ruptura celular por ósmosis **Tabla 19**. Comparando los rendimientos en ambos métodos, se calculará el porcentaje de bacterias que se rompen por ósmosis en comparación con una ruptura completa mediante un disruptor, que se considera el 100% de lisis celular.

Para evaluar el rendimiento de la prueba, se deben determinar los pesos del polímero madre (producción total del fermentador) y del polímero hija (muestra para la prueba) y conocer el volumen de fermentación al que pertenecen ambas muestras. Tomaremos como referencia un volumen de fermentación de 15 litros, que corresponde al peso total del precipitado del fermentador.

$$\text{Volumen fermentado (L)} = \frac{15 \text{ (L)} * \text{Peso precipitado de la muestra (g)}}{\text{Peso precipitado total (g)}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{Rendimiento} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Peso del polímero puro (mg)}}{\text{Volumen fermentado (L)}} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Rendimiento muestra "hija" (mg/L)}}{\text{Rendimiento Madre (mg/L)}} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

3.2.3. Caracterización de los ELR's.

Para caracterizar los polímeros producidos se usan diversas técnicas como ser:

Espectrofotometría de transformada de Fourier "FTIR"

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) se realizó en muestras liofilizadas utilizando un espectrómetro Bruker Tensor 27 (Bruker Corporation) y se analizó utilizando el programa de recopilación de datos OPUS. La técnica se utiliza para identificar los grupos funcionales característicos de la estructura química de los ELR's y se basa en una irradiación infrarroja de la muestra para observar cuáles de las longitudes de onda de la irradiación son absorbidas por la muestra. Cada compuesto tiene un conjunto singular de bandas de absorción en su espectro infrarrojo. Las bandas específicas que se encuentran en los espectros infrarrojos de proteínas y polipéptidos incluyen la amida I y la amida II. Estos últimos aparecen debido a los enlaces que unen los aminoácidos. La absorción relacionada con la banda Amida I conduce a las vibraciones de estiramiento del enlace C=O en la amida, mientras que la absorción asignada a la banda Amida II conduce principalmente a vibraciones de flexión del enlace N-H.

La espectroscopía infrarroja permite obtener información, mediante el estudio de las vibraciones moleculares, sobre la presencia de grupos funcionales y determinados agrupamientos.

Sobre la muestra incide un haz de radiación monocromática que hace un barrido de frecuencia entre 600-4000 cm^{-1} , produciendo modificaciones en el estado de vibración de los enlaces. Así, los enlaces absorben energía cuando la frecuencia de radiación coincide con la suya de vibración, dando lugar a una banda en el espectro.

Se ha utilizado la técnica FTIR-ATR (Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada). La técnica permite que se dé una reflexión interna total cuando la radiación infrarroja llega al cristal ATR (transmisor con alto índice de refracción) creando así una onda que mantiene el contacto con el cristal registrando el espectro infrarrojo. Con la Transformada de Fourier es posible, además, convertir el espectro del dominio del tiempo a un dominio de frecuencia, obteniéndose espectros más rápidos, con menos ruido y, por ello, más precisos.

El equipo utilizado es un espectrómetro de Infrarrojo Bruker TENSOR 27.

Espectrometría de masas, desorción/ionización láser asistida por matriz "MALDI-TOF"

La técnica ionización/desorción por láser asistida por matriz, con analizador de tiempo de vuelo, se incluyó en la caracterización de los ELR, ya que proporcionaba una evaluación fiable del peso molecular del polímero. El análisis fue realizado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (Universidad de Valladolid). Se añadió aproximadamente 1 μL de matriz, ácido sinapínico en acetonitrilo al 70% y ácido trifluoroacético al 0,1% a la placa MALDI con 1 μL de muestra disuelta en agua fría (1 mg/mL). La placa se secó al aire y se obtuvo el espectro de masas en un Bruker Autoflex Speed (MALDI-TOF; Bruker), en modo lineal y con calibración externa utilizando BSA mono y especies descargadas para calibrar.

La espectroscopía de masas es una técnica analítica con la capacidad de estudiar compuestos de diferente naturaleza obteniendo información tanto cualitativa como cuantitativa sobre su masa molecular y estructura.

En el caso de la espectroscopía de masas MALDI-TOF, inicialmente la muestra se ioniza, ya que no detecta formas neutras y, a continuación, los iones se aceleran desde la fuente de iones hasta el analizador del espectrómetro. En el analizador, los diferentes iones se separan en función de su relación masa/carga mediante la acción de un campo eléctrico

Resonancia magnética nuclear de protón "RMN"

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se basa en las propiedades magnéticas de los núcleos de los elementos. Con esta técnica se puede obtener información sobre el entorno de estos núcleos dentro de la molécula en la que se encuentran. Para que esto sea posible es necesario que los núcleos sean magnéticamente activos, es decir, que tengan un número cuántico de espín diferente de cero, lo que hace que se comporten como pequeños imanes con sus correspondientes momentos magnéticos. Es lo que sucede en átomos como ^1_1H , $^{13}_6\text{C}$ o $^{19}_9\text{F}$.

De esta forma se aplica un campo magnético sobre la muestra que produce un desdoblamiento de los niveles de energía del espín nuclear, induciendo transiciones

entre los diferentes niveles de energía. Para cada núcleo de una molécula el entorno químico es diferente, por lo que el campo magnético al que resuena en cada caso, a este efecto se le denomina apantallamiento. Por lo general, el apantallamiento para cada protón de una molécula es diferente, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión y como resultado da un espectro donde cada conjunto de núcleos específicos da lugar a una señal única en el RMN a un desplazamiento químico diferente. En función de los protones que contribuyen a una misma señal esta se representa con mayor o menor intensidad. Esto se representa con una curva superpuesta en las señales denominada integral, que es proporcional al número de protones presentes en la molécula.

Para caracterizar las muestras de polímero es necesario disolverlas. Para ello se pesan 5-6 mg de polímero y se disuelven en 0,6 mL de DMSO-d₆. A continuación, la disolución se pasa a un tubo de RMN que es el que se introducirá en el equipo para realizar el análisis. Los disolventes empleados son deuterados, en los que 99% de sus protones están sustituidos por deuterio para evitar que den señales que interfieran en el espectro.

El equipo utilizado en todos los RMN hechos ha sido el espectrómetro automático Agilent MR 400 del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la UVA. La representación del espectro y la integración de las áreas de las señales correspondientes a los diferentes protones se evaluó utilizando el software MestReNova 6.0.2-5475.

Calorimetría diferencial de barrido "DSC".

La calorimetría diferencial de barrido "DSC" pertenece al grupo de métodos físico y físico-químicos de análisis térmicos "TA" y es uno de los métodos de TA utilizados para determinar los cambios de energía "entalpía" en una sustancia de estudio. Estos métodos se basan en la medida de la temperatura "termometría", y de los flujos de calor espontáneos o compensadores.

DSC es un método calorimétricamente "puro". Se basa en calentar o enfriar una muestra y una referencia a una velocidad preestablecida, manteniendo sus temperaturas iguales y midiendo el flujo de calor compensatorio que mantiene la temperatura de la muestra dentro de los límites de un programa determinado. Las curvas DSC experimentales muestran el flujo de calor en "mJ*s⁻¹" o la capacidad calorífica específica C, "Jg⁻¹-K⁻¹" frente a la temperatura "en experimentos isotérmicos contra el tiempo".

Una de las características generales del DSC es que la muestra y la sustancia de referencia se calientan con una sola fuente de calor, y la temperatura se mide mediante transmisores sensibles introducidos en ellas. Lo que se mide es la **diferencia** $\Delta T = T_s - T_r$ entre las temperaturas de la muestra **T_s** y de referencia **T_r** en función de la duración del calentamiento o cambio de temperatura. El valor de ΔT es proporcional al cambio en la entalpía **H**, la capacidad calorífica **C** y la resistencia térmica total **R** al flujo del calor.

Electroforesis.

Se realizó una electroforesis en gel de proteína de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo de Laemmli. Este método permite separar proteínas según su tamaño. Las proteínas se desnaturalizaron y se rompieron los enlaces

secundarios, lo que permitió que el detergente SDS y el agente reductor β -mercaptoetanol actuaran sobre ellas. La desnaturalización y reducción se facilitaron mediante la ebullición de las muestras durante 5 minutos.

El gel de resolución se eligió en función del peso molecular de la proteína a separar. Las muestras se cargaron en el gel en un tampón de corrida y se sometieron a electroforesis bajo una corriente constante de 25 mA. La electroforesis se detuvo cuando el azul de bromofenol del tampón alcanzó el final del gel.

Es importante destacar que el análisis del peso molecular de las proteínas mediante esta técnica a menudo muestra un valor aproximadamente un 20% mayor que el teóricamente previsto.

3.2.4. cultivo celular.

Para llevar a cabo las pruebas de bio-impresión 3D de los andamios, es esencial contar con células de condrocitos en cantidades que pueden variar desde 1 millón hasta 6 millones, ya que investigaciones previas realizadas por el grupo G.I.R. Bioforge han utilizado este rango de cantidades. Para obtener las células necesarias, se llevaron a cabo cambios de medio y levantamiento de células después de haber realizado el cultivo primario. Los levantamientos se llevaron a cabo cuando la confluencia celular alcanzó aproximadamente el 80% o 90% [Figura 12](#). Este proceso se llevó a cabo para evitar la inhibición por contacto de las células. La confluencia celular se evaluó utilizando un microscopio óptico Leica DFC3000G.

Cambio de medio y manteniendo

Cuando las líneas celulares crecen de manera óptima y ocupan la mayoría de la superficie del frasco “Flask”, este proceso agota gradualmente los nutrientes disponibles y conduce a la acumulación de productos de desecho como células muertas [Figura 10](#). Para abordar esta situación y mantener un entorno de cultivo celular saludable, es necesario realizar cambios de medio cada 48 o 72 horas. Un indicador visual de la necesidad de cambio de medio es la observación de que el color del medio se vuelve gradualmente de naranja a amarillo, lo que refleja el cambio en el pH del medio hacia la acidificación. El proceso de cambio de medios se compone de tres pasos simples: primero, se aspira el medio de cultivo agotado; segundo, se añade medio de cultivo fresco; y finalmente, se devuelve el frasco de cultivo a la incubadora para mantener las condiciones adecuadas de crecimiento celular [\[97\]](#).

Tripsinización “Levantamiento de células”

Para despegar “Levantar” las líneas celulares se lleva a cabo un proceso de suspensión celular utilizando tripsina, una enzima proteasa que descompone las proteínas celulares involucradas en la adhesión celular. El procedimiento se desarrolla de la siguiente manera [\[97\]](#):

- Se aspira el medio de cultivo del frasco que previamente ha estado en la incubadora de CO₂.
- Se realiza un lavado del frasco por tres veces, utilizando 10 ml a 15 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Esto contribuye a debilitar la adhesión de

las células al interior del frasco de cultivo celular, al mismo tiempo que elimina el suero fetal bovino (FBS) del medio, que contiene inhibidores de tripsina.

- Se añaden al frasco de cultivo 5 a 7 ml de tripsina, en cantidad proporcional al tamaño del frasco. Luego, se agita de manera horizontal durante 1 minuto para asegurar que toda la superficie esté cubierta.
- El frasco con la línea celular y tripsina se incuba durante 5 minutos a 37°C.
- Pasados los 5 minutos, se observan las células bajo el microscopio. Deben aparecer redondeadas y en movimiento, lo que indica que han perdido su capacidad de adherencia.
- Se diluye la suspensión tripsinizada en el mismo frasco de cultivo añadiendo el doble de la cantidad de medio de cultivo (DMEM).
- Se realiza una pipeteada de la suspensión tres veces: primero, pipeteando hacia arriba y abajo para asegurar que la suspensión se distribuya por toda la superficie del frasco; luego, se pipetea hacia arriba todo el contenido y se suelta desde una esquina del frasco para evitar aglomeraciones.
- Luego se traspasa toda la suspensión a un falco de 15 ml, se centrifuga a 1500rpm durante 5min. Se desecha el sobrenadante y nos quedamos con el precipitado.
- Se resuspende el precipitado celular en DMEM dando toques en la punta del falcón.
- El volumen de la suspensión celular que se transfiere al nuevo frasco de cultivo depende del conteo de células y puede variar de 1 ml a 5 ml. Finalmente, se incuba nuevamente para permitir que las células se adhieran y crezcan.

Los dos pasos finales se llevan a cabo cuando se busca continuar expandiendo las células para disponer de una mayor cantidad en caso de que sean necesarias.

Este proceso de levantamiento celular garantiza que las células estén en condiciones óptimas para su uso en experimentos posteriores.

3.2.5. Impresión 3D.

El primer paso en la bio-impresión 3D de los andamios “Scaffolds” implicó familiarizarse con la bio-impresora REGEMAT, lo que incluyó aprender sobre el software y los parámetros de impresión, así como entender el hardware de la impresora.

Los modelos tridimensionales para imprimir se pueden crear utilizando software CAD que genere archivos en formato STL. REGEMAT 3D proporciona su propio software que permite configurar la bio-impresora y los modelos predefinidos [Figura 21 \[98\]](#).

Antes de imprimir, se deben configurar dos pasos: el andamio (scaffold) y el relleno (filling). En el tamaño, se ajustan las dimensiones y se puede redimensionar si se carga un archivo STL. En la configuración de objetos, se ajustan parámetros como el tamaño de los poros, el número de perímetros, las capas sólidas y la altura de la capa. Se puede personalizar el patrón de relleno, afectando la porosidad [Figura 22 \[98\]](#).

La configuración del proceso de impresión incluye temperatura, capas, perímetro y velocidad del flujo. El relleno se divide en herramientas y parámetros para las capas.

La velocidad de retracción es crucial para evitar hilos no deseados. Este valor se ajusta manualmente en cada impresión para garantizar precisión y calidad.

Existen algunos parámetros que es necesario configurar para cada proceso de impresión [Figura 22](#). Hay una pestaña específica para estas acciones en la pantalla de inicio denominada **Tool Configuration**. Para cada jeringa utilizada, es obligatorio establecer “**Total μ l**”, que es la cantidad de material que se recarga en una jeringa. El “**Diámetro de la boquilla (mm)**” especifica el diámetro de la aguja. La “**Temperatura**” se refiere a la temperatura de un cabezal aliente o una jeringa calentada. Indica la temperatura objetivo para el proceso. Este valor debe ser menor que la “**Temperatura máxima**” en “Configuración del encabezado” [\[98\]](#).

Una característica crucial de los ELR's y, por lo tanto, de nuestra bio-tinta, es el proceso de sol-gel inducido por la temperatura de transición “ T_t ”. Para lograrlo, se debe calentar la plataforma de impresión de la impresora para aumentar la viscosidad de la bio-tinta. Esta configuración se encuentra en la pestaña “Advance” [Figura 24](#).

La temperatura de trabajo utilizada para la bio-impresión fue de 30°C, que es mayor que la temperatura de transición en la que ocurre la gelificación. Para establecer esta temperatura de trabajo, se puede ingresar el código del programa de temperatura, que es “M104S30 H1” [\[98\]](#).

Para iniciar la impresión, se conecta la bio-impresora al servidor a través de USB, se presiona “Connect” en la interfaz y se genera el código de impresión haciendo clic en “Printable model”. La vista previa y ajustes del diseño se pueden hacer en “Printable viewer”. Cuando esté listo, se inicia la impresión con “Start Print”. Se pueden pausar o detener durante la impresión con “Pause” o “Emergency Stop”, incluso usando el botón físico “Emergency Stop”.

Se realizaron múltiples impresiones para optimizar los parámetros, incluyendo pruebas con crema Nivea y bio-tinta sin células. Se configuraron con agujas de 0,25 mm de diámetro, una velocidad de 1 mm/s y un flujo de 0,06 mm³/s para lograr la mejor calidad y control de impresión.

Se crearon andamios con un diámetro de 8 mm y una estructura de poros a 90 grados. Estos se fabricaron con una aguja roma de 0,25 mm de diámetro, con el cabezal de impresión moviéndose a 1 mm/s y un flujo de material de 0,06 mm³/s. Se imprimieron varios andamios y se compararon con el ZS-EI-ELR y la crema Nivea como control.

Parámetros críticos para la bio-impresión 3D

Para garantizar una impresión exitosa de los andamios diseñados, es fundamental ajustar varios parámetros:

Tamaño y Porosidad del Andamio (Scaffold): El tamaño del diseño y su porosidad son críticos. A medida que el diseño aumenta de tamaño, el tiempo de impresión aumenta debido a la necesidad de más capas.

Temperatura de la Bio-Tinta: La bio-tinta debe mantenerse a baja temperatura para mantener una baja viscosidad. Esto se logra mediante una camisa de enfriamiento de agua desde un Chiller. La temperatura se establece en 14°C, inferior a la Temperatura de Transición (Tt).

Temperatura de la Cama: Se fija en 30°C para garantizar una buena fidelidad de forma. Debe estar dentro del rango de temperaturas fisiológicas.

Ajuste de la Distancia Cama-Dispensador: Es crucial configurar la distancia entre el dispensador cónico y la cama de manera precisa. Debe ser aproximadamente igual al grosor de una capa típica de impresión, generalmente entre 0,21 mm y 0,4 mm.

Retract Speed: Esta velocidad se ajusta según las necesidades de cada impresión para evitar deposiciones no deseadas de bio-tinta cuando el dispensador se mueve.

Velocidad de Flujo de la Bio-Tinta: Controlar la velocidad de flujo es fundamental, ya que afecta directamente a las células presentes en la bio-tinta.

Compresión Celular: Una velocidad de flujo alta puede dañar las células debido a la presión ejercida sobre ellas.

Daño a la Membrana Celular: El flujo rápido puede dañar las membranas celulares, liberando componentes celulares internos.

Uniformidad en la Distribución Celular: La velocidad de flujo debe ser adecuada para garantizar una distribución uniforme de las células en la estructura impresa.

En resumen, configurar correctamente estos parámetros es esencial para lograr una bio-impresión precisa y exitosa, especialmente cuando se trabaja con bio-tintas que contienen componentes biológicos.

Preparación y caracterización de la bio-tinta.

El bio-polímero ZS-EI-ELR utilizado como bio-tinta ha sido producido en el grupo de investigación G.I.R Bioforge. La caracterización de esta bio-tinta se lleva a cabo mediante diversas técnicas instrumentales. Algunas de las más comunes incluyen la electroforesis en gel de poliacrilamida, la resonancia magnética nuclear de protón (RMN) [Figura 37](#), la calorimetría diferencial de barrido (DSC) [Figura 39](#), la espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) [Figura 35](#) y la espectrometría de masas mediante la técnica MALDI-TOF [Figura 38](#).

La preparación de la bio-tinta implica un proceso previo a la bio-impresión. Este proceso comienza disolviendo el bio-polímero ZS-EIELR usando DMEM como solvente a una concentración de 225 mg/ml. La concentración específica de la bio-tinta cargada con células debe ser de 180 mg/ml la cual se determinó previamente en investigaciones realizadas por el grupo de investigación G.I.R. Bioforge [\[3\]](#). Para lograr la solución de bio-tinta, la mezcla de bio-polímero y DMEM se mantiene en constante agitación utilizando una noria. Este proceso se lleva a cabo en una cámara refrigerada a 4°C y debe realizarse al menos 12 horas antes de comenzar la bio-impresión.

Cuando llega el momento de la impresión, se combina esta solución de bio-tinta con las células que se utilizarán. Estas células se encuentran suspendidas en un medio de cultivo adecuado, en este caso, DMEM con alto contenido en glucosa en un volumen necesario para alcanzar la concentración ideal bio-tinta la cual es 180 mg/ml. En el curso de este Trabajo de Fin de Máster, se emplearon condrocitos como células de interés. Es fundamental subrayar que todo este proceso se lleva a cabo en condiciones de esterilidad rigurosas, dentro de una cabina de flujo laminar de Clase II conocida como "Telstar Bio-II-A". Además, la campana de flujo laminar se somete a esterilización mediante luz ultravioleta y se desinfecta utilizando etanol al 70%.

Una vez que se ha obtenido la bio-tinta cargada con las células, se procede a transferirla a una jeringa que se acoplará al cabezal de impresión de la bio-impresora, el cual se mantendrá a una temperatura controlada de 14°C.

Así como el proceso de preparación de la bio-tinta exige condiciones estériles, la etapa de bio-impresión debe realizarse igualmente en un entorno estéril. Por esta razón, la bio-impresora se ubica en el interior de una cámara de flujo laminar.

Para simplificar el proceso de transporte de los andamios impresos, estos se imprimen sobre soportes circulares. Una vez que la bio-impresión de los andamios ha concluido, estos cubre-objetos se trasladan a una placa de múltiples pocillos. Aquí, se cubren con DMEM y se incuban a 37°C en una unidad de incubación celular. El medio de cultivo es remplazado por uno nuevo cada 72 horas.

3.2.6. Citotoxicidad y proliferación celular.

Ensayo viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD® para células de mamíferos

Para evaluar la viabilidad celular de los condrocitos después de la bio-impresión, se utilizó el kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD® para células de mamíferos de Invitrogen. Este kit permite la visualización de las células que están vivas y las que han perdido su viabilidad **Figura 20**.

Las células vivas se distinguen por la presencia de actividad de esterasa intracelular ubicua, determinada por la conversión enzimática del calceína AM permeable a las células, virtualmente no fluorescente, en la calceína intensamente fluorescente. El tinte polianiónico calceína se retiene bien dentro de las células vivas, lo que produce una intensa fluorescencia verde uniforme en las células vivas **Figura 16** (excitación/emisión ~495 nm/~515 nm) [99].

El EthD-1 entra en las células con membranas dañadas y experimenta una mejora de 40 veces en la fluorescencia al unirse a los ácidos nucleicos, produciendo así una fluorescencia roja brillante en las células muertas **Figura 15** (excitación/emisión ~495 nm/~635 nm). El EthD-1 es excluido por la membrana plasmática intacta de las células vivas. La determinación de la viabilidad celular depende de estas propiedades físicas y bioquímicas de las células. Eventos citotóxicos que no afectan estas propiedades celulares pueden no evaluarse con precisión utilizando este método. Los niveles de

fluorescencia de fondo son inherentemente bajos con esta técnica de ensayo porque los tintes son virtualmente no fluorescentes antes de interactuar con las células [99].

Se llevaron a cabo pruebas LIVE/DEAD[®] en los andamios impresos en los días 1, 5, 7, 9, 13 y 41 para evaluar la viabilidad celular en diferentes momentos a lo largo del estudio.

Protocolo de microscopia de fluorescencia

- I. Antes de llevar a cabo el ensayo de viabilidad celular en los andamios impresos, se realizó un procedimiento de lavado meticuloso. El medio de cultivo se aspiró y se realizaron tres lavados con PBS 1X para garantizar una eliminación completa del medio de cultivo y así poder eliminar o diluir la actividad de esterasa del suero presente en los medios de crecimiento suplementados con suero "FBS" (las esterasas del suero podrían causar un aumento en la fluorescencia extracelular al hidrolizar el calceína AM). El PBS 1X se mantuvo a una temperatura de 37°C para evitar cualquier posible disolución o deformación de los andamios. Para mantener esta temperatura durante el procedimiento fuera de la incubadora, se utilizó una placa calefactora, sobre la cual se colocó la placa multipocillos durante el lavado y la posterior adición de los reactivos LIVE/DEAD[®].
- II. Después del proceso de lavado, los andamios se transfirieron a una nueva placa multipocillos y se les añadieron los reactivos LIVE/DEAD[®] **Tabla 3**. Estos reactivos consisten en la calceína y el homodímero-1 de etidio, los cuales se prepararon en una solución con una concentración de 1,5 μM de calceína y 2 μM de homodímero-1 de etidio, utilizando PBS 1X como disolvente. El volumen final de la solución se ajustó para asegurar que cubriera completamente el andamio, generalmente alrededor de 250 μL a 500 μL .
- III. Finalmente, los andamios se incubaron durante 30 minutos a 37°C en una incubadora de células. Esto permitió que los reactivos LIVE/DEAD[®] actuaran sobre las células presentes en los andamios. Posteriormente, se llevaron a cabo observaciones microscópicas utilizando un microscopio de fluorescencia confocal Leica TCS SP8.

Se realizó un estudio previo para determinar las concentraciones óptimas de los reactivos LIVE/DEAD[®]. Este estudio constó de dos fases. En la primera fase, se buscó obtener las concentraciones más bajas posibles de cada reactivo para teñir las células sin la presencia del bio-polímero. Esto se hizo siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante de los reactivos.

Se obtienen los mejores resultados al ajustar las concentraciones de los colorantes para lograr un marcado distintivo de las células vivas con calceína AM y de las células muertas con EthD-1. Las concentraciones óptimas variarán según el tipo de célula. En general, es mejor utilizar la concentración de tinte más baja que proporcione una señal suficiente [99].

Protocolo para la determinación óptima de tinte LIVE/DEAD®

- I. Sacar los reactivos del ensayo LIVE/DEAD® del congelador y permíteles alcanzar la temperatura ambiente.
- II. Prepara muestras de células muertas una placa multipocillo. Matar las células utilizando 70% de metanol durante 30 minutos
- III. Utilizando las muestras de células muertas, selecciona una concentración de EthD-1 que tiña los núcleos de las células muertas de rojo intenso sin teñir significativamente el citoplasma (intenta con concentraciones de EthD-1 que van desde 0.1 hasta 10 μ M).
- IV. Utilizando muestras de células muertas, selecciona una concentración de calceína AM que no produzca una fluorescencia significativa en el citoplasma de las células muertas (prueba concentraciones de calceína AM que van desde 0.1 hasta 10 μ M).
- V. Utilizando muestras de células vivas, verifica que la concentración de calceína AM seleccionada genere una señal de fluorescencia suficiente en las células vivas (si no es así, prueba con una concentración más alta).

Una vez obtenidas estas concentraciones, se llevó a cabo la segunda fase del estudio, en la cual se evaluó la interacción de estos reactivos con los andamios impresos que contenían células. Con el fin de garantizar que las concentraciones elegidas son las adecuadas para el ensayo de viabilidad celular.

Debido a que los reactivos del kit LIVE/DEAD® son fotosensibles, todos los protocolos y ensayos se llevaron a cabo en condiciones de baja o nula luminosidad y se trabajó bajo una campana de flujo laminar para asegurar la esterilidad de los ensayos.

3.2.7. Obtención de imágenes mediante microscopía confocal.

Para evaluar la viabilidad celular de los andamios impresos, se realizó la adquisición de imágenes mediante microscopía de fluorescencia. Esto permitió visualizar las células viables en los andamios en diferentes días posteriores a la impresión. Para llevar a cabo esta observación, se utilizó el microscopio confocal Leica TCS SP8.

El análisis se realizó utilizando el kit de viabilidad/citotoxicidad Live/Dead. Para garantizar la consistencia en la comparación de las imágenes de los diferentes días de prueba, se mantuvo una configuración constante en el microscopio. Se realizaron ajustes mínimos, como la ganancia estática y la profundidad de penetración, mientras se utilizaba el mismo objetivo en todos los casos, específicamente el objetivo de 10X. Esto permitió una evaluación precisa y coherente de las muestras en diferentes momentos del experimento.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.1. Lisis celular.

Pruebas de ruptura con nitrógeno líquido para el polímero HE5:

La ruptura celular del polímero HE5 se llevó a cabo en las primeras pruebas denominadas PF3 y PF4. Tras completar el proceso de fermentación en el biorreactor, se procedió al lavado de células para obtener un precipitado correspondiente a la masa de bacterias *E. coli* que producen el biopolímero. De esta masa de reacción, se tomaron dos alícuotas de 26.9 gramos, denominadas "PF3" y 26.4 gramos, denominadas "PF4" que se colocaron en tubos falcón. Ambas alícuotas se resuspendieron en agua ultrapura (MQ), manteniendo PF3 a 30°C y PF4 a 4°C esta última en agitación y ambas durante 24 horas.

Una vez transcurrido el tiempo, se procedió a la ruptura de las bacterias mediante congelación rápida. Para esto, las muestras se sumergieron en nitrógeno líquido durante 15 minutos y luego se descongelaron a 30°C. Tras la descongelación, se tomó una alícuota de 1 ml para llevar a cabo una electroforesis con el fin de detectar la presencia del biopolímero. Esta muestra se centrifugó a 4°C y 14000 rpm para separar el sobrenadante del precipitado. Dado el comportamiento inteligente de los ELR's (biopolímeros), se esperaba que el polímero liberado de las bacterias quedara en el sobrenadante. Si aún se encontraba polímero en el precipitado, indicaba que no todas las bacterias se habían roto, por lo que se requería otro ciclo de congelación y descongelación.

Dado que la electroforesis es un proceso que lleva tiempo y la ruptura de las bacterias debe ser rápida, se llevaron a cabo cinco ciclos de congelación y descongelación en las alícuotas para asegurar la máxima ruptura posible. Se seleccionaron cinco ciclos como número de repeticiones, en concordancia con la cantidad de veces que normalmente se pasa la suspensión de bacterias por el disruptor GA durante un proceso de purificación estándar.

De manera análoga, se obtuvo una muestra de 1 ml antes de iniciar el primer ciclo de congelación y descongelación, con el propósito de confirmar la presencia del biopolímero mediante electroforesis.

Los resultados de esta electroforesis se muestran en [Figura 5](#) y [Figura 6](#).

En la electroforesis de muestra sometida a hinchamiento caliente [Figura 5](#), se observa una ruptura evidente causada por la osmosis pasiva en los pocillos 2 y 3. En los pocillos 4 y 6, se nota una diferencia en el grosor de la banda, lo que sugiere que incluso en el segundo ciclo de congelación, las bacterias aún están experimentando ruptura. Por otro lado, en el resto de los precipitados no se observa ninguna diferencia notable.

En los pozos 5 y 7, se aprecia una tendencia inversa en comparación con los pozos 4 y 6 (donde un precipitado con una banda más pequeña corresponde a un

sobrenadante mayor). Sin embargo, en los pozos posteriores, no se observa un aumento significativo en esta tendencia.

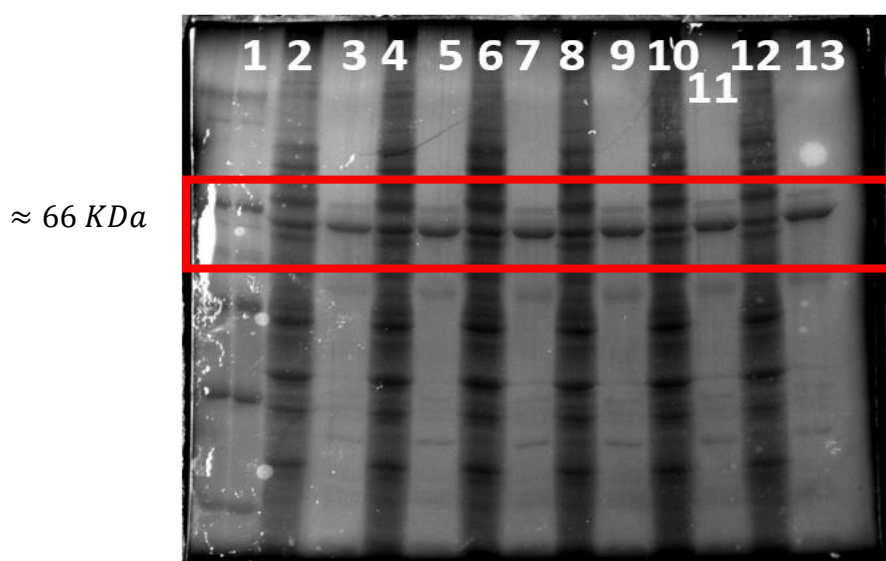


Figura 5: Electroforesis PF3 hinchamiento en caliente sin agitación durante 24 horas. Se recuadra la franja correspondiente al peso molecular ≈ 66 KDa "Kg/mol" del polímero "HE5"

Pocillos	PF3	Descripción
1	Marker	
2	↓ +0	Precipitado después del hinchamiento
3	Sb +0	Sobrenadante después del hinchamiento
4	↓ +1	Precipitado después del primer ciclo de congelación y descongelación
5	Sb +1	Sobrenadante después del primer ciclo de congelación y descongelación
6	↓ +2	Precipitado después del segundo ciclo de congelación y descongelación
7	Sb +2	Sobrenadante después del segundo ciclo de congelación y descongelación
8	↓ +3	Precipitado después del del tercer ciclo de congelación y descongelación
9	Sb +3	Sobrenadante después del tercer ciclo de congelación y descongelación
10	↓ +4	Precipitado después del cuarto ciclo de congelación y descongelación
11	Sb +4	Sobrenadante después del cuarto ciclo de congelación y descongelación
12	↓ +5	Precipitado después del quinto ciclo de congelación y descongelación
13	Sb +5	Sobrenadante después del quinto ciclo de congelación y descongelación

Tabla 6: Detalle de la Electroforesis PF3 "HE5"

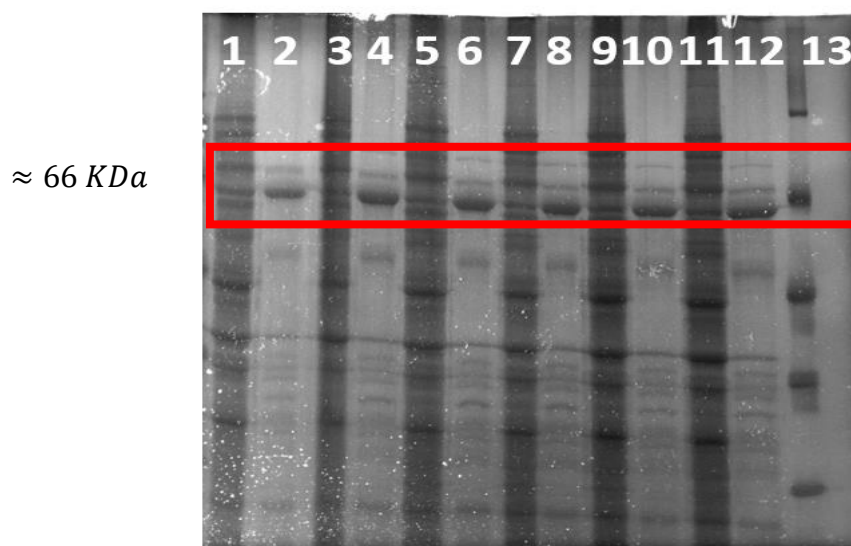


Figura 6: Electroforesis PF4 hinchamiento en frío, con agitación durante 24 horas "HE5"

Pocillos	PF4	Descripción
1	↓ +0	Precipitado después del hinchamiento
2	Sb +0	Sobrenadante después del hinchamiento
3	↓ +1	Precipitado después del primer ciclo de congelación y descongelación
4	Sb +1	Sobrenadante después del primer ciclo de congelación y descongelación
5	↓ +2	Precipitado después del segundo ciclo de congelación y descongelación
6	Sb +2	Sobrenadante después del segundo ciclo de congelación y descongelación
7	↓ +3	Precipitado después del del tercer ciclo de congelación y descongelación
8	Sb +3	Sobrenadante después del tercer ciclo de congelación y descongelación
9	↓ +4	Precipitado después del cuarto ciclo de congelación y descongelación
10	Sb +4	Sobrenadante después del cuarto ciclo de congelación y descongelación
11	↓ +5	Precipitado después del quinto ciclo de congelación y descongelación
12	Sb +5	Sobrenadante después del quinto ciclo de congelación y descongelación
13	Marker	

Tabla 7: Detalle de la Electroforesis PF4 "HE5"

En esta electroforesis **Figura 6**, se observa una tendencia similar a la anterior, pero con algunas diferencias destacables. Los pozos 2 y 3, en particular el 3, sugieren que la osmosis ha sido de alguna manera más eficiente en esta ocasión en comparación con la PF3. Esto podría deberse a que, a diferencia de la PF3 en la que no hubo agitación durante el hinchamiento en caliente, en esta ocasión se aplicó agitación. En lo que

respecta a la ruptura celular, la tendencia sigue siendo la misma: aumenta hasta el segundo ciclo y luego se mantiene constante. Esta tendencia se hace más evidente al observar los precipitados.

Pruebas de ruptura con nitrógeno líquido para el polímero VKV:

Siguiendo un enfoque similar al utilizado en las pruebas con el polímero HE5, se llevó a cabo esta prueba con VKV, extendiendo el tiempo de hinchado de las bacterias a 48 horas.

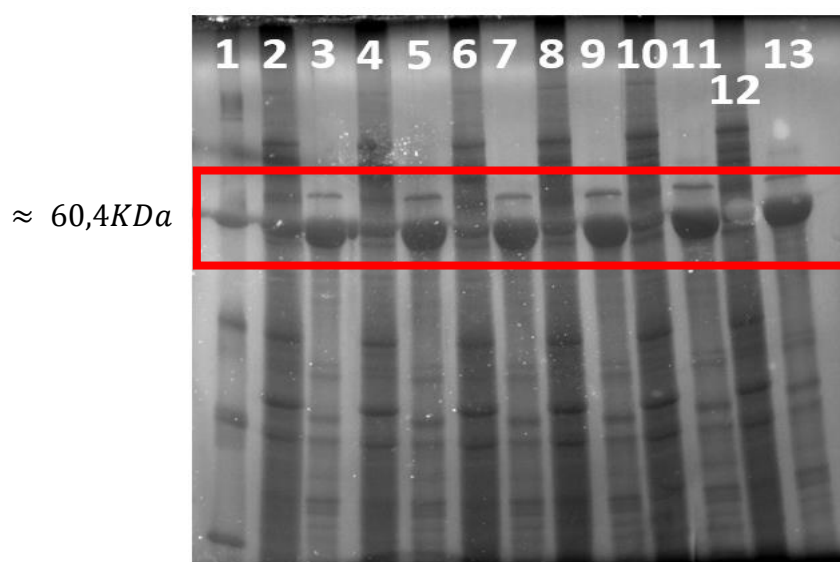


Figura 7: Electroforesis PF5 hinchamiento en caliente sin agitación durante 48 horas Se recuadra la franja correspondiente al peso molecular $\approx 60,4 \text{ KDa}$ "Kg/mol" del polímero "VKV"

Pocillos	PF5	Descripción
1	Marker	
2	↓ +0	Precipitado después del hinchamiento
3	Sb +0	Sobrenadante después del hinchamiento
4	↓ +1	Precipitado después del primer ciclo de congelación y descongelación
5	Sb +1	Sobrenadante después del primer ciclo de congelación y descongelación
6	↓ +2	Precipitado después del segundo ciclo de congelación y descongelación
7	Sb +2	Sobrenadante después del segundo ciclo de congelación y descongelación
8	↓ +3	Precipitado después del del tercer ciclo de congelación y descongelación
9	Sb +3	Sobrenadante después del tercer ciclo de congelación y descongelación
10	↓ +4	Precipitado después del cuarto ciclo de congelación y descongelación

11	Sb +4	Sobrenadante después del cuarto ciclo de congelación y descongelación
12	↓ +5	Precipitado después del quinto ciclo de congelación y descongelación
13	Sb +5	Sobrenadante después del quinto ciclo de congelación y descongelación

Tabla 8: Detalle de la Electroforesis PF5 "VKV"

En esta electroforesis **Figura 7**, se evidencia claramente que el proceso de osmosis durante un período de 48 horas es considerablemente más eficiente en comparación con el de 24 horas. La tendencia en relación con los ciclos de congelación sigue siendo consistente, con un aumento en la liberación de material en el segundo ciclo en comparación con el primero, y una estabilización en los ciclos subsiguientes.

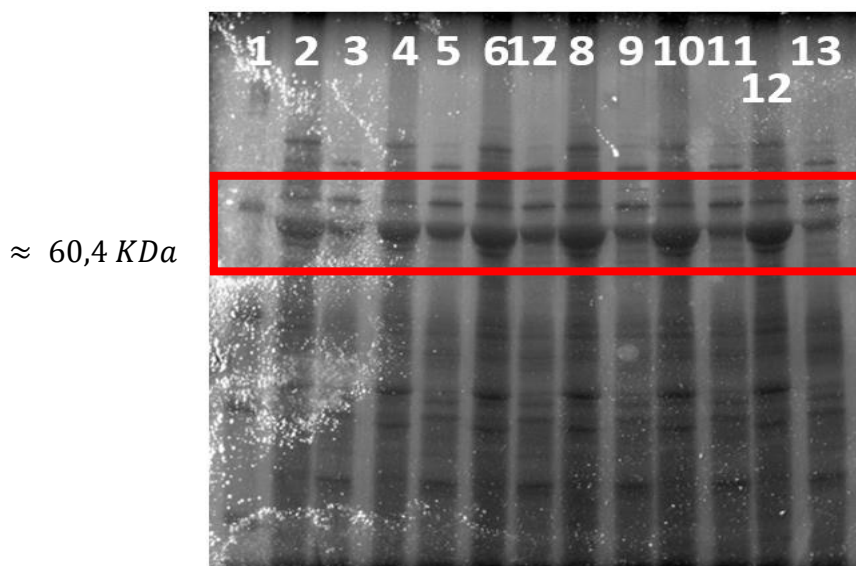


Figura 8: Electroforesis PF6 hinchamiento en frio con agitación durante 48 horas "VKV"

Pocillos	PF6	Descripción
1	Marker	
2	↓ +0	Precipitado después del hinchamiento
3	Sb +0	Sobrenadante después del hinchamiento
4	↓ +1	Precipitado después del primer ciclo de congelación y descongelación
5	Sb +1	Sobrenadante después del primer ciclo de congelación y descongelación
6	↓ +2	Precipitado después del segundo ciclo de congelación y descongelación
7	Sb +2	Sobrenadante después del segundo ciclo de congelación y descongelación
8	↓ +3	Precipitado después del del tercer ciclo de congelación y descongelación
9	Sb +3	Sobrenadante después del tercer ciclo de congelación y descongelación

10	↓ +4	Precipitado después del cuarto ciclo de congelación y descongelación
11	Sb +4	Sobrenadante después del cuarto ciclo de congelación y descongelación
12	↓ +5	Precipitado después del quinto ciclo de congelación y descongelación
13	Sb +5	Sobrenadante después del quinto ciclo de congelación y descongelación

Tabla 9: Detalle de la Electroforesis PF6 "VKV"

Pruebas de ruptura con nitrógeno líquido para el polímero M80:

Utilizando el mismo método que en las pruebas previas, se llevó a cabo una evaluación adicional utilizando el polímero M80. Dado que las pruebas anteriores indicaron que una mayor ruptura de las bacterias se lograba al aumentar el tiempo de hinchado, en esta ocasión se decidió extender el tiempo de hinchado a 72 horas. Se realizaron dos muestras correspondientes a la misma producción, pero con una diferencia crucial: una se sometió a un proceso de resuspensión e hinchado en caliente sin agitación, mientras que la otra se hizo en frío con agitación.

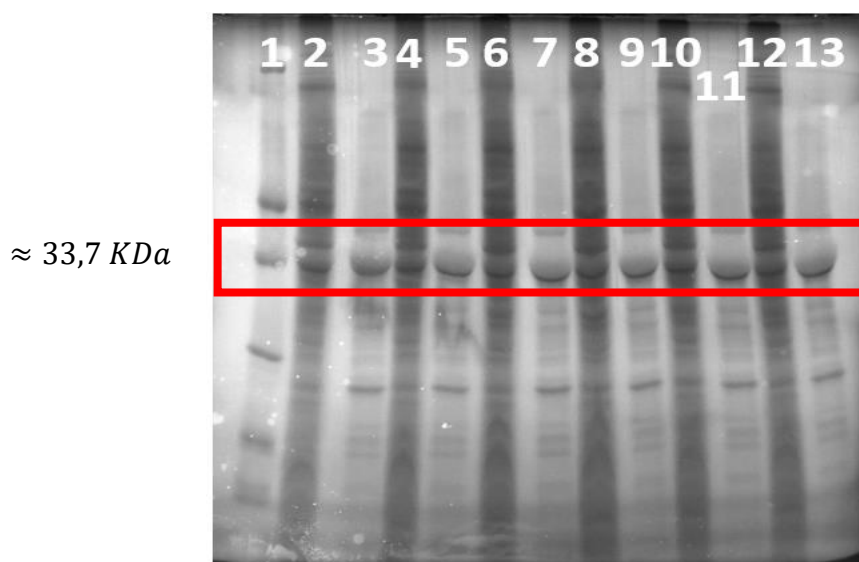


Figura 9: Electroforesis PF7 hinchamiento en caliente sin agitación durante 72 horas. Se recuadra la franja correspondiente al peso molecular ≈ 33,7 KDa "Kg/mol" del polímero "M80"

Pocillos	PF7	Descripción
1	Marker	
2	↓ +0	Precipitado después del hinchamiento
3	Sb +0	Sobrenadante después del hinchamiento
4	↓ +1	Precipitado después del primer ciclo de congelación y descongelación
5	Sb +1	Sobrenadante después del primer ciclo de congelación y descongelación
6	↓ +2	Precipitado después del segundo ciclo de congelación y descongelación
7	Sb +2	Sobrenadante después del segundo ciclo de congelación y descongelación

8	↓ +3	Precipitado después del del tercer ciclo de congelación y descongelación
9	Sb +3	Sobrenadante después del tercer ciclo de congelación y descongelación
10	↓ +4	Precipitado después del cuarto ciclo de congelación y descongelación
11	Sb +4	Sobrenadante después del cuarto ciclo de congelación y descongelación
12	↓ +5	Precipitado después del quinto ciclo de congelación y descongelación
13	Sb +5	Sobrenadante después del quinto ciclo de congelación y descongelación

Tabla 10: Detalle de la Electroforesis PF6 "M80"

En la electroforesis que corresponde al proceso de osmosis llevada a cabo durante 72 horas [Figura 9](#), se aprecia un aumento en la producción hasta el tercer ciclo de congelación. Sin embargo, es interesante notar que la banda de sobrenadante de este tercer ciclo no parece ser significativamente más grande que en el ciclo anterior. Además, en lo que respecta al proceso de osmosis, no se observan diferencias significativas en comparación con el período de 48 horas. Estos resultados sugieren que la osmosis no se vuelve más productiva después de 48 horas y que posiblemente haya alcanzado un equilibrio osmótico antes de ese tiempo.

Esto sugiere que, a partir del segundo día de osmosis, las bacterias dejan de hincharse, y parece ser indiferente la temperatura a la que se realice el proceso en términos de la eficacia de la osmosis.

A la vista de los resultados obtenidos se realizan pruebas de dos muestras sin ciclos de congelación "PF9 y PF10" ya que en todas las pruebas se observa que cierta cantidad de bacterias se rompen por simple osmosis. En estas pruebas de osmosis sin congelación, se observa que la bacteria apenas se rompió. Los resultados de la purificación indican que, a pesar de que la disolución madre tiene un rendimiento dentro de la media, no se pudo obtener polímero de las purificaciones de osmosis.

Dado que se ha confirmado que el proceso de hinchado alcanza un posible equilibrio osmótico a las 48 horas, y que la ruptura de las bacterias se logra durante el segundo ciclo de congelación y descongelación, se tomó la decisión de escalar las pruebas. Esto implicó llevar a cabo las pruebas con una cantidad equivalente a la mitad de la producción habitual, utilizando el precipitado obtenido tras el lavado de 8 litros de fermentador.

Los resultados del rendimiento obtenido de todas las pruebas realizadas se presentan en la [Tabla 11](#)

Denominación	Volumen fermentado (L)	Peso precipitado (g)	Peso bio-polímero puro (mg)	Rendimiento mg/L	Rendimiento %
P20 (He5)	12,5	264,9	317,4	25,36	100
PF3	1,27	26,9	28,94	22,78	89,83
PF4	1,24	26,4	28,79	23,21	91,52
P23 (VKV4)	14,30	235,5	3678,7	257,25	100
PF5	0,36	6	61,4	170,56	66,30
PF6	0,33	5,4	0	0	0
P24 (M80)	14,11	200,8	3715,5	263,32	100
PF7	0,41	5,9	96,7	235,85	89,57
PF8	0,46	6,5	123,6	268,7	102,04
P26 (He5)	14,24	262,3	784,6	55,10	100
PF9	0,75	13,9	0	0	0
P27 (He5)	14,09	265,6	886	62,8	100
PF10	0,91	17,1	8,9	0,09	0,001
P29 (He5)	14,18	235	707	49,86	100
PF11	0,39	6,4	14,4	36,92	74,04
PF12	0,43	7,1	10,9	25,35	50,84
P30 (RGTAR)	0	0	0	0	0
PF13	7,5		156,3	20,8	10,4
P31 (RGTAR)	7,06	159,5	512,8	72,63	100
PF14	7,94	179,6	362,7	45,68	62

Tabla 11: Resultados obtenidos de las pruebas de lisis celular de las bacterias usando nitrógeno líquido.

Todas las pruebas designadas con la etiqueta “PF” seguida de números se refieren a las pruebas de ruptura realizadas utilizando nitrógeno líquido o a través de osmosis simple. Por otro lado, las pruebas etiquetadas con “P” seguida de números corresponden al proceso de ruptura convencional utilizando el disruptor GA.

Para calcular el rendimiento de la PF13, considerando la pérdida de la muestra madre durante el proceso de purificación, se utilizaron datos promedio de producciones anteriores. Los valores obtenidos son los siguientes: un rendimiento de 200 mg/L y una producción total de 3 g en los 15 litros fermentados.

Es importante mencionar que, para inactivar las proteasas presentes en la masa bacteriana, se calienta la muestra a una temperatura que oscila entre 80 y 90°C, mientras se mantiene una agitación manual constante durante un período de treinta 30 min. Este proceso es esencial para cada polímero que se somete al nuevo tipo de ruptura, ya que, al notar que parte de la masa bacteriana se romperá por osmosis, las proteasas también permanecerán en la solución hasta el primer ciclo de centrifugación. Este calentamiento se realiza con los polímeros que tiene este tratamiento en su protocolo de purificación.

En resumen, hemos establecido que la lisis celular mediante nitrógeno es una opción viable. Sin embargo, aún existen numerosos aspectos que requieren investigación adicional y mejoras en el protocolo antes de que pueda desempeñar un papel crucial en la escalabilidad de la producción de ELR's.

4.2. Caracterización de los ELR's

Ruptura de celular de las bacterias sometidas a congelación rápida usando nitrógeno líquido

La caracterización de los ELR's es de suma importancia para evaluar su pureza y garantizar la consistencia en el proceso de producción de lote a lote. Por lo tanto, compararemos los resultados obtenidos en el nuevo método de lisis celular con las características típicas de producción que se han registrado en diversos lotes de diferentes polímeros probados. Esto nos permitirá evaluar la eficacia y la coherencia del nuevo proceso en relación con los métodos tradicionales de producción.

Se llevó a cabo un análisis de la estructura del polímero bioproducido mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Para ello, se generó un espectro de ^1H (consultar ANEXO V y VII) que facilitó la identificación de los tipos de hidrógenos en función de su frecuencia de resonancia y la cuantificación de su presencia en la estructura del espectro mediante la integración del área bajo la curva correspondiente [Figura 28](#); [Figura 34](#).

- I. Mediante espectroscopía infrarroja (FTIR), se ha obtenido el espectro de los polímeros (consultar ANEXO V y VI) de prueba. Este espectro nos permite identificar diversos grupos funcionales presentes en la estructura del polímero, ya que muestran bandas características asociadas a la absorción de luz infrarroja. A pesar de la complejidad debida al alto peso molecular del polímero y a la superposición de bandas, hemos logrado identificar una banda a 3400 cm^{-1} relacionada con la tensión del enlace N-H y otra banda a 1600 cm^{-1} que corresponde al enlace C=O de amidas, entre otras.

Al igual que con los RMN, se generaron espectros infrarrojos FT-IR para los polímeros RGTAR y HE5, como se muestra en la [Figura 27](#) y [Figura 33](#). Además, se obtuvieron estos espectros para diversas muestras, como se representa en las [Figura 29](#); [Figura 30](#); [Figura 31](#) y [Figura 32](#), en las cuales se observan las bandas características de los ELR's, similares a las observadas en otras caracterizaciones realizadas en diferentes producciones.

- II. La técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se empleó para determinar la temperatura de transición (T_t) del polímero, que desempeña un papel fundamental en su comportamiento inteligente (consultar ANEXO V y VII) [Figura 26](#); [Figura 33](#).

Según las caracterizaciones detalladas en los anexos, se observa que los polímeros sometidos a un tratamiento con nitrógeno líquido no muestran diferencias significativas en comparación con los polímeros que fueron tratados de manera convencional. Sin embargo, no se pudo realizar una caracterización completa de todos los polímeros probados, por lo cual a un podría haber discordancia entre los polímeros sometidos a los ciclos de congelación con los que se someten al proceso habitual de disrupción GA.

Bio-tinta

La caracterización de la bio-tinta ha sido previamente abordada en investigaciones anteriores realizadas por el G.I.R. Bioforge [3], los resultados se exponen en las [Figura 36](#); [Figura 37](#) y [Figura 39](#)

4.3. Cultivo celular.

Obtenido el cultivo primario de los condrocitos en un medio de cultivo apropiado, fue esencial llevar a cabo su expansión celular hasta alcanzar una densidad celular deseada. Esto se logró mediante un reemplazo del medio de cultivo cada 72 horas aproximadamente, siempre que las células no alcanzaran la confluencia. A continuación, se mantuvieron incubadas a una temperatura de 37°C, en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ y un 95% de aire.

Como se mencionó en la sección [3.2.4](#) la evaluación de la proliferación celular de los condrocitos se llevó a cabo mediante la adquisición de imágenes utilizando un microscopio óptico Leica DFC3000G. A continuación, se presentan las imágenes obtenidas:

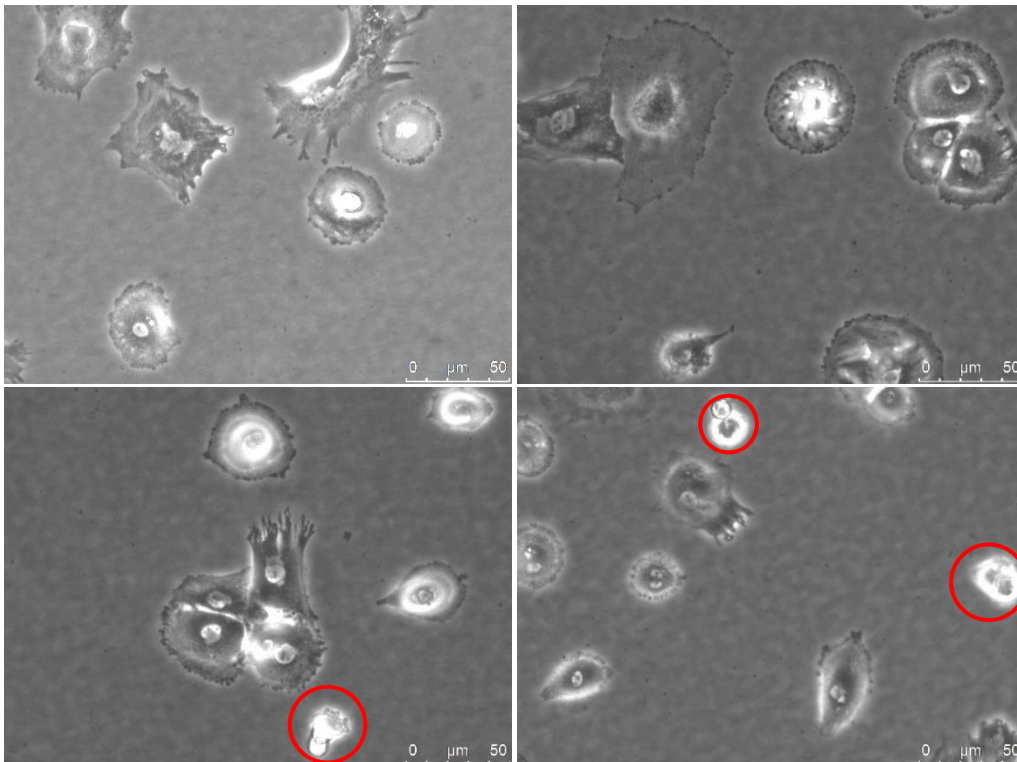


Figura 10: Condorcitos pasados 10 días después de realizar el cultivo celular, las células muertas están resaltadas en círculos rojos.

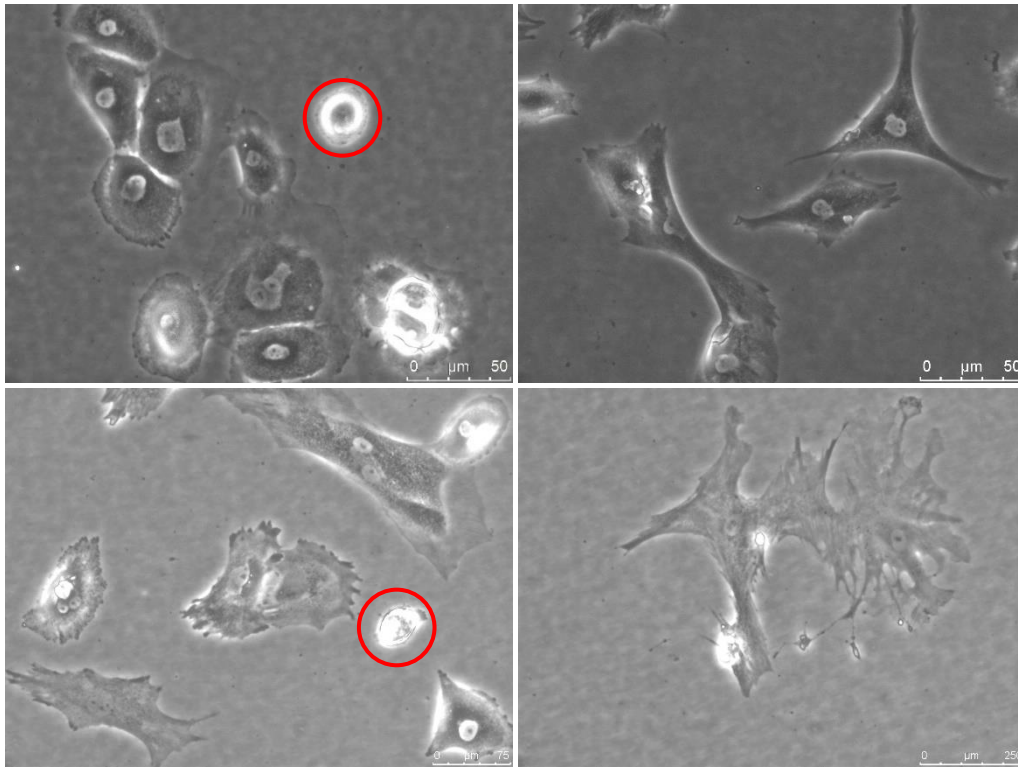


Figura 11: Condorcitos pasados 20 días después de realizar el cultivo celular, las células muertas están resaltadas en círculos rojos.

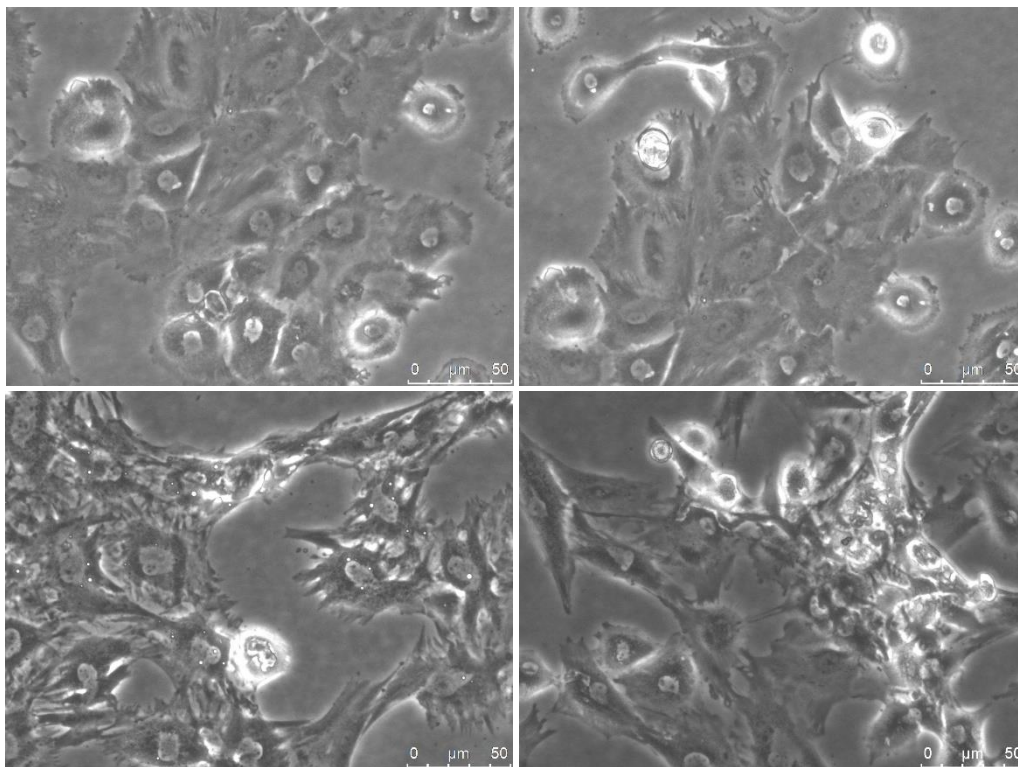


Figura 12: Condorcitos pasados 50 días después de realizar el cultivo celular.

En estas imágenes, se puede apreciar la proliferación celular a lo largo de varios días. Inicialmente, se observa una baja adhesión de los condrocitos al frasco de cultivo, pero con el tiempo, estas células viables comienzan a adherirse y proliferar. Las células no viables permanecen en suspensión en el medio de cultivo “DMEM” y se eliminan durante cada cambio de medio. En la última imagen, se puede observar que las células han alcanzado la confluencia en el frasco de cultivo.

El período requerido para alcanzar la cantidad necesaria de células “Condrocitos” destinadas a la bio-impresión 3D de los andamios fue de aproximadamente 60 días. Esto puede percibirse como una duración significativa en comparación con los cultivos de otras células comunes, como los fibroblastos o queratinocitos los cuales requieren menos tiempo para alcanzar similares cantidades o superiores.

4.4. Bio-impresión 3D.

Antes de iniciar la bio-impresión 3D de los andamios con las células cargadas, se llevaron a cabo pruebas de optimización de los parámetros de impresión utilizando crema corporal, en este caso, NIVEA, como material de prueba al igual que con el biopolímero base de la bio-tinta. Esto nos permitió determinar la geometría de impresión óptima para los andamios, utilizando la menor cantidad de bio-tinta posible, pero asegurando que la geometría resultante fuera relevante para evaluar la capacidad de impresión de la bio-tinta.

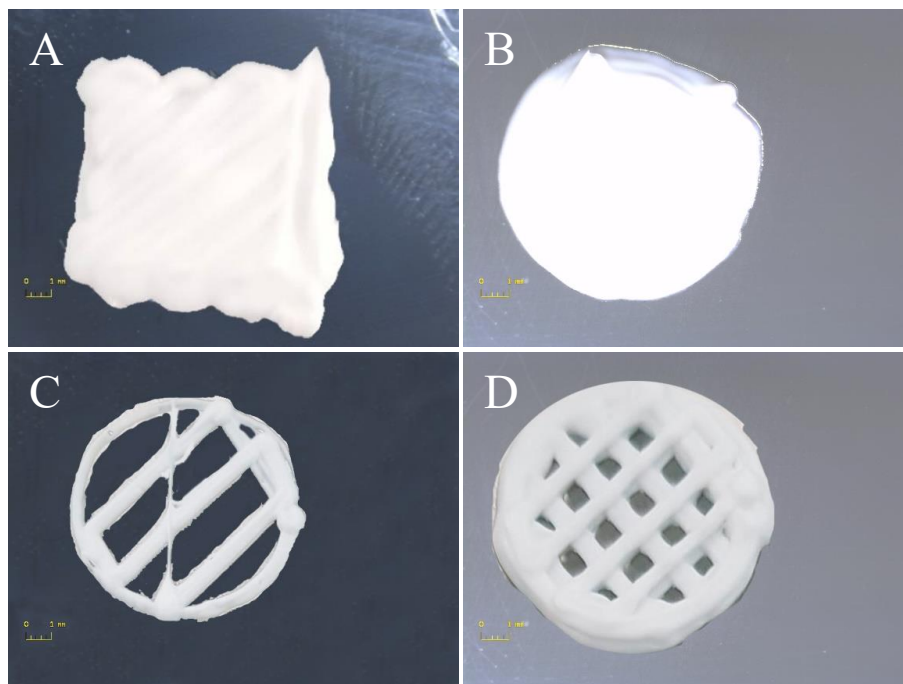


Figura 13: Pruebas de impresión utilizando NIVEA como material de impresión; A) Impresión de un andamio de forma geométrica cúbica sin relleno; B) Impresión de un andamio de forma geométrica cilíndrica sin relleno; C) Impresión de un cilindro con poros simples.; D) Impresión de un cilindro con poros.

Figura 13	Parámetro de impresión	Valores y unidades	Comentario
A	Layers	8	Se observa la capacidad de la impresora para imprimir formas geométricas predefinidas.
	Height	1,2 mm	
	Width	10 mm	
	Length	10 mm	
	Poros Size	Sin poros	
	Layer Height	0,15 mm	
	Flow Speed	0.8 mm/s	
	Patron de porosidad	Sin poros	
B	Layers	8	
	Height	1,2 mm	
	Diameter	12 mm	
	Poros Size	Sin poros	
	Layer Height	0,15 mm	
	Flow Speed	0.8 mm/s	
	Patron de porosidad	Sin poros	
C	Layers	3	Los poros presentan una disposición diagonal en una sola dirección.
	Height	0,5 mm	
	Diameter	10 mm	
	Poros Size		
	Layer Height	0,15mm	
	Flow Speed	0,5 mm/s	
	Patron de porosidad	Diagonal	
D	Layers	4	Se aprecia un cilindro con una mayor cantidad de poros dispuestos en diagonal en ambas direcciones, formando un patrón a 45 grados.
	Height	0,7 mm	
	Diameter	12 mm	
	Poros Size	1,4 mm	
	Layer Height	0,15 mm	
	Flow Speed	0,6 mm/s	
	Patron de porosidad	Diagonal	

Tabla 12: Detalles de la Figura 13.

Luego de realizar numerosas impresiones utilizando NIVEA y observando el comportamiento de la bio-impresora REGEMAT 3D, procedimos a realizar impresiones utilizando el biopolímero base de la bio-tinta. Esto nos permitió afinar los parámetros de impresión óptimos.

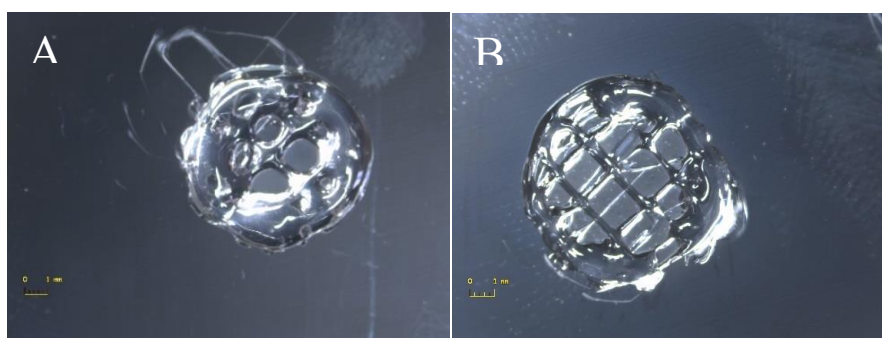


Figura 14: Pruebas de impresión con el biopolímero A y B) impresión usando como tinta el biopolímero.

Figura 14	Parámetro de impresión	Valores y unidades	Comentario
A	Layers	4	Se puede apreciar cómo la bio-tinta se difumina debido a la baja temperatura de la cama o base de impresión. Al igual que unos filamentos que no son partes del diseño.
	Height	0,7 mm	
	Diameter	8 mm	
	Poro Size	1,2 mm	
	Layer Height	0,15 mm	
	Flow Speed	0,8 mm/s	
	Patron de porosidad	Diagonal	
B	Layers	4	Para eliminar los filamentos que no están presentes en el diseño se varió el Retract Speed
	Height	0,7 mm	
	Diameter	10 mm	
	Poro Size	1,4 mm	
	Layer Height	0,15 mm	
	Flow Speed	0,4 mm/s	
	Patron de porosidad	Diagonal	

Tabla 13: Detalle de la **Figura 14**

Al igual que con la crema NIVEA, fue necesario realizar múltiples impresiones para determinar los parámetros de impresión ideales antes de proceder con la impresión utilizando la bio-tinta.

Se pudo notar que el comportamiento de la bio-tinta era ligeramente diferente en comparación con la NIVEA, a pesar de tener una densidad similar. Resultó evidente que el proceso de gelificación de la tinta requería una consideración especial en cuanto a la temperatura de transición del polímero. Esto se debe a que la fidelidad de la impresión con respecto al diseño CAD depende en gran medida de cómo se gestiona la etapa inicial del proceso de **Gelificación Rápida Primaria**, como se describe en la sección **2.7**

Con el objetivo de optimizar el uso de la bio-tinta, se tomó la decisión de aumentar el tamaño de los poros en las impresiones posteriores. Esto se hizo después de haber probado tamaños de poro que oscilaban entre 1 mm y 2 mm. Finalmente, se optó por un tamaño de poro de 4 mm, lo que resultó en la creación de andamios que contenían un total de 4 poros.

De manera similar, se optó por reducir el número de capas y la altura de los cilindros porosos en las impresiones. En este caso, se eligió un diseño de 3 capas de altura y 1,25 mm de altura para los cilindros porosos. Esta configuración garantizaba que los andamios tuvieran un volumen suficiente para evitar la deshidratación y que los andamios se volvieran laminas, asegurando así un entorno adecuado para la proliferación celular. Es importante destacar que, durante las pruebas con el biopolímero, la altura máxima probada y el número máximo de capas impresas fueron de 5 mm y 13 capas, respectivamente. Con esta altura máxima probada, se asegura que los andamios conservarán su forma y estructura, evitando la difusión o el colapso

durante todo el proceso de bio-impresión. No se exploraron impresiones de andamios de mayor altura, ya que esto habría resultado en un consumo innecesario de material, considerando el alcance de este Trabajo de Fin de Máster.

El diámetro de los andamios y el tamaño de los poros tienen un impacto significativo en la cantidad de poros que presenta el andamio. Inicialmente, se realizaron impresiones con diámetros de hasta 14 mm, probando diferentes tamaños de poros. Sin embargo, se determinó que un diámetro de 8 mm era el más adecuado desde una perspectiva de optimización de material.

Los demás parámetros fueron seleccionados considerando la experiencia acumulada durante las pruebas. Se hizo un esfuerzo por mantener estos parámetros constantes, pero estaban sujetos a modificaciones durante la impresión si se observaba que no producía los resultados deseados.

A continuación, se detallan los parámetros de bio-impresión óptimos utilizados con la bio-tinta cargada con células.

<i>Parámetros de impresión</i>	<i>Valores y unidades</i>
Leyer	3
Height	1,25 mm
Diameter	8 mm
Pore Size	4 mm
Layer Height	0,41 mm
Flow Speed	0,6 mm
Infill Pattern	Diagonal
Retract Speed	2,5 mm/s
The Infill Direction	45°
Scaffold Geometry	Cylinder

Tabla 14: *Parámetros óptimos para la impresión de los andamios.*

En el día de la bio-impresión 3D de los andamios, una vez que se alcanzó la cantidad de células necesaria, se llevó a cabo el proceso de recolección de las células, que luego se utilizarían para preparar la bio-tinta cargada con células. Esta recolección se lleva a cabo siguiendo el mismo procedimiento que se describió previamente para el levantamiento de células explicados en la sección [3.2.1](#)

Con los parámetros de bio-impresión optimizados y la bio-tinta preparada, se procedió a la impresión de los andamios que contenían condrocitos. Posteriormente, se evaluó la proliferación y viabilidad celular, lo que proporcionará información crucial sobre la idoneidad de la bio-tinta para futuras aplicaciones en la regeneración de tejidos osteocondrales, en particular en la regeneración de cartílagos.

4.5. viabilidad celular

Según lo indica el protocolo de optimización de tinte del kit de Viabilidad/Citotoxicidad LIVE/DEAD® se realizaron pruebas para obtener la concentración óptima de tinte, este protocolo recomienda probar concentraciones para el EthD-1 y la cal AM que van desde los 0,1µM a los 10µM, se probaron concentraciones de ambos tintes de 1µM, 2µM, 3µM, tiñendo condrocitos solo con **EthD-1** a estas tres concentraciones y posteriormente tiñendo otra muestra de condrocitos solo con **cal AM** con estas tres concentraciones para posteriormente tomar imágenes usando el microscopio confocal Leica TCS SP8 usando el objetivo de 10X y la misma configuración de parámetros del microscopio variando solo el enfoque, ganancia estática. De esta manera se pudo determinar la concentración mínima de los reactivos “tinte” LIVE/DEAD® necesarios para obtener buenas imágenes. Los condrocitos usados para estas pruebas se cultivaron en una placa multipocillos en los cuales se añadieron los tintes según el protocolo mencionado en la sección 3.2.6.

Según el protocolo de optimización de tinción del kit de Viabilidad/Citotoxicidad LIVE/DEAD®, se llevaron a cabo pruebas para determinar la concentración óptima de tinte. Este protocolo recomienda probar concentraciones de EthD-1 y cal AM que van desde 0.1 µM hasta 10 µM. Se realizaron pruebas con concentraciones de ambos tintes, 1 µM, 2 µM y 3 µM, tiñendo condrocitos solo con EthD-1 a estas tres concentraciones y luego tiñendo otra muestra de condrocitos solo con cal AM a estas tres concentraciones. Posteriormente, se adquirieron imágenes utilizando el microscopio confocal Leica TCS SP8 con un objetivo de 10X y la misma configuración de parámetros del microscopio, variando solo el enfoque y la ganancia estática. De esta manera, se pudo determinar la concentración mínima de los reactivos de tinción LIVE/DEAD® necesarios para obtener imágenes de alta calidad. Los condrocitos utilizados en estas pruebas se cultivaron en placas de múltiples pocillos a las cuales se les añadieron los tintes siguiendo el protocolo mencionado en la sección 3.2.6

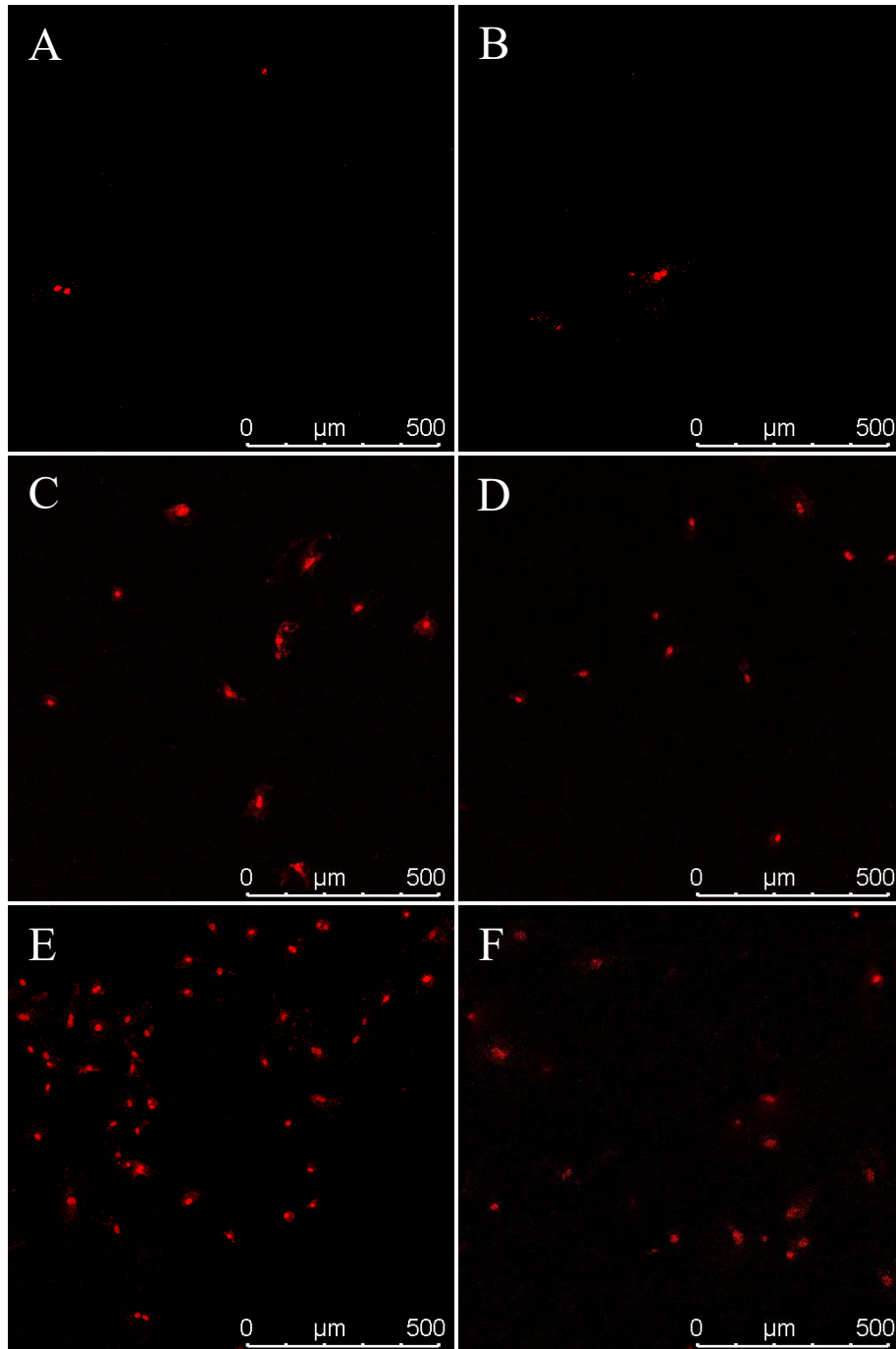


Figura 15: Pruebas de tinción de los Condrocitos usando el Homodimero-1 de Etidio a distintas concentraciones; A, B) EthD-1 [1μM]; C, D) EthD-1 [2μM]; E, F) EthD-1 [3μM]

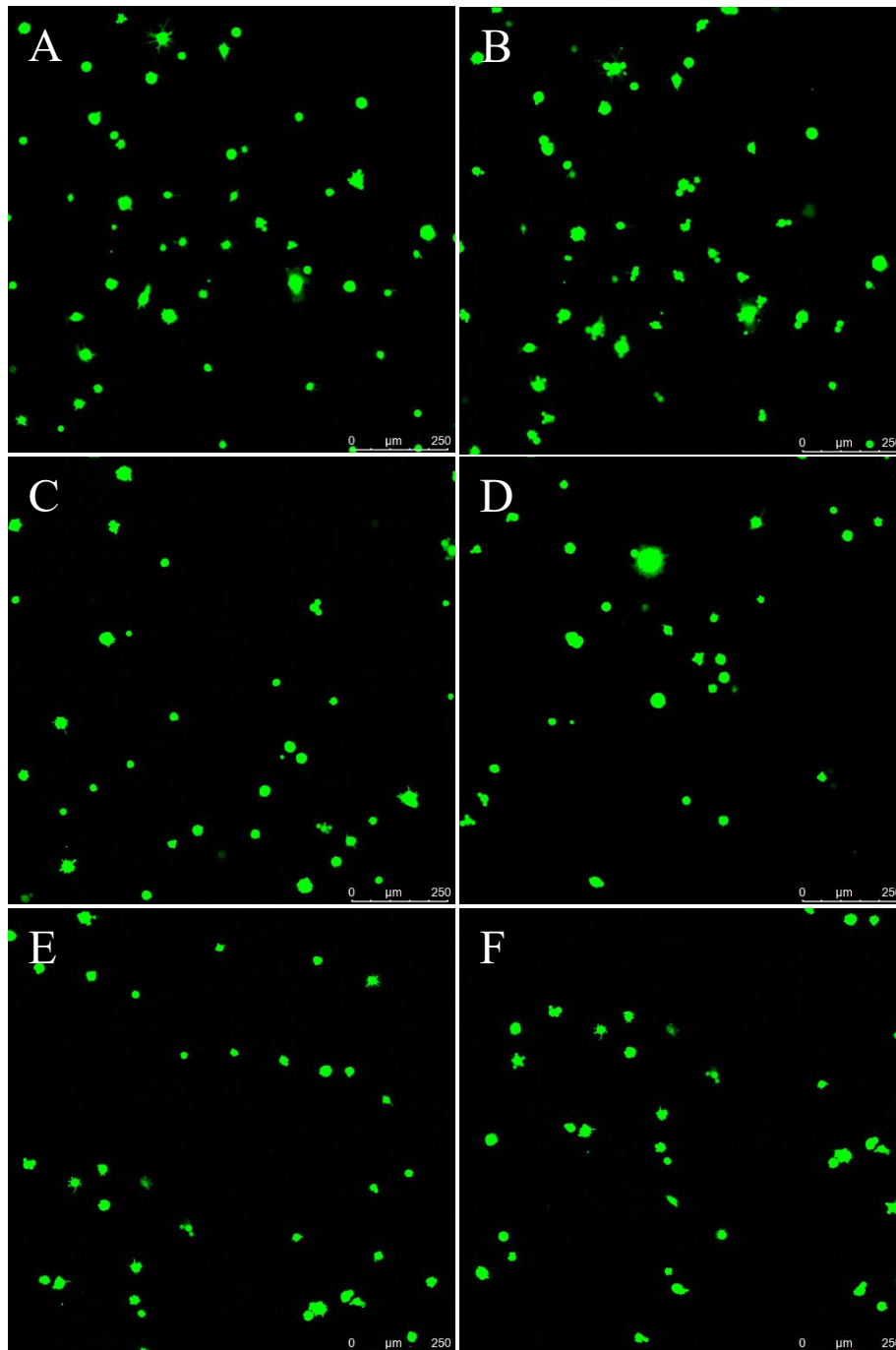


Figura 16: Pruebas de tinción de los Condrocitos usando Calceína AM a distintas concentraciones; A, B) cal AM [1 μ M]; C, D) cal AM [2 μ M]; E, F) cal AM [3 μ M]

En la [Figura 15](#), se observa que los condrocitos no viables los cuales se trataron con metanol al 70% para asegurar que estas células estén muertas, se tiñeron de manera más efectiva con una concentración de 3 μ M en comparación con las otras dos concentraciones probadas. La concentración de 1 μ M mostró los peores resultados, ya que solo unas pocas células se tiñeron. Sin embargo, al comparar las muestras teñidas con 2 μ M y 3 μ M, podemos concluir que ambas concentraciones son adecuadas. Es importante destacar que esta es una conclusión parcial, ya que estas concentraciones de tinte se probaron solo con condrocitos y no con la bio-tinta cargada con las células. Esto

significa que aún debemos evaluar cómo se comporta la tinción en la bio-tinta con células antes de tomar una decisión final sobre la concentración óptima de tinte a utilizar en los andamios bio-impresos.

En la [Figura 16](#), se presentan las pruebas realizadas con tres concentraciones diferentes de cal AM. En estas pruebas, se utilizaron muestras de condrocitos viables. Al comparar las imágenes tomadas de estas muestras, se observa que las tres concentraciones proporcionan buenos resultados. Sin embargo, al igual que con las pruebas anteriores utilizando EthD-1, es importante destacar que estas conclusiones son parciales, ya que aún debemos observar cómo interactúa la calceína AM con la bio-tinta cargada con las células.

Hasta este punto en la realización del TFM, las conclusiones provisionales sugieren que sería apropiado utilizar una combinación de reactivos o tintas, con una concentración de EthD-1 de 2 μM o 3 μM y una concentración de cal AM de 1 μM . Sin embargo, es crucial realizar pruebas adicionales para evaluar la interacción de estos tintes con la bio-tinta cargada con las células antes de llegar a una decisión final sobre las concentraciones óptimas a utilizar.

Luego de haber definido las concentraciones óptimas de los reactivos LIVE/DEAD[®], avanzamos a realizar pruebas con cultivos de condrocitos que contenían tanto células viables como no viables. Empleamos las concentraciones previamente seleccionadas de los tintes, pero esta vez los combinamos para evaluar su idoneidad en relación con los andamios impresos con la bio-tinta cargada con células.

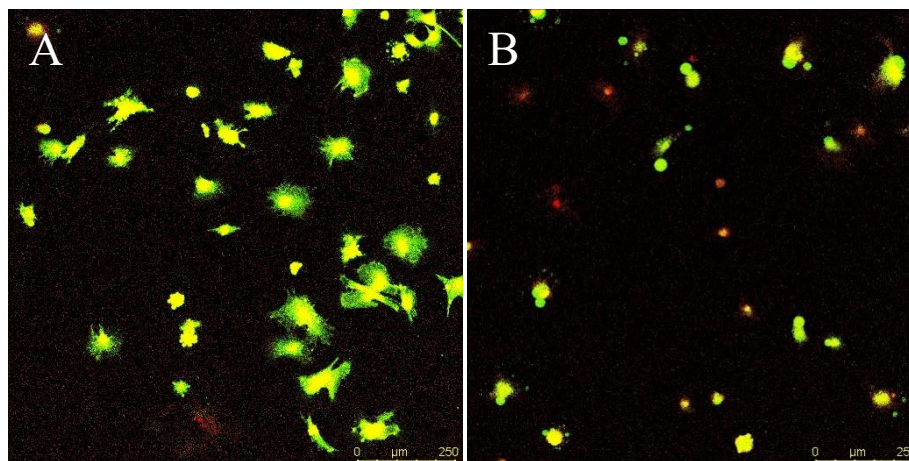


Figura 17: Pruebas de tinción de los Condrocitos usando EthD-1 y Cal AM; A) EthD-1 [2 μM] y cal AM [2 μM]; B) EthD-1 [1,5 μM] y cal AM [1,5 μM].

En la [Figura 17](#), se puede observar la interacción de ambos reactivos LIVE/DEAD[®] con los condrocitos a dos concentraciones diferentes. En la [Figura 17 A](#), se aprecia que la cal AM a 2 μM tiñe eficazmente los condrocitos en verde, pero también enmascara la tinción roja del EthD-1 a 2 μM sobre los condrocitos. Por lo tanto, decidimos reducir la concentración de ambos tintes.

Tras disminuir la concentración de ambos reactivos LIVE/DEAD[®], se puede apreciar en la [Figura 17 B](#) que ambas tinciones son claramente visibles y distinguibles entre sí. Esto sugiere que las concentraciones de 1,5 μM para ambos reactivos son

adecuadas. Sin embargo, es necesario comprobar cómo estas concentraciones afectan a los andamios impresos con la bio-tinta cargada con células.

Al igual que en las pruebas anteriores de optimización de la concentración de los tintes por separado, se utilizó el microscopio confocal Leica TCS SP8 con un objetivo de 10X en las pruebas donde se mezclaron ambos tintes.

Una vez concluidas las pruebas de optimización de los reactivos para teñir los condrocitos, se procedió a realizar el protocolo de microscopía de fluorescencia, como se describe en la sección 3.2.6, para evaluar la proliferación y viabilidad de los condrocitos presentes en los andamios bio-impresos.

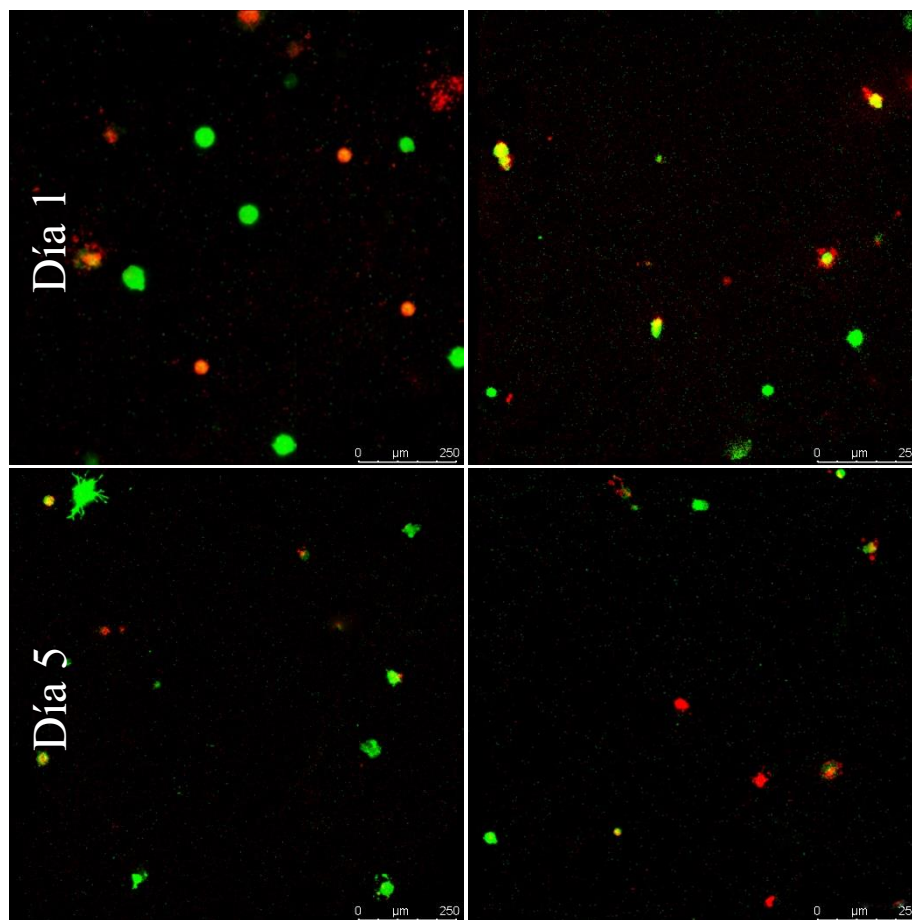


Figura 18: Proliferación celular Live/Dead “1,5 μ M cal AM y 2 μ M EthD-1”, objetivo 10X, días 1 y 5.

En los primeros días después de la impresión de los andamios [Figura 18](#), es evidente que la cantidad de células viables es limitada. Esto se debe a que muchas de ellas experimentan daños durante el proceso de impresión, tanto debido al cizallamiento, presión de paso de la jeringa a la punta cónica, así como a la manipulación necesaria en la preparación de la bio-tinta.

En las imágenes, las células teñidas de verde se consideran viables, mientras que las células teñidas de rojo se consideran no viables. Las células que presentan un color amarillo o naranja indican que eran viables en el momento de la tinción, pero muestran cierto daño en su membrana celular o que una célula viva este sobre una muerta y viceversa.

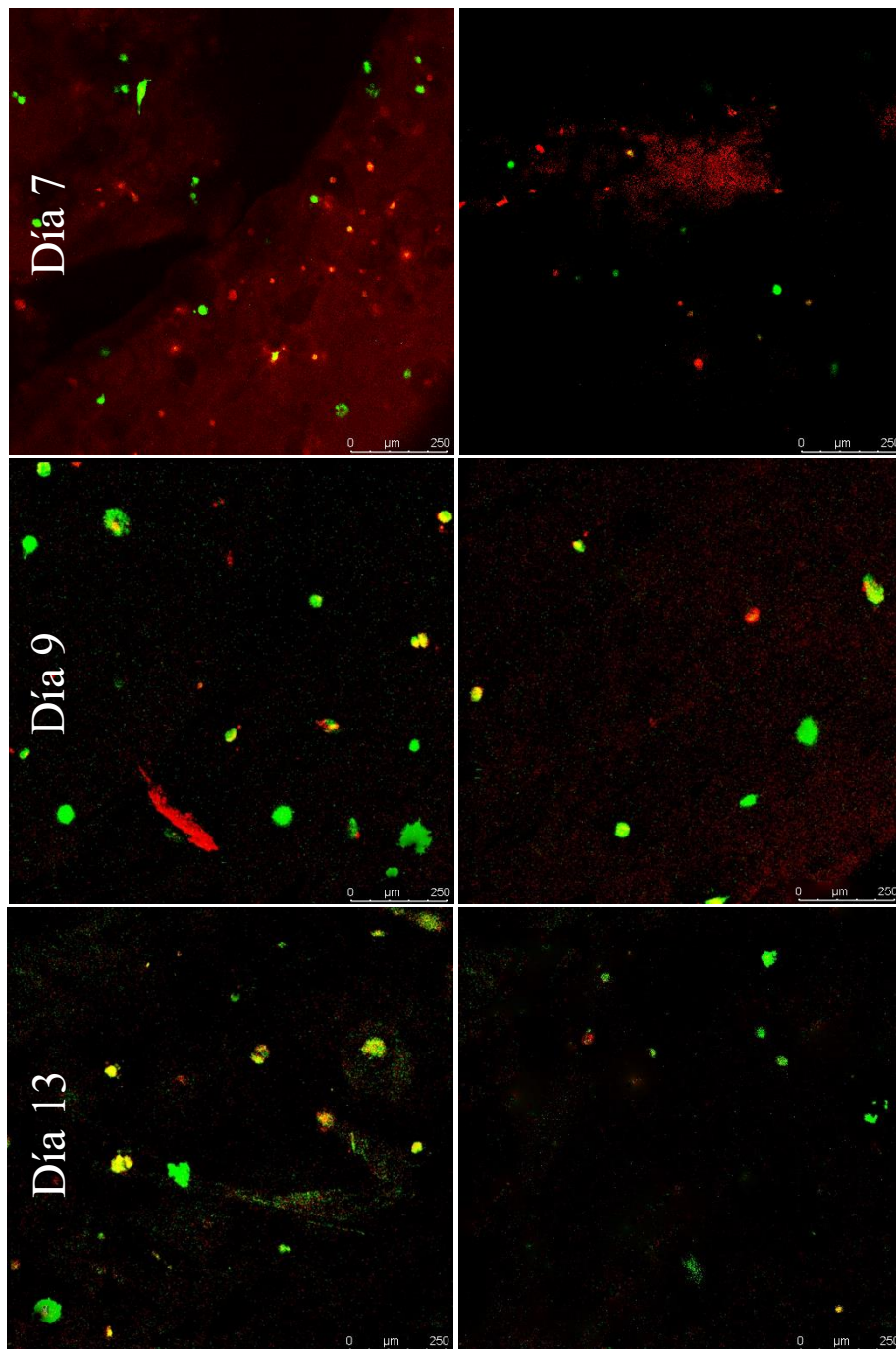


Figura 19: Proliferación celular Live/Dead "1,5μM cal AM y 2 μM EthD-1", objetivo 10X, días 7; 9 y 13.

En la imagen del día 7, se puede notar que la elastina muestra cierta fluorescencia que, en ocasiones, no se puede eliminar por completo de la imagen. Además, se aprecia parte del diseño del andamio en la [Figura 19](#). En las imágenes posteriores, correspondientes a los días 9 y 13, se observa un aumento en la proliferación celular, con un creciente número de células viables.

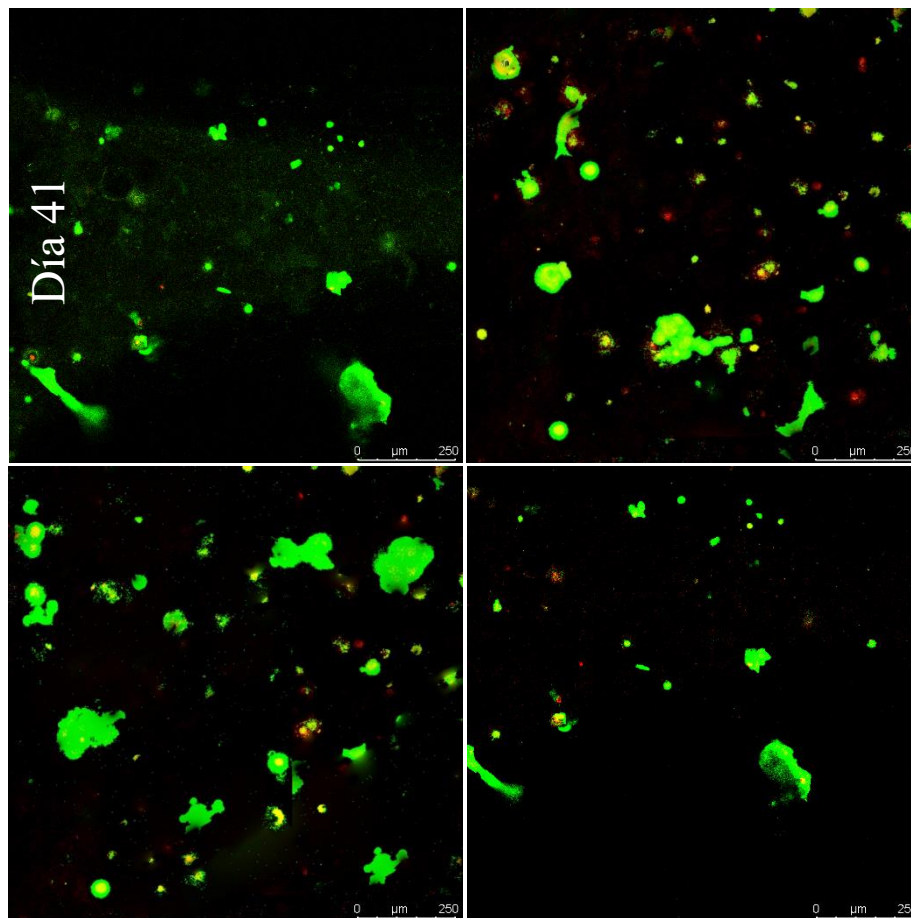


Figura 20: Proliferación celular Live/Dead “1,5 μ M cal AM y 2 μ M EthD-1”, objetivo 10X, día 41.

En las imágenes del día 41, se nota claramente que la mayoría de las células presentes en el andamio son viables, y hay muy pocas células que no lo son. Esto indica que la bio-tinta, además de servir como un soporte que imita la matriz extracelular de los condrocitos, proporciona un entorno propicio para su proliferación.

5. CONCLUSIONES

Desde una perspectiva general, se lograron todos los objetivos establecidos para este TFM. Se encontraron los parámetros óptimos para imprimir los andamios con la bio-tinta cargada con células. Además, según el análisis de las imágenes obtenidas mediante el microscopio confocal, se puede concluir que el proceso de bio-impresión fue exitoso. Se logró imprimir andamios que mantuvieron la fidelidad de forma con el diseño previo y que presentaron una alta viabilidad celular, ya que los condrocitos continuaron proliferando a medida que pasaba el tiempo.

Es importante destacar que, en los primeros días posteriores a la bio-impresión, se observó una baja viabilidad celular. Esto se debe a varios factores que afectan directamente a las células. En primer lugar, el proceso de impresión somete a las células a presiones relativamente elevadas debido al paso de la bio-tinta desde la jeringa hasta el dispensador cónico. Este cambio de sección puede causar cierta deformación en las células, lo que podría dañar la pared celular de los condrocitos. Además, las células experimentan una fuerza de cizallamiento durante la deposición de las distintas capas que componen el andamio, lo que también puede afectar su viabilidad. El estrés causado por la manipulación de las células durante el proceso, que incluye la exposición a bajas temperaturas para garantizar que la bio-tinta se forme correctamente, también contribuye a esta baja viabilidad inicial.

Sin embargo, a medida que avanza el tiempo, las células logran adaptarse y proliferar, lo que demuestra que el proceso de bio-impresión fue exitoso en última instancia.

Según las caracterizaciones detalladas en los anexos, se observa que los polímeros sometidos a un tratamiento con nitrógeno líquido no muestran diferencias significativas en comparación con los polímeros que fueron tratados de manera convencional. Sin embargo, se observó una disminución en el rendimiento cuando se escaló la producción a un reactor de tamaño medio. Por otro lado, las pruebas realizadas con pequeñas alícuotas mostraron un rendimiento satisfactorio en la producción. Por lo tanto, es esencial optimizar el proceso y llevar a cabo una investigación más exhaustiva para comprender a fondo los posibles fenómenos que podrían afectar el rendimiento durante el escalado. A pesar de los desafíos de rendimiento mencionados, fue posible obtener polímeros utilizando este novedoso proceso de ruptura celular. La verificación de este proceso se realizó mediante técnicas como la electroforesis SDS y FT-IR. Para una caracterización completa, se recomienda llevar a cabo un análisis MALDI-TOF para confirmar la coherencia de los resultados obtenidos en la electroforesis. Demostrando así que este proceso es factible para un posible escalado en la producción de los bio-polímeros ELR's

6. Bibliografía

- [1] J. J. Greene and D. Watson, "Septal Cartilage Tissue Engineering : New Horizons".
- [2] A. M. DEL VALLE, "BIOIMPRESIÓN 3D DE ANDAMIOS PARA LA REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO ARTICULAR," *G.I.R.Bioforge*, p. 60, 2023.
- [3] S. S. Fern, V. Dirigida, and C. Rodr, "TESIS DOCTORAL : DEVELOPMENT OF BIOMATERIALS BASED ON ELASTIN LIKE RECOMBINAMERS FOR 3D BIOPRINTING APPLICATIONS".
- [4] I. Ozbolat and Y. Yu, "Bioprinting towards Organ Fabrication : Challenges and Future Trends," no. c, 2013.
- [5] Y. Zhang, "Post-printing surface modification and functionalization of 3D-printed biomedical device," *Int. J. Bioprinting*, vol. 3, no. 2, pp. 93–99, 2017, doi: 10.18063/IJB.2017.02.001.
- [6] D. Richards, J. Jia, M. Yost, R. Markwald, and Y. Mei, "3D Bioprinting for Vascularized Tissue Fabrication," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 45, no. 1, pp. 132–147, 2017, doi: 10.1007/s10439-016-1653-z.
- [7] L. Mendoza-cerezo, J. M. Rodríguez-rego, and A. Macías-garcía, "Evolution of bioprinting and current applications," vol. 9, no. 4, 2023.
- [8] R. Chang, B. Starly, W. Sun, C. Culbertson, H. Holtorf, and S. Gonda, "Freeform bioprinting of liver encapsulated in alginate hydrogels tissue constructs for pharmacokinetic study," *17th Solid Free. Fabr. Symp. SFF 2006*, pp. 138–147, 2006.
- [9] F. C. Fierz *et al.*, "The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite scaffolds," *Biomaterials*, vol. 29, no. 28, pp. 3799–3806, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.06.012.
- [10] K. Arai, S. Iwanaga, H. Toda, C. Genci, Y. Nishiyama, and M. Nakamura, "Three-dimensional inkjet biofabrication based on designed images," *Biofabrication*, vol. 3, no. 3, 2011, doi: 10.1088/1758-5082/3/3/034113.
- [11] J. Visser *et al.*, "Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibrils," *Nat. Commun.*, vol. 6, pp. 1–10, 2015, doi: 10.1038/ncomms7933.
- [12] S. Hong *et al.*, "3D Printing of Highly Stretchable and Tough Hydrogels into Complex, Cellularized Structures," *Adv. Mater.*, vol. 27, no. 27, pp. 4035–4040, 2015, doi: 10.1002/adma.201501099.
- [13] H. W. Kang, S. J. Lee, I. K. Ko, C. Kengla, J. J. Yoo, and A. Atala, "A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity," *Nat. Biotechnol.*, vol. 34, no. 3, pp. 312–319, 2016, doi: 10.1038/nbt.3413.
- [14] M. M. Laronda *et al.*, "A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. May, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1038/ncomms15261.
- [15] P. Chen *et al.*, "Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration," *Theranostics*, vol. 9, no. 9, pp. 2439–2459, 2019, doi: 10.7150/thno.31017.

- [16] Y. Sun, Y. You, W. Jiang, Q. Wu, B. Wang, and K. Dai, "Generating ready-to-implant anisotropic menisci by 3D-bioprinting protein-releasing cell-laden hydrogel-polymer composite scaffold," *Appl. Mater. Today*, vol. 18, p. 100469, 2020, doi: 10.1016/j.apmt.2019.100469.
- [17] S. V. Murphy and A. Atala, "3D bioprinting of tissues and organs," *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 773–785, 2014, doi: 10.1038/nbt.2958.
- [18] G. Gao, M. Ahn, W. W. Cho, B. S. Kim, and D. W. Cho, "3D printing of pharmaceutical application: Drug screening and drug delivery," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 9, pp. 1–35, 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13091373.
- [19] M. Vaidya, "Startups tout commercially 3D-printed tissue for drug screening," *Nat. Med.*, vol. 21, no. 1, p. 2, 2015, doi: 10.1038/nm0115-2.
- [20] L. Li *et al.*, "Robotic in situ 3D bio-printing technology for repairing large segmental bone defects," *J. Adv. Res.*, vol. 30, no. 321, pp. 75–84, 2021, doi: 10.1016/j.jare.2020.11.011.
- [21] J. P. Vanderburgh, S. J. Fernando, A. R. Merkel, J. A. Sterling, and S. A. Guelcher, "Fabrication of Trabecular Bone-Templated Tissue-Engineered Constructs by 3D Inkjet Printing," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 6, no. 22, pp. 1–7, 2017, doi: 10.1002/adhm.201700369.
- [22] I. Greco, V. Miskovic, C. Varon, C. Marraffa, and C. S. Iorio, "Printability of Double Network Alginate-Based Hydrogel for 3D Bio-Printed Complex Structures," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 10, no. July, pp. 1–10, 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.896166.
- [23] A. Fatimi, O. V. Okoro, D. Podstawczyk, J. Siminska-Stanny, and A. Shavandi, "Natural Hydrogel-Based Bio-Inks for 3D Bioprinting in Tissue Engineering: A Review," *Gels*, vol. 8, no. 3, 2022, doi: 10.3390/gels8030179.
- [24] P. S. Gungor-Ozkerim, I. Inci, Y. S. Zhang, A. Khademhosseini, and M. R. Dokmeci, "Bioinks for 3D bioprinting: An overview," *Biomater. Sci.*, vol. 6, no. 5, pp. 915–946, 2018, doi: 10.1039/c7bm00765e.
- [25] D. Williams, P. Thayer, H. Martinez, E. Gatenholm, and A. Khademhosseini, "A perspective on the physical, mechanical and biological specifications of bioinks and the development of functional tissues in 3D bioprinting," *Bioprinting*, vol. 9, no. February, pp. 19–36, 2018, doi: 10.1016/j.bprint.2018.02.003.
- [26] J. Groll *et al.*, "A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks," *Biofabrication*, vol. 11, no. 1, 2019, doi: 10.1088/1758-5090/aac52.
- [27] R. Levato *et al.*, "The bio in the ink: cartilage regeneration with bioprintable hydrogels and articular cartilage-derived progenitor cells," *Acta Biomater.*, vol. 61, pp. 41–53, 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.08.005.
- [28] A. Fatimi and O. V. Okoro, "Biopolymer-Based Hydrogels for 3D Bioprinting †," pp. 1–2, 2021.
- [29] R. Levato, J. Visser, J. A. Planell, and E. Engel, "Biofabrication of tissue constructs by 3D bioprinting of cell-laden microcarriers", doi: 10.1088/1758-5082/6/3/035020.
- [30] B. Baumann *et al.*, "Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds Angewandte," pp. 4623–4628, 2017, doi: 10.1002/anie.201700153.
- [31] L. K. Narayanan, P. Huebner, M. B. Fisher, T. Spang, B. Starly, and R. A. Shirwaiker, "3D-Bioprinting of Polylactic Acid (PLA) Nano fi ber – Alginate Hydrogel Bioink Containing

- Human Adipose-Derived Stem Cells,” 2016, doi: 10.1021/acsbiomaterials.6b00196.
- [32] T. Kamperman *et al.*, “Single Cell Microgel Based Modular Bioinks for Uncoupled Cellular Micro- and Macroenvironments,” 2017, doi: 10.1002/adhm.201600913.
- [33] R. Sharma, I. P. M. Smits, L. D. La Vega, C. Lee, and S. M. Willerth, “3D Bioprinting Pluripotent Stem Cell Derived Neural Tissues Using a Novel Fibrin Bioink Containing Drug Releasing Microspheres,” vol. 8, no. February, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00057.
- [34] F. Islands and D. Survey, “Nature 117,” no. 4706, 1960.
- [35] S. Zhang, D. Huang, H. Lin, Y. Xiao, and X. Zhang, “Cellulose Nanocrystal Reinforced Collagen-Based Nanocomposite Hydrogel with Self-Healing and Stress-Relaxation Properties for Cell Delivery,” 2020, doi: 10.1021/acs.biomac.0c00345.
- [36] L. Zhou *et al.*, “3D printing of high-strength chitosan hydrogel scaffolds without any organic solvents,” 2020, doi: 10.1039/d0bm00896f.
- [37] E. Hesse *et al.*, “Collagen type I hydrogel allows migration , proliferation , and osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells,” 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32696.
- [38] S. Chattopadhyay and R. T. Raines, “Review Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing,” vol. 101, no. 8, 2014, doi: 10.1002/bip.22486.
- [39] Y. Liu *et al.*, “A Simple , Cross-linked Collagen Tissue Substitute for Corneal Implantation,” vol. 47, no. 5, 2006, doi: 10.1167/iovs.05-1339.
- [40] W. Liu *et al.*, “Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes,” vol. 29, pp. 1147–1158, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.11.011.
- [41] P. Fagerholm *et al.*, “Biomaterials Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold q , qq,” vol. 35, pp. 2420–2427, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.079.
- [42] N. Diamantides, C. Dugopolski, E. Blahut, S. Kennedy, and L. J. Bonassar, “High density cell seeding affects the rheology and printability of collagen bioinks High density cell seeding affects the rheology and printability of collagen bioinks”.
- [43] E. O. Osidak *et al.*, “Viscoll collagen solution as a novel bioink for direct 3D bioprinting,” 2019, doi: 10.1007/s10856-019-6233-y.
- [44] Y. B. Kim, H. Lee, and G. H. Kim, “Strategy to Achieve Highly Porous/Biocompatible Macroscale Cell Blocks, Using a Collagen/Genipin-bioink and an Optimal 3D Printing Process,” 2016, doi: 10.1021/acsami.6b11669.
- [45] C. Benwood *et al.*, “Natural Biomaterials and Their Use as Bioinks for Printing Tissues,” pp. 1–19, 2021.
- [46] E. O. Osidak, V. I. Kozhukhov, M. S. Osidak, and S. P. Domogatsky, “Collagen as Bioink for Bioprinting : A Comprehensive Review,” pp. 17–26, 2020, doi: 10.18063/ijb.v6i3.270.1.
- [47] J. Eysturskard, I. J. Haug, A. S. Ulset, and K. I. Draget, “Mechanical properties of mammalian and fish gelatins based on their weight average molecular weight and molecular weight distribution,” *Food Hydrocoll.*, vol. 23, no. 8, pp. 2315–2321, 2009, doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.06.007.
- [48] S. Gnani *et al.*, “Gelatin-based hydrogel for vascular endothelial growth factor release in peripheral nerve tissue engineering,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 11, no. 2, pp. 459–

- 470, 2017, doi: 10.1002/term.1936.
- [49] K. Nie *et al.*, "Enzyme-crosslinked electrospun fibrous gelatin hydrogel for potential soft tissue engineering," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 9, pp. 1–16, 2020, doi: 10.3390/polym12091977.
- [50] Y. Qiao *et al.*, "Gelatin Templated Polypeptide Co-Cross-Linked Hydrogel for Bone Regeneration," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–7, 2020, doi: 10.1002/adhm.201901239.
- [51] D. J. Choi, Y. J. Kho, S. J. Park, Y. J. Kim, S. Chung, and C. H. Kim, "Effect of cross-linking on the dimensional stability and biocompatibility of a tailored 3D-bioprinted gelatin scaffold," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 135, pp. 659–667, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.207.
- [52] C. Claaßen *et al.*, "Quantification of Substitution of Gelatin Methacryloyl: Best Practice and Current Pitfalls," *Biomacromolecules*, vol. 19, no. 1, pp. 42–52, 2018, doi: 10.1021/acs.biomac.7b01221.
- [53] E. Hoch, T. Hirth, G. E. M. Tovar, and K. Borchers, "Chemical tailoring of gelatin to adjust its chemical and physical properties for functional bioprinting," *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 41, pp. 5675–5685, 2013, doi: 10.1039/c3tb20745e.
- [54] L. G. Poole *et al.*, "Chronic liver injury drives non-traditional intrahepatic fibrin(ogen) crosslinking via tissue transglutaminase," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 17, no. 1, pp. 113–125, 2019, doi: 10.1111/jth.14330.
- [55] T. A. E. Ahmed, E. V. Dare, and M. Hincke, "Fibrin: A versatile scaffold for tissue engineering applications," *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 14, no. 2, pp. 199–215, 2008, doi: 10.1089/ten.teb.2007.0435.
- [56] K. AU - Kolehmainen and S. M. AU - Willerth, "Preparation of 3D Fibrin Scaffolds for Stem Cell Culture Applications," *JoVE*, no. 61, p. e3641, 2012, doi: doi:10.3791/3641.
- [57] K. H. Park, H. Kim, S. Moon, and K. Na, "Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded nanoparticles mixed with human mesenchymal stem cell in fibrin hydrogel for bone tissue engineering," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 108, no. 6, pp. 530–537, 2009, doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.05.021.
- [58] Y. B. Lee *et al.*, "Bio-printing of collagen and VEGF-releasing fibrin gel scaffolds for neural stem cell culture," *Exp. Neurol.*, vol. 223, no. 2, pp. 645–652, 2010, doi: 10.1016/j.expneurol.2010.02.014.
- [59] Z. Wang, S. J. Lee, H. J. Cheng, J. J. Yoo, and A. Atala, "3D bioprinted functional and contractile cardiac tissue constructs," *Acta Biomater.*, vol. 70, pp. 48–56, 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.02.007.
- [60] N. Cubo, M. Garcia, J. F. Del Cañizo, D. Velasco, and J. L. Jorcano, "3D bioprinting of functional human skin: Production and in vivo analysis," *Biofabrication*, vol. 9, no. 1, 2017, doi: 10.1088/1758-5090/9/1/015006.
- [61] B. A. G. de Melo, Y. A. Jodat, E. M. Cruz, J. C. Benincasa, S. R. Shin, and M. A. Porcionatto, "Strategies to use fibrinogen as bioink for 3D bioprinting fibrin-based soft and hard tissues," *Acta Biomater.*, vol. 117, pp. 60–76, 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.09.024.
- [62] W. Xu *et al.*, "Rapid Prototyping Three-Dimensional Cell/Gelatin/Fibrinogen Constructs for Medical Regeneration," *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 22, no. 4, pp. 363–377, Jul.

- 2007, doi: 10.1177/0883911507079451.
- [63] Y. Sriphutkiat, S. Kasetsirikul, D. Ketpun, and Y. Zhou, "Cell alignment and accumulation using acoustic nozzle for bioprinting," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-54330-8.
- [64] C. Vepari and D. L. Kaplan, "Silk as a biomaterial," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 8–9, pp. 991–1007, 2007, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013.
- [65] L. Meinel *et al.*, "Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects," *Bone*, vol. 39, no. 4, pp. 922–931, 2006, doi: 10.1016/j.bone.2006.04.019.
- [66] S. Kapoor and S. C. Kundu, "Silk protein-based hydrogels: Promising advanced materials for biomedical applications," *Acta Biomater.*, vol. 31, pp. 17–32, 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2015.11.034.
- [67] Y. Guan *et al.*, "Silk fibroin hydrogel promote burn wound healing through regulating TLN1 expression and affecting cell adhesion and migration," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 31, no. 5, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1007/s10856-020-06384-8.
- [68] F. Mottaghitlab, H. Hosseinkhani, M. A. Shokrgozar, C. Mao, M. Yang, and M. Farokhi, "Silk as a potential candidate for bone tissue engineering," *J. Control. Release*, vol. 215, pp. 112–128, 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.07.031.
- [69] B. B. Mandal, S. Kapoor, and S. C. Kundu, "Biomaterials Silk fibroin / polyacrylamide semi-interpenetrating network hydrogels for controlled drug release," *Biomaterials*, vol. 30, no. 14, pp. 2826–2836, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.040.
- [70] A. Bandyopadhyay and B. B. Mandal, "A three-dimensional printed silk-based biomimetic tri-layered meniscus for potential patient-specific implantation A three-dimensional printed silk-based biomimetic tri-layered meniscus for potential patient-specific implantation".
- [71] M. J. Rodriguez, J. Brown, J. Giordano, S. J. Lin, F. G. Omenetto, and D. L. Kaplan, "Biomaterials Silk based bioinks for soft tissue reconstruction using 3-dimensional (3D) printing with in vitro and in vivo assessments," *Biomaterials*, vol. 117, pp. 105–115, 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.11.046.
- [72] H. Sanz-fraile, S. Amoros, I. Mendizabal, C. Galvez-monton, C. Prat-vidal, and A. Bayes-genis, "Silk-Reinforced Collagen Hydrogels with Raised Multiscale," vol. 26, pp. 358–370, 2020, doi: 10.1089/ten.tea.2019.0199.
- [73] S. Chawla, A. Sharma, A. Bandyopadhyay, and S. Ghosh, "Developmental Biology-Inspired Strategies To Engineer 3D Bioprinted Bone Construct," 2018, doi: 10.1021/acsbiomaterials.8b00757.
- [74] J. Jiang *et al.*, "Three-dimensional bioprinting collagen / silk fibroin scaffold combined with neural stem cells promotes nerve regeneration after spinal cord injury," vol. 2017, no. 2017, pp. 959–968, 2019, doi: 10.4103/1673-5374.268974.
- [75] L. P. Datta, S. Manchineella, and T. Govindaraju, "Biomolecules-derived biomaterials," *Biomaterials*, vol. 230, no. November 2019, p. 119633, 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119633.
- [76] J. M. Oliveira, S. Pina, R. L. Reis, J. San, and R. Editors, *Osteochondral Tissue Engineering*.
- [77] J. Forbes and K. Krishnamurthy, *Biochemistry, Peptide*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2022. [Online]. Available: <http://europepmc.org/books/NBK562260>

- [78] S. M. Mithieux and A. S. Weiss, "Elastin," in *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers*, vol. 70, Academic Press, 2005, pp. 437–461. doi: [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70013-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70013-9).
- [79] J. C. Rodríguez-cabello, I. G. De Torre, and S. Acosta, *Elastin-like proteins: Molecular design for self-assembling*. Elsevier Ltd., 2018. doi: 10.1016/B978-0-08-102015-9.00004-6.
- [80] J. I. Won and A. E. Barron, "A new cloning method for the preparation of long repetitive polypeptides without a sequence requirement," *Macromolecules*, vol. 35, no. 22, pp. 8281–8287, 2002, doi: 10.1021/ma020892i.
- [81] L. Martín, F. J. Arias, M. Alonso, C. García-Arévalo, and J. C. Rodríguez-Cabello, "Rapid micropatterning by temperature-triggered reversible gelation of a recombinant smart elastin-like tetrablock-copolymer," *Soft Matter*, vol. 6, no. 6, pp. 1121–1124, 2010, doi: 10.1039/b923684h.
- [82] D. W. Urry, "Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers," *J. Phys. Chem. B*, vol. 101, no. 51, pp. 11007–11028, 1997, doi: 10.1021/jp972167t.
- [83] F. J. Arias, "Emerging applications of multifunctional elastin - like recombinamers R eview".
- [84] D. W. Urry *et al.*, "Hydrophobicity scale for proteins based on inverse temperature transitions," *Biopolymers*, vol. 32, no. 9, pp. 1243–1250, 1992, doi: 10.1002/bip.360320913.
- [85] A. Girotti, J. Reguera, J. C. Rodríguez-Cabello, F. J. Arias, M. Alonso, and A. M. Testera, "Design and bioproduction of a recombinant multi(bio)functional elastin-like protein polymer containing cell adhesion sequences for tissue engineering purposes," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 15, no. 4, pp. 479–484, 2004, doi: 10.1023/B:JMSM.0000021124.58688.7a.
- [86] A. K. Singh, G. K. Srivastava, L. Martín, M. Alonso, and J. C. Pastor, "Bioactive substrates for human retinal pigment epithelial cell growth from elastin-like recombinamers," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 102, no. 3, pp. 639–646, 2014, doi: 10.1002/jbm.a.34726.
- [87] S. Salinas-fernández, M. Santos, M. Alonso, L. Quintanilla, and J. C. Rodríguez-cabello, "Genetically engineered elastin-like recombinamers with sequence-based molecular stabilization as advanced bioinks for 3D bioprinting," *Appl. Mater. Today*, vol. 18, p. 100500, 2020, doi: 10.1016/j.apmt.2019.100500.
- [88] L. E. Bertassoni, J. C. Cardoso, and V. Manoharan, "Direct-write bioprinting of cell-laden methacrylated gelatin hydrogels," 2014, doi: 10.1088/1758-5082/6/2/024105.
- [89] K. C. Yan *et al.*, "Characterization of cell viability during bioprinting process.," no. August, 2009, doi: 10.1002/biot.200900004.
- [90] K. Hölzl, S. Lin, L. Tytgat, S. Van Vlierberghe, L. Gu, and A. Ovsianikov, "Bioink properties before , during and after 3D bioprinting," 2016.
- [91] C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, and D. Kim, "3D bioprinting for engineering complex tissues," *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, no. 4, pp. 422–434, 2016, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.011.

- [92] "Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering : State-of-the-art and novel application in organ printing," p. 2023, 2023, doi: 10.1089/ten.2006.0175.
- [93] H. Lee, J. J. Yoo, H. Kang, and D. Cho, "Investigation of thermal degradation with extrusion-based dispensing modules for 3D bioprinting technology.," 2016.
- [94] C. C. Chang, E. D. Boland, S. K. Williams, J. B. Hoying, and E. M. A. Blvd, "Direct-write Bioprinting Three-Dimensional Biohybrid Systems for Future Regenerative Therapies," vol. 1381, 2013, doi: 10.1002/jbm.b.31831.Direct-write.
- [95] "Three-Dimensional BioAssembly Tool for Generating Viable Tissue-Engineered Constructs."
- [96] A. Shavandi, S. Hosseini, O. V. Okoro, and L. Nie, "3D Bioprinting of Lignocellulosic Biomaterials," vol. 2001472, 2020, doi: 10.1002/adhm.202001472.
- [97] M. de M. Rodríguez, "CULTIVO CELULAR Cambio de Medio. Mantenimiento," *Dep. Citol. e Histol. Norm. y Patológica Univ. Sevilla*, 2010, [Online]. Available: <http://personales.us.es/mmiguel/assets/protocolos-cultivos-mdm-toc.pdf>
- [98] "REGEMAT3D Designer".
- [99] Q. Facts and E. Em, "LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*," 2005.

7. Anexos

I. Aminoácidos esenciales

<i>Aminoácido</i>	<i>Abreviación</i>	
<i>Alanina</i>	Ala	A
<i>cisteína</i>	Cys	C
<i>Acido aspártico</i>	Asp	D
<i>Acido glutámico</i>	Glu	E
<i>Fenilalanina</i>	Phe	F
<i>Glicina</i>	Gly	G
<i>Histidina</i>	His	H
<i>Isoleucina</i>	Ile	I
<i>Lisina</i>	Lys	K
<i>Leucina</i>	Leu	L
<i>Metionina</i>	Met	M
<i>Asparragina</i>	Asn	N
<i>Prolina</i>	Pro	P
<i>Glutamina</i>	Gln	Q
<i>Arginina</i>	Arg	R
<i>Serina</i>	Ser	S
<i>Treonina</i>	Thr	T
<i>Valina</i>	Val	V
<i>Triptófano</i>	Trp	W
<i>Tirosina</i>	Tyr	Y

Tabla 15: Aminoácidos.

II. Detalles de la ruptura celular mediante congelación rápida usando nitrógeno líquido.

<i>Denominación</i>	<i>Polímero</i>	<i>Purificación</i>	<i>Tipo de muestra</i>	<i>Proceso</i>
<i>P20</i>	He5	P20	Madre	Disruptor GEA
<i>PF3</i>	He5	P20	Hija	Caliente
<i>PF4</i>	He5	P20	Hija	Frio
<i>P23</i>	VKV4	P23	Madre	Disruptor GEA
<i>PF5</i>	VKV4	P23	Hija	Caliente
<i>PF6</i>	VKV4	P23	Hija	Frio
<i>P24</i>	M80	P24	Madre	Disruptor GEA
<i>PF7</i>	M80	P24	Hija	Caliente
<i>PF8</i>	M80	P24	Hija	Frio
<i>P26</i>	He5	P26	Madre	Disruptor GEA

PF9	He5	P26	Hija	Caliente
P27	HE5	P27	Madre	Disruptor GEA
PF10	He5	P27	Hija	Caliente
P29	He5	P29	Madre	
PF11	He5	P29	Hija	Caliente
PF12	He5	P29	Hija	Frio

Tabla 16: Pruebas de rupturas realizadas.

<i>Denominación</i>	<i>Polímero</i>	<i>Purificación</i>	<i>Tipo de muestra</i>	<i>Proceso</i>
P30	RGTAR	P30	Madre	Disruptor GEA
PF13	RGTAR	P30	Hija	Frio
P31	RGTAR	P31	Madre	Disruptor GEA
PF14	RGTAR	P31	Hija	Frio

Tabla 17: Pruebas de ruptura escalados a media producción.

<i>Purificaciones</i>	<i>Tiempo de hinchado</i>	<i>Frio Con agitación (4°C)</i>	<i>Caliente (30°C)</i>
PF3 – PF4	24 horas	PF4	PF3
PF5 – PF6	48 horas	PF6	PF5
PF7 – PF8	72 horas	PF8	PF7
PF9	48 horas		PF9
PF10	72 horas		PF10
PF11	24 horas		
PF12	24 horas		

Tabla 18: Hinchado o hidratación de muestras.

<i>Purificaciones</i>	<i>Ciclos de congelación</i>
PF1 – PF2 – PF3 – PF4 – PF5 – PF6 – PF7 – PF8	5 ciclos de congelación y descongelación
PF9 – PF10	Sin ciclos de congelación
PF 11 – PF12	2 ciclos de congelación y descongelación

Tabla 19: Detalle de los ciclos de congelación y descongelación de las pruebas de ruptura con nitrógeno.

III. Capturas de pantalla de la interfaz REGEMAT 3D.

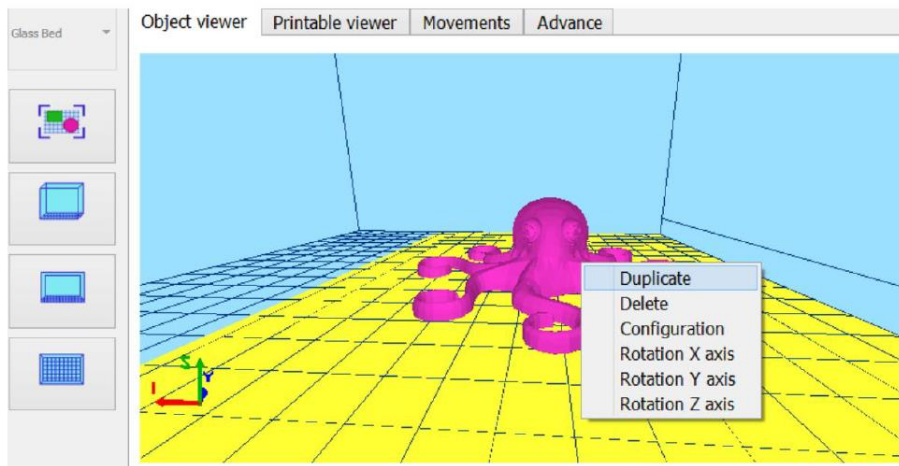


Figura 21: Visor de objetos 3D y opciones [98].

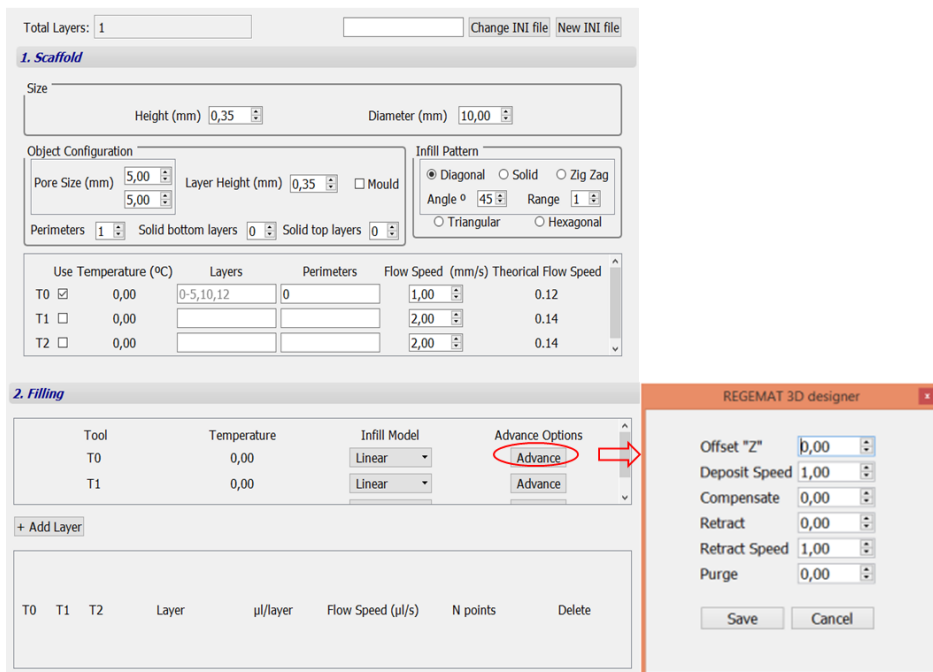


Figura 22: Pantalla de configuración de los distintos parámetros para cada modelo 3D.

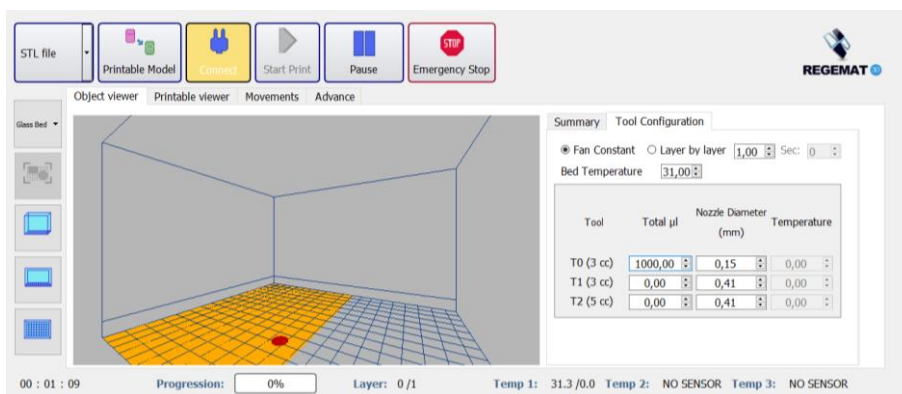


Figura 23: Pantalla de inicio y la sección de Tool Configuration.

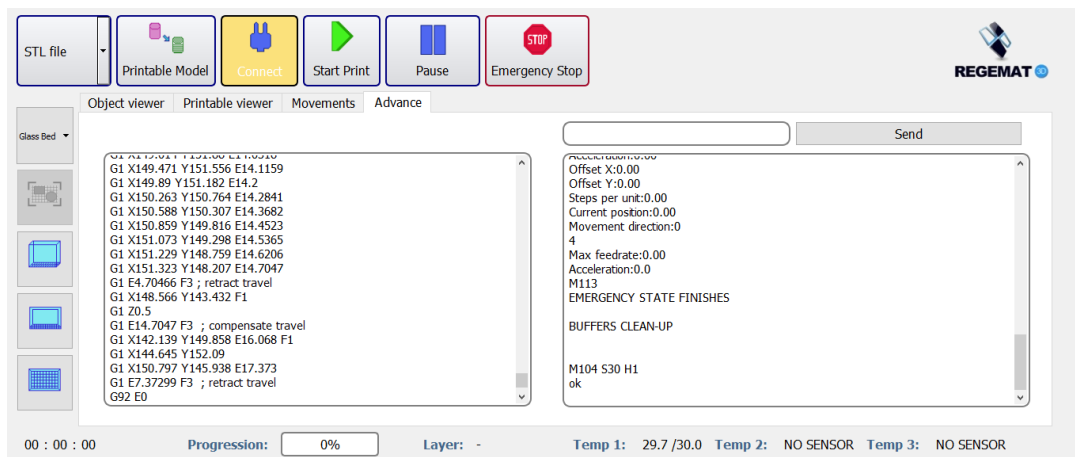


Figura 24: Pantalla de configuración de la pestaña Advance.

IV. Bandas SPS-PAGE del marcador “Marker”.

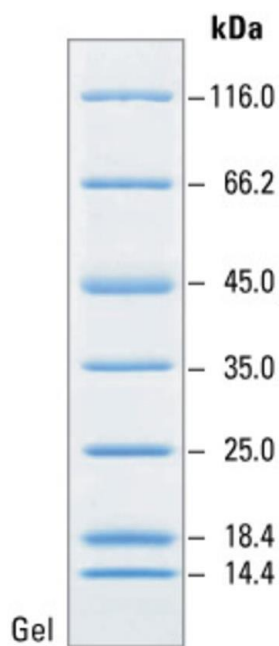


Figura 25: Perfil de banda SDS-PAGE del marcador de peso molecular de proteína sin teñir.

V. Caracterización del polímero RGTAR.

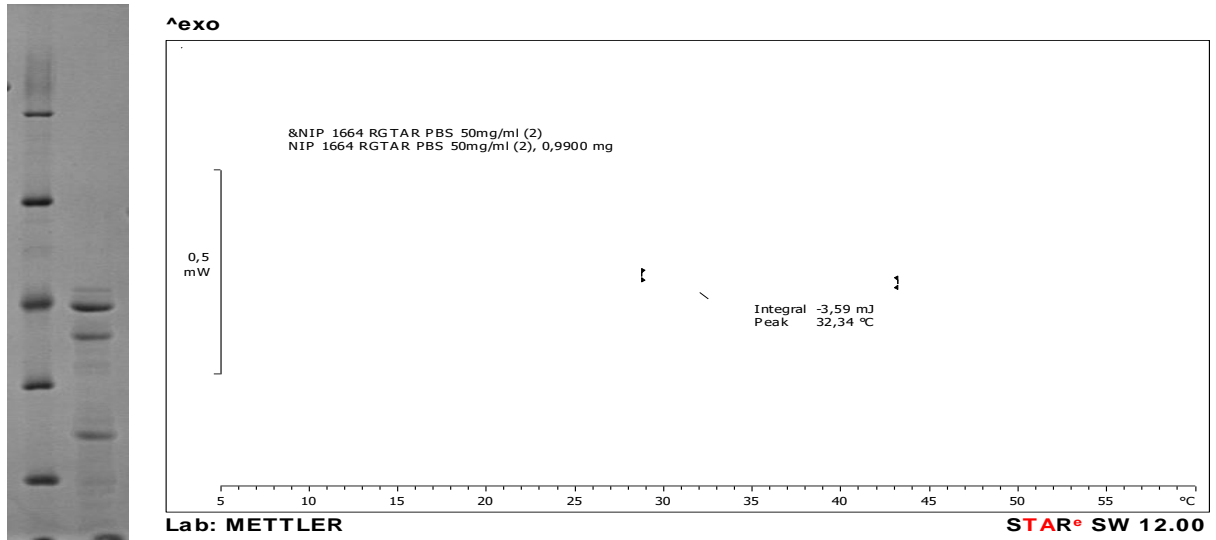


Figura 26: Electroforesis "SDS-PAGE" y calorimetría diferencial de barrido "DSC" del polímero RGTAR.

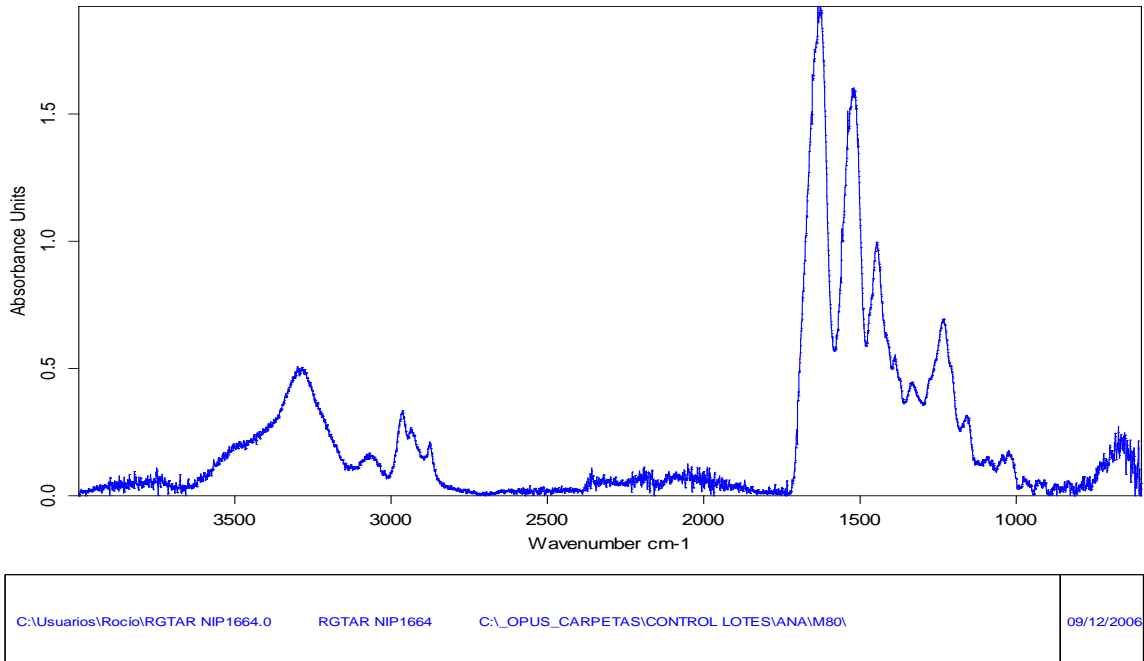


Figura 27: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier "FT-IR" del polímero RGTAR.

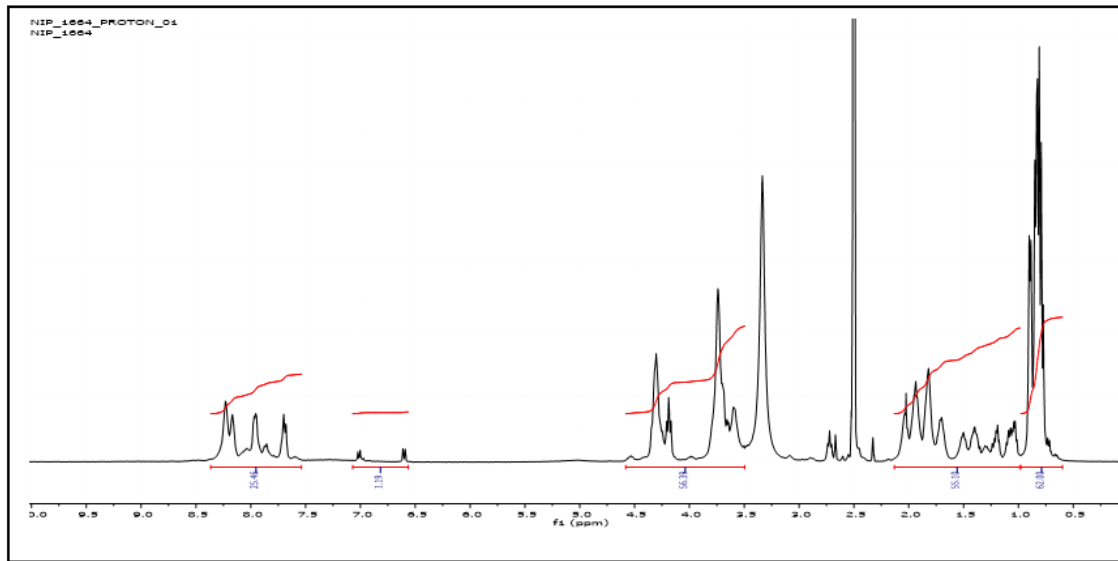
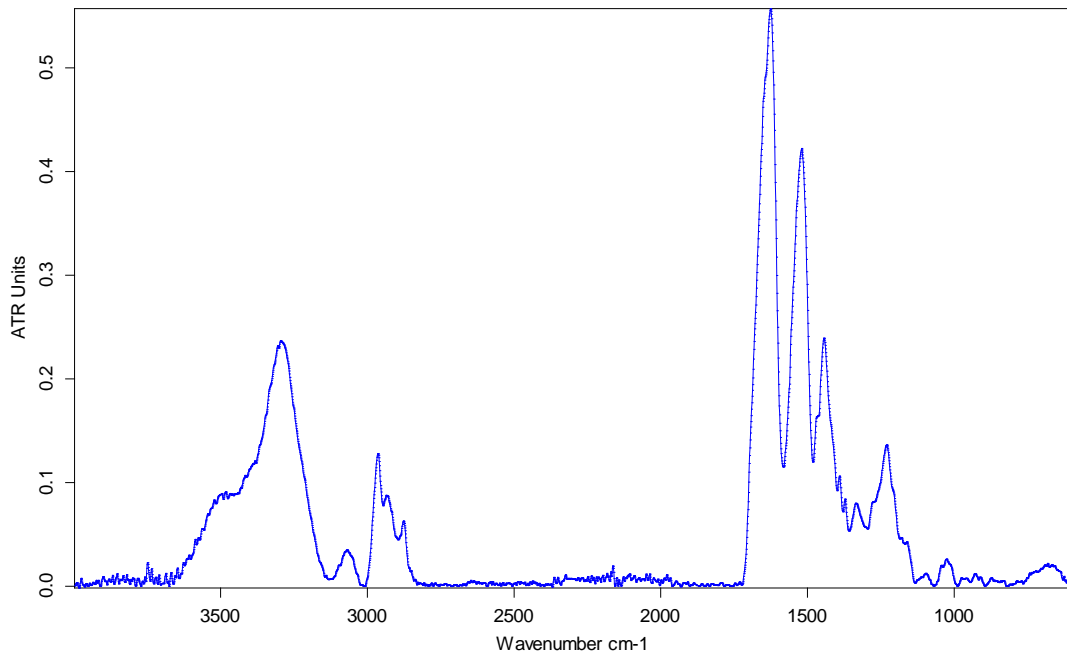


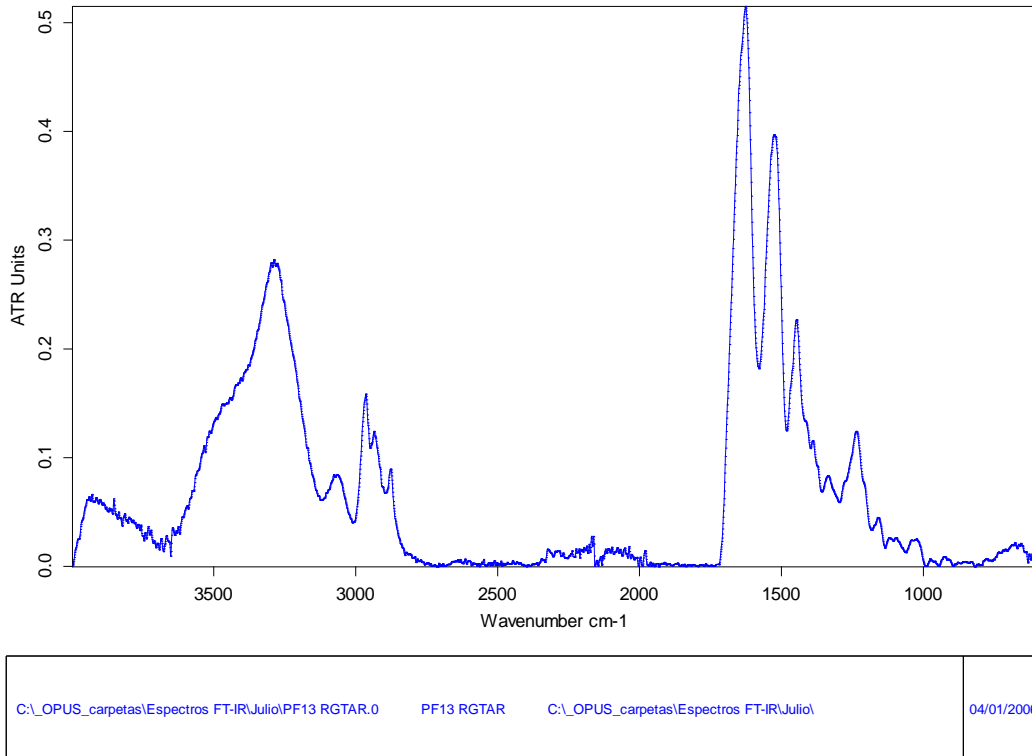
Figura 28: Resonancia magnética nuclear de protón “RMN” del polímero RGTAR.

VI. Caracterización de los polímeros sometidos a lisis celular usando nitrógeno líquido.



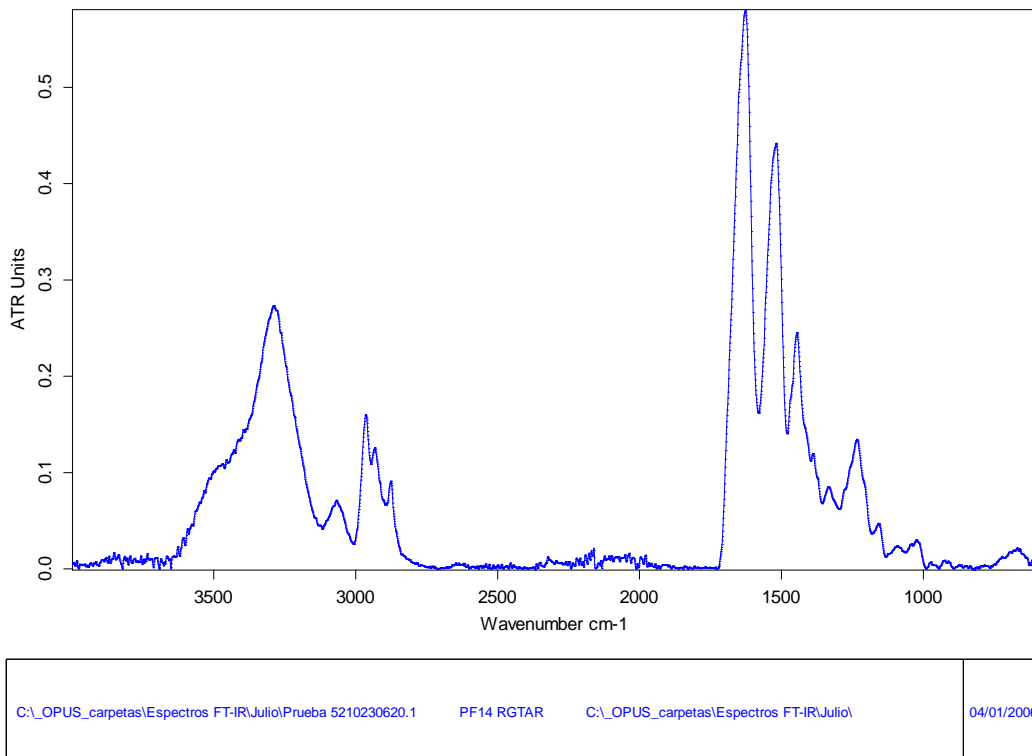
C:_OPUS_carpetas\Espectros FT-IR\Julio\Prueba 5210230620.2	PF8 Frío M80	C:_OPUS_carpetas\Espectros FT-IR\Julio\	04/01/2006
---	--------------	--	------------

Figura 29: Espectroscopia infrarroja FT-IR “PF8-M80”, hinchamiento de 72 horas con agitación en frío.



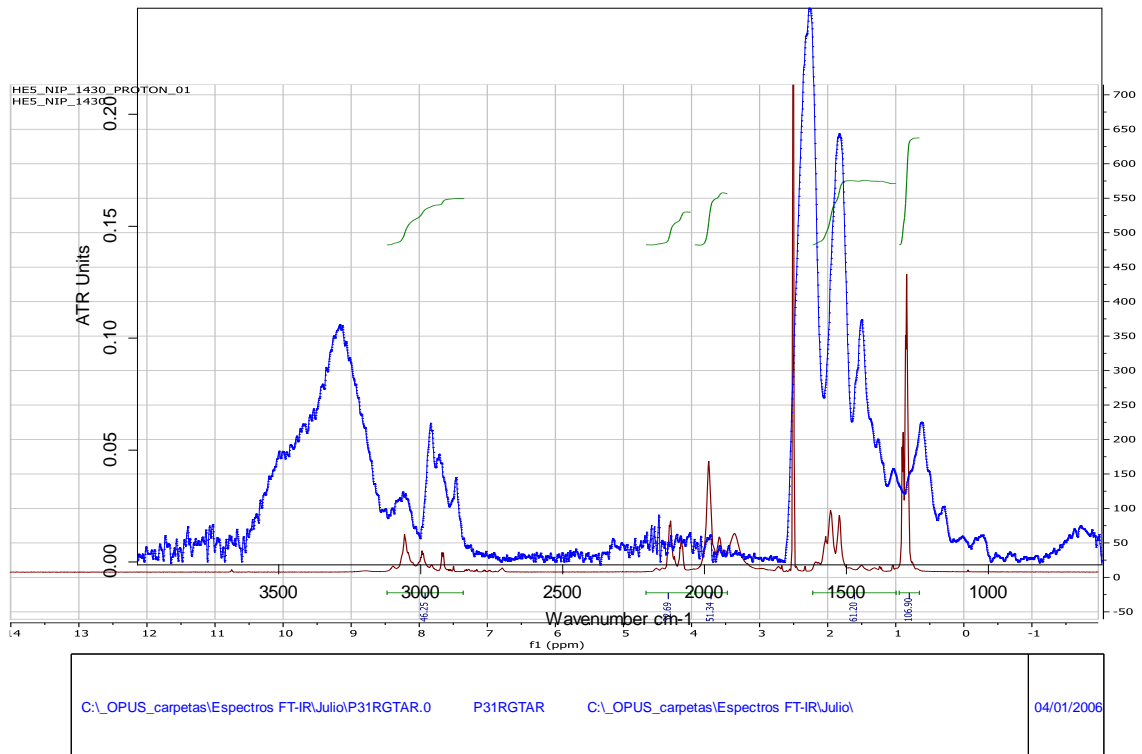
Page 1 of 1

Figura 30: Espectroscopia infrarroja FT-IR "PF13-RGTAR" correspondiente al escaldo de medio reactor, hinchamiento de 48 horas con agitación en frío.



Page 1 of 1

Figura 31: Espectroscopia infrarroja FT-IR "PF14-RGTAR" correspondiente al escaldo de medio reactor, hinchamiento de 48 horas con agitación en frío.



Page 1 of 1

Figura 32: Espectroscopia infrarroja FT-IR “P31-RGTAR” correspondiente al medio reactor restante de la PF 14 el cual se sometió a proceso habitual de disrupción celular.

Caracterización HE5

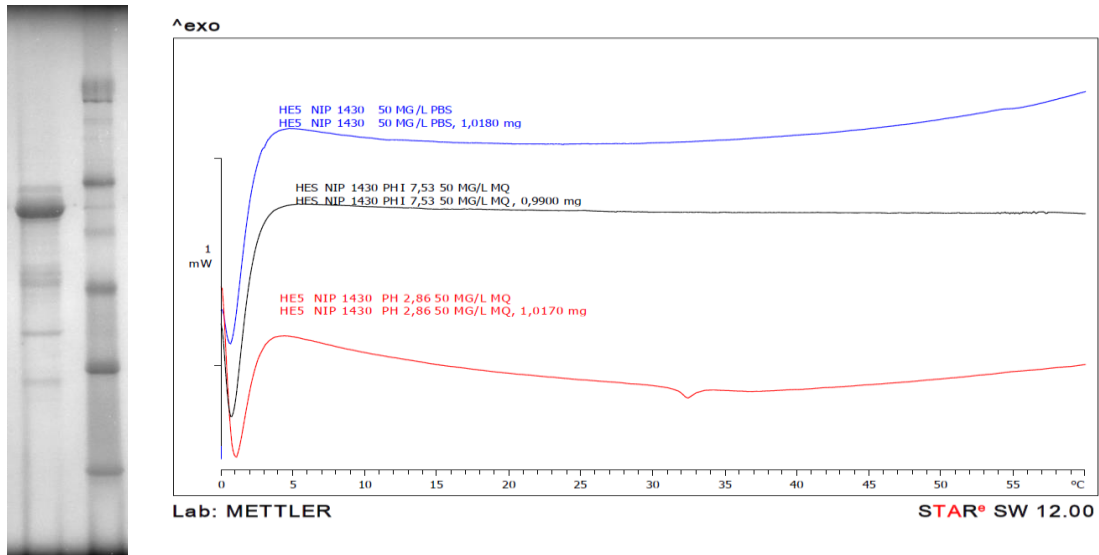


Figura 33: Electroforesis “SDS-PAGE” calorimetría diferencia de barrido “DSC” del polímero HE5 a diferentes pH disueltos en PBS y MQ.

Figura 34: Espectro del H-RMN del polímero HE5.

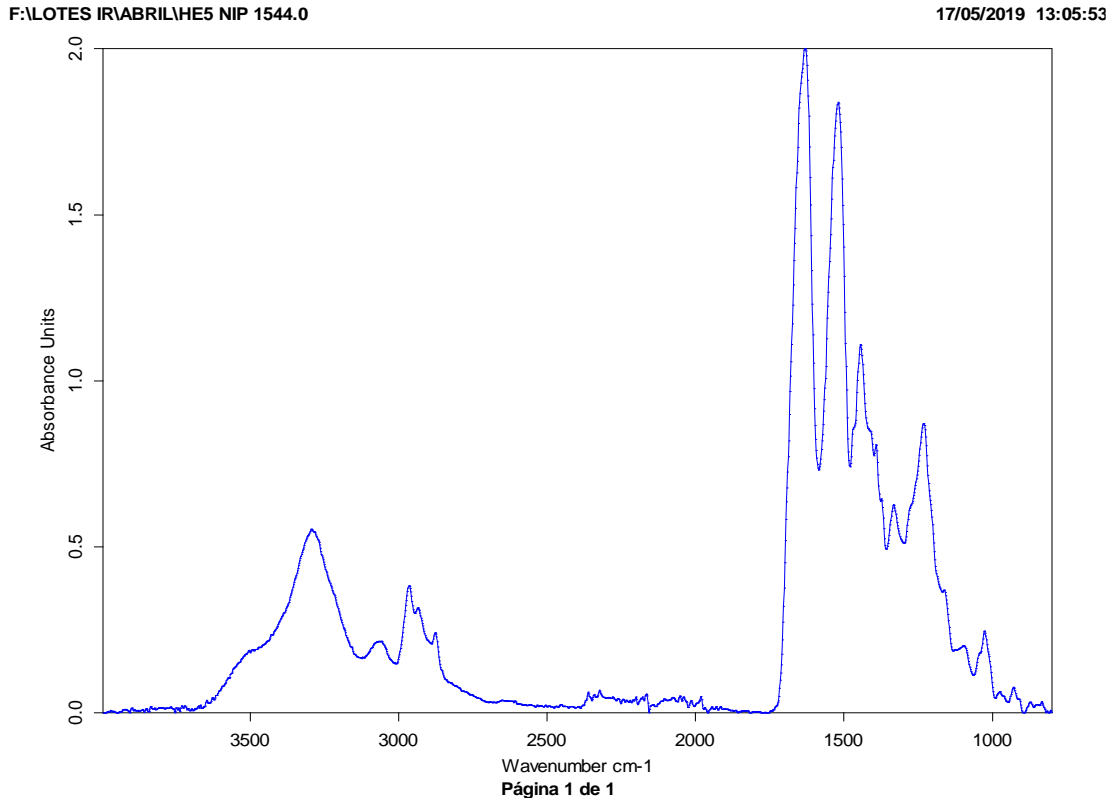


Figura 35: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier "FT-IR" del polímero HE5.

VII. Caracterización de la bio-tinta

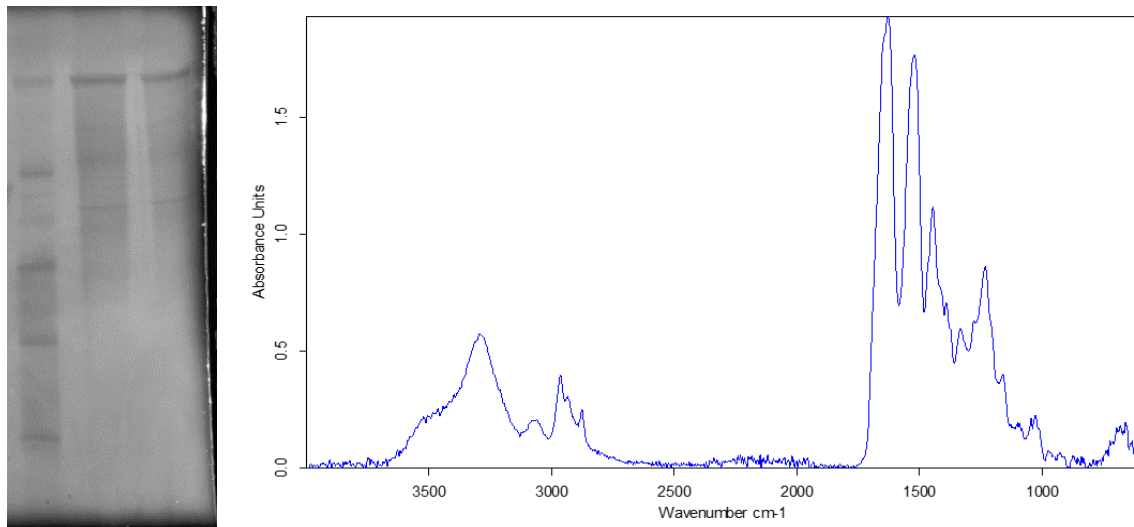


Figura 36: Electroforesis y espectro FTIR del polímero ZS-EI-ELR.

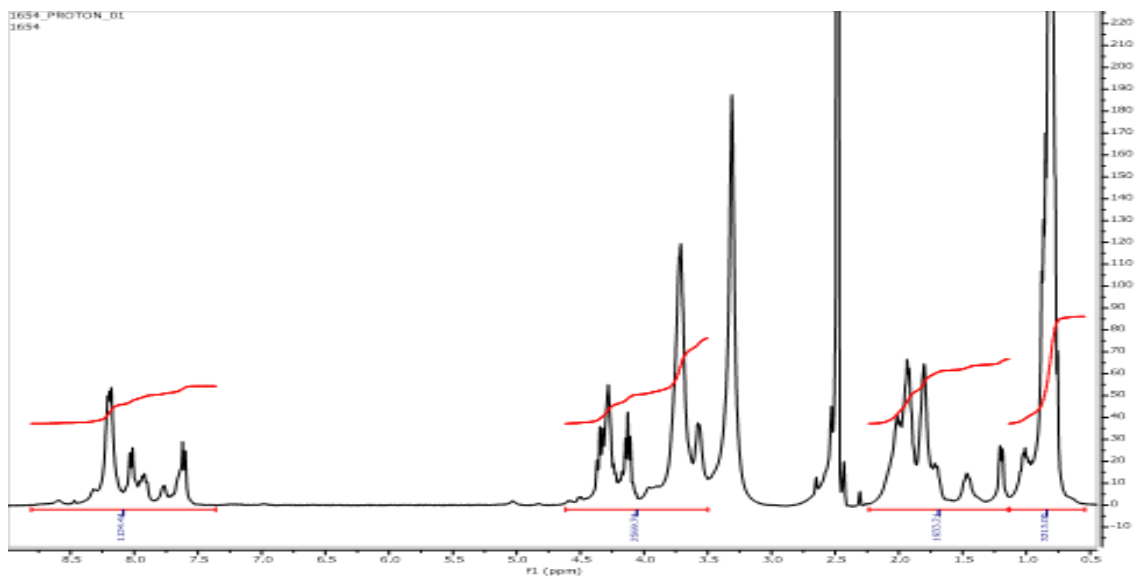


Figura 37: Espectro del H-RMN del polímero ZS-EI-ELR.

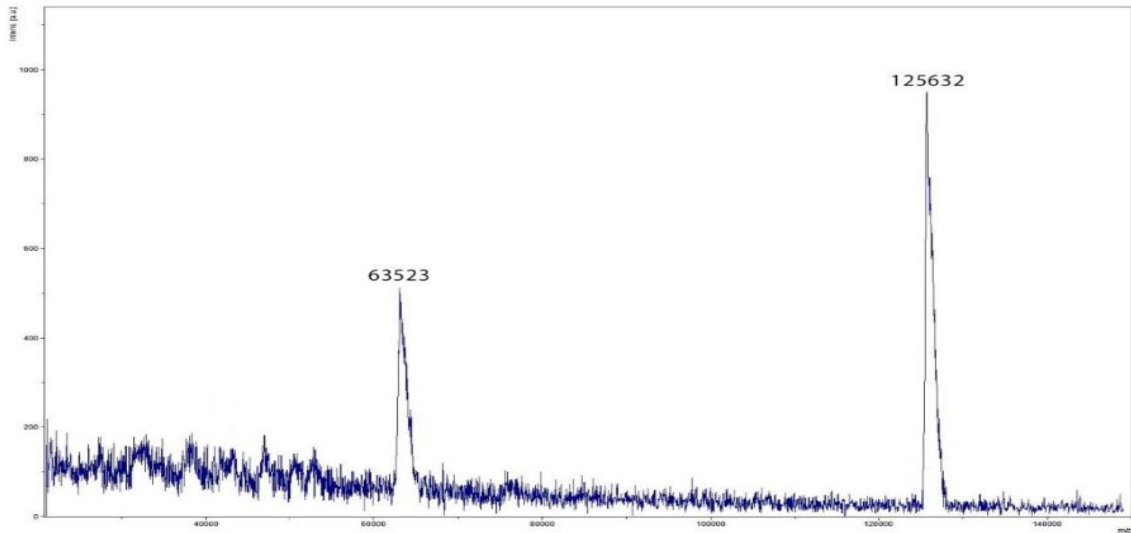


Figura 38: Espectro del MALDI-TOF del polímero ZS-EI-ELR.

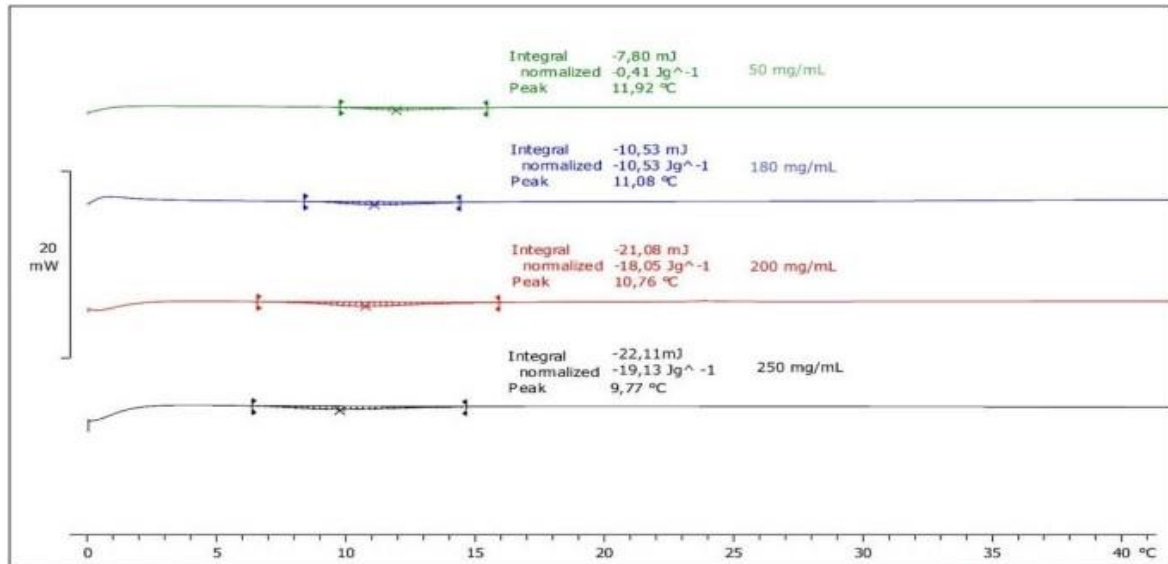


Figura 39: Representación gráfica de la calorimetría diferencial para diferentes concentraciones del polímero ZS-EI-ELR.

8. ABREVIATURAS

ADNc:	ADN complementario.
ARN:	Ácido ribonucleico.
Alg:	Alginato de sodio.
Alg-CaSO₄:	Hidrogeles compuestos del alginato de sodio y sulfato cálcico.
Alg-Carr-CaSO₄:	Hidrogeles compuestos de alginato de sodio, carrageno y sulfato cálcico.
ACI:	trasplante autólogo de condrocitos, Autologous Chondrocyte Implantation.
Carr:	Carrageno.
CaSO₄:	Sulfato cálcico.
Cal AM:	Calceína AM.
CAD:	diseño asistido por computadora.
dsDNA:	Es un virus en el que su material genético está compuesto por ADN de doble cadena y se replica usando una ADN polimerasa dependiente del ADN, no usando el ARN como intermediario durante la replicación.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
DMEM:	Modificación de Eagle del Medio Dulbecco.
dECM:	Matriz extracelular des-celularizada.
DSC:	Calorimetría diferencial de barrido.
ELR's:	Recombinámeros tipo elastina.
EthD-1:	Homodimero-1 de etidio.
ECM:	Matriz extracelular.
FTIR:	Espectrofotometría de transformada de Fourier.
FBS:	Suero fetal bobino.
GelMA:	Gelatin Methacryloyl, Metacrilato de Gelatina.
HLF:	leucemia hepática.
iPSC:	Células madre pluripotentes inducidas.
ITT:	Temperatura de transición inversa.
Lt:	Litros.
LB:	Medio de cultivo Luria-Broth.
nM:	Nano molar.
nm:	Nanómetro.
min:	Minutos.
mL:	Mililitros.

mA:	Miliamperios.
Mg:	Miligramo.
MQ:	Agua destilada ultrapura.
MALDI-TOF:	Espectrometría de masas, desorción/ionización láser asistida por matriz.
PLGA:	Ácido láctico co-glicólico.
PLA:	Poli (ácido L-láctico).
PEG:	Poli(etilenglicol).
PCL:	Poli(ϵ -caprolactona).
PBS:	Solución salina tamponada con fosfato.
pb:	Pares de bases, un par de bases mide alrededor de 3,4 Å
rpm:	Revoluciones por minuto.
RMN:	Resonancia magnética nuclear de protón.
SDS:	Dodecilsulfato de sodio.
Tt:	Temperatura de transición.
TFM:	Trabajo de fin de máster.
TB:	El medio Terrific Broth.
TEMED:	Tetrametiletilendiamina.
Ts:	Temperatura de la muestra.
Tr:	Temperatura de referencia.
μL:	Microlitro.
μg:	Microgramo.
μM:	Micro molar.

9. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Secuencia aminoacídica del pentapéptido ZS-EI-ELR.	17
Tabla 2: Reactivos.	18
Tabla 3: Kit de viabilidad/citotoxicidad Live/Dead para células de mamíferos.	18
Tabla 4: Componentes de la bio-impresora REGEMAT 3D.	20
Tabla 5: Equipos e insumos requeridos.	21
Tabla 6: Detalle de la Electroforesis PF3 “HE5”.	36
Tabla 7: Detalle de la Electroforesis PF4 “HE5”.	37
Tabla 8: Detalle de la Electroforesis PF5 “VKV”.	39
Tabla 9: Detalle de la Electroforesis PF6 “VKV”.	40
Tabla 10: Detalle de la Electroforesis PF6 “M80”.	41
Tabla 11: Resultados obtenidos de las pruebas de lisis celular de las bacterias usando nitrógeno líquido.	42
Tabla 12: Detalles de la Figura 13	47
Tabla 13: Detalle de la Figura 14	48
Tabla 14: Parámetros óptimos para la impresión de los andamios.	49
Tabla 15: Aminoácidos.	65
Tabla 16: Pruebas de rupturas realizadas.	66
Tabla 17: Pruebas de ruptura escalados a media producción.	66
Tabla 18: Hinchado o hidratación de muestras.	66
Tabla 19: Detalle de los ciclos de congelación y descongelación de las pruebas de ruptura con nitrógeno.	66

Figura 1: Diferencia entre una bio-tinta “cargado con células” y una tinta de biomaterial “sin células”. En el caso de las bio-tintas “ilustradas arriba”, las células son elementos intrínsecos de la formulación de bio-impresiones 3D, ya sea incorporadas en microportadores, encapsulados en microgeles, integradas en un hidrogel físico o compuestas con precursores de hidrogel. Por otro lado, en las tintas de biomateriales “representados abajo”, las células se introducen en la estructura del biomaterial impreso en 3D, lo que reduce las restricciones biológicas de las tintas (creado con Biorender.con adaptado de [23]; [26])..... 7

Figura 2: Principio de la formación de hidrogel [23]; [26]..... 8

Figura 3: Esquema gráfico de los bloques peptídicos que constituyen la novedosa tinta ELR diseñada y su ensamblaje molecular de bloques que conduce a la estabilización..... 17

Figura 4: Bio-impresora 3D REGEMAT propiedad del grupo de investigación G.I.R Bioforge. 20

Figura 5: Electroforesis PF3 hinchamiento en caliente sin agitación durante 24 horas. Se recuadra la franja correspondiente al peso molecular $\approx 66 \text{ KDa "Kg/mol"}$ del polímero “HE5” 36

Figura 6: Electroforesis PF4 hinchamiento en frío, con agitación durante 24 horas “HE5” 37

Figura 7: Electroforesis PF5 hinchamiento en caliente sin agitación durante 48 horas Se recuadra la franja correspondiente al peso molecular $\approx 60,4 \text{ KDa "Kg/mol"}$ del polímero “VKV” 38

Figura 8: Electroforesis PF6 hinchamiento en frío con agitación durante 48 horas “VKV” 39

Figura 9: Electroforesis PF7 hinchamiento en caliente sin agitación durante 72 horas Se recuadra la franja correspondiente al peso molecular $\approx 33,7 \text{ KDa "Kg/mol"}$ del polímero “M80” 40

Figura 10: Condorcitos pasados 10 días después de realizar el cultivo celular, las células muertas están resaltadas en círculos rojos. 44

Figura 11: Condorcitos pasados 20 días después de realizar el cultivo celular, las células muertas están resaltadas en círculos rojos.	45
Figura 12: Condorcitos pasados 50 días después de realizar el cultivo celular.	45
Figura 13: Pruebas de impresión utilizando NIVEA como material de impresión; A) Impresión de un andamio de forma geométrica cúbica sin relleno; B) Impresión de un andamio de forma geométrica cilíndrica sin relleno; C) Impresión de un cilindro con poros simples.; D) Impresión de un cilindro con poros.	46
Figura 14: Pruebas de impresión con el biopolímero A y B) impresión usando como tinta el biopolímero.	47
Figura 15: Pruebas de tinción de los Condrocitos usando el Homodimero-1 de Etidio a distintas concentraciones; A, B) EthD-1 [1µM]; C, D) EthD-1 [2µM]; E, F) EthD-1 [3µM].	51
Figura 16: Pruebas de tinción de los Condrocitos usando Calceína AM a distintas concentraciones; A, B) cal AM [1 µM]; C, D) cal AM [2 µM]; E, F) cal AM [3 µM].	52
Figura 17: Pruebas de tinción de los Condrocitos usando EthD-1 y Cal AM; A) EthD-1 [2 µM] y cal AM [2 µM]; B) EthD-1 [1,5 µM] y cal AM [1,5 µM].	53
Figura 18: Proliferación celular Live/Dead “1,5µM cal AM y 2 µM EthD-1”, objetivo 10X, días 1 y 5.	54
Figura 19: Proliferación celular Live/Dead “1,5µM cal AM y 2 µM EthD-1”, objetivo 10X, días 7; 9 y 13.	55
Figura 20: Proliferación celular Live/Dead “1,5µM cal AM y 2 µM EthD-1”, objetivo 10X, día 41.	56
Figura 21: Visor de objetos 3D y opciones [98].	67
Figura 22: Pantalla de configuración de los distintos parámetros para cada modelo 3D.	67
Figura 23: Pantalla de inicio y la sección de Tool Configuration.	67
Figura 24: Pantalla de configuración de la pestaña Advance.	68
Figura 25: Perfil de banda SDS-PAGE del marcador de peso molecular de proteína sin teñir. ...	68
Figura 26: Electroforesis “SDS-PAGE” y calorimetría diferencia de barrido “DSC” del polímero RGTAR.	69
Figura 27: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier “FT-IR” del polímero RGTAR.	69
Figura 28: Resonancia magnética nuclear de protón “RMN” del polímero RGTAR.	70
Figura 29: Espectroscopia infrarroja FT-IR “PF8-M80”, hinchamiento de 72 horas con agitación en frío.	70
Figura 30: Espectroscopia infrarroja FT-IR “PF13-RGTAR” correspondiente al escaldo de medio reactor, hinchamiento de 48 horas con agitación en frío.	71
Figura 31: Espectroscopia infrarroja FT-IR “PF14-RGTAR” correspondiente al escaldo de medio reactor, hinchamiento de 48 horas con agitación en frío.	71
Figura 32: Espectroscopia infrarroja FT-IR “P31-RGTAR” correspondiente al medio reactor restante de la PF 14 el cual se sometió a proceso habitual de disrupción celular.	72
Figura 33: Electroforesis “SDS-PAGE” calorimetría diferencia de barrido “DSC” del polímero HE5 a diferentes pH disueltos en PBS y MQ.	72
Figura 34: Espectro del H-RMN del polímero HE5.	73
Figura 35: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier “FT-IR” del polímero HE5. ..	73
Figura 36: Electroforesis y espectro FTIR del polímero ZS-EI-ELR.	74
Figura 37: Espectro del H-RMN del polímero ZS-EI-ELR.	74
Figura 38: Espectro del MALDI-TOF del polímero ZS-EI-ELR.	75
Figura 39: Representación gráfica de la calorimetría diferencial para diferentes concentraciones del polímero ZS-EI-ELR.	75