



---

**Universidad de Valladolid**  
TRABAJO FIN DE MÁSTER

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

Optimización del método de preparación de  
esferoides celulares recubiertos con biopolímeros  
tipo elastina para el tratamiento de osteoartritis.

Autor/a:

**D.<sup>a</sup> Aymeé Melany Marcano González**

Tutor/as:

**D.<sup>a</sup> Mercedes Santos García**

**D.<sup>a</sup> Desiré Venegas**

## RESUMEN

En este trabajo se han preparado esferoides celulares de células madre mesenquimales de potencial aplicación en enfermedades como la osteoartritis. Para ello se ha llevado a cabo la puesta punto de un método de preparación de esferoides a partir del método de “superficies no adherentes”.

La estabilización de dichos esferoides se lleva a cabo mediante recubrimiento de estos con biopolímeros tipo elastina. El método elegido para el recubrimiento fue el denominado capa a capa (layer-by-layer), mediante deposición sobre la superficie de los esferoides, capa a capa, de disoluciones de los biopolímeros modificados con grupos ciclooctinilo y azido, respectivamente. Las capas permanecen unidas entre sí utilizando la metodología click, por reacción de cicloadición 1,3-dipolar.

Los esferoides de células mesenquimales, recubiertos por biopolímeros tipo elastina GTAR y HRGD<sub>6</sub>, presentan una gran biocompatibilidad y viabilidad celular. Por tanto, los esferoides preparados en este trabajo presentan potencial aplicación con fines terapéuticos para la regeneración de cartílago articular.

## ABSTRACT

In this work, cellular spheroids of mesenchymal stem cells have been prepared for potential application in diseases such as osteoarthritis. For this purpose, a method for preparing spheroids has been developed using the “non-adherent surfaces” method.

The stabilization of said spheroids is carried out by coating them with elastin-type biopolymers. The method chosen for the coating was the so-called layer-by-layer, by deposition on the surface of the spheroids, layer by layer, of solutions of the biopolymers modified with cyclooctinyl and azido groups, respectively. The layers remain linked to each other using the click methodology, by 1,3-dipolar cycloaddition reaction.

Mesenchymal cell spheroids, coated by GTAR and HRGD<sub>6</sub> elastin-type biopolymers, present great biocompatibility and cell viability. Therefore, the spheroids prepared in this work have potential application for therapeutic purposes for the regeneration of articular cartilage.

**PALABRAS CLAVES:** Esferoides, células madre mesenquimales, biopolímeros tipo elastina (ELRs), layer-by-layer, osteoartritis.

# INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1.1	TEJIDO CARTILAGINOSO	5
1.2	CARTÍLAGO HIALINO	5
1.3	CARTÍLAGO ARTICULAR	6
1.4	COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL CARTÍLAGO ARTICULAR	7
1.4.1	COLÁGENO	7
1.4.2	PROTEOGLICANO (PG)	8
1.4.3	GLUCOPROTEÍNAS MULTIADHESIVAS	9
1.4.4	CONDROCITOS	9
1.5	LÍQUIDO SINOVIAL	9
1.6	PATOLOGÍAS DEL CARTÍLAGO ARTICULAR	9
1.6.1	OSTEOARTRITIS (OA)	10
1.6.2	ARTRITIS REUMATOIDE (AR)	11
1.6.3	OTRAS PATOLOGÍAS ARTICULARES	12
1.7	TERAPIA CELULAR	13
1.8	CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	14
1.8.1	CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LAS MSCs	15
1.9	CAPACIDAD TERAPÉUTICA DE LAS MSCs EN OSTEOARTRITIS (ARTROSIS)	15
1.10	CULTIVO CELULAR	16
1.10.1	TIPOS DE CULTIVOS	16
1.11	ESFEROIDES IN VITRO	18
1.12	POLÍMEROS TIPO ELASTINA	19
1.13	QUÍMICA CLICK	20
1.14	HIDROGELES	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	<b>22</b>
3.1	MATERIALES INERTES	22
3.2	MATERIAL BIOLÓGICO	23
3.2.1	LÍNEA CELULAR Y MEDIO DE CULTIVO	23
3.2.2	BACTERIAS Y MEDIOS DE CULTIVO	23
3.3	SUSTANCIAS QUÍMICAS	24
3.4	EQUIPAMIENTO	26
3.5	BIOPOLÍMEROS	27

3.6	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	27
3.6.1	BIOPRODUCCIÓN DE ELRs .....	27
3.6.2	CARACTERIZACIÓN .....	30
3.6.3	MODIFICACIÓN QUÍMICA DE ELRs .....	32
3.6.4	CULTIVO CELULAR EN MONOCAPA .....	35
3.6.5	CULTIVO DE ESFEROIDES .....	37
3.6.6	VIABILIDAD CELULAR .....	39
3.6.7	RECUBRIMIENTOS POR LAYER BY LAYER (LBL) .....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
4.1.1	BIOPRODUCCIÓN .....	42
4.1.2	MODIFICACIÓN QUÍMICA DEL POLÍMERO GTAR CON CICLOOCTINO Y CARACTERIZACIÓN.....	44
4.1.3	MODIFICACIÓN QUÍMICA DEL POLÍMERO HRGD <sub>6</sub> CON GRUPOS AZIDO Y CARACTERIZACIÓN.....	46
4.1.4	MODIFICACIÓN QUÍMICA DE HRGD <sub>6</sub> -N <sub>3</sub> Y GTAR-CC CON FLUORÓFORO.....	48
4.1.5	LBL EN LÁMINAS DE VIDRIO.....	50
4.1.6	CULTIVO DE ESFEROIDES .....	53
4.1.7	LBL EN ESFEROIDES.....	57
4.1.8	VIABILIDAD DE ESFEROIDES RECUBIERTOS CON 3 BL.....	57
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>LINEAS FUTURAS.....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>68</b>

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 TEJIDO CARTILAGINOSO

El cartílago es un tejido conjuntivo avascular compuesto por células llamadas condrocitos y una matriz extracelular muy especializada (MEC). Dependiendo de la composición de la matriz extracelular (MEC) y su ubicación en el cuerpo humano, se clasifica como cartílago elástico, fibrocartílago y cartílago hialino. El cartílago elástico contiene haces de elastina dispersas en la MEC que le proporcionan rigidez y elasticidad al tejido. Este tejido se encuentra en el oído y en la epiglotis. El fibrocartílago contiene una MEC fibrosa rica en colágeno de tipo I y se encuentra entre los discos vertebrales y los meniscos [1], [2]. La MEC del cartílago hialino es rica en colágeno de tipo II y proteoglucano; está situada en la superficie articular de la diartrosis, laringe, tráquea y bronquios [3].

## 1.2 CARTÍLAGO HIALINO

El cartílago hialino surge de condensaciones de células mesenquimales durante el desarrollo embriológico en un proceso denominado condrogénesis [4][5]. Estas condensaciones celulares dan origen a un nódulo, denominado nódulo condrogénico, el cual expresa factor de transcripción SOX-9, desencadenando la diferenciación de las células mesenquimales en condroblastos, los cuales se van separando progresivamente conforme depositan matriz cartilaginosa a su alrededor. Una vez que la matriz los ha rodeado por completo reciben el nombre de condrocitos [3].

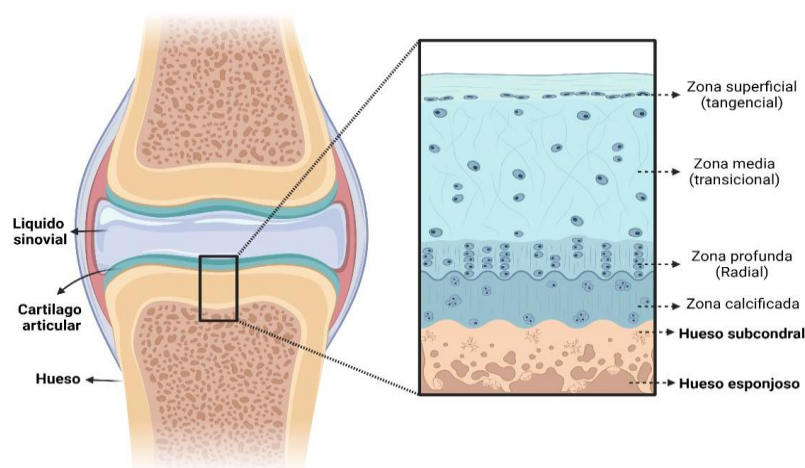
El cartílago hialino tiene como objetivo proveer una superficie de baja fricción, participa en la lubricación de las articulaciones sinoviales y distribuye las fuerzas aplicadas al hueso subyacente. Está compuesto por un 60-80% de agua intercelular, la cual está unida a aglomeraciones de proteoglucanos (agrecano 9%); alrededor del 15% del peso total se atribuye a las moléculas de colágeno (tipo II, VI, IX, X y XI) de las cuales las más abundantes son las de colágeno tipo II, también contiene un 5% de glucoproteínas multiadhesivas y solo el 3-5% de la masa cartilaginosa total está formada por condrocitos [3]. El agua le confiere un aspecto vítreo, de ahí el calificativo hialino (del griego *hyalos*, vidrio), además la hidratación juega un papel fundamental permitiendo la difusión de metabolitos pequeños y la elasticidad.

El pericondrio es tejido conjuntivo denso que limita al cartílago hialino (excepto en los cartílagos articulares), está compuesto por una capa externa fibrosa de colágeno tipo I y una capa celular interna constituida por condroblastos [6].

### 1.3 CARTÍLAGO ARTICULAR

Es un tejido cartilaginoso de tipo hialino que se ubica en la superficie de los extremos óseos tras completarse la osificación endocondral. Se caracteriza por carecer de pericondrio [7]. Su función principal es soportar y amortiguar la tensión mecánica de las superficies articulares. El tejido está dispuesto en capas que se generan después de un proceso de maduración y como resultado de fuerzas hidrostáticas ejercidas en el tejido, de acuerdo con la morfología celular y la orientación del colágeno de tipo II, se pueden identificar las siguientes zonas; superficial (tangencial), media (transicional), profunda (radial) y calcificada. [8] [9]

La zona superficial o tangencial es la más distantes al hueso y delgada. Está compuesta por condrocitos de morfología aplanada y fibras de colágeno paralelas a la articulación. Además, las concentraciones de PG son bajas [10]. Una región de transición establece la zona media del cartílago articular; representa el 40-60% del grosor del cartílago y se caracteriza por tener una baja densidad celular. Los condrocitos presentan una morfología esferoidal y gran actividad sintética de colágeno tipo II y agregano. El colágeno es el componente mayoritario de esta zona [11]. En la zona profunda, el colágeno de tipo II se encuentra de manera perpendicular a la articulación y los condrocitos de morfología circular se ordenan en columnas. Finalmente, en la zona calcificada se reagrupan condrocitos de morfología más alargada y aplanada que sintetizan colágeno de tipo X con el objeto de formar fibrocartílago y proveer de amortiguación entre el hueso subcondral y el cartílago articular [12].



*Fig. 1.3. Sección transversal de articulación de rodilla. Dibujo representativo de la anatomía histológica del cartílago articular. Muestra la organización de la red de colágeno y de los condrocitos en las diversas zonas del cartílago articular.*

## 1.4 COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

### 1.4.1 COLÁGENO

Es una molécula de triple hélice compuesta por tres cadenas polipeptídicas de tipo  $\alpha$ . La secuencia aminoacídica de la cadena polipeptídica está formada por la repetición de tres aminoácidos (GXY) en los cuales; G representa la glicina (Gly) ocupando siempre la primera posición, la posición X la ocupa frecuentemente la prolina (Pro), mientras que la hidroxiprolina e hidroxilisina ocupan la posición Y [13].

Existen 5 tipos de colágeno en el cartílago articular, su función se describe a continuación en la siguiente tabla [3][14]:

COLÁGENO	FUNCIÓN
TIPO II	Provee de una alta resistencia a la compresión cíclica.
TIPO VI	Se concentra la mayor parte alrededor de las células y ayuda a que los condrocitos se adhieran a la MEC.
TIPO IX	Facilita la interacción entre las fibrillas de colágeno con los PG dentro la MEC.
TIPO X	Organiza las fibrillas de colágeno en una red hexagonal tridimensional en la zona calcificada del cartílago articular.
TIPO XI	Regula el tamaño de las fibrillas que forman la cesta pericelular del condrocito. Además, permite la producción de colágeno de tipo II.

*Tabla 1.4.1. colágeno y su respectiva función. MEC: matriz extracelular; PG: proteoglicanos [12]*

## 1.4.2 PROTEOGLICANO (PG)

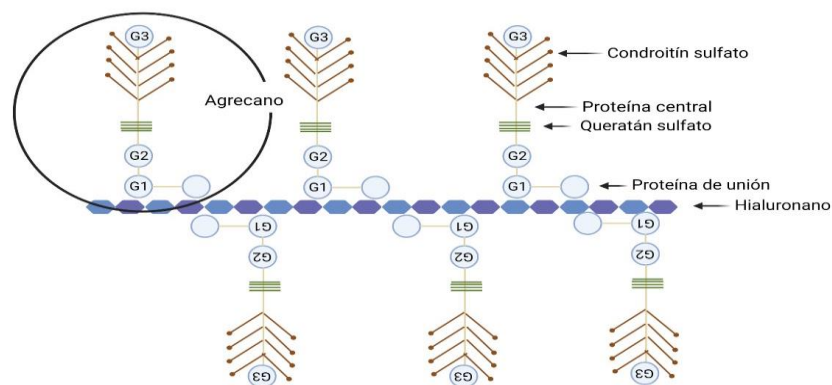
Son macromoléculas formadas por un núcleo proteico y cadenas de polisacáridos, denominados glucosaminoglucanos (GAGs), unidos a la proteína a modo de ramificaciones. Los PGs están compuestos en un 95% por hidratos de carbono. Los GAGs se encuentran habitualmente sulfatados (esterificados con sulfato), salvo el hialuronano. Existen dos clases de GAGs que forman el cartílago hialino: hialuronano y agrecano [15]

### 1.4.2.1 HIALURONANO

El hialuronano, o también conocido por ácido hialurónico (AH), está formado por polisacáridos de ácido D-glucurónico y de N-acetilglucosamina que se repiten centenares o miles de veces. Estos sacáridos presentan en su estructura numerosos grupos carboxilo e hidroxilo con elevada afinidad al agua. A pH fisiológico, los grupos carboxilo están ionizados y, en presencia de cationes como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , tiene lugar la formación de una sal conocida con el nombre de hialuronano. El AH es uno de los GAGs no sulfatado presentes en el ser humano que, a diferencia de la mayoría de ellos, se genera en la cara interna de la membrana plasmática de la célula y no en el aparato de Golgi [16].

### 1.4.2.2 AGRECANO

Es el PG más abundante y fundamental para el funcionamiento del cartílago hialino. Está compuesto por una proteína central de 210 a 250 kDa con tres dominios globulares: dos en el amino terminal (G1 y G2) y un tercer dominio en el carboxilo-terminal (G3). A este tercer dominio lo separa una región de GAG compuesta por queratán-sulfato seguido de otra región de condroitín-sulfato. La función de los dominios globulares es proporcionar agregación, sitios de unión al hialuronano y adhesión celular [12]. El condroitín sulfato conforma el 90% del agrecano [17]. Debido a los grupos sulfatos que tienen estas moléculas poseen una gran carga negativa con elevada afinidad por las moléculas de agua.[17]



**Figura. 1.4.2.2. Ensamblaje del agrecano con el hialuronano. Las moléculas de condroitín sulfato y queratán sulfato se unen al centro de la proteína entre los dominios globulares G2 y G3 formando el agrecano.**

### **1.4.3 GLUCOPROTEÍNAS MULTIADHESIVAS**

Tienen como principal función actuar sobre las interacciones entre los condrocitos y las moléculas de la matriz, brindando sostén y soporte. Las principales proteínas multiadhesivas que componen la matriz articular son: ancorina, que actúa como receptor de colágeno en los condrocitos; tenascina y fibronectina, que ayudan a fijar los condrocitos a la matriz [3].

### **1.4.4 CONDROCITOS**

Son células del tejido cartilaginoso que producen y mantienen la matriz extracelular. Se distribuyen solos o en cúmulos llamados grupos isógenos. Cuando se encuentra en grupos isógenos significa que acaban de dividirse, posteriormente sintetizan matriz que los va rodeando y se dispersan. Son capaces de secretar colágeno, GAG Y PG para conformar la matriz y de secretar metaloproteinasas, enzimas que degradan la matriz cartilaginosa, permitiendo que las células se expandan y se reubiquen dentro del grupo isógeno en crecimiento [3].

## **1.5 LÍQUIDO SINOVIAL**

Es un líquido viscoso secretado por las células sinoviales y el ultrafiltrado de los capilares. Está compuesto por una mezcla de plasma rico en proteínas, ácido hialurónico y glucoproteínas [18]. Su función principal es permitir el deslizamiento entre las superficies articulares sin que se produzcan lesiones por contacto. Tiene la capacidad de aumentar su viscosidad cuando se aplica una fuerza de presión sobre el cartílago, acción que le permite incrementar su resistencia. Además, es el responsable tanto de la nutrición como de la eliminación de desechos del cartílago articular [19].

## **1.6 PATOLOGÍAS DEL CARTÍLAGO ARTICULAR**

El cartílago articular puede presentar diversas etiologías patológicas a lo largo de la vida. Los factores predisponentes se asocian al envejecimiento, obesidad, deportes de impacto o fracturas, entre otras. Estos factores generan un desgaste interno del tejido, debido a las cargas mecánicas externas soportadas y el desgaste trae como consecuencias alteraciones morfológicas y funcionales. Sin

embargo, existen lesiones y algunas patologías que pueden anticiparse debido a factores genéticos, metabólicos y traumáticos [12].

Existen tres tipos de lesiones que afectan a la integridad del cartílago. Las que deterioran la MEC del tejido, exigiendo forzar fisiológicamente la actividad sintética de los condrocitos restantes para reparar las zonas afectadas. Por otro lado, están las alteraciones que generan fisuras en la superficie del cartílago afectando a su espesor y, por último, están las lesiones que afectan a todo el espesor del cartílago hasta penetrar en el hueso subcondral [12].

Las patologías más comunes que afectan al tejido cartilaginoso articular son la osteoartritis, la artritis reumatoide, las microfracturas y los defectos osteocondrales [20]

### 1.6.1 OSTEOARTRITIS (OA)

La OA es una artropatía degenerativa, siendo la enfermedad articular más frecuente de este tejido. Afecta a las articulaciones que soportan peso: coxofemorales (cadera), femorotibiales (rodilla), intervertebrales lumbares inferiores y articulaciones de manos y pies. En estos tejidos hay una disminución en la cantidad de proteoglicanos que causa una reducción del contenido de agua intercelular en la matriz cartilaginosa. Los condrocitos también desempeñan un papel importante en la patogenia de la osteoartritis, dado que generan interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), estimulando la producción de metaloproteinasas e inhibiendo la síntesis de colágeno tipo II y proteoglicanos. En las etapas iniciales de la enfermedad, la capa superficial del cartílago articular se destruye. Finalmente, la destrucción del cartílago se extiende hasta el hueso, en donde el tejido óseo subcondral expuesto se convierte en la nueva superficie articular. Estos cambios traen como consecuencia una reducción progresiva de la movilidad con diversos grados de deformidad y un aumento del dolor con los movimientos articulares [3]. Los principales factores de riesgo incluyen la edad (personas de edad avanzada), género (mujeres a partir de los 45 años), una biomecánica anormal, predisposición genética y obesidad [21]

#### 1.6.1.1 MOLÉCULAS IMPLICADAS EN EL MECANISMO FISIOPATOLÓGICO DE LA OSTEOARTRITIS

La degradación del cartílago articular es causado por dos grupos de enzima perteneciente a las familias: ADAMTS (desintegrinas y metaloproteinasas con motivo trombospondina) y MMPs (metaloproteinasas). Las ADAMTS degradan el agregano y las MMPs el colágeno [22]. En condiciones fisiológicas normales, los condrocitos también producen metaloproteinasas para degradar la matriz envejecida y permitir dar espacio a los grupos isógenos (condrocitos jóvenes)

[3]. La OA comienza con un desequilibrio en la producción de MMPs que desencadena la destrucción del cartílago [23]. Las principales moléculas implicadas son las MMP-3, MMP-13 y la MMP-14 [24], así como ADAMTS-4 y ADAMTS-5[23]. La producción mayor de las enzimas es inducida por citoquinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  y por el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) [25]

Así mismo, los receptores tipo Toll (TLRs), de tipo TLR2 y TLR4, están presentes a niveles elevados en los condrocitos durante la OA [26]. Los TLRs y las citocinas IL-1 e IL-6 son marcadores de inflamación que afectan al metabolismo de los condrocitos y ocasionan cambios en el fenotipo de estas células [27][26].

Cambios sobre el fenotipo de los condrocitos trae como consecuencias defectos en la transcripción de SOX-9, afectando la diferenciación condral y el funcionamiento de estas células [28]. Otros estudios demuestran que la reducción de SOX-9 en la OA también se produce por la matrilina-3, que es una proteína del MEC que contiene los dominios A del factor Von Willebrand y cuya función principal es actuar como regulador del fenotipo condrocítico, y que está sobreexpresada en la OA [29]

El sidecan-4 (SYND4) es un proteoglucano heparán sulfato transmembrana que se expresa en condrocitos hipertróficos y está presente durante la OA, regulando la actividad de ADAMTS-5 [30]. Estudios en modelos murinos han demostrado que la inhibición de ADAMTS-4 y ADAMTS-5 también bloquea la destrucción del cartílago, revirtiendo la severidad de OA [20].

## **1.6.2 ARTRITIS REUMATOIDE (AR)**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica inmunomediada y multisistémica [31], [32]. Afecta principalmente a las articulaciones diartrodiales (con cavidad articular), produciendo destrucción y discapacidad progresiva. Como enfermedad multisistémica presenta manifestaciones extraarticulares que implican a otros órganos como el pulmón, el sistema cardiovascular e incluso a los ojos. Su etiología sigue siendo desconocida. El factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  y la interleucina (IL)-6, juegan un papel importante en la patogénesis y en la persistencia de inflamación [33].

### **1.6.2.1 MOLECULAS IMPLICADAS EN EL MECANISMO FISIOPATOLOGICO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE**

Es un proceso iniciado por la infiltración de células inflamatorias, principalmente células T CD4+ específicas para antígenos que tiene como diana primordial la membrana sinovial. Se desconoce el origen del antígeno. Se especula que podría ser un antígeno exógeno, probablemente de naturaleza viral, o una proteína endógena [33].

Los linfocitos B también están presentes en el líquido sinovial, agrupándose en el centro de los folículos linfoides rodeadas por las células T. Los linfocitos B pueden diferenciarse en células plasmáticas y producir factor reumatoide (FR) bajo la influencia de las células T y de citocinas, como la IL-6 o el factor estimulante de los linfocitos B (BLyS). En la sinovial reumatoide también se encuentran macrófagos activados y células dendríticas que, además de su papel principal como células presentadoras de antígeno (CPA), pueden participar en la perpetuación de la sinovitis [34]. En la AR, los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF) presentan un fenotipo agresivo produciendo metaloproteinasas de matriz (MMP) responsables de la erosión articular. Los STF también tienen efectos proinflamatorios adicionales mediante la producción de IL-6 y el factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF) que activan las células B y T, factores quimiotácticos como CCL2 y la IL-8 (CXCL8), que reclutan células mieloides, o el ligando del activador del receptor del factor nuclear kappa-B (RANKL), que promueve la formación de osteoclastos [34].

### **1.6.3 OTRAS PATOLOGÍAS ARTICULARES**

#### **1.6.3.1 MICROFRACTURAS**

Las microfracturas en el cartílago producen daños en la red de colágeno dando lugar a la pérdida de proteoglicanos en la superficie y alteraciones de la distribución de la carga en la matriz. Debido a esta pérdida se produce una respuesta metabólica anormal en los condrocitos que, a su vez, hace que haya una mayor pérdida de proteoglicanos, con el consiguiente desgaste y progresión de fisuras [20].

#### **1.6.3.2 DEFECTOS CONDRALES**

Son lesiones generalmente consecuencia de un trauma o de la generación de una microfractura previa. La actividad metabólica intrínseca después de la lesión es insuficiente para que se produzca una reparación correcta y, como resultado, se origina una fisura progresiva subcondral. Este tipo de fisuras se extienden hacia zonas más profundas del cartílago hasta penetrar el hueso, lo que provoca un sangrado. Vehiculizados por la sangre, las células madre mesenquimales (MSC) migran hacia el cartílago y genera un nuevo tejido cicatricial que se asemeja al fibrocartílago [20].

## 1.7 TERAPIA CELULAR

El uso de células como agentes terapéuticos constituye una nueva estrategia en medicina regenerativa. Por tanto, estudiar y determinar cuál es el tipo celular que debe seleccionarse es imprescindible. Para ello es necesario profundizar en la seguridad, capacidad para reparar o restaurar la función biológica de los tejidos y órganos dañados [35]. Hasta la actualidad las células madre han demostrado ser adecuadas para emplearse en medicina regenerativa gracias a sus características biológicas; son células no especializadas que tienen la capacidad para autorrenovarse durante largos periodos de tiempo y de diferenciarse (plasticidad) en células especializadas con funciones específicas [36].

Las células madre se clasifican según su origen y según su potencialidad. Según su origen se dividen en embrionarias y adultas. Según su potencialidad o capacidad de diferenciación se clasifican en: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes; siendo las más estudiadas para su aplicación clínica las células madre pluripotentes y multipotentes. Las células madre pluripotentes pueden diferenciar a cualquier célula del organismo y se subdividen en embrionarias e inducidas. Las células madre multipotentes, adultas, somáticas o específicas de tejido, son aquellas cuyo potencial de especialización está limitado exclusivamente a uno o varios linajes celulares [37].

Existen dos grandes grupos de células madre adultas: Hematopoyéticas (HSCs), que dan origen a las líneas celulares sanguíneas y se encuentran en el cordón umbilical y médula ósea, y Mesenquimales (MSCs), que dan origen a distintos tipos de tejidos como cartílagos, huesos o músculos. Estas últimas se encuentran en el tejido del cordón umbilical, la pulpa dental, flujo menstrual y el tejido adiposo. Las HSCs son empleadas para el tratamiento de hematologías malignas, como leucemias y linfomas, pero también en otros tipos de cáncer como el neuroblastoma y el mieloma múltiple. En cuanto a enfermedades no cancerígenas se utilizan las HSCs en la talasemia y la anemia de células falciformes, alteraciones congénitas del metabolismo, inmunodeficiencias y aplasia medular. Las MSCs se emplean en múltiples ensayos clínicos para curar enfermedades neurológicas como el Alzheimer y ayudar a una recuperación más eficiente en heridas, cicatrización y fracturas debido a su capacidad proliferativa [38].

Actualmente, las células madre adultas son las más utilizadas en terapia celular, específicamente las mesenchymal stem cells (MSC, «células madre mesenquimales»). A pesar de presentar menor potencial proliferativo y menor plasticidad en comparación con las células madre embrionarias y las células madre inducidas, son más fáciles de obtener de los tejidos y no crean problemas éticos para su manipulación [39].

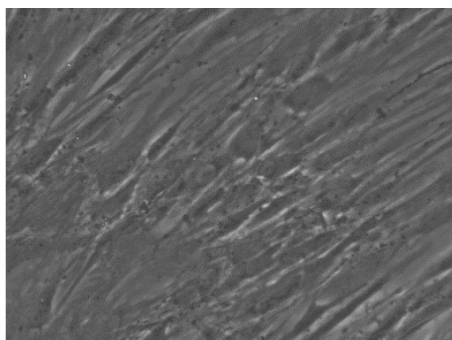
En las últimas décadas se ha considerado al tejido adiposo como una de las principales fuentes de células madre. Este tejido está compuesto principalmente por adipocitos y por la fracción vascular estromal que contiene el resto de los

componentes celulares (preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales, células inmunes y células madre mesenquimales) [40].

La administración de células madre de tejido adiposo (ASCs) para el tratamiento de lesiones condrales incluye métodos como las inyecciones intraarticulares de suspensiones celulares o el uso de biomateriales como plataformas vehiculares para dichas células. La inyección intraarticular ha sido más comúnmente realizada y estudiada con resultados alentadores en animales [41]. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que, aunque las inyecciones de suspensiones de ASCs eran eficaces en el tratamiento de los defectos del cartílago, las mejoras significativas en el soporte de carga del cartílago disminuyeron gradualmente después de 3 meses [42]. Ello sugiere que las ASCs inyectadas no pueden integrarse de manera adecuada en el tejido del huésped y requieren de un biomaterial que brinde un soporte estructural favoreciendo la adhesión, migración celular y difusión de factores bioquímicos en un ambiente quimiotáctico, prolongando y potenciando el efecto terapéutico de las ASCs.

## 1.8 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Son células adultas multipotentes, con morfología fibroblastoide y plasticidad hacia diversos linajes celulares como condrocitos, osteocitos y adipocitos, entre otros. Estas células pueden ser aisladas y expandidas en medio de cultivo debido a sus propiedades de adhesión al plástico, diferenciación y proliferación *in vitro*. Se caracterizan por presentar una morfología en forma de huso con núcleo alargado, central, que contienen de 2 a 3 nucleolos. Se aíslan de diferentes fuentes, entre ellas: la médula ósea, la sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial y pulpa dental. No obstante, los tejidos más empleados son la médula ósea, la sangre del cordón umbilical y el tejido adiposo. Las características que debe cumplir una célula para ser definida como MSC son: expresar los antígenos mesenquimales CD73, CD90 y CD105 y no tener antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14 y CD11b. Además, se ha planteado que las MSC pueden expresar los siguientes antígenos: CD13, CD29, CD44, CD116 y el receptor a del factor de crecimiento derivado de las plaquetas [43].



*Figura 1.8. MSC sin diferenciar. Crecen adheridas a la superficie y próximas entre sí, presentan forma fusiforme. Imagen captada por microscopía óptica en objetivo de 10X. Confluencia 70%.*

### 1.8.1 CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LAS MSCs.

Las MSCs tienen sobre el sistema inmunológico un efecto modulador, ya que tras su expansión *in vitro* son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T desencadenada tanto por estímulos celulares (linfocitos alogénicos) como humorales (fitohemaglutinina). Son capaces además de promover un perfil Th2 en los linfocitos, potenciar la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a linfocitos T reguladores, suprimir la proliferación y citotoxicidad de las células NK, inhibir la proliferación de linfocitos B e inhibir tanto la diferenciación de monocitos a células dendríticas como la maduración y migración de estas [44]. En resumen, las MSCs pueden disminuir la inflamación, participar en la reparación y cicatrización de tejidos debido a sus propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y paracrinas [20].

Debido a todas estas propiedades, las MSCs han sido aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) y la AEM (Agencia Europea del Medicamento) para el tratamiento de diversas patologías. El primer fármaco con células madre (Prochymal) fue aprobado en Canadá en 2012 como mecanismo para tratar la enfermedad de injerto contra huésped [45].

### 1.9 CAPACIDAD TERAPÉUTICA DE LAS MSCs EN OSTEOARTRITIS (ARTROSIS)

Las MSCs, en artrosis, tienen como objetivo principal inducir la señalización paracrina que modula la respuesta inmunitaria y la inflamación; estimular la migración celular y la proliferación de condrocitos endógenos; así como regular el entorno de la matriz extracelular. Así, las MSCs reducen la respuesta inmune al secretar moléculas solubles, como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), la interleucina 6 y la prostaglandina E2, entre otros [47]. Estos factores inhiben la proliferación y función de las células T, suprimen las células NK y reprograman los macrófagos de su estado M1 al fenotipo M2 [48].

Durante la regeneración, los factores de crecimiento secretados por las MSCs, como el factor 1 derivado de células estromales y el factor de crecimiento derivado de plaquetas, promueven la migración y el reclutamiento de MSCs y condrocitos endógenos. [49],[50]. Estudios murinos demuestran aumento de colágeno tipo II y agrecano con la exposición de MSCs; incrementando la producción de matriz extracelular y, a su vez, conservando la integridad de las articulaciones [52].

## 1.10 CULTIVO CELULAR

Es un proceso que recrea un ambiente artificial “in vitro”, favorable para la proliferación y crecimiento de células provenientes de un tejido, con el objetivo de mantener sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Los factores que influyen en el crecimiento son: el medio que proporciona sustratos esenciales (aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, minerales), los factores de crecimiento, hormonas, gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ) y las condiciones fisicoquímicas (pH, presión osmótica y temperatura) [53]. Estos elementos permiten la proliferación celular hasta ocupar toda la superficie del cultivo, fenómeno conocido como confluencia celular. En este contexto, es importante controlar cada uno de estos factores, ya que de ello dependerá el éxito del cultivo. Además, ciertos factores pueden variar según el tipo de célula que se quiera reproducir.

Las células en cultivo tienen un patrón de crecimiento representado por una curva sigmoidea, dividida en cuatro fases:

- Fase lag: Periodo de tiempo en que las células se adaptan, adhieren e inician la diseminación sobre la superficie del cultivo [54]
- Fase log: También conocida como fase logarítmica o exponencial, se caracteriza por una proliferación celular máxima y constante. Es la fase con mayor actividad metabólica del ciclo celular [53]
- Fase estacionaria o meseta: En esta fase el cultivo se vuelve más denso, alcanzando la confluencia celular, y se ralentiza o detiene su ritmo de crecimiento. En esta etapa, el número de muertes celulares puede volverse proporcional al número de células nuevas, la actividad metabólica disminuye y las células se vuelven más susceptibles al daño [55].
- Fase de declive o muerte celular: Se caracteriza por un predominio de células muertas con una reducción en el número de células viables. La muerte celular no se debe a la reducción de nutrientes, sino a la progresión natural del ciclo celular [56].

### 1.10.1 TIPOS DE CULTIVOS

#### 1.10.1.1 BIDIMENSIONALES (2D)

Se caracterizan por el crecimiento de células en monocapa. Las células se encuentran adheridas a sustratos sobre superficies planas y sólidas de plástico o vidrio. Según el origen de las células, los cultivos se dividen en dos grupos:

#### 1.10.1.1.1 CULTIVO PRIMARIO

Se obtiene a partir de la fragmentación mecánica o enzimática de los tejidos, de esta manera las células que sobreviven al proceso de aislamiento presentan características genotípicas y fenotípicas de su tejido de origen. Estas células tienen un crecimiento limitado, ya que no son resistentes a largos períodos de tiempo en cultivo, y se denominan células primarias.

La apoptosis o proceso de muerte celular controlada, normalmente ocurre en nuestros tejidos, permitiendo la renovación constante de las células del organismo. Debido a esto, las células primarias no sobreviven mucho tiempo en cultivo, además de morir por no adaptarse al medio o por traumas y estrés derivados del proceso de aislamiento. Sin embargo, algunas células podrán sobrevivir y proliferar más rápidamente porque se han adaptado bien al medio de cultivo, llegando a ser predominantes en el medio después de algunos pases. Estas células formarán linajes celulares que, a diferencia del cultivo primario, pueden mantenerse durante largos períodos de tiempo [55]

#### 1.10.1.1.2 LÍNEAS CELULARES

Las células somáticas, en condiciones fisiológicas normales, rara vez adquieren una capacidad de proliferación ilimitada durante el cultivo. Sólo después de un cierto número de divisiones celulares, dejan de crecer. Investigadores de todo el mundo aislaron y establecieron varios linajes de diferentes tipos celulares [57], los cuales se clasifican en dos grupos:

- Linaje celular continuo: Presenta algunas características propias de su tejido de origen, sin embargo, tiene una alta capacidad proliferativa y puede dividirse un gran número de veces sin perder sus características, posibilitando formar bancos de células a partir de la criopreservación [58]. Debido a esto, estas células se utilizan ampliamente en investigaciones, como en la producción de medicamentos y vacunas.
- Células transformadas: Son aquellas con características tumorales, que presentan modificaciones genéticas y morfológicas diferentes del tejido original, debido a cambios en los genes que controlan la división celular, induciendo una proliferación descontrolada. La transformación de la célula puede ocurrir por diferentes factores, como virus, sustancias químicas o agentes físicos [55]. Se utilizan para comprender procesos farmacodinámicos.

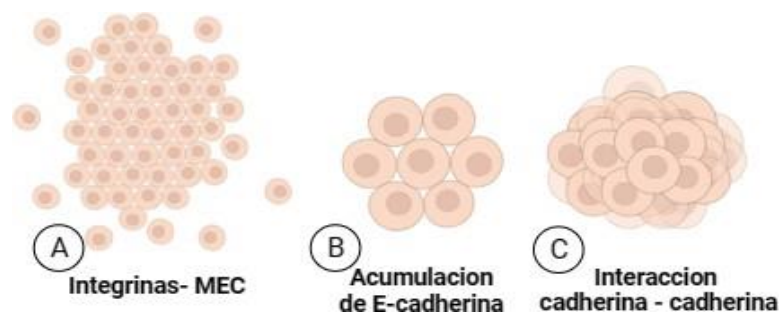
Los cultivos bidimensionales son un método fácil, con buena relación coste-efectividad y están ampliamente extendidos; sin embargo, presentan ciertas limitaciones significativas. Una de las principales limitaciones es que no mimetizan el ambiente tridimensional en el que se encuentran las células in vivo. Esto puede conllevar un comportamiento celular distinto al que realmente se da en el interior del organismo [59].

### 1.10.1.2 TRIDIMENSIONALES (3D)

Los organismos vivos tienen una disposición tridimensional con interacciones complejas entre células y transporte dinámico de nutrientes. In vivo, las células se mantienen en un entorno quimiotáctico con una suplementación constante de nutrientes frescos y oxígeno, además de una eliminación constante de metabolitos y desechos tóxicos a través del sistema circulatorio. Por lo tanto, es importante que el entorno de las células cultivadas considere esta organización espacial. El ambiente tridimensional puede desarrollarse a través de diferentes tecnologías para su fabricación como, por ejemplo; scaffolds, sistemas microfluídicos, bioimpresión, insertos de cultivos, superficies de baja adherencia [59]. Estas superficies permiten el desarrollo de esferoides celulares que mimetizan el ambiente tridimensional, a través de una técnica sencilla, económica y de fácil ejecución.

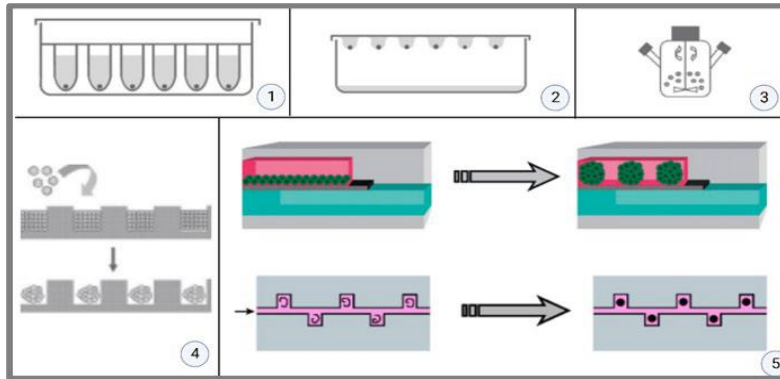
### 1.11 ESFEROIDES IN VITRO

Son estructuras tridimensionales conformadas por células unidas entre sí y fisiológicamente relacionadas. La agregación de las células se puede obtener de manera in vitro por medio del autoensamblaje de las proteínas de matriz extracelular. El proceso de formación del esferoide empieza con la adherencia de las células a las proteínas de la matriz extracelular por medio de las integrinas de superficie. Esta unión fomenta la expresión y acumulación de cadherinas sobre la superficie de las células. Finalmente, mediante la unión de cadherinas entre las células vecinas, generan la compactación del cúmulo celular [60]. (ver fig. 1.11).



*Figura 1.11. Agregación y compactación celular.*

Entre los métodos para la formación de esferoides se encuentran: la gota colgante, superficie no adherente, biorreactores rotativos, centrifugación, microfluídica o micromoldeado, entre otros [60], [61]. (ver fig. 1.11.1).



**Figura 1.11.1. Técnicas para la formación de esferoides. 1. Cultivo en superficie no adherente, 2. Gota colgante, 3. Biorreactores rotativos, 4. Micromoldeado, 5. Microfluídica.**

Para el desarrollo de este trabajo se ha seleccionado el método de superficie no adherente por ser una técnica eficiente, sencilla, económica y de fácil ejecución. [62]

In vitro, las células se encuentran en suspensión, caen por gravedad sobre la superficie y establecerán adhesión celular al plástico. Si el objetivo es que las células formen agregados en suspensión, éstas deben cultivarse en una condición que no les permite adherirse a la superficie sólida [60]. Las superficies de baja adherencia están hechas generalmente de poliestireno y son tratadas con un recubrimiento polimérico, no citotóxico, que se une covalentemente a la superficie y evita la adhesión de las células al plástico, fomentando la formación de agregados esferoidales.

## 1.12 POLÍMEROS TIPO ELASTINA

La matriz extracelular (MEC) es una red estructural compleja que rodea y sustenta a las células de los tejidos. Como se mencionó antes, la MEC está compuesta por fibras de colágeno y elastina, además de otras proteínas y polisacáridos (proteoglucanos/glucoproteínas). Todas estas moléculas le brindan a la MEC soporte físico y, a su vez, le confieren propiedades mecánicas y bioquímicas específicas al tejido en el que se encuentran.

Las fibras elásticas están compuestas por un núcleo central de elastina y una red circundante de microfibrillas de fibrillina-I, quien organiza la elastina en fibras. La elastina permite que los tejidos respondan al estiramiento y la distensión [3], también es capaz de regular el comportamiento celular y promover la reparación tisular [63]. La propiedad elástica de esta molécula es gracias a su esqueleto polipeptídico que causa el enrollamiento aleatorio [3]. Los aminoácidos que conforman la cadena polipeptídica contienen las siguientes secuencias: **VPGG**, **VPGVG**, **APGVG**, **GVVAPG** (V: valina, P: prolina, G: glicina, A: alanina), que se repiten a lo largo de la cadena y se denominan dominios elastoméricos [64].

Los polímeros tipo elastina (ELP “Elastin Like Polymers”) son polipéptidos artificiales cuya secuencia está inspirada en el motivo **(VPGXG)<sub>n</sub>** de la elastina

natural. En donde X representa cualquier aminoácido excepto la L-prolina y n el número de veces que se repite la secuencia pentapeptídica a lo largo de la cadena [65].

La biología molecular permite obtener polímeros recombinantes mediante técnicas de ingeniería genética y, a su vez, lograr un control absoluto de su secuencia [64]. Estos polímeros son denominados ELRs (“Elastin Like Recombinamers”) y son capaces de mantener las propiedades inherentes de la elastina natural [66] tales como las propiedades mecánicas, la biocompatibilidad [67], la naturaleza inteligente y el comportamiento autoensamblable [68].

En medio acuoso, los ELRs presentan un comportamiento termosensible con la capacidad de transicionar y cambiar su estructura conformacional según alcancen la temperatura crítica. Esta temperatura se denomina temperatura de transición ( $T_t$ ). Por debajo de la  $T_t$  el polímero presenta una conformación estirada-desordenada y estableciendo interacciones con moléculas de agua mediante hidratación hidrofóbica formando estructuras de tipo clartrato [69]; las valinas presentes en el polímero poseen una cadena lateral hidrocarbonada que les confiere el carácter hidrofóbico a la molécula [70].

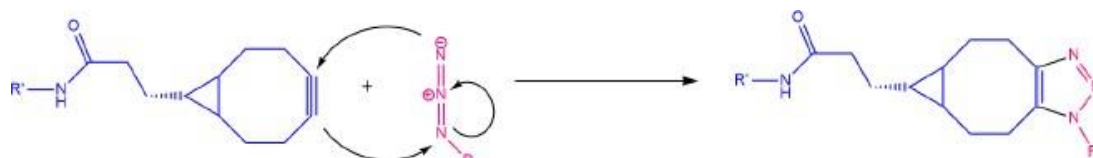
Por encima de la  $T_t$  presentan una conformación plegada-ordenada. La agitación térmica hace que las moléculas de agua que rodean al polímero pierdan la conformación tipo clartrato, obteniendo como resultado una cadena polipeptídica plegada hidrofóticamente con la aparición de puentes de hidrógeno entre los diferentes aminoácidos, dando lugar a una estructura regular llamada espiral  $\beta$ , constituida por una sucesión de horquillas  $\beta$  [69]. En este punto la molécula es totalmente insoluble, llegando a precipitar en disoluciones acuosas; sin embargo, el proceso es totalmente reversible. La naturaleza inteligente le confiere a la molécula la capacidad de revertir su conformación estructural con el cambio de temperatura y a este proceso se le denomina transición inversa con la temperatura (ITT) [71].

Sus propiedades mecano-elásticas, biocompatibilidad y comportamiento termosensible convierten a los ELRs en un objeto de investigación interesante para aplicaciones biomédicas. Así podemos destacar su uso para el direccionamiento específico de la proteína diana, el transporte de proteínas farmacéuticas activas, la elaboración de superficies inteligentes, bioseparación, la ingeniería de tejidos y la cosecha de células [64], [72].

### 1.13 QUÍMICA CLICK.

La química click es una metodología que permite, a partir de moléculas pequeñas, la obtención de estructuras complejas mediante reacciones altamente eficientes [73]. El método fue presentado por Kolb, Sharpless y col. en 2001 y reúne una serie de características como: facilidad experimental, compatibilidad con una elevada variedad de grupos funcionales, fácil purificación del producto final y elevado rendimiento.

Una de las reacciones click más conocidas es la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre azidas y alquinos [74]. Originalmente esta reacción requiere un ión metálico como catalizador para iniciar la reacción, generalmente  $\text{Cu}^+$ . Dado que este ion puede ser citotóxico para los sistemas biológicos [75], se implementó el uso de grupos alquínico activados, como los derivados del ciclooctino, en los que la tensión anular de estos compuestos cíclicos les hace reaccionar con el grupo azido sin necesidad de catalizador en el medio [76].



*Figura 1.13. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre azida y alquino (ciclooctino) en ausencia de catalizador.*

En los sistemas biológicos la reacción click entre azidas y alquinos es bastante estable. Gracias a su biocompatibilidad, es útil para diversas funciones, tales como la preparación de dispositivos para liberación controlada de fármacos, la bioconjugación con proteínas y ADN, el marcaje de superficies celulares y la síntesis de hidrogeles [77].

## 1.14 HIDROGELES

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales hidrofílicas capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos sin perder su estructura, manteniendo un balance osmótico dentro del sistema. La alta hidrofiliidad se debe a la presencia de grupos funcionales hidrofílicos, tales como grupos carboxilo, amido, amino e hidroxilo distribuidos a lo largo de las cadenas poliméricas [78]. Son insolubles en agua, forman redes tridimensionales por entrecruzamiento de las cadenas poliméricas y poseen consistencia blanda y elástica.

Estas características les convierten en biomateriales ideales para diversas aplicaciones biomédicas. Su uso en sistemas de liberación de fármacos, encapsulación celular, lentes de contacto, apósitos para heridas, reemplazo de tejidos blandos, medicina regenerativa, ingeniería de tejidos y como biosensores representa un gran avance para la ciencia biomédica [79].

En relación con el uso de hidrogeles para la reparación de tejido, es necesario que el hidrogel sea capaz de soportar fuerzas mecánicas, que permita la adhesión y la migración celular. Además, debe permitir la difusión de nutrientes y factores bioquímicos [80].

## 2 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo del presente trabajo es la preparación de esferoides celulares de potencial aplicación biomédica en enfermedades como la osteoartritis. Se plantea la estabilización de los esferoides a preparar mediante recubrimiento con bicapas poliméricas, formadas mediante deposición sobre la superficie de los esferoides, capa por capa (layer-by-layer), de polímeros tipo elastina y unidas entre sí por enlaces covalentes tipo click. El recubrimiento tiene como fin: potenciar el efecto terapéutico de las células mesenquimales, hMSCs, mediante una adhesión celular prolongada y facilitar la difusión de nutrientes, oxígeno y productos metabólicos entre las células y el medio que las rodea.

Para su ejecución se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

1. Bioproducción del biopolímero HRGD6 por técnicas de ADN recombinante en *Escherichia Coli*.
2. Preparación de biopolímeros tipo elastina, ELRs, modificados químicamente con grupos ciclooctinilo para GTAR y grupos azido para HRGD<sub>6</sub>, y su caracterización.
3. Modificación química de biopolímeros tipo elastina, ELRs, con fluoróforos, NHS-fluoresceína para HRGD6-N3 y Cy5-NHS para GTAR-CC, y su caracterización.
4. Puesta a punto de la técnica layer by layer como método de recubrimiento superficial por reacción click.
5. Puesta a punto del cultivo de esferoides de células mesenquimales, hMSCs, a diferentes concentraciones celulares y evaluación de su viabilidad en diferentes periodos de tiempo (48, 72, 96 horas).
6. Estudiar la biocompatibilidad de los esferoides hMSCs ante el recubrimiento polimérico por técnicas de viabilidad celular.

## 3 MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Los suministros empleados para este trabajo se pueden resumir de forma general y esquematizada en los siguientes grupos: materiales inertes, y materiales biológicos, sustancias químicas, polímeros sintéticos y equipos. Se han tabulado y descrito cada uno de ellos por grupos en los apartados que se mencionan a continuación:

### 3.1 MATERIALES INERTES

Desechable: Agujas, Eppendorfs, tubos Falcón, guantes, jeringas, papel de aluminio, Parafilm, pipeta pasteur, placas Petri, puntas de pipeta, cubreobjetos, tripa de diálisis, flask de siembra, papel de filtro, pipetas volumétricas, placas de microtitulación.

No desechable: Bidón de diálisis, capilares y contenedores capilares, embudo, Erlenmeyer, Espátula, gradilla, imanes de agitación, matraz aforado, pipetas automáticas, probeta, tijeras, vaso precipitado, rotulador.

## 3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

### 3.2.1 LÍNEA CELULAR Y MEDIO DE CULTIVO

**hMSCs:** Normal Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ATCC, USA, PCS-500-011). Para su desarrollo y crecimiento fueron cultivadas en medio DMEM 1X (1 g/L glucose, Corning), suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) y solución antibiótica de penicilina/estreptomicina.

Estudios demuestran que las hMSCs presentan algunas ventajas con respecto a MSCs derivadas de médula ósea, como son mayor capacidad proliferativa, mayor secreción de factores de crecimiento relacionados con la diferenciación condrogénica, mayores propiedades antiinflamatorias y mayor estabilidad en el proceso de diferenciación [81] Por tal motivo, fueron seleccionadas las hMSCs para el desarrollo de este trabajo.

### 3.2.2 BACTERIAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo necesarios para la replicación de *Escherichia coli*, se describen a continuación en la siguiente tabla:

MEDIOS DE CULTIVO PARA *Escherichia coli*.

PROVEEDOR	DESCRIPCIÓN	PREPARACIÓN
CondaLab	<p><b>Medio Luria Bertani (LB).</b></p> <p>Composición:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Triptona</li> <li>• Extracto de levadura</li> <li>• Cloruro sódico</li> </ul> <p>La peptona de caseína y el extracto de levadura proporcionan al medio los nutrientes necesarios para su crecimiento. El cloruro de sodio ayuda a mantener el equilibrio osmótico.</p>	<p>Es reconstituido en agua destilada a 20 g/L y esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Al caldo se añadió un 1% (p/v) de glucosa estéril y ampicilina (100 µg/ml) (o kanamicina en su lugar (30 µg/ml) cuando fuera necesario).</p>
CondaLab + Thermofisher	<p><b>Medio Luria Bertani (LB) + Bacto™ (BD/Difco).</b></p> <p>Composición: Mismas que la descripción anterior, solo que se le ha añadido agar Bacto, que es un solidificante purificado.</p>	<p>Se reconstituyeron en agua destilada; 25 g/L (medio LB) y 15g/L (BD/Difco). Se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se añadieron glucosa estéril al 1% (p/v) y ampicilina (100 µg/ml) al medio antes del recubrimiento en placas de Petri.</p>

### Medio Terrific Broth medium (TB).

Composición:

- Extracto de levadura
- Triptona

Formedium

Se diferencia del LB porque contiene mayor proporción de extracto de levadura, rica en vitamina B, especialmente dirigido a cepas de E. coli nutricionalmente exigentes ya que no son capaces de producir vit B.

Reconstituido en agua destilada a 55,85 g/L y suplementado con 100 µg/ml de antiespumante (SIGMA-ALDRICH), 8 ml/l de glicerol (Fisher scientific) y 100 µg/ml de ampicilina o kanamicina (30 µg/ml).

**Tabla 3.2.2. Medios de crecimiento bacteriano para E. coli. Instrucciones previas y casas comerciales. Proveedores:** <https://formedium.com/?v=04c19fa1e772> / <https://www.condalab.com/>

## 3.3 SUSTANCIAS QUÍMICAS

Se describen como sustancias químicas: reactivos (tabla 3.3.1), tampones o buffer (tabla 3.3.2) y disolventes (tabla 3.3.3).

### REACTIVOS

PROVEEDOR	SUSTANCIAS	ENLACES WEB
Apollo	Ampicilina	<a href="https://www.apolloscientific.co.uk/">https://www.apolloscientific.co.uk/</a>
	Kanamicina	
	Penicilina-Estreptomina	
Sigma-Aldrich	Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/ES/es">https://www.sigmaaldrich.com/ES/es</a>
	Persulfato de amonio (PSA)	
	Cloruro de cobre	
	Azul de bromofenol	
	Ácido clorhídrico (HCL)	
	Agarosa	
	Glicerol	
	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	
	Tetramethylethylenediamine (TEMED)	
Azul de tripano		

	β-Mercaptoethanol	
	Estreptomina	
	Alamar blue	
	Calcein AM	
	Ethidium homodimer-1	
Thermofisher	NHS-Fluoresceína	<a href="https://www.thermofisher.com/es/es/home.html">https://www.thermofisher.com/es/es/home.html</a>
	DMEM, 1X 1g/L	
	Suero bovino fetal (FBS)	
	Solución salina tamponada con fosfato (PBS)	
Amresco	Acrilamida	<a href="https://us.vwr.com/store/search?supplierName=Amresco">https://us.vwr.com/store/search?supplierName=Amresco</a>

**Tabla 3.3.1. Relación reactivos/proveedores con enlace web de las páginas comerciales.**

#### SOLUCIONES TAMPÓN

PROVEEDOR	TAMPONES	COMPOSICIÓN
	Tampón de lavado	Tris pH7.5 400 mM NaCl 4M
	Tampón de sonicación	Tris pH7.5 200mM EDTA 25mM
Sigma-Aldrich	Running buffer	Tris pH8.3 15g Glicina 72g, SDS 5g
	Loading buffer	Tris 1M pH6.5 Glicerol, SDS, 2-ME, Bromofenol.

**Tabla 3.3.2. Disoluciones tamponadas empleadas. Proveedor <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es>**

#### DISOLVENTES

PROVEDOR	DISOLVENTES	ENLACES WEB
PanReac	Etanol	<a href="https://www.itwreagents.com/iberia/es/home">https://www.itwreagents.com/iberia/es/home</a>

	Acetona 99%	
Scharlau	Dietiléter	<a href="https://www.scharlab.com/">https://www.scharlab.com/</a>
	Metanol	
	Dimetil sulfóxido duterado (DMSO)	
Sigma-Aldrich	Dimetilformamida (DMF)	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/ES/es">https://www.sigmaaldrich.com/ES/es</a>

**Tabla 3.3.3. Relación disolvente/proveedores con enlace web de las páginas comerciales.**

### 3.4 EQUIPAMIENTO

TÉCNICA INSTRUMENTAL	PROVEDOR	MODELO
Microscopia confocal		DMi8
Microscopia óptica	Leica Microsystems	Dfc3000G
Microscopia de fluorescencia	Nikon	Eclipse Ti versión TI-SH-W
Centrifugación	Sigma-Aldrich	Eppendorf Centrifuge 5810/5810R
		ST 16R
Cultivo celular	Thermo-Scientific	Incubator Steri-Cycle
		Baño maría Polytest 8
Espectrofotometría multiplaca.	Molecular devices	SpectraMax iD3

Espectrometría infrarroja (FTIR)		FT-IR Tensor27
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Mettler Toledo	DSC822
Plasma cleaner	Harrick Plasma	PLASMAFLO PDC-FMG

**Tabla 3.4.1. Relación de equipos con la técnica instrumental empleada para cada uno de ellos.**

### 3.5 BIOPOLÍMEROS

POLÍMEROS	
<b>GTAR</b> PM 41854 (Da)	MESLLP-{{(VPGIG)2(VPGKG)(VPGIG)2}2}- YAVTG <b>GTAR</b> SASPASSA- [(VPGIG)2(VPGKG)(VPGIG)2]2}4-V
<b>HRGD<sub>6</sub></b> PM 60825 (Da)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH-MESLLP-{{(VPGIG)2(VPGKG)(VPGIG)2}2}- AVTGRGDSPASS- [(VPGIG)2(VPGKG)(VPGIG)2]2}6-V

**Tabla 3.6. Representación esquemática de la relación y comportamiento de los polímeros GTAR Y RGD según la secuencia aminoacídica.** Ambos polímeros presentan un bloque hidrofóbico (VPGIG) y uno hidrofílico (VPGKG) que se repite a lo largo de la cadena polipeptídica. VPGIG es el pentapéptido responsable del comportamiento termosensible y de la biocompatibilidad de estas moléculas. Por otro lado, los grupos amino terminal que conforman las lisinas de los fragmentos VPGKG permiten que se lleven a cabo modificaciones químicas en los polímeros. Es importante señalar que la secuencia bioactiva de RGD (arginina, glicina y ácido aspártico) promueve y favorece la adhesión celular y GTAR (glicina, treonina, alanina, arginina) es una secuencia de degradación sensible a proteasas.

### 3.6 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.6.1 BIOPRODUCCIÓN DE ELRs.

El proceso, que comprende varias etapas, parte con la replicación de bacterias genéticamente modificadas y finaliza con la obtención de una masa algodonosa pura de polímero. Durante el proceso se mantienen parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, etc.) según la naturaleza del polímero a producir.

##### 3.6.1.1 REPRODUCCIÓN DE BACTERIA RECOMBINANTE.

Se parte con la siembra por el método de aislamiento de una cepa de *Escherichia coli* sobre una placa Petri que contiene medio LB fortificado con glucosa y ampicilina. Previamente la bacteria ha sido modificada genéticamente por

técnicas de biología molecular con la inserción de un plásmido que codifica para la expresión del polímero RGD y que expresa resistencia antibiótica. La cepa está dispuesta para su uso en una disolución de glicerol estéril al 80% a una temperatura de -80° C.

La adición del antibiótico (ampicilina) al medio de cultivo permite discernir las bacterias transfectadas de las no transfectadas, asegurando que sólo crezcan los clones que contienen el plásmido que codifica la proteína de interés (RGD) al ser resistentes a dicho antibiótico una vez transfectadas. Este proceso se lleva a cabo en las condiciones de asepsia, en campana de flujo laminar y utilizando material estéril. Posterior a la siembra, la placa Petri es incubada a 37°C por 24 horas, para favorecer la proliferación y crecimiento bacteriano.

### 3.6.1.2 SCREENING DE PLACA.

Pasado el tiempo de incubación, se seleccionan 8 colonias de la placa Petri siguiendo como criterios de exclusión, colonias aisladas y con bordes uniformes. Dichas colonias serán incubadas nuevamente bajo las mismas condiciones (37°C/24 h) en una disolución que contiene medio TB (5ml) y ampicilina (40ul) contenido en un tubo falcon.

Al día siguiente, se realiza un screening por medio de análisis electroforético en gel de poliacrilamida de cada uno de los cultivos. El protocolo consiste en tomar muestras de 20 µl en distintos eppendorf, de cada una de las colonias, a los que se añadirá 5 µl de Loading Buffer. Luego serán hervidas durante 5 minutos a 100 °C para desnaturalizar las proteínas y, posteriormente, centrifugadas durante otros 5 minutos a 14000 rpm para eliminar los restos menos solubles. De esta forma, las muestras quedan preparadas y se cargan sobre el gel de poliacrilamida que se encuentra en la cubeta electroforética. La función principal del Loading Buffer es brindar peso, densidad y color a la muestra, lo que facilita su depósito en el pocillo y permite monitorear el corrimiento de la muestra. Se inicia la electroforesis durante 80 min y al finalizar se tiñe el gel con cloruro de cobre, revelando el peso molecular de las colonias cultivadas. Se selecciona aquella cuya banda de expresión sea más gruesa y coincida con el peso molecular del polímero.

### 3.6.1.3 FERMENTACIÓN.

La producción se realiza bajo condiciones controladas en el fermentador. Se inicia con la preparación del inóculo. La colonia seleccionada será incubada a 37°C por 24h en medio LB (1000 ml), adicionando glucosa (50 ml) y ampicilina (1ml) y en un matraz Erlenmeyer con agitación orbital a 250 rpm. Posteriormente, en un vaso de precipitados se prepara una disolución enriquecida con vit B (medio TB/500g), que potencia la producción de las *E. coli* que son incapaces de producir vit B. Así mismo, se adiciona glicerol (112 ml) que estabiliza las membranas celulares y, a su vez, maximiza el crecimiento en conjunto con el medio LB (100 g) y TB. Todo

el contenido se suspende en agua hasta alcanzar un volumen final de 14L, se vierte en el fermentador y se calibran los parámetros (O<sub>2</sub>: 100%, Temp: 35° - 37°C, pH: 6,6). Una vez ajustado el fermentador, se agrega el inóculo previamente contenido en el matraz Erlenmeyer.

Se lleva un seguimiento de la biomasa en intervalos de 30 min por medio de la medida de la densidad óptica. Para ello, se mide la absorbancia de la muestra a una longitud de 600 nm. De los datos recogidos se puede determinar el aumento o disminución en la concentración celular y llevar un control en el patrón de crecimiento bacteriano. El patrón de crecimiento está dividido en cuatro etapas: "Fase de latencia" o "Fase lag", corresponde a la adaptación de las bacterias a las condiciones ambientales; "Fase exponencial" o "Fase log", representada por un crecimiento a máxima velocidad sin limitación de nutrientes; "Fase estacionaria" caracterizada por un detenimiento en el crecimiento debido a la escasez de nutrientes y "Fase de muerte celular" como su mismo nombre lo indica declive y muerte por la carencia de nutrientes en el medio.

Cuando la absorbancia medida es constante significa que se ha alcanzado la fase estacionaria; por ende, la bacteria ha dejado de reproducirse por escasez de nutrientes. En ese momento se detiene el fermentador y se da por concluida la producción.

#### 3.6.1.4 LAVADO DE CÉLULAS.

Se recogen alícuotas del fermentador, posteriormente se centrifugan a baja temperatura (4°C por 15min a 4000rpm), se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en tampón de lavado, el proceso se repite hasta obtener un sobrenadante transparente y sin turbidez. Tras la última centrifugación, las células son resuspendidas en tampón de sonicación, dejándolas preparadas para la siguiente etapa de extracción y purificación. El tampón de lavado ayuda a mantener la morfología y estructura de la membrana celular y, por lado contrario, el tampón de sonicación ayuda a la lisis de la membrana (Composición en apartado 3.3 sustancias químicas, tabla 3.3).

#### 3.6.1.5 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN.

Las propiedades físicas y la naturaleza inteligente ante cambios en la temperatura y el pH, juega un papel fundamental en este apartado.

Para la extracción, las células lavadas y resuspendidas en el tampón de sonicación son sometidas a un proceso de lisis celular por acción mecánica mediante un disruptor a una temperatura controlada de 4 °C, permitiendo liberar el biopolímero producido.

El proceso de purificación del polímero se lleva a cabo mediante ciclos de transición inversa (ITC), en una serie de fases sucesivas de calentamiento,

centrifugación y enfriamiento, bajo control del pH. Una vez fuera de la célula y en medio acuoso el polímero tiene la propiedad de ser soluble a baja temperatura y en alta temperatura precipitar. Esta es una característica importante que contribuye a la eliminación de detritus celulares u otros elementos que puedan interferir con la pureza del polímero (para más detalle consultar el apartado 1.10).

Posterior a la extracción, se centrifuga el extracto (14000 rpm, 30 min, 4°C) con el objetivo de descartar el precipitado y obtener el sobrenadante, en el cual se encuentra el polímero. Para mantener el pH neutro del medio se adiciona NaCl 1.5M. A continuación, el sobrenadante es calentado (20 min/30°C) en baño maría, el polímero precipita y se vuelve a centrifugar (7000 rpm, 20 min, 30°C). Eliminamos el sobrenadante, se resuspende el precipitado en agua mili-Q fría y se deja toda la noche a una temperatura constante de 4°C. El proceso se repite dos veces bajo los mismos parámetros de calentamiento, centrifugación y enfriamiento (2 días adicionales) variando únicamente la concentración de NaCl, 1.5M (día 1), 1M (día 2) y 0.5M (día 3).

La purificación termina con el proceso de diálisis por osmosis, con el objetivo de eliminar la presencia de sales que acompañan al polímero, enfrentándolo a agua milliQ, durante 3 cambios de 25L. La disolución acuosa del biopolímero se filtra sobre membranas de poliétersulfona (PES, Thermo Scientific™ Nalgene Rapid- Flow) y es congelado a -20 °C; posteriormente, el ultrafiltrado se liofiliza hasta la obtención de un sólido blanco de aspecto algodonoso.

### **3.6.2 CARACTERIZACIÓN**

Finalmente, se caracteriza el biopolímero producido mediante técnicas instrumentales: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Espectrometría de Masas (MALDI-TOF), Espectroscopía Infrarroja (FTIR) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

#### **3.6.2.1 LA CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)**

Mide las temperaturas y los flujos de calor asociado con transiciones térmicas del polímero. El comportamiento térmico se analizó empleando un equipo Mettler Toledo 822e con refrigeración de nitrógeno líquido. La calibración de la temperatura y de la entalpía se realizaron con muestras estándar de indio. Se preparó una disolución con una concentración de 20 mg/ml en PBS a pH 7 para cada polímero. Se introdujeron 20 µL de la disolución dentro de crisoles de aluminio herméticamente sellados, manteniendo una temperatura constante de 4°C. En otro crisol se preparó la referencia agregando un volumen de 20µl de PBS a pH7. El volumen de contención para los crisoles de aluminio es de 40 µl. Posteriormente, ambos crisoles fueron introducidos en el equipo y sometidos a rampas de enfriamiento-calentamiento, asegurándonos de tener la misma temperatura para la muestra y la referencia durante el proceso de medición.

### 3.6.2.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF)

La desorción/ionización con láser y asistida por matriz (MALDI-TOF) determina el peso molecular del polímero. La técnica se llevó a cabo en el espectrómetro de masas modelo Bruker Autoflex Spped en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI-UVA).

Sobre una placa metálica se agregó 1  $\mu$ l de matriz (ácido sinapínico en acetonitrilo al 70 % y ácido trifluoroacético al 0,1 %) con 1  $\mu$ l de muestra (polímero disuelto en agua en una concentración de 1 mg/ml a 4°C). Luego que el analito y la matriz cocrystalizan, se introduce la placa metálica al espectrómetro de masas donde es bombardeada por pulsos de luz láser para producir la desorción e ionización de las moléculas que son aceleradas por medio de un campo electrostático. En el analizador de tiempo de vuelo, ToF, los iones viajan en función a su relación masa/carga, el detector recepta los iones y produce un espectro.

### 3.6.2.3 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER DE REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)

La espectroscopía Infrarroja nos permite identificar los grupos funcionales, mediante las vibraciones moleculares del polímero. La técnica se llevó a cabo en un espectrómetro Bruker Tensor 27 (Bruker Corporation) y se analizó utilizando el programa de recopilación de datos OPUS.

Se mide la interacción de la radiación infrarroja con la muestra liofilizada, haciendo un barrido de frecuencias entre 600-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Las longitudes de ondas irradiadas producen vibración en los enlaces de la molécula, absorbiendo el haz de luz y dando lugar a una banda en el espectro.

### 3.6.2.4 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

La técnica se llevó a cabo en un espectrómetro automático Agilent MR 400, en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI-UVA). Para la representación de las señales se usó el software MestReNova v 15.

El RMN evalúa el comportamiento de núcleos atómicos con espín nuclear distinto de cero en presencia de un campo magnético externo, obteniendo información sobre el entorno del núcleo. A medida que aumenta el campo magnético se separan los niveles de energía, causando un alineamiento del espín nuclear, que puede ser a favor o en contra del campo electromagnético, cuando se alinean a favor del campo, se habla de espín alfa, y en contra al campo, espín beta. El espín alfa posee menor energía con respecto al beta, por tanto, cuando se incide con la energía adecuada sobre protones con espín alfa, estos adquieren la

energía suficiente para pasar a espín beta, esta absorción de energía es lo que mide el equipo y se conoce como resonancia.

El equipo se compone de un electroimán, un transmisor de radiofrecuencias y un detector de señales. El electroimán genera un campo magnético rotatorio sobre la muestra, al mismo tiempo se emiten ondas de radiofrecuencia por el transmisor sobre la muestra, y el detector mide la diferencia de energía entre la onda que entra y la que sale, generando señales en el espectro.

Para cada núcleo de un átomo la densidad electrónica que le rodea es diferente y va en función al entorno químico en el que se encuentre, a medida que aumenta el número de electrones que rodean al núcleo, habrá mayor densidad electrónica, lo que se conoce como apantallamiento. Dependiendo del nivel de apantallamiento, la cantidad de energía que necesitaran las moléculas para que resuenen será diferente. A mayor nivel de apantallamiento, mayor será el campo magnético, menor desplazamiento químico habrá y viceversa. Hay casos en el que estas señales pueden solaparse, debido a moléculas químicamente similares o iguales entre sí, este tipo de señales se representa con una curva superpuesta sobre ellas. El área por debajo de esas señales, integradas, representan el número de átomos presentes en las moléculas.

Para la realización de la técnica, se disolvieron 6 mg de polímero liofilizado en 0.6 ml de DMSO-d6 y la disolución fue transferida a capilares de 5mm, específicos para RMN. Posteriormente los capilares fueron trasladados al LTI para su lectura.

### **3.6.3 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE ELRs.**

La reacción click entre las cadenas poliméricas para la producción de los hidrogeles requiere una modificación química previa de los biopolímeros. Puesto que el entrecruzamiento se lleva a cabo mediante cicloadición 1,3-dipolar, se hace necesario introducir grupos azido y grupos ciclooctinilo, respectivamente, en los distintos ELRs. El biopolímero GTAR se modifica con grupos ciclooctinilo y el polímero HRGD6 con grupos azido (ver apartado 1.13).

Se realizará una segunda modificación química, añadiendo un marcador o fluoróforo para cada polímero, en proporción 1:1. Los fluoróforos seleccionados fueron: NHS-Fluoresceína para HRGD6-N3 con una longitud de emisión a 518 nm y Cyanine5-NHS para GTAR-CICLO con una longitud de emisión a 665nm, en el espectro UV. Ambos de la casa comercial Thermo Fisher.

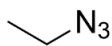
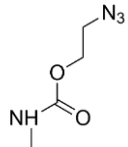
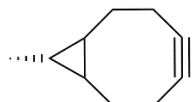
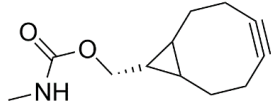
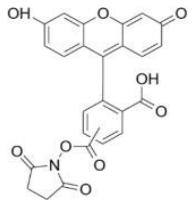
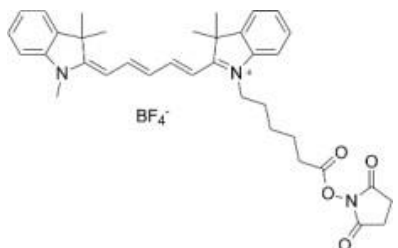
Abreviaturas	Molécula
R <sup>1</sup>	MGSSHHHHHSSGLVPRGSH-MESLLP-[[ <b>(VPGIG)</b> 2 <b>(VPGKG)</b> <b>(VPGIG)</b> 2]2-AVTG <b>RGD</b> SPASS- [[ <b>(VPGIG)</b> 2 <b>(VPGKG)</b> <b>(VPGIG)</b> 2]2]6-V
R <sup>2</sup>	MESLLP-[[ <b>(VPGIG)</b> 2 <b>(VPGKG)</b> <b>(VPGIG)</b> 2]2-YAVTG <b>GTAR</b> SASPASSA- [[ <b>(VPGIG)</b> 2 <b>(VPGKG)</b> <b>(VPGIG)</b> 2]2]4-V
R <sup>3</sup>	
R <sup>3'</sup>	
R <sup>4</sup>	
R <sup>4'</sup>	
F <sup>1</sup>	
F <sup>2</sup>	

Figura 3.6.3.0.3. Abreviaturas de las moléculas utilizadas para representar gráficamente las modificaciones químicas que se realizan.

El producto de las modificaciones químicas; se caracterizaron por las técnicas instrumentales mencionadas en el apartado 3.6.2.

### 3.6.3.1 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE HRGD6 CON AZIDAS.

En un matraz de fondo redondo de 100 ml se disuelve el polímero HRGD<sub>6</sub> (2000 mg, 0,033 mmol, 0,79 mmol<sub>(NH<sub>2</sub>)</sub>, PM 60825) en DMF (40 ml) bajo atmósfera inerte. Posteriormente, se añade vía jeringa una disolución de 2-(Azidoetil)(2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (108,3 mg, 0,47 mmol, 0,6 eq, PM 228,17) en DMF(1mL). Se deja en agitación constante durante 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se depositan 7 ml de la disolución en tubos falcons de 50 ml, y se añade hasta 45 ml de Et<sub>2</sub>O para precipitar el polímero. A continuación, se centrifuga a 17000 G por 40 min. El sobrenadante es descartado y el precipitado se lava con acetona (30 ml) y se centrifuga a 17500 G. El proceso se repite por triplicado. El sólido resultante es secado a presión reducida y se redisuelve en agua Mili-Q a 4°C (15 ml). La disolución acuosa del polímero se dializa a una temperatura de 4°C contra un volumen de 25 ml de agua doblemente destilada (x4). Finalmente, el producto es filtrado y liofilizado, obteniendo como resultado una masa algodonosa de polímero modificado con un rendimiento del 80%.

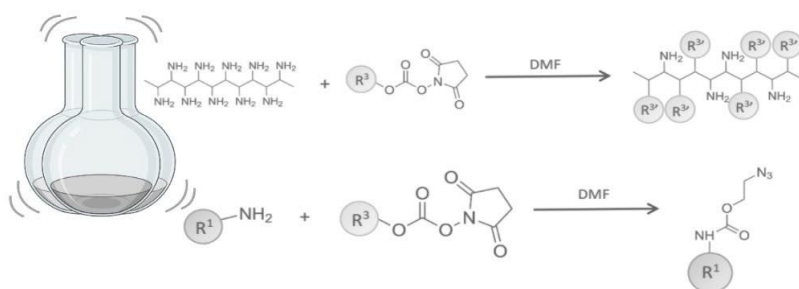


Figura 3.6.3.1. Modificación química del polímero HRGD6 con grupos azido.

### 3.6.3.2 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE GTAR CON CICLOOCTINOS.

En un matraz de fondo redondo de 100 ml se disuelve el polímero GTAR (2000 mg, 0.048 mmol, 0.77 mmol<sub>(NH<sub>2</sub>)</sub>, PM 41854) en DMF (40 mL) bajo atmósfera inerte. Posteriormente, se añade vía jeringa una dilución de (1R, 8S,9S)-biciclo (6.1.0.) non-4-yn-9-ilmetil succinidimil carbonato (202,75 mg, 0,46 mmol, 0,6 eq, PM 291,30) en DMF (1mL). Se deja en agitación constante durante 48 horas a temperatura ambiente. El procesado y purificación posterior se lleva a cabo con el mismo protocolo que el descrito en el apartado anterior 3.6.3.1. El rendimiento obtenido fue del 76%.

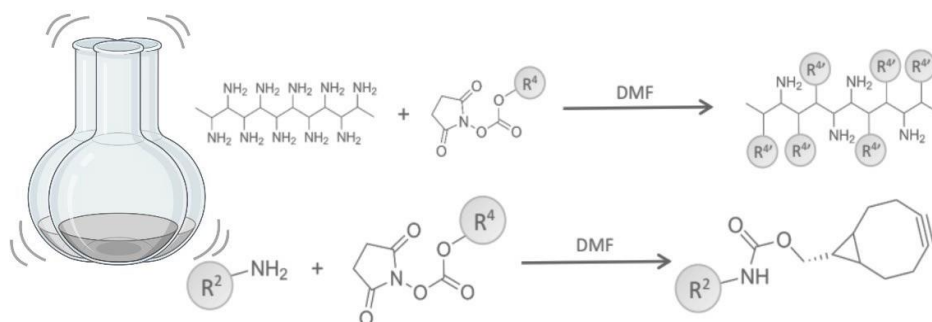


Figura 3.6.3.2. Modificación química del polímero GTAR con grupos Ciclooctinilo.

### 3.6.3.3 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE HRGD6-N3 CON EL FLUORÓFORO NHS-FLUORESCÉINA.

En un matraz de fondo redondo de 100 ml se disuelve el polímero HRGD<sub>6</sub>-N3 (250 mg, 4.0 μmol, PM 62544) en DMF (5 ml) bajo atmósfera inerte. Posteriormente, se añade vía jeringa una disolución del reactivo NHS-Fluoresceína (1,90 mg, 4.0 μmol, PM 473) en DMF (5 mL). La reacción se lleva a cabo en oscuridad (reactivo fotosensible), bajo agitación constante, durante 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se continúa con el protocolo de purificación del apartado 3.6.3.2.1. El pH es ajustado a 7 antes de filtrar y liofilizar. Se obtiene por resultado una masa algodonosa de color amarillo que corresponde al polímero HRGD<sub>6</sub>-N3 modificado con un rendimiento del 67%.

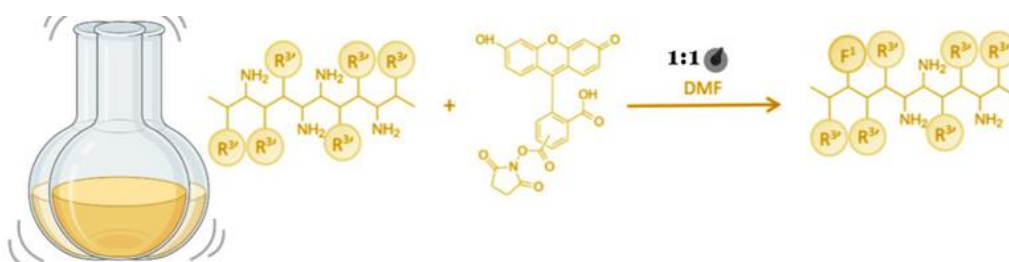


Figura 3.6.3.3. Modificación química del polímero HRGD<sub>6</sub>-N3 con el fluoróforo NHS-Fluoresceína.

### 3.6.3.4 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE GTAR-CC CON EL FLUORÓFORO CY5-NHS.

En un matraz de fondo redondo de 100 ml se disuelve el polímero GTAR-CC (250 mg, 5,8 μmol, PM 43404) en DMF (7,5 mL) y DMSO (3mL) bajo atmósfera inerte. Posteriormente, se añade vía jeringa una disolución del reactivo Cyanine5-NHS (3,87 mg, 5.8 μmol, PM 667,54) en DMF (5 mL). La reacción se lleva a cabo en oscuridad (reactivo fotosensible), bajo agitación constante, durante 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se continúa con el protocolo de purificación del apartado 3.6.3.2.1. El pH es ajustado a 7 antes de filtrar y liofilizar. Se obtiene por resultado una masa algodonosa de color azul que corresponde al polímero GTAR-CC modificado con un rendimiento del 55%.

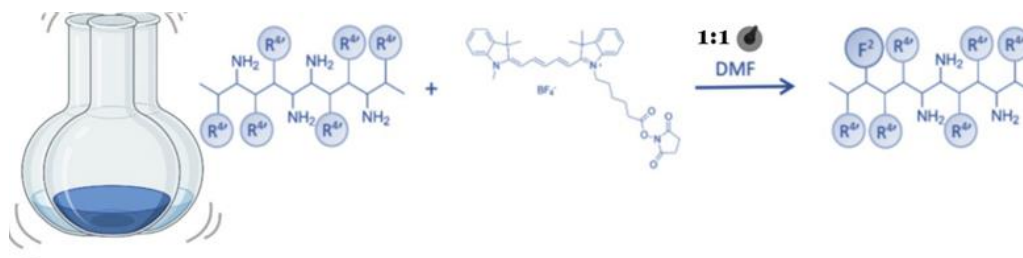


Figura 3.6.3.4. Modificación química del polímero GTAR-ciclo con el fluoróforo Cy5-NHS.

### 3.6.4 CULTIVO CELULAR EN MONOCAPA

#### 3.6.4.1 DESCONGELACIÓN

Las células mesenquimales (hMSCs) se encuentran criopreservadas a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  en viales contenidos en un tanque de nitrógeno. Las células están suspendidas en una disolución (70% de medio, 20% de FBS y 10% DMSO). El dimetilsulfóxido (DMSO) inhibe la formación de cristales de hielo intracelulares que pueden provocar la muerte celular durante el proceso de congelación, sin embargo, a temperatura ambiente el DMSO es tóxico para las células, por tanto, el proceso de descongelación y sustitución del nuevo medio debe ser rápido.

Se parte descongelando un criovial en baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 2 minutos, posteriormente bajo campana de flujo laminar, se diluye la suspensión celular en 5 ml de medio DMEM con una pipeta volumétrica de 10 ml; la dilución se vierte en un tubo falcon de 15 ml para ser centrifugado a 270 G por 5 min. Transcurrido el tiempo, el sobrenadante se descarta y las células son resuspendidas en 1 ml de medio DMEM.

#### 3.6.4.2 VIABILIDAD Y CONCENTRACIÓN CELULAR

Para determinar la densidad de células vivas y muertas se realizó un conteo en cámara de Neubauer. Para ello, se realiza una dilución  $\frac{1}{2}$  con 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular (1 ml) y 10  $\mu\text{L}$  del reactivo azul tripán. Posteriormente se llena uno de los compartimientos de la cámara con 10  $\mu\text{L}$  de la dilución, es importante homogenizar muy bien la muestra antes de realizar la dilución y antes del llenado de la cámara, para asegurar una concentración real y uniforme del analito.

El conteo se realiza en un microscopio óptico a objetivo de 20x en los cuatro cuadrantes externos del hemocitómetro de Neubauer, en un orden de izquierda a derecha recorriendo los dieciséis subcuadrantes que conforman cada extremo. Las células localizadas en los márgenes externos rojos (ver fig 3.6.4.2) no son incluidas. El azul de tripano discrimina las células birrefringentes (vivas) de las azules (muertas), por exclusión de captación, ya que el azul de tripano no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras.

Una vez contadas las células de los 4 cuadrantes, se determina la concentración, células totales y viabilidad, mediante las siguientes fórmulas:

Concentración celular:

$$x1 = \frac{\text{Total de cel vivas}}{4} \times fd \times 10^4$$

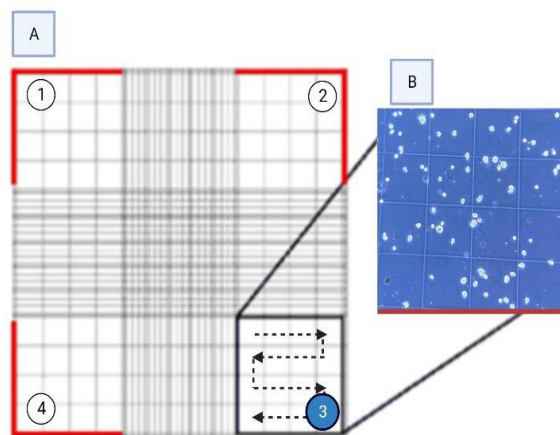
*fd; factor de dilución.*

Células totales:

$$x2 = x1(\text{vol total de la suspensión celular})$$

Viabilidad:

$$x3 = \text{cel vivas} / (\text{cel vivas} + \text{cel muertas}) \times 100$$



**Figura 3.6.4.2. Cámara de Neubauer, vista bajo objetivo de 20X en microscopio óptico. El tercer cuadrante especifica la forma de contar las células y los márgenes rojos las células excluidas. Sección B; coloración azul de tripano con células vivas y muertas.**

### 3.6.4.3 SIEMBRA Y MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

La manipulación de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar vertical. El material utilizado fue esterilizado previamente en autoclave para evitar contaminación. El tamaño del flask está relacionado con el volumen de células a expandir.

Superficie cm <sup>2</sup>	[celular]	Volumen
T25	125.000	3 ml
T75	375.000	6 ml
T175	875.000	12 ml

**Tabla 3.6.4.3. Relación tamaño y volumen del flask con respecto a la concentración celular.**

Se parte realizando un cultivo en flask de 75 cm<sup>2</sup>, mantenido en un incubador a 37°C, bajo una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se reemplazó al día siguiente para eliminar cualquier residuo de DMSO que pudiera interferir con el crecimiento celular y posteriormente se cambió cada 48 o 72 horas, hasta alcanzar una confluencia del 80%.

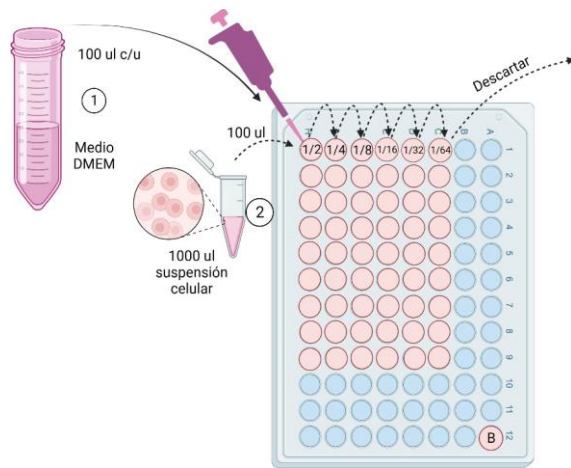
#### 3.6.4.4 PASE CELULAR

Una vez alcanzado el 80% de confluencia, las células se propagaban en un nuevo flask de mayor volumen con el objetivo de expandirse hasta alcanzar el volumen ideal. Se iniciaba retirando el medio y lavando con PBS para retirar los restos de metabolitos celulares; para levantar las células, se añade tripsina al 0,05% (3 ml), y se incubaba en la estufa a 37°C durante 5 min. En el microscopio invertido se verifica el levantamiento e inmediatamente se inactiva la tripsina añadiendo medio de cultivo DMEM (6 ml), con una pipeta serológica de 10 ml, el líquido resultante es vertido en un tubo falcon de 15 ml, se centrifuga a 270 G durante 5 min. Transcurrido el tiempo, el sobrenadante es descartado para eliminar la tripsina y el precipitado se resuspende en medio DMEM (1 ml) y es transferido a un eppendorf de 2 ml. Posteriormente, se realizaba el conteo de las células (ver apartado 3.6.4.2), se retira el volumen necesario de la suspensión y se siembra (ver apartado 3.6.4.3). Se finaliza con la identificación de flask, rotulando el tipo celular, el pase, fecha y nombre del operador.

#### 3.6.5 CULTIVO DE ESFEROIDES.

Una vez las células fueron expandidas en monocapa hasta alcanzar la confluencia y la densidad celular requerida, se procedió a realizar el cultivo de esferoides. Para ello, previamente se realizó un levantamiento y conteo de las células expandidas como se describe en los apartados 3.6.4.2- 3.6.4.4 hasta obtener una suspensión celular madre de 1 ml con una concentración de 400.000 cel.

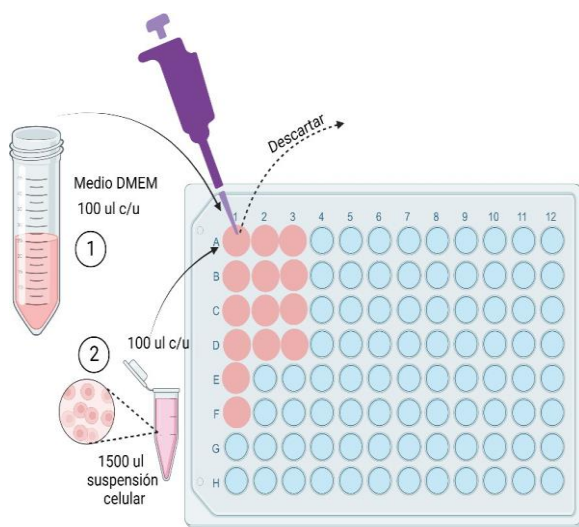
Posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1/2 con 100 µl de la suspensión celular madre y 100 µl de medio DMEM hasta alcanzar un título 1/64. Obteniendo los siguientes volúmenes por pocillo; 20.000, 10.000, 5.000, 2.500, 1.250 y 625 células. La técnica fue ejecutada sobre una placa de 96 pocillos con superficie antiadherente de la casa comercial Facellitate, este tipo de superficies permiten la agregación entre células por medio de uniones adherentes tipo integrina – cadherina, que llevará a la formación de esferoides. La siembra se realizó en un N=3 para evaluar viabilidad celular por Alamar blue, live/dead y características morfológicas en función de los días. Una vez cultivada la placa se incubaba a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 4-5 días.



**Figura 3.6.5. Diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$ .** Primero se agregó 100 µl de medio DMEM a 54 pocillos (desde H1, hasta C9), posteriormente se realizaron diluciones seriadas con 100 µl de la suspensión celular madre desde el pocillo H-1 hasta el pocillo C-1 como se observa en la ilustración, hasta alcanzar un título 1/64. El mismo procedimiento se repite hasta la fila 9, respetando el orden de las filas (H-2/C-2),(H3-C3),(H-4/C-4),(H-5/C-5),(H-6/C-6),(H-7/C-7),(H-8/C-8) y (H-9/C-9). Títulos;  $\frac{1}{2}$  (20.000),  $\frac{1}{4}$  (10.000),  $\frac{1}{8}$  (5.000)  $\frac{1}{16}$  (2.500)  $\frac{1}{32}$  (1.250)  $\frac{1}{64}$  (625). (B) representa el blanco, compuesto por 100 µl de medio DMEM.

Una vez evaluadas las diferentes concentraciones celulares por esferoide, se determina que la más idónea es la de 5000 células. Se realizó un levantamiento y conteo de las células expandidas como se describe en los apartados 3.6.4.2-3.6.4.4 hasta obtener una suspensión celular madre de 1500 µl con una concentración de 145.000 cel.

Para el cultivo de esferoides, se realizaron diluciones  $\frac{1}{2}$  por separado con 100 µl de la suspensión celular madre y 100 µl de medio DMEM en 14 pocillos. Obteniendo un volumen de 5000 cel por pocillo. La placa fue cultivada como se ilustra en la figura 3.6.5.1 y se tuvo en cuenta un N=3 para evaluar viabilidad celular por Alamar blue y live/dead de esferoides recubiertos con polímero y sin recubrir. También se incluyeron controles; un control positivo (esferoide recubierto con polímero/fluoróforo) y un control negativo (esferoide sin recubrimiento). La placa fue incubada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas. La técnica de recubrimiento con polímero se describe en el apartado 3.6.7.



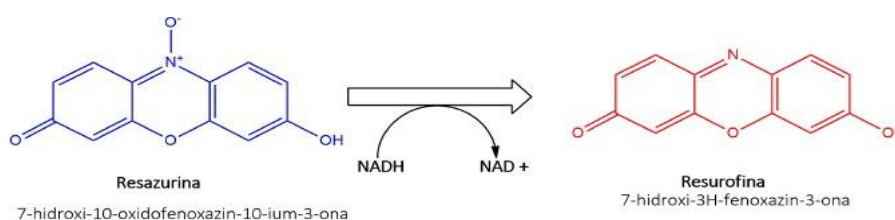
**Figura 3.6.5.1. Cultivo de 14 esferoides a partir de diluciones  $\frac{1}{2}$ .** Esferoides sin recubrimiento polimérico; fila A/1-3 (live/dead), Fila B/1-3 (alamar blue). Esferoides con recubierto polimérico; fila C/1-3 (live/dead), Fila D/1-3 (alamar blue). E-1 Control positivo. F-1 control negativo.

### 3.6.6 VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar el metabolismo celular de los esferoides se utilizaron las técnicas de alamar blue y live/dead.

#### 3.6.6.1 ALAMAR BLUE O RESAZURINA

La resazurina es un compuesto de color azul, no tóxico, capaz de penetrar la membrana celular y reducirse a resurofina, que es excretada al medio extracelular, siendo una técnica sencilla para evaluar el metabolismo celular porque no se requiere lisis celular. Así mismo, tanto la resazurina como la resurofina son hidrosolubles, lo que permite que ambos compuestos sean solubles en medio de cultivo.



**Figura 3.6.6.1. Reducción de resazurina dentro de las células.**

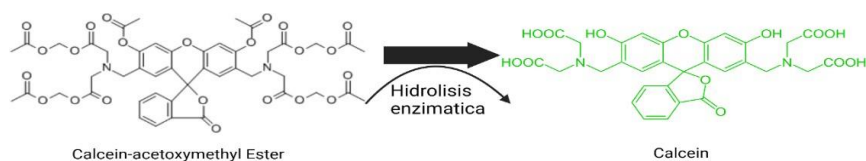
Una vez finalizada la incubación de los esferoides, se retiró el medio de cada pocillo y fue reemplazado por 100 µL de una dilución 1/10 de resazurina preparada en DMEM. La placa fue incubada durante la noche a 37°C, bajo oscuridad, pasado el tiempo de incubación, se determinó la intensidad de la absorbancia de cada pocillo usando un lector de microplacas SpectraMax iD3. La longitud de onda de excitación fue de 530 nm y la de emisión se registró a 590 nm. Para cada experimento se incluyeron blancos experimentales los cuales contenían DMEM y resazurina con el fin de determinar la autorreducción de la resazurina durante la incubación.

La viabilidad de los esferoides se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad de esferoides} = (\text{abs esferoides} - \text{abs blanco}) \times 100.$$

##### 3.6.6.1.1 LIVE AND DEAD.

Este ensayo discrimina las células vivas de las muertas mediante la tinción simultánea con calceína AM y homodímero-1 de etidio. La calceína AM es capaz de penetrar la membrana celular, una vez dentro, las esterasas intracelulares hidrolizan el grupo acetoximetil (AM) ester, liberando la calceína que es altamente fluorescente (verde); hidrólisis indicativa de metabolismo y actividad celular. Por el contrario, el homodímero-1 de etidio (rojo) es un colorante nuclear cargado, que es incapaz de ingresar al interior de células vivas. Solo es capaz de llegar al núcleo si la célula ha perdido la integridad de membrana y, por tanto, indicativo de lisis y muerte celular.



**Figura 3.6.6.1.1. Hidrólisis enzimática intracelular de la calceína AM.**

Transcurrido el tiempo de incubación de los esferoides, se retiró un 50 % del medio de cada pocillo y se realizaron tres lavados por dilución con 150  $\mu\text{L}$  de PBS, en el último lavado se retiraron 100  $\mu\text{L}$  y se dejaron 50  $\mu\text{L}$  de PBS con el objetivo de no arrastrar el esferoide. Posteriormente, los esferoides fueron trasladados a otra placa multipocillo con superficie no tratada y se agregó una disolución con una concentración 2 $\mu\text{M}$  de calceína y 4  $\mu\text{M}$  de homodímero-1 de etidio en PBS. La placa fue incubada 40 min a 37°C bajo oscuridad. Los reactivos empleados fueron de la casa comercial Invitrogen Thermo Fisher Scientific.

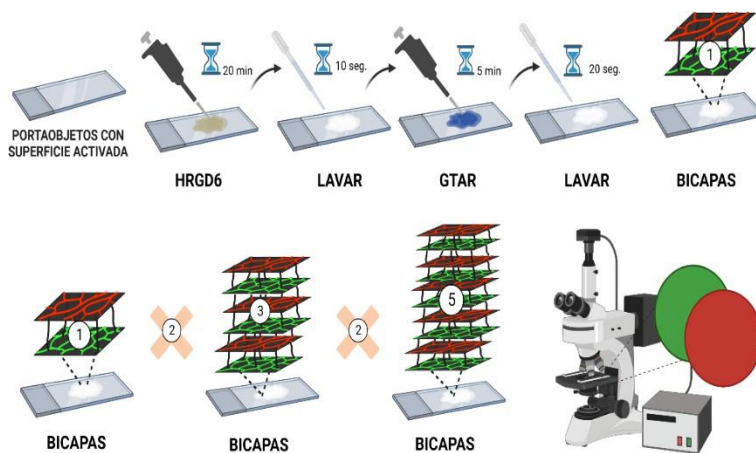
Finalmente, se observaron los esferoides usando un microscopio confocal (Leica DMI8) en los canales alexa 532 para rojo (excitación 590 nm - emisión 650 nm) y calcein green para verde (excitación 491 nm – emisión 528 nm).

### 3.6.7 RECUBRIMIENTOS POR LAYER BY LAYER (LBL).

LBL es una técnica que fabrica películas delgadas por deposición en capas alternas de materiales con cargas opuestas y permite recubrir superficies de distintas geometrías. Se pueden obtener por diferentes métodos; inmersión, centrifugado, deposición, pulverización, electromagnetismo o fluidica [82].

La técnica se optimizó mediante el uso de superficies de vidrio implementado como material portaobjetos de microscopía. Para ello, las láminas de vidrio fueron activadas por plasma en un equipo Harrick Plasma Cleaner PDC-002, con el objetivo de eliminar cualquier partícula que pudiera interferir en la adherencia del polímero y a su vez propiciar una superficie hidrofílica que se asemeje a la membrana celular por medio de la incorporación de grupos hidroxilos al portaobjeto. Este procedimiento se llevó a cabo en la cámara del Plasma Cleaner y se genera plasma de argón y, posteriormente, de oxígeno durante 10 min. Se comprobó la activación antes y después del tratamiento con plasma midiendo el ángulo de contacto en la superficie de vidrio. El ángulo es medido con una gota de agua que cae por contacto estrecho sobre la superficie, esta gota es capaz de discernir entre superficies hidrofílicas e hidrofóbicas, por medio de las fuerzas adhesivas y cohesivas que existen entre el líquido y el sólido. Ante fuerzas de adherencia altas, el líquido es atraído por el sólido observándose una gota extendida con un ángulo menor de 90° (superficie hidrofílica). Si por el contrario las fuerzas de adhesión son débiles, el líquido se repele observándose una gota redonda casi perfecta con un ángulo mayor de 90° (superficie hidrofóbica).

Para el recubrimiento se utilizaron los polímeros químicamente modificados HRGD<sub>6</sub>-N3-F y GTAR-CC-F. Los mismos fueron disueltos en PBS por separado, a una concentración de 5 mg/ml y temperatura de 4°C. Para la primera capa se depositaron 50 µL de HRGD<sub>6</sub>-N3-F sobre la superficie de vidrio activada, dejando actuar 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente la superficie fue lavada con PBS y se realizó la segunda capa depositando 50 µL de GTAR-CC-F, dejando actuar 5 min a temperatura ambiente, se lavó después con PBS; como resultado se obtuvo una capa doble o bicapa unida por los grupos azidos y ciclooctinos de los polímeros. Se llevó a cabo el mismo procedimiento para conformar tres y cinco bicapas (ver figura 15). Finalmente, se comprobó la adherencia de las bicapas al vidrio por medio de dos técnicas: ángulo de contacto en un equipo Contact Angle System OCA de la empresa Dataphysics y microscopía de fluorescencia (exposición 1 seg - ganancia 4x) en un microscopio invertido Nikon ECLIPSE Ti.



**Figura 3.6.7. Recubrimientos sobre superficies de vidrio mediante deposiciones por capas de los polímeros HRGD<sub>6</sub>-N3-F y GTAR-CC-F. Obteniendo tres superficies recubiertas con una, tres y cinco bicapas.**

Una vez puesta a punto la técnica, se procedió al recubrimiento sobre los esferoides de 5000 células, los cuales se encontraban suspendidos en una placa de 96 pocillos y fueron lavados previamente con PBS para remover el DMEM. Cada pocillo admite un volumen final de 200 µL. Por tanto, se inició removiendo 150 µL de DMEM del pocillo y posteriormente se agregó 150 µL de PBS, el procedimiento se repitió por triplicado y siempre manteniendo la previsión de dejar un remanente de 50 µL para no llevar el esferoide durante el pipeteo.

Una vez retirado el medio DMEM, se inició la deposición de las capas poliméricas, llevando a cabo prácticamente la misma metodología de LBL antes descrita. Los polímeros fueron disueltos previamente a una concentración de 10 mg/ml, a una temperatura de 4°C. La primera capa se realizó depositando 50 µL de HRGD<sub>6</sub>-N3-F sobre los esferoides que se encontraban contenidos en los pocillos con 50 µL de PBS, dejando actuar por 20 min. Posteriormente se lavaron los esferoides, para remover los remanentes del HRGD<sub>6</sub>-N3-F. Para ello, se inició agregando 100 µL de PBS, completando hasta un volumen final por pocillo de 200 µL y luego se retiraron 150 µL de PBS, dejando 50 µL para no llevar el esferoide. Para la segunda capa se implementó el polímero GTAR-CC-F, llevando a cabo el mismo procedimiento de recubrimiento y de lavado que para HRGD<sub>6</sub>-N3-F. La única diferencia es que el tiempo de exposición para el recubrimiento fue de 5

min en vez de 20 min.

Como resultado se obtuvo una capa doble o bicapa unida por los anillos de triazol generados entre los grupos azido y ciclooctinilo de los polímeros. Se llevó a cabo la misma técnica para conformar tres bicapas, repitiendo el número de veces necesarias los recubrimientos. Finalmente, se comprobó la adherencia de las bicapas por microscopía de fluorescencia con una longitud de emisión de 518 nm para HRGD<sub>6</sub>-N3-F y 665 nm para GTAR-CC-F (ganancia 100%), el equipo utilizado fue un microscopio confocal Leica DMI8.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.1 BIOPRODUCCIÓN

Para producir el polímero HRGD<sub>6</sub> fue necesario seleccionar una colonia de *Escherichia coli* productora. Para ello, inicialmente fueron seleccionadas 8 colonias de *E. coli* tras la siembra del glicerol stock en placa Petri. Para discernir entre las colonias y seleccionar la que mejor se exprese, se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). En general todas las colonias corresponden con un PM alrededor de 60 KDa que es proporcional con el PM del polímero HRGD<sub>6</sub>, sin embargo, la colonia que mejor se expresa la banda electroforética es la número 6 haciéndola ideal para la bioproducción (ver figura 4.1.1).

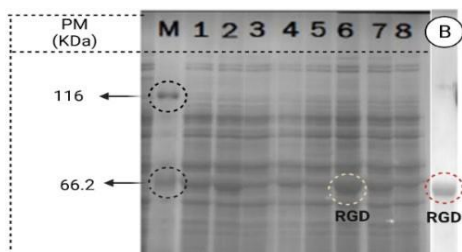
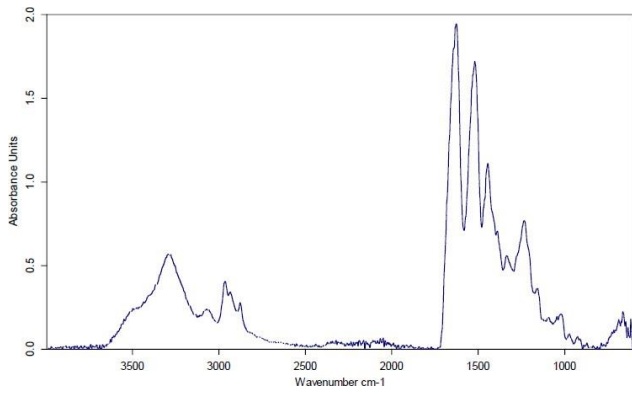


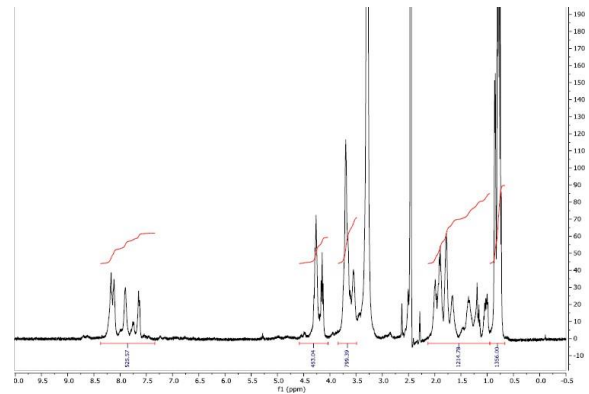
Figura 4.1.1. Screening de las 8 colonias. B representa el PM del polímero después de la bioproducción. (M) corresponde al marker y (1-8) colonias.

Finalizada la bioproducción, la cantidad de polímero obtenido fue de 2.238 mg. Se evalúa el PM (ver parte B de la figura 4.1.1), por medio de SDS-PAGE, verificando la eliminación de restos celulares y cualquier otro componente que pueda interferir con la pureza del polímero. Se puede observar una única banda a la altura del PM de HRGD<sub>6</sub> (60598Da).

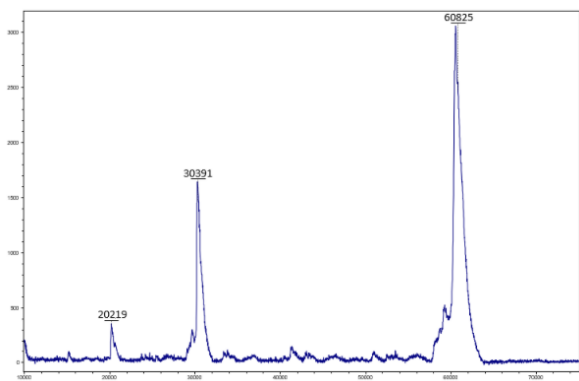
Posteriormente, se caracteriza el polímero por medio de las técnicas instrumentales; FTIR, RMN, MALDI-ToF y DSC.



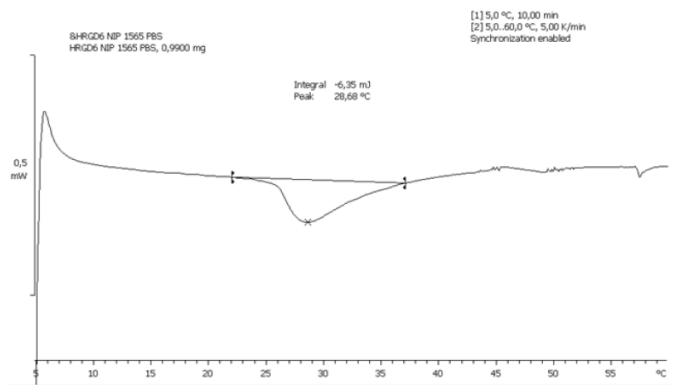
**FTIR. Bandas características sobre 3000 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a los grupos aminos (N-H) primarios y secundarios y a 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  señal de los grupos amida**



**Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del polímero HRGD<sub>6</sub>**



**MALDI-ToF. Representa el PM de HRGD<sub>6</sub> (60825 Da)**



**DSC. Temperatura de transición de 29°C para HRGD<sub>6</sub>**

**Figura 4.1.1.2 Caracterización química del polímero HRGD<sub>6</sub>.**

#### 4.1.2 MODIFICACIÓN QUÍMICA DEL POLÍMERO GTAR CON CICLOOCTINO Y CARACTERIZACIÓN

El polímero GTAR se ha sometido a una modificación química a través de los grupos amino de las lisinas que permite la introducción de grupos ciclooctinilo. Se modifica el polímero con 0.6 equivalentes de (1R, 8S, 9S)-bicyclo (6.1.0.) non-4-in-9-ilmetil succinidimil carbonato. De esta forma, se produce la reacción de amidación entre los grupos amino presentes en la cadena lateral de los aminoácidos lisina y el derivado de NHS-éster portador de un anillo de ciclooctino. Se obtiene un rendimiento químico del 76%.



Figura 4.1.2. Modificación de GTAR con grupos ciclooctinilo

El GTAR-CC es caracterizado por las técnicas instrumentales; FTIR, RMN, y MALDI-ToF.

##### FTIR. GTAR-CC.

El espectro de radiación infrarroja de GTAR-CC es similar al del polímero sin modificar, con bandas características sobre  $3000$  a  $3500\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a los grupos aminos (N-H) primarios y secundarios, así como bandas de absorción a  $1700$ - $1600\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los grupos amido.

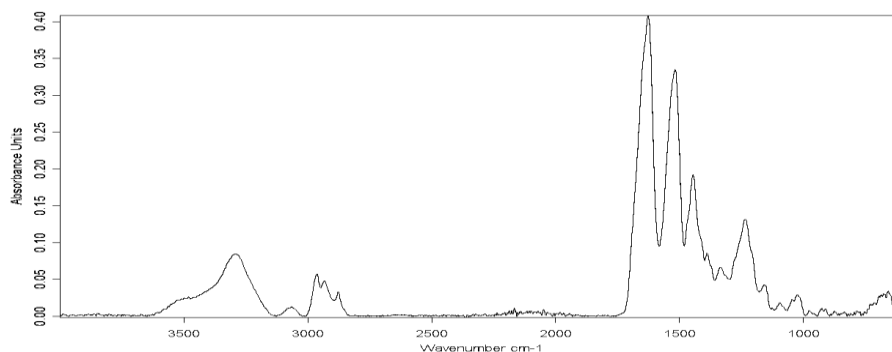


Figura 4.1.2.1. FTIR. GTAR-CC

##### RMN. GTAR-CC.

Se representa el desplazamiento químico de los protones del polímero, así como el valor de las integrales de sus señales correspondientes. Analizando la señal que aparece sobre 7.1 ppm, que integra por 18.63 protones, observamos que se produce un solapamiento de dos señales: la propia del protón del carbamato formado a partir del grupo amino de la lisina y otra señal de un protón aromático del propio GTAR que corresponde al mismo número de protones que la señal que aparece a 6.5 ppm. De la diferencia de integrales podemos deducir que se han modificado 9.4 lisinas de las 16 presentes en el polímero. Dado que con 0,6

equivalentes solo se puede modificar el 60% de las lisinas (9.6 lisinas), se puede considerar que se ha producido una conversión del 98%.

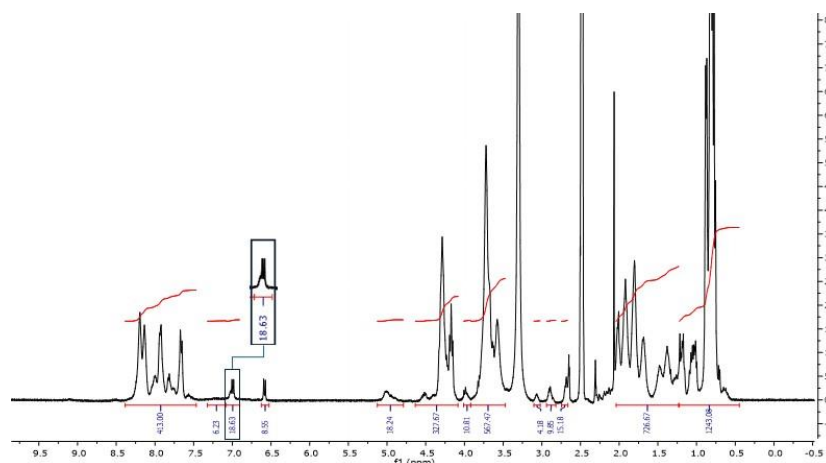


Figura 4.1.2.2. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del polímero GTAR-CC

### MALDI-ToF. GTAR-CC.

El espectro de masas detecta el PM de polímero modificado (43404Da), comparándolo con el peso inicial (41854Da), se puede obtener la diferencia entre los pesos moleculares (1550Da). Conociendo la masa del grupo ciclooctinilo que se está introduciendo con la modificación química (176Da), se puede calcular el número de lisinas modificadas. Se han modificado 8.8 lisinas de los 16 totales, es decir, 0.55 equivalentes. Por tanto, se obtiene una conversión del 91.7%

$$n^{\circ} \text{ lys modificadas} = \frac{PM \text{ GTARcc} - PM \text{ GTAR}}{PM \text{ ciclooctino}}$$

$$= \frac{43404 \text{ Da} - 41854 \text{ Da}}{176 \text{ Da}} = 8.81$$

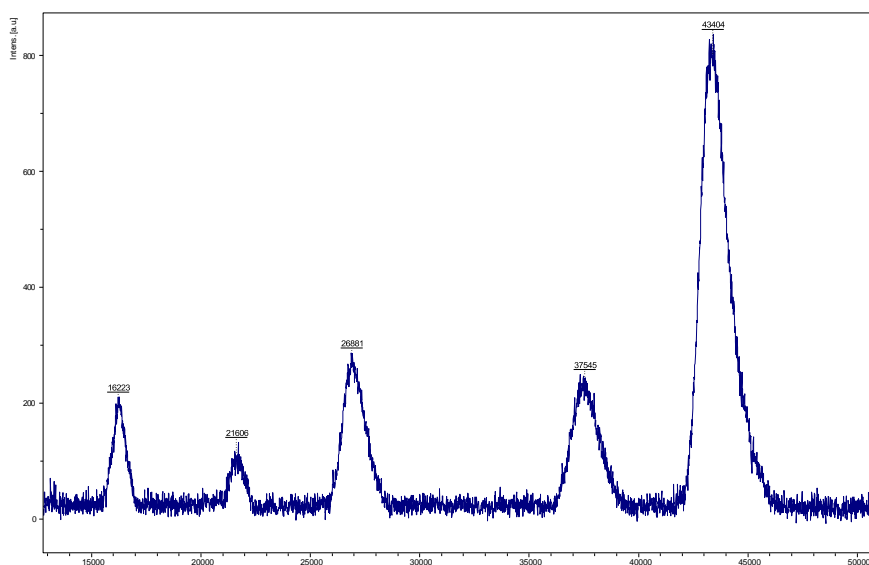


Figura 4.1.2.3. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) de GTAR-CC. PM 43404 Da.

### 4.1.3 MODIFICACIÓN QUÍMICA DEL POLÍMERO HRGD<sub>6</sub> CON GRUPOS AZIDO Y CARACTERIZACIÓN.

Utilizando el mismo mecanismo que el GTAR, el polímero HRGD<sub>6</sub> se ha sometido a una modificación química en los grupos amino de las lisinas que permite la introducción de grupos azido. Se modifica el polímero con 0.6 equivalentes de 2-(azidoetil) (2,5- dioxipirrolidin-1-il) carbonato. Obteniendo un rendimiento químico del 80%.

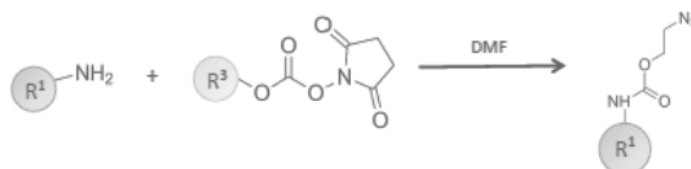


Figura 4.1.3. sustitución de grupos aminos de las lisinas por grupos azidos en HRGD<sub>6</sub>.

El HRGD<sub>6</sub>-N<sub>3</sub> es caracterizado por FTIR, RMN, y MALDI-ToF.

#### FTIR. HRGD<sub>6</sub>-N<sub>3</sub>.

Además de las bandas de absorción ya descritas para el polímero de partida, se puede observar la modificación del HRGD<sub>6</sub> con grupos azido, por la presencia de la banda característica de los azidas sobre 2100 cm<sup>-1</sup> que no se observa en el espectro del polímero sin modificar.

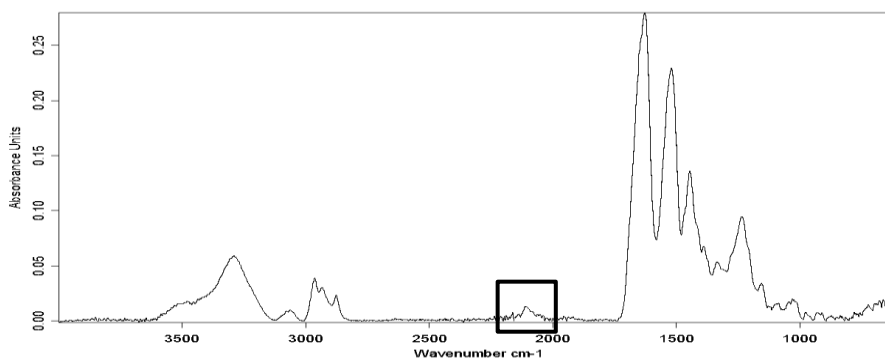


Figura 4.1.3.1. FTIR RGD-N<sub>3</sub>.

#### RMN. HRGD<sub>6</sub>-N<sub>3</sub>.

Se representa el valor de las integrales y el desplazamiento químico. Se aprecia el número de lisinas modificadas. La señal que aparece sobre 7.3 ppm corresponde al hidrogeno del carbamato formado a partir de los grupos amino de las lisinas modificadas. Integrando el espectro de protón y analizando esta señal se conoce el número de lisinas del polímero que se han modificado. La señal que aparece sobre 7,3 ppm integra por 15,13 protones, indicando que se han modificado 15 lisinas de 24 presentes en el polímero. Dado que con 0,6

equivalentes solo se pueden modificar un 60% de las lisinas (14 lisinas), se puede considerar que se ha producido una conversión casi del 100%.

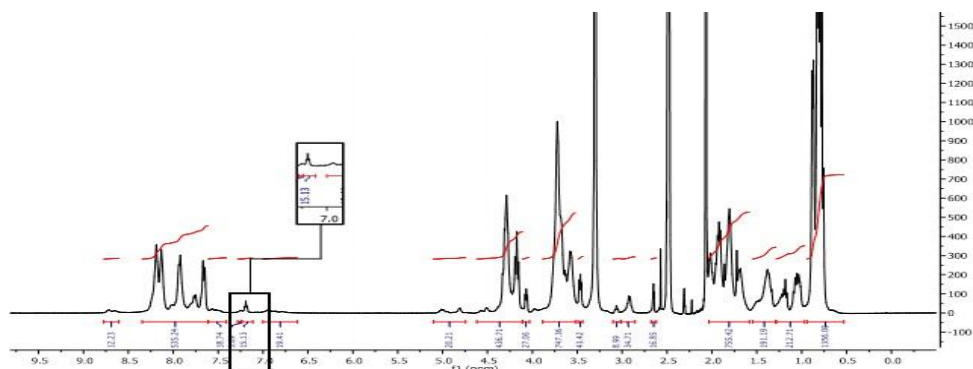


Figura 4.1.3.2. Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  del polímero de RGD-N3.

### MALDI-ToF. HRGD<sub>6</sub>-N3.

El PM de polímero modificado es (62544Da), comparándolo con el peso inicial (60825Da), se puede obtener la diferencia entre los pesos moleculares (1719Da). Conociendo la masa del grupo azido que se está introduciendo con la modificación química (113Da), se puede calcular el número de lisinas modificadas:

$$n^{\circ} \text{ lys modificadas} = \frac{PM \text{ HRGD6} - N3 - PM \text{ HRGD6}}{PM \text{ AZIDA}}$$

$$= \frac{62544 \text{ Da} - PM \text{ 60825 Da}}{113 \text{ Da}} = 15,22$$

Se han modificado 15 lisinas de 24, es decir, el porcentaje de sustitución ha sido del 60% y, por tanto, un rendimiento de la conversión del 100%, teniendo en cuenta los equivalentes utilizados en la reacción.

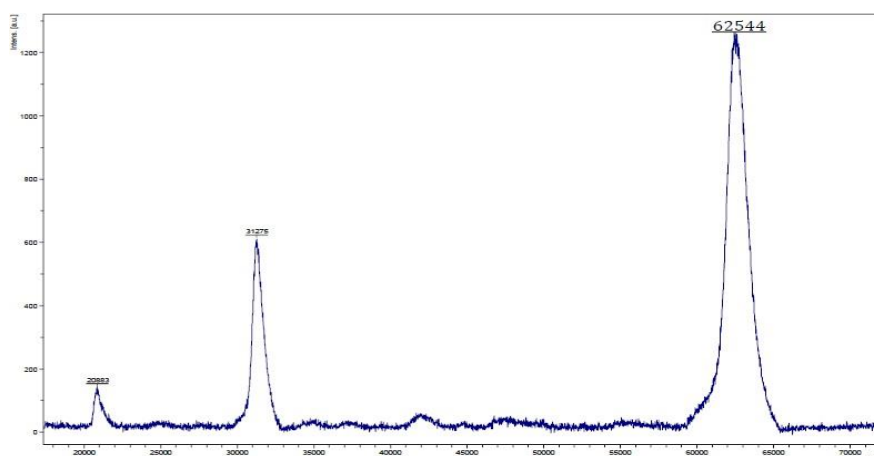


Figura 4.1.3.4. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del HRGD<sub>6</sub>-N3. PM 62544 Da

Antes de efectuar la caracterización por los métodos instrumentales a los polímeros modificados GTAR-CC y HRGD<sub>6</sub>-N3; se realizó previamente una electroforesis en gel de poliácridamida para comprobar que, durante la reacción, los polímeros no hayan sufrido degradación química. Se comprobó el PM para cada uno de ellos.

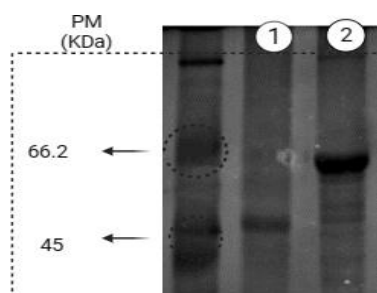


Figura 4.1.3.4 Electroforesis SDS-PAGE. (2) HRGD<sub>6</sub>-N3 PM 62544 Da. (1) GTAR-CC PM 43404

#### 4.1.4 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE HRGD<sub>6</sub>-N3 Y GTAR-CC CON FLUORÓFORO.

Ambos polímeros han sido modificados químicamente añadiendo una molécula de fluoróforo por reacción de amidación con el derivado NHS-éster. Se obtuvo un rendimiento químico del 67% para HRGD<sub>6</sub>-N3 con el fluoróforo NHS-Fluoresceína y del 55% para GTAR-CC con el fluoróforo cyanine5-NHS. Se comprobó la adición del marcador por medio de MALDI-ToF, comparando la diferencia entre los pesos moleculares (ver figuras 4.1.4.5 y 4.1.4.6) y por medio de su espectro de <sup>1</sup>H-NMR, estudiando las nuevas señales presentes en el espectro del producto modificado.



Figura 4.1.4.1. Modificación de los polímeros con su respectivo marcador. (A) F1 representa la adición del fluoróforo NHS-fluoresceína al grupo amino de HRGD<sub>6</sub>-N3. (B) F2 representa la adición del fluoróforo cyanine5-NHS al grupo amino de GTAR-CC.

#### RMN. HRGD<sub>6</sub>-N3-F.

El espectro de NMR muestra ligeros cambios en la zona de 6.5-7.0 ppm perteneciente a los nuevos protones aromáticos introducidos con la molécula del fluoróforo, especialmente dos señales nuevas a 6.6 y 6.7 ppm.



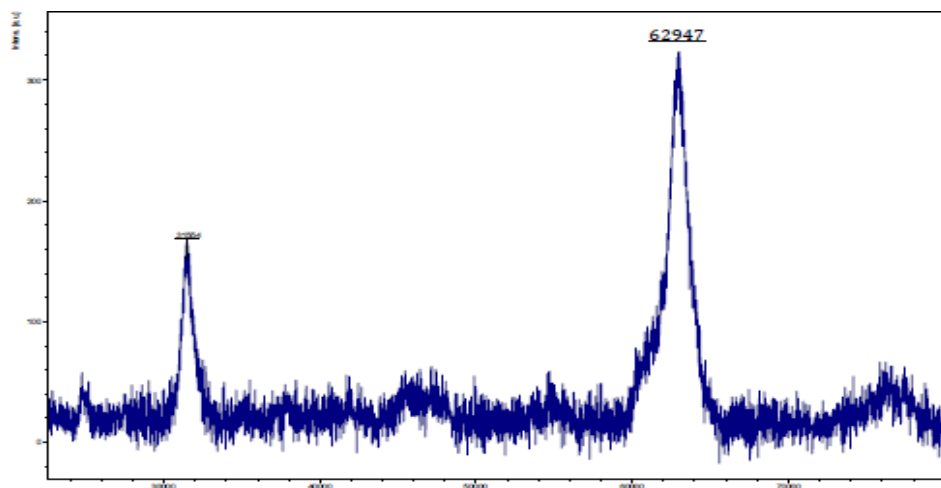


Figura 4.1.4.5. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del HRGD6-N3-F. PM 62947 Da.

**MALDI-ToF. GTAR-CC-Cy5.** El PM de polímero modificado es 43637 g/mol, comparándolo con el peso inicial (43404 g/mol), se puede obtener la diferencia entre los pesos moleculares de 233 g/mol, similar al peso molecular del fluoróforo.

Por lo tanto, podemos corroborar la modificación deseada del polímero GTAR-CC-Cy5 con una molécula de fluoróforo.

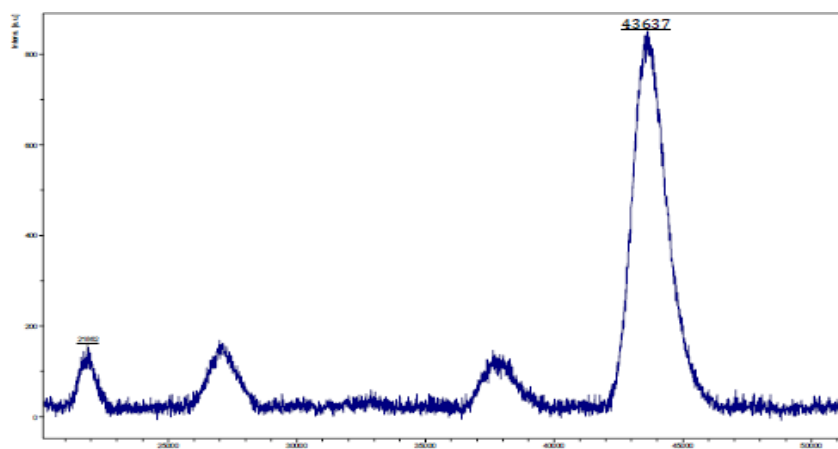
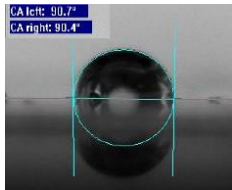

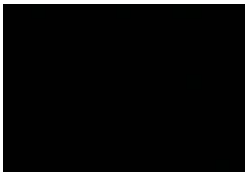

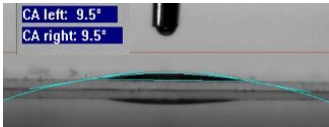

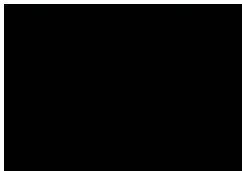

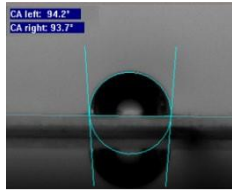

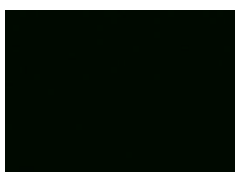
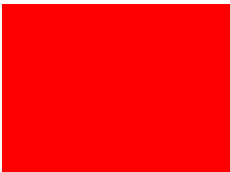
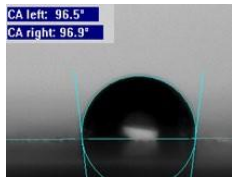








Figura 4.1.4.6. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del GTAR-CC-Cy5. PM 43637 Da.

#### 4.1.5 LBL EN LÁMINAS DE VIDRIO.

Como se mencionó en el apartado 3.6.7, para los recubrimientos en portaobjetos de vidrio fue necesario activar la superficie por plasma cleaner. Se realizaron mediciones por ángulo de contacto antes y después del plasma, comprobando la activación. Posteriormente, se ejecutaron los recubrimientos con los polímeros RGD-N3-F y GTAR-CC-Cy5 a una concentración de 5 mg/ml, sobre tres láminas de vidrio, obteniendo tres LBL distintos; 1 bicapa, 2 bicapas y 3 bicapas.

Finalmente, los recubrimientos se evaluaron por microscopia de fluorescencia y por ángulo de contacto, comprobando la presencia de los polímeros sobre la superficie del cubreobjetos (ver tabla 4.1.5.1).

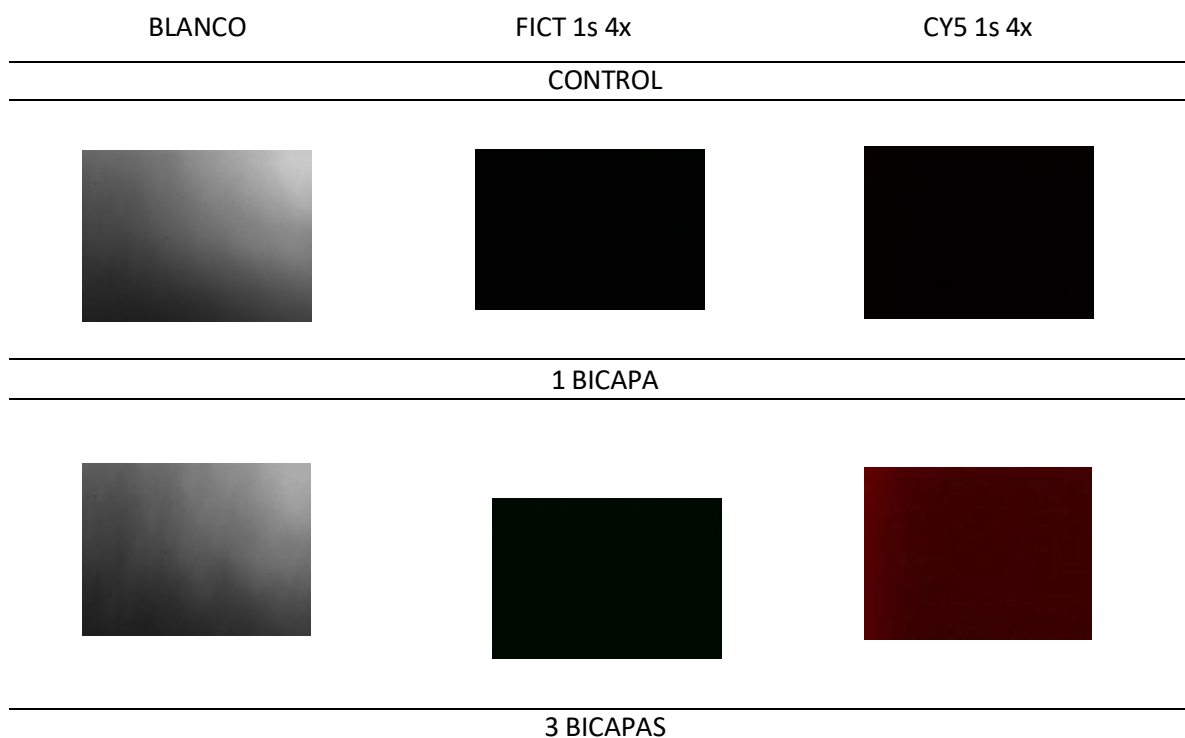
	ÁNGULO DE CONTACTO	BLANCO 1s 1x	FICT 1s 4x	CY5 1s 4x
SIN PLASMA				
CON PLASMA				
1 BL				
3 BL				
5 BL				

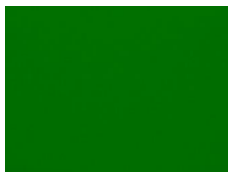
**Tabla 4.1.5.1. Activación por plasma y recubrimiento en vidrio por LBL. Medición por ángulo de contacto para 1-3-5 bicapas. FICT (518 nm); canal de emisión para el fluoróforo NHS-Fluoresceína acoplado al polímero RGD-N3. CY5 (665 nm); canal de emisión para el fluoróforo cyanine5-NHS ester acoplado al polímero GTAR-CC. Microscopia de fluorescencia; objetivo 4x – exposición 1 segundo. Blanco; visualización en campo claro.**

Se puede apreciar cómo disminuye el ángulo de contacto una vez que se activa la superficie, como consecuencia de la aparición de grupos hidroxilos, obteniendo como resultado una superficie hidrofílica. A medida que aumentan las bicapas depositadas sobre la superficie, aumenta a su vez el ángulo de contacto, consecuencia de la mayor hidrofobicidad de la superficie analizada.

Además, este análisis es indicativo de la adherencia de los polímeros a la superficie activa. Con respecto a los canales de fluorescencia (FICT - CY5); para FICT se observa un cambio de intensidad progresiva a medida que aumenta el número de capas de RGD-N3. En el caso de GTAR-CC se puede apreciar el color rojo muy intenso a partir de la primera capa depositada. Se atribuye a una saturación del canal CY5, que se produce para las tres bicapas; sin embargo, indica la presencia del polímero detrás la reacción click entre los polímeros de cada bicapa.

Con objeto de eliminar la saturación del polímero GTAR-CC-cy5, se realizaron diluciones 1/50, 1/100, 1/200 y 1/300, utilizando disoluciones del polímero GTAR-CC (polímero llamado "frío"). Para ello, se realizaron dos disoluciones poliméricas con una concentración de 5 mg/ml. Para la primera se pesó GTAR-CC (15 mg) y se diluyó en PBS (3 ml) y para la segunda se pesó GTAR-CC-cy5 (5 mg) y se diluyó en PBS (1 ml), posteriormente se realizó una dilución 1/50 con 12,25 ml de la disolución de GTAR-CC y 250 µl de la disolución de GTAR-CC-cy5. Finalmente, se realizaron tres diluciones seriadas 1/2 a partir de la dilución 1/50. La dilución que presentó el porcentaje de saturación más adecuado fue 1/100, siendo seleccionada para repetir el recubrimiento. Una vez dispuestas las capas, se observó un ligero cambio de intensidad progresiva en el canal CY5 para GTAR-CC, sin embargo, no en la misma proporción del RGD-N3 emitida por el canal FICT. En este caso, el aumento progresivo de la intensidad se debe a las deposiciones capa a capa del RGD-N3 y a su vez al fenómeno click que genera con el polímero GTAR-CC, obteniendo como resultado el recubrimiento esperado.





---

5 BICAPAS

---



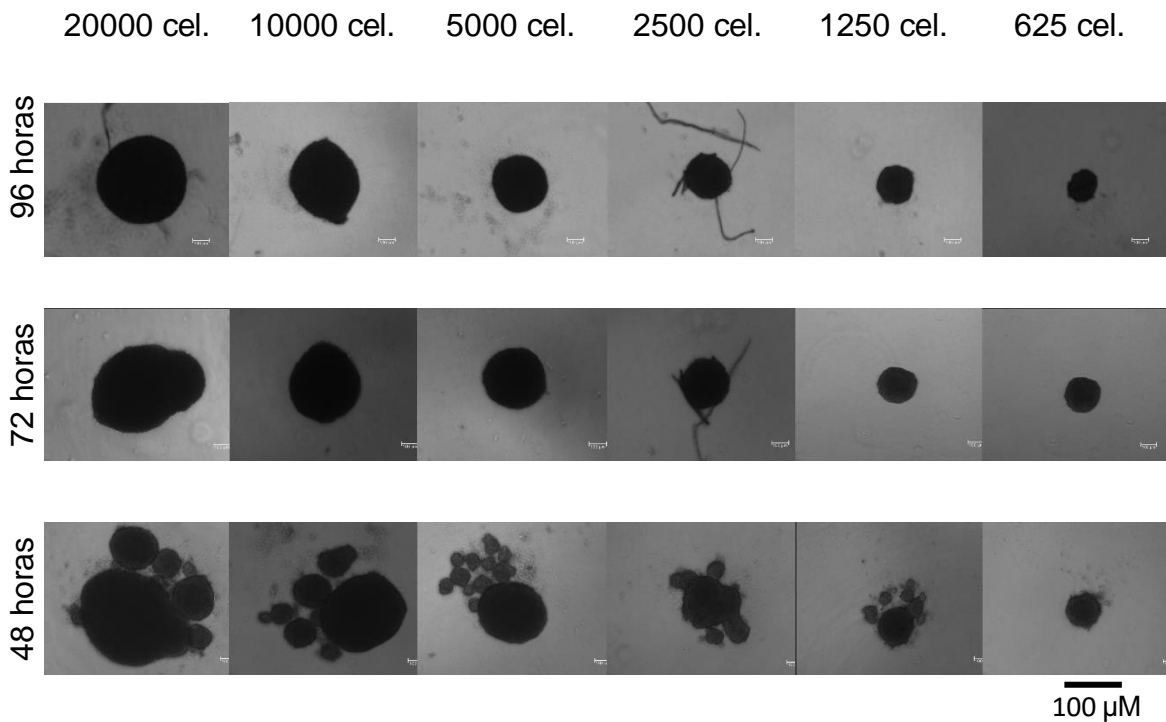
*Tabla 4.1.5.2. Recubrimiento en vidrio por LBL. FICT (518 nm); canal de emisión para el fluoróforo NHS-Fluoresceína acoplado al polímero RGD-N3. CY5 (665 nm); canal de emisión para el fluoróforo cyanine5-NHS ester acoplado al polímero GTAR-CC. Microscopia de fluorescencia; objetivo 4x – exposición 1 segundo. Blanco; visualización en campo claro.*

#### 4.1.6 CULTIVO DE ESFEROIDES

Con el objetivo de poner a punto el método de obtención y selección del tamaño idóneo de los esferoides, se realizaron cultivos de células en superficie de baja adherencia a diferentes concentraciones. Como criterio de discriminación se utiliza tanto la morfología tridimensional como la viabilidad celular (alamar blue - live and dead).

##### 4.1.6.1 MORFOLOGÍA DE ESFEROIDES

En el diseño experimental se depositaban en placas de 96 pocillos: 20.000, 10.000, 5.000, 2.500, 1.250, 625 células, por medio de la siembra de un mismo volumen de disoluciones celulares de distintas concentraciones. El crecimiento y formación del esferoide se documentó desde las 48 hasta las 96 horas de cultivo. Dentro de las primeras 48 horas del cultivo de los esferoides, se observan varias etapas como la sedimentación de las células en el fondo del pocillo y la formación de un agregado flojo de células vía integrinas-matriz extracelular (MEC). A continuación, se observa un periodo de retraso, en el cual se incrementa la expresión y acumulación de cadherinas para finalmente compactarse y formar los esferoides a través interacciones cadherina-cadherina. Una vez formados los esferoides, se documentó fotográficamente la evolución de sus características morfológicas a 48, 72, 96 horas.



*Figura 4.1.6.1. Evolución del crecimiento de los esferoides de MSC a diferentes densidades celulares. Microscopio óptico objetivo 10x.*

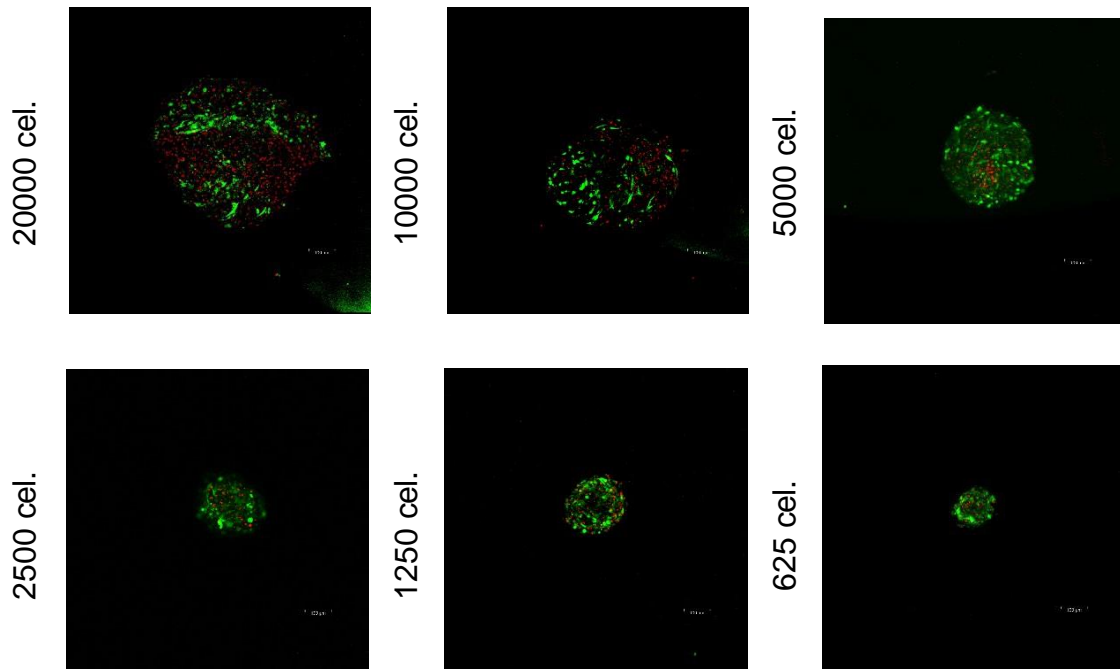
En la figura 4.1.6.1 se puede observar un collage de fotografías adquiridas de los esferoides a distintos tiempos de cultivo y a diferente densidad celular. Es apreciable como, pasada las 72 horas, los esferoides reducen su tamaño de manera significativa en comparación a los esferoides de 48 horas. Este fenómeno es indicativo de que las células se encuentran en fase C de compactación (ver figura 1.11) en donde hay un grado mayor de interacción entre las células vía cadherinas, siendo especialmente notorio en los esferoides de mayor densidad celular. Pasada la fase de compactación, como se puede observar en las imágenes, el esferoide con mejor simetría es el de 5000 células.

#### 4.1.6.2 VIABILIDAD DE ESFEROIDES

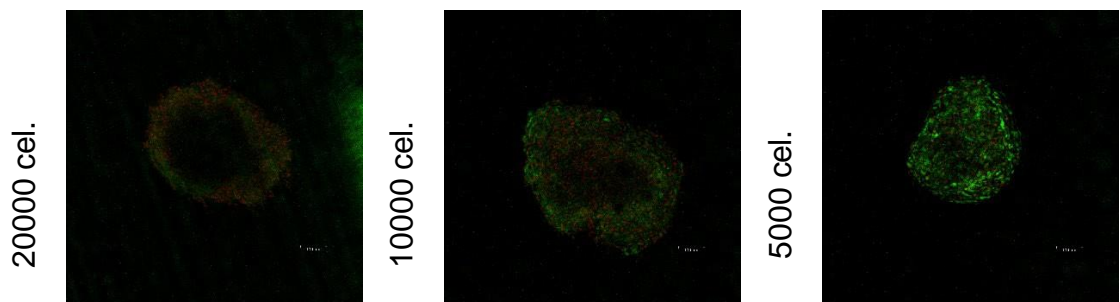
En busca del esferoide ideal para el recubrimiento, se hicieron estudios de viabilidad para distintas concentraciones celulares en diferentes periodos de tiempo. El esferoide ideal es aquel que dentro de su composición presenta la mayor cantidad de células metabólicamente activas y a su vez sea capaz de mantener la viabilidad durante un periodo de tiempo. La viabilidad del esferoide se documentó fotográficamente desde las 48 hasta las 96 horas de incubación. La discriminación de células vivas y muertas se llevó a cabo por la técnica de live and dead, en donde el homodímero-1 de etidio tiñe de rojo el núcleo de células muertas que pierden la integridad de la membrana y la calceína tiñe de verde las células vivas una vez liberada por enzimas intracelulares.

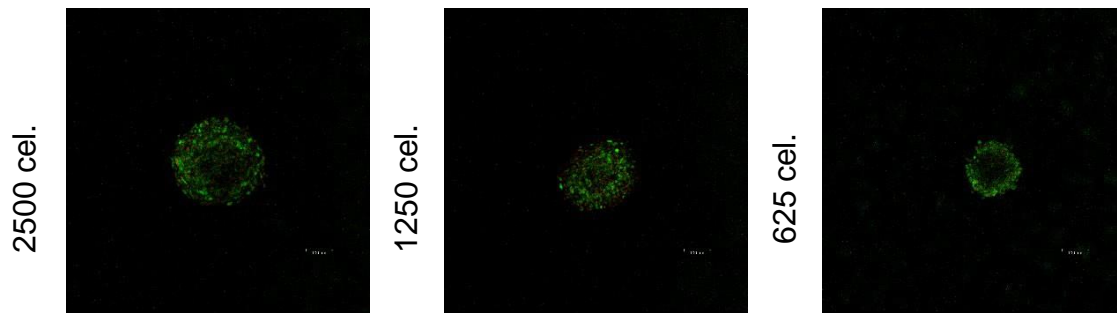
En la figura 4.1.6.2 se puede observar cómo decae la viabilidad al cabo de 96 horas en cultivo, se aprecia mayor cantidad de células muertas que vivas, para cuatro de seis esferoides (10.000, 2.500, 1.250, 625 cel) la zona mayormente afectada es la interna; a mayor tiempo de cultivo más compactado se encontrará el esferoide lo que desfavorece el acceso de nutrientes y oxígeno, trayendo consigo necrosis de las células centrales. Para concentraciones celulares altas (20000-10000cels) es notoria una proporción de células muertas a partir de las 48 horas de incubación por que la alta densidad celular retarda la circulación y difusión de nutrientes desde el medio de cultivo al esferoide, esta demora trae perdida de vitalidad y muerte celular.

#### 48 HORAS DE INCUBACIÓN

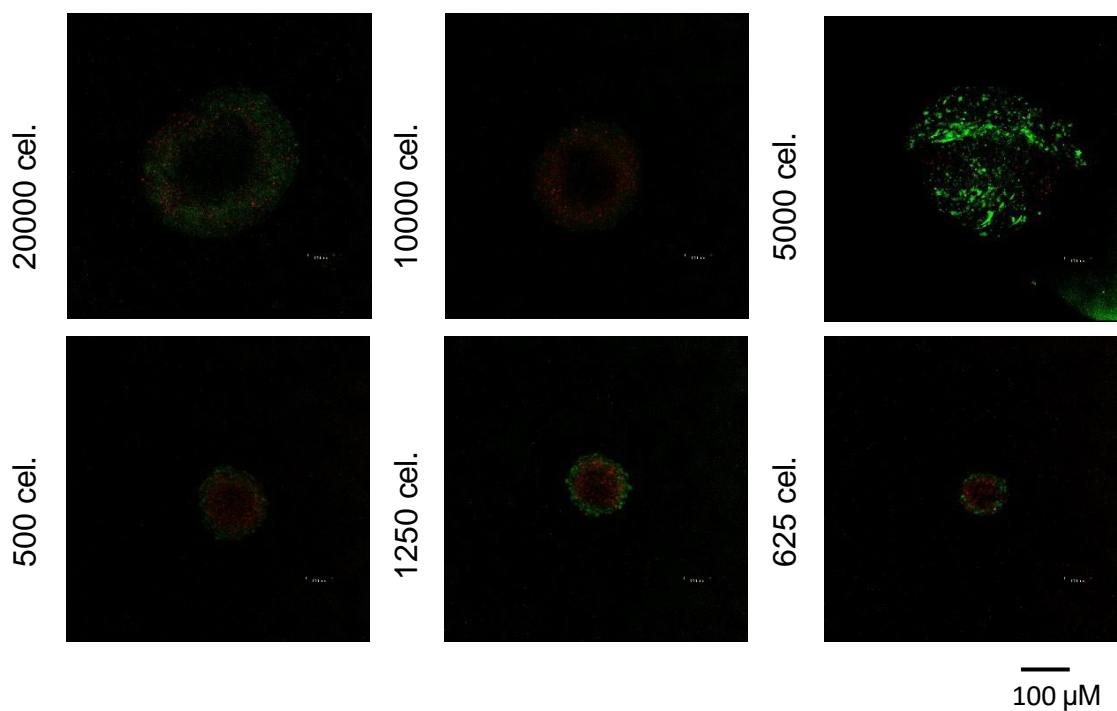


#### 72 HORAS DE INCUBACIÓN





### 96 HORAS DE INCUBACIÓN



*Tabla de figura 4.1.6.2. vitalidad de esferoides en distintos periodos de tiempo.*

Los esferoides de 5000, 2500, 1250, 625 células conservaron la vitalidad alrededor de las 48 y 72 horas de incubación, lo que permite deducir que a menor concentración de células mejor es el intercambio con el medio externo, permitiendo una mejor circulación/difusión de nutrientes, oxígeno y metabolitos de desechos. El acúmulo de desechos producto al metabolismo celular trae consigo radicales libres que oxidan a la célula e influye directamente en su viabilidad. Se observó decaimiento significativo a las 96 horas de cultivo.

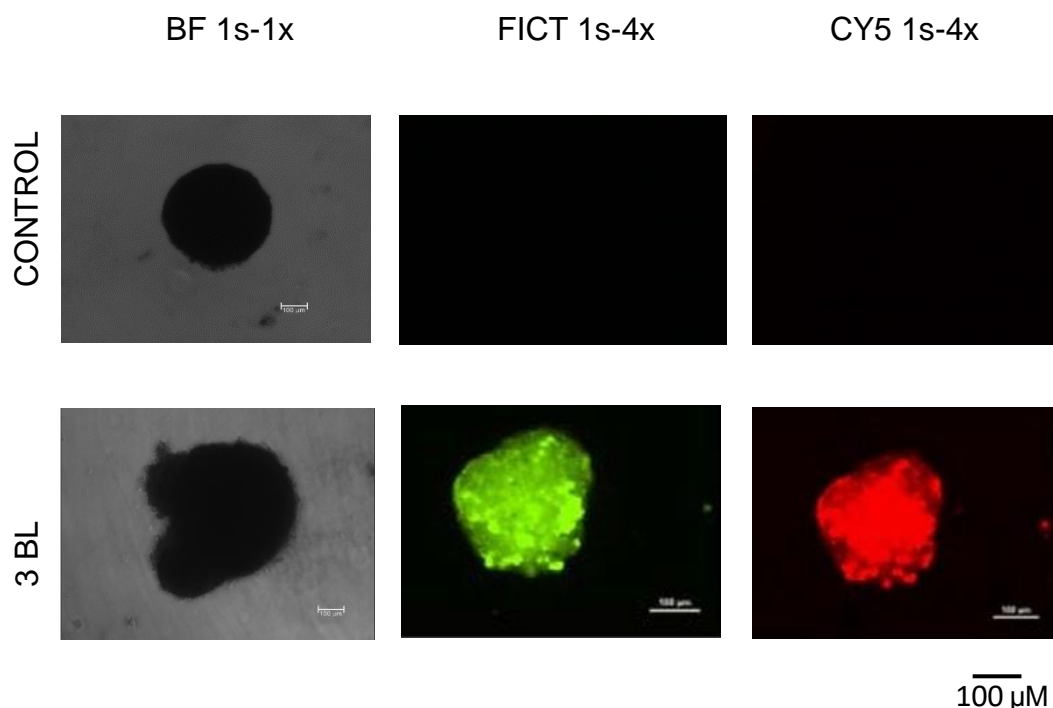
También se puede observar mejor difusión de los reactivos en el periodo de 48 horas en comparación con los periodos de 72 y 96 horas, sobre todo en los de alta densidad celular (20000/ 10000 cel). Esto es debido a la fase c de compactación (ver figura 1.11).

#### 4.1.7 LBL EN ESFEROIDES

Se emplearon esferoides de 5000 células con 48 horas de cultivo para el recubrimiento, debido a que, dentro del grupo de esferoides vitales (5000, 2500, 1250, 625 cel), es el que mayor concentración y viabilidad celular tiene.

Por lo que respecta al recubrimiento, se realizaron deposiciones de tres bicapas poliméricas marcadas con fluoróforo (RGD-N3-F/GTAR-CC-cy5) sobre el esferoide, como se describe en el apartado 3.6.7. Se aplicó la técnica por 3 BL, ya que el recubrimiento es bastante notorio y requiere menor manipulación celular en comparación a la de 5 BL (Ver tabla 4.1.5.2). Mientras menor sea la cantidad de bicapas mejor difusión y circulación de nutrientes habrá.

La figura 4.1.7. muestra un recubrimiento uniforme sobre toda la superficie del esferoide para ambos polímeros. Se incluyó un esferoide sin recubrimiento como control para los canales FICT y CY5.



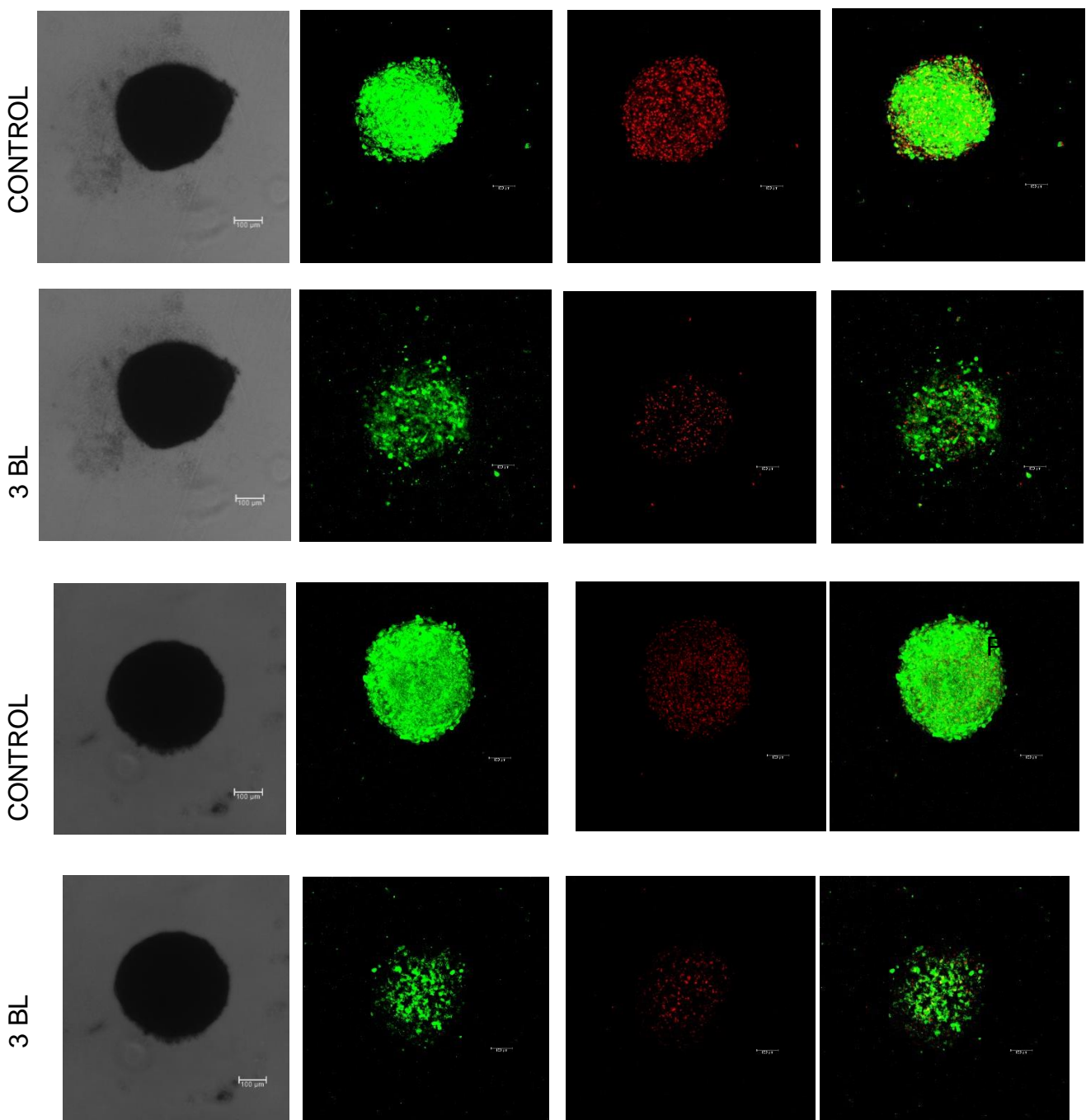
**Tabla 4.1.7. Recubrimiento de esferoides por LBL. FICT (518 nm); canal de emisión para el fluoróforo NHS-fluoresceína acoplado al polímero RGD-N3. CY5 (665 nm); canal de emisión para el fluoróforo cyanine5-NHS acoplado al polímero GTAR-CC. Microscopía de fluorescencia; ganancia 4x – exposición 1 segundo. Control; visualización en campo claro, ganancia 1x – exposición 1 segundo.**

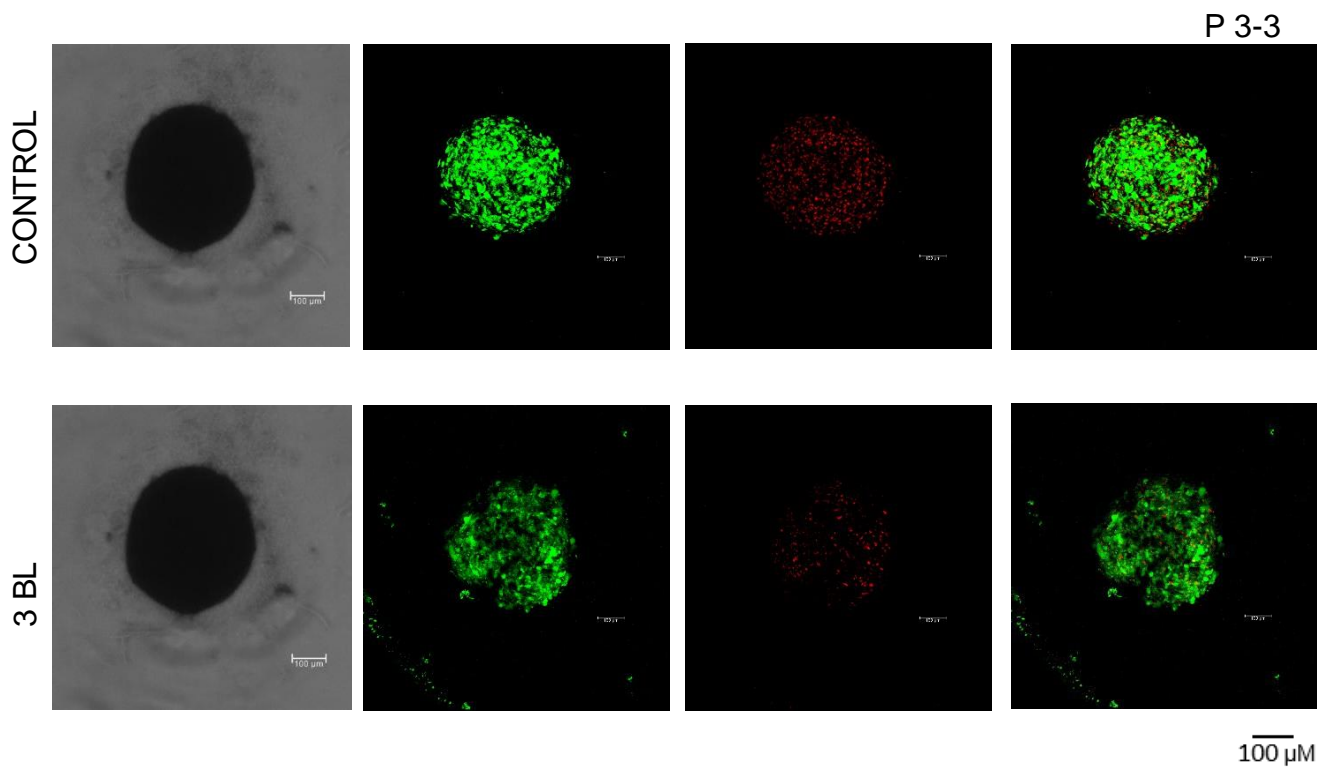
#### 4.1.8 VIABILIDAD DE ESFEROIDES RECUBIERTOS CON 3 BL

Para evaluar la viabilidad post recubrimiento, se aplicó el método de live/dead para N=3 en esferoides recubiertos con 3 BL y en esferoides sin recubrir como grupo control. Ambos grupos han sido cultivados y teñidos en el mismo periodo de tiempo, con el objetivo de evaluar el comportamiento de los polímeros sobre las células y de comprobar si este recubrimiento influye de alguna manera en la viabilidad celular. La tinción se realizó a las 48 horas de cultivo, ya que las células no se encuentran en fase c de compactación, lo que permite una mejor difusión del reactivo como se demostró en el apartado 4.1.6.2.

ESFEROIDES (5000 CÉLULAS)

P 1-3





**Tabla 4.1.8. Viabilidad de esferoides (5000 células) post recubrimiento. N=3; P 1-3, P 2-3, P 3-3, representa cada uno de los esferoides contenidos en pocillos. Figura un control y 3 BL para cada ejemplar. Control; esferoides sin recubrimiento. 3 BL; esferoides recubiertos. Microscopia de fluorescencia. Canales; calcein green (emisión 528 nm), células vivas (verde) y alexa 532 (emisión 650 nm), células muertas (rojas). Microscopio confocal Leica DMI8; obj 10x/gain 100%.**

En la figura 4.1.8, se puede observar la estructura tridimensional de los agregados celulares bajo microscopia de fluorescencia, después de ser teñidas con homodímero-1 de etidio (rojo) y calceína am (verde). Entre los aspectos morfológicos, se puede apreciar cómo las superficies de los esferoides de P 1-3 y P 2-3, después de recubiertos (3 BL), se encuentran parcialmente disgregada en comparación a la de P 3-3 que se mantiene bastante uniforme; sin embargo, la densidad celular en todas las estructuras (P 1-3/P 2-3/P 3-3) se mantiene concéntrica. En cuanto a la viabilidad posterior al recubrimiento, se mantiene una mayor proporción de células vivas que muertas para todos los casos (P 1-3/P 2-3/P 3-3).

## 5 CONCLUSIONES

En este trabajo se ha llevado a cabo la puesta a punto del método y la preparación de esferoides hMSCs que, posteriormente, fueron recubiertos por medio de la técnica de layer by layer (LBL), mediante química click entre los biopolímeros tipo elastina HRGD<sub>6</sub>-N3 y GTAR-CC; los cuales fueron previamente bioproducidos por técnicas de ADN recombinante en *Escherichia Coli*.

Finalmente, se concluye:

1. El biopolímero HRGD<sub>6</sub> se produjo correctamente y no hubo degradación durante el proceso, como se observa en su caracterización por las técnicas instrumentales: FTIR, RMN, DSC, MALDI-ToF
2. Los biopolímeros HRGD<sub>6</sub> y GTAR se han modificado químicamente con rendimiento y conversión de lisinas elevado, obteniendo el número totales de lisinas modificadas que se esperaban de cada uno de ellos en ambas reacciones químicas; adición de grupo azido para HRGD<sub>6</sub> y ciclooctino para GTAR.
3. Se ha conseguido la confluencia celular necesaria de hMSCs para la fabricación de esferoides.
4. Se obtuvieron esferoides hMSCs de distintas concentraciones por el método de cultivo en superficies antiadherentes.
5. Los esferoides con más alto grado de viabilidad fueron los de 5000 células para distintos periodos de tiempo.
6. Los esferoides de hMSCs recubiertos con bicapas de ELRs (3BL) fueron biocompatibles como se demuestra en los estudios de viabilidad y morfología celular.

Por tanto, de la combinación de todos estos resultados se puede concluir que se ha puesto a punto el método de preparación de esferoides hMSCs. Estos esferoides recubiertos presentan potencial aplicación con fines terapéuticos para la regeneración de cartílago articular.

## 6 LINEAS FUTURAS

El presente TFM forma parte del trabajo final de una tesis doctoral, por lo que se continuará con la puesta a punto y estudiando diferentes métodos, posterior a su culminación, con el objetivo de evaluar el efecto terapéutico de los esferoides hMSCs sintetizados en la regeneración de cartílago hialino articular. Para ello será necesario;

1. La bioproducción de polímeros aún más específicos a la zona de tratamiento; el componente mayoritario del cartílago articular es el colágeno y el condroitín sulfato (ver apartado 1.4), por tanto, será necesario incluir polímeros con motivos de adhesión a colágeno tipo II y de adhesión a condroitín sulfato.
2. Incluir estos biopolímeros como bicapa adicional sobre el recubrimiento del esferoide.
3. Evaluar la biocompatibilidad de esferoides hMSCs posterior al número total de recubrimientos.
4. Valorar como influyen las bicapas sobre el tamaño del esferoide durante la técnica de recubrimiento.
5. Aplicar los esferoides hMSCs sobre mólelos murinos experimentales.
6. Valorar si se obtienen los resultados esperados, como; migración específica por afinidad a los motivos de adhesión al colágeno/condroitín sulfato y tiempo de adherencia que permitan mayor exposición celular para potenciar el efecto reparador de las hMSCs.
7. Evaluar mediante pruebas de tinción histológica el efecto reparador de las hMSCs.
8. Incluir pruebas bioquímicas, para el análisis de los niveles inflamatorios del tejido y a su vez evaluar el efecto inmunomodulador de las hMSCs (VSG, PCR, citoquinas tipo IL-1 $\beta$  y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), sidecan-4, entre otros) [25] [83]

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Stephen C. Cowin y Stephen B. Doty, «Tissue Mechanics», New York, USA, 2007.
- [2] J. Liebman y R. L. Goldberg, «Chondrocyte Culture and Assay», *Curr Protoc Pharmacol*, vol. 12, n.º 1, pp. 12.2.1-12.2.18, mar. 2001, doi: 10.1002/0471141755.PH1202S12.
- [3] W. Pawlina. Michael H. Ross, «Ross. Histología: Texto y Atlas.», *Lippincott Williams & Wilkins*, vol. 7, n.º revisada, 2015.
- [4] J. M. Coburn, M. Gibson, S. Monagle, Z. Patterson, y J. H. Elisseeff, «Bioinspired nanofibers support chondrogenesis for articular cartilage repair», doi: 10.1073/pnas.1121605109.
- [5] G. Karsenty, H. M. Kronenberg, y C. Settembre, «Genetic control of bone formation», *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 25, pp. 629-648, nov. 2009, doi: 10.1146/ANNUREV.CELLBIO.042308.113308.
- [6] A. Morales Villaescusa, «Identificación de patrones de viabilidad y expresión génica en condrocitos articulares humanos para su utilización en ingeniería tisular», 2010, Accedido: 23 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=63773&info=resumen&idioma=SPA>
- [7] M. D. , Ph. D. and L. T. M. D. , Ph. D. Abraham L Kierszenbaum, *Histología y biología celular*, Elsevier., vol. 5. 2020. Accedido: 23 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: [https://tienda.elsevier.es/histologia-y-biologia-celular-9788491137733.html?utm\\_source=google&utm\\_medium=paid\\_search&utm\\_campaign=pmax&campid=ES\\_GO\\_TA\\_All-Categories\\_P-Max\\_XC\\_1809ES230002&gclid=Cj0KCQjw3JanBhCPARIsAJpXTx47JavHHkdnfGAANzPShLrKkYM PM\\_fwWUkpXLoyq40wVEnZbqsPPEcaAi\\_0EALw\\_wcB&gclsrc=aw.ds](https://tienda.elsevier.es/histologia-y-biologia-celular-9788491137733.html?utm_source=google&utm_medium=paid_search&utm_campaign=pmax&campid=ES_GO_TA_All-Categories_P-Max_XC_1809ES230002&gclid=Cj0KCQjw3JanBhCPARIsAJpXTx47JavHHkdnfGAANzPShLrKkYM PM_fwWUkpXLoyq40wVEnZbqsPPEcaAi_0EALw_wcB&gclsrc=aw.ds)
- [8] Kyriacos A. Athanasiou, Eric M. Darling, y Jerry C. Hu, *Articular Cartilage Tissue Engineering*, 1.<sup>a</sup> ed., vol. 1. California, EEUU., 2009. doi: 10.1007/978-3-031-02578-5.
- [9] A. Thambyah y N. Broom, «On how degeneration influences load-bearing in the cartilagebone system: a microstructural and micromechanical study», doi: 10.1016/j.joca.2007.05.006.
- [10] Dr. Alejandro Álvarez López; Carlos Casanova Morote; Dra. Yenima García Lorenzo; Marco Antonio Moras Hernández, «Osteoartritis de rodilla. Parte I revisión del tema», *Revista Archivo Médico de Camagüey*, vol. 8, n.º 4, 2004, Accedido: 24 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02552004000400015](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552004000400015)
- [11] C. B. Knudson y W. Knudson, «Cartilage proteoglycans», *Semin Cell Dev Biol*, vol. 12, n.º 2, pp. 69-78, 2001, doi: 10.1006/scdb.2000.0243.
- [12] J. J. Vaca-González, M. L. Gutiérrez, y D. A. Garzón-Alvarado, «Cartílago articular: estructura, patologías y campos eléctricos como alternativa terapéutica. Revisión de conceptos actuales», *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, vol. 31, n.º 4, pp. 202-210, dic. 2017, doi: 10.1016/j.rccot.2017.06.002.
- [13] M. A. Lizarbe Iracheta, «EL COLÁGENO, ¿UN CEMENTO BIOLÓGICO QUE MANTIENE LA ARQUITECTURA Y PLASTICIDAD TISULAR?», 2001.
- [14] M. D. Shoulders y R. T. Raines, «COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY», doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.

- [15] Annemarie Brüel / Erik Ilsø Christensen / Jørgen Trantum-Jensen / Klaus Qvortrup / Finn Geneser, *Geneser Histología.*, vol. 4ª Edición. 2015.
- [16] A. Fallacara, E. Baldini, S. Manfredini, y S. Vertuani, «Hyaluronic acid in the third millennium», *Polymers*, vol. 10, n.º 7. MDPI AG, 25 de junio de 2018. doi: 10.3390/polym10070701.
- [17] C. Kiani, L. Chen, Y. J. Wu, A. J. Yee, y B. B. Yang, «Structure and function of aggrecan», *Cell Res*, vol. 12, n.º 1, pp. 19-32, 2002, doi: 10.1038/SJ.CR.7290106.
- [18] A. Y. Hui, W. J. Mccarty, K. Masuda, G. S. Firestein, y R. L. Sah, «A Systems Biology Approach to Synovial Joint Lubrication in Health, Injury, and Disease», *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, vol. 4, n.º 1, pp. 15-37, 2012, doi: 10.1002/wsbm.157.
- [19] S. Camarero-Espinosa, B. Rothen-Rutishauser, E. J. Foster, y C. Weder, «Articular cartilage: from formation to tissue engineering», *Biomater Sci*, vol. 4, n.º 5, pp. 734-767, may 2016, doi: 10.1039/C6BM00068A.
- [20] V. Zubillaga Marañon, «Desarrollo de una construcción de ingeniería de tejidos de cartilago basada en esferoides hASCs diferenciados bajo hipoxia en un andamio 3D de nanocristales de quitosano/quitina», Leioa, Bizcaya, 2019.
- [21] R. F. Loeser, S. R. Goldring, C. R. Scanzello, y M. B. Goldring, «Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ», *Arthritis Rheum*, vol. 64, n.º 6, pp. 1697-1707, jun. 2012, doi: 10.1002/ART.34453.
- [22] H. Nagase, R. Visse, y G. Murphy, «Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs», 2006, doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002.
- [23] C.-Y. Yang, A. Chanalaris, y L. Troeberg, «ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis e looking beyond the “usual suspects”», 2017, doi: 10.1016/j.joca.2017.02.791.
- [24] | October ; Pap y T. Korb-Pap, «Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis—two unequal siblings», *Nat. Rev. Rheumatol*, vol. 11, pp. 606-615, 2015, doi: 10.1038/nrrheum.2015.95.
- [25] M. B. Goldring y M. Otero, «Inflammation in osteoarthritis», *Curr Opin Rheumatol*, vol. 23, n.º 5, pp. 471-478, sep. 2011, doi: 10.1097/BOR.0B013E328349C2B1.
- [26] H. A. Kim *et al.*, «The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes», *Arthritis Rheum*, vol. 54, n.º 7, pp. 2152-2163, jul. 2006, doi: 10.1002/ART.21951.
- [27] F. Berenbaum Yz, «Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!)», doi: 10.1016/j.joca.2012.11.012.
- [28] P. Dy *et al.*, «Developmental Cell Sox9 Directs Hypertrophic Maturation and Blocks Osteoblast Differentiation of Growth Plate Chondrocytes», doi: 10.1016/j.devcel.2011.12.024.
- [29] O. Pullig, G. Weseloh, A. R. Klatt, R. Wagener, y B. Swoboda, «Matrilin-3 in human articular cartilage: increased expression in osteoarthritis», *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 10, pp. 253-263, 2002, doi: 10.1053/joca.2001.0508.
- [30] J. Wang, D. Markova, D. G. Anderson, Z. Zheng, I. M. Shapiro, y M. V Risbud, «TNF-and IL-1 Promote a Disintegrin-like and Metalloprotease with Thrombospondin Type I Motif-5-mediated Aggrecan Degradation through Syndecan-4 in Intervertebral Disc \* □ S», 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.264549.

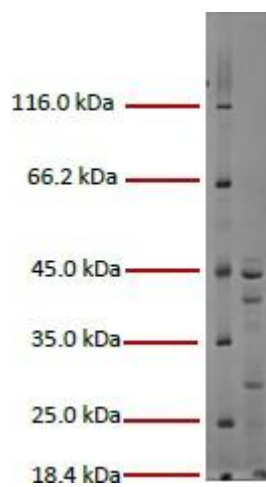
- [31] H. U. Scherer, T. Häupl, y G. R. Burmester, «The etiology of rheumatoid arthritis», 2020, doi: 10.1016/j.jaut.2019.102400.
- [32] F. Wouters *et al.*, «Determining in which pre-arthritis stage HLA-shared epitope alleles and smoking exert their effect on the development of rheumatoid arthritis», *Ann Rheum Dis*, vol. 81, n.º 1, pp. 48-55, ene. 2022, doi: 10.1136/ANNRHEUMDIS-2021-220546.
- [33] F. Díaz-González y M. V. Hernández-Hernández, «La artritis reumatoide», *Med Clin (Barc)*, ago. 2023, doi: 10.1016/J.MEDCLI.2023.07.014.
- [34] G. S. Firestein y I. B. McInnes, «Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis», doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.006.
- [35] P. Gálvez, A. Ruiz, y B. Clares, «El futuro de la medicina clínica hacia nuevas terapias: terapia celular, genética y nanomedicina», doi: 10.1016/j.medcli.2010.12.005.
- [36] J. A. Guadix, J. L. Zugaza, y P. Gálvez-Martín, «Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular», *Medicina Clínica*, vol. 148, n.º 9. Ediciones Doyma, S.L., pp. 408-414, 10 de mayo de 2017. doi: 10.1016/j.medcli.2016.11.033.
- [37] H. D. Zomer, A. S. Vidane, N. N. Gonçalves, y C. E. Ambrósio, «Stem Cells and Cloning: Advances and Applications Dovepress Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives», *Stem Cells Cloning*, vol. 8, pp. 125-134, 2015, doi: 10.2147/SCCAA.S88036.
- [38] G. A. Pimentel-Parra y B. Murcia-Ordoñez, «PERINATOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN HUMANA Células madre, una nueva alternativa médica», *Perinatol Reprod Hum*, vol. 31, n.º 1, pp. 28-33, 2017, doi: 10.1016/j.rprh.2017.10.013.
- [39] A. Trounson y C. McDonald, «Cell Stem Cell Review Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges», doi: 10.1016/j.stem.2015.06.007.
- [40] M. Makridakis, M. G. Roubelakis, y A. Vlahou, «Stem cells: Insights into the secretome», *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, vol. 1834, n.º 11. pp. 2380-2384, 2013. doi: 10.1016/j.bbapap.2013.01.032.
- [41] M. Ter Huurne *et al.*, «Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis», *Arthritis Rheum*, vol. 64, n.º 11, pp. 3604-3613, nov. 2012, doi: 10.1002/ART.34626.
- [42] J. M. Vilar *et al.*, «Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis», vol. 10, pp. 1-7, 2014, doi: 10.1186/1746-6148-10-143.
- [43] L. Bertha Beatriz Socarrás-Ferrer, I. Lic Lázaro Orlando del Valle-Pérez, I. Lic Karelys de la Cuétara-Bernal, I. Dra Vianed Marsán-Súarez, I. Dra Miriam-Sánchez Segura, y I. I. DraCM Consuelo Macías-Abraham, «Células madre mesenquimales: aspectos relevantes y aplicación clínica en la medicina regenerativa Mesenchymal stem cells: relevant aspects and clinical applications in regenerative medicine», *Inmunología y Hemoterapia*, vol. 29, n.º 1, pp. 16-23, 2013, Accedido: 20 de noviembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu>
- [44] L. Álvarez Vallina *et al.*, *Inmunotecnología y sus aplicaciones*. Ediciones de la Universidad de Oviedo, 2018. Accedido: 23 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=724127&info=resumen&idioma=SPA>

- [45] D. Cyranoski, «Canada approves stem cell product», *Nat Biotechnol*, 2012, doi: 10.1038/nbt0712-571b.
- [46] N. B. Vu y P. Van Pham, «Production and Application of Mesenchymal Stem Cell Spheroids for Cartilage and Bone Regeneration», 2022, pp. 137-153. doi: 10.1007/978-3-030-93056-1\_7.
- [47] B.-C. Lee *et al.*, «PGE 2 maintains self-renewal of human adult stem cells via EP2-mediated autocrine signaling and its production is regulated by cell-to-cell contact OPEN», *Nature Publishing Group*, 2016, doi: 10.1038/srep26298.
- [48] P. Gonzalez-Fernandez, C. Rodríguez-Nogales, O. Jordan, y E. Allémann, «Combination of mesenchymal stem cells and bioactive molecules in hydrogels for osteoarthritis treatment», *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 172, pp. 41-52, mar. 2022, doi: 10.1016/j.ejpb.2022.01.003.
- [49] L. A. Marquez-Curtis y A. Janowska-Wieczorek, «Enhancing the Migration Ability of Mesenchymal Stromal Cells by Targeting the SDF-1/CXCR4 Axis», *Biomed Res Int*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/561098.
- [50] S. Zhang *et al.*, «Articular cartilage regeneration: The role of endogenous mesenchymal stem/progenitor cell recruitment and migration», *Semin Arthritis Rheum*, vol. 50, pp. 198-208, 2020, doi: 10.1016/j.semarthrit.2019.11.001.
- [51] B. Corradetti *et al.*, «Hyaluronic acid coatings as a simple and efficient approach to improve MSC homing toward the site of inflammation OPEN», doi: 10.1038/s41598-017-08687-3.
- [52] S. Cosenza, M. Ruiz, K. Toupet, C. Jorgensen, y D. Noël, «Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis OPEN», doi: 10.1038/s41598-017-15376-8.
- [53] Amorim Alves Emanuele y Rosa Guimares Anna Christina, «Capítulo 5. Cultivo celular», en *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*, vol. 2, Rio de Janeiro, 2010, pp. 215-253.
- [54] I. A. Cree, «Principles of Cancer Cell Culture», en *Cancer Cell Culture Methods and Protocols*, 2.<sup>a</sup> ed., UK, 2011, pp. 1-499.
- [55] R. Ian Freshney, *CULTURE OF ANIMAL CELLS*, 6.<sup>a</sup> ed. New Jersey USA: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken , 2010.
- [56] Sigma-Aldrich, «Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook 4th Edition», USA, 2018.
- [57] M. T. Arango, P. Q. Ronderos, J. Castiblanco, y G. Ortiz, «Cell culture and cell analysis», en *Autoimmunity*, Bogota, Colombia., 2013, pp. 1-872.
- [58] R. A. Vertrees, J. M. Jordan, T. Solley, y T. J. Goodwin, «Tissue Culture Models», en *Basic Concepts of Molecular Pathology*, 2009, pp. 159-182. doi: 10.1007/978-0-387-89626-7\_18.
- [59] G. V. Feltre, «DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE DIFERENCIACIÓN 3D BIOIMPRESA EMPLEANDO AGREGADOS CELULARES DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS DEL TEJIDO ADIPOSO».

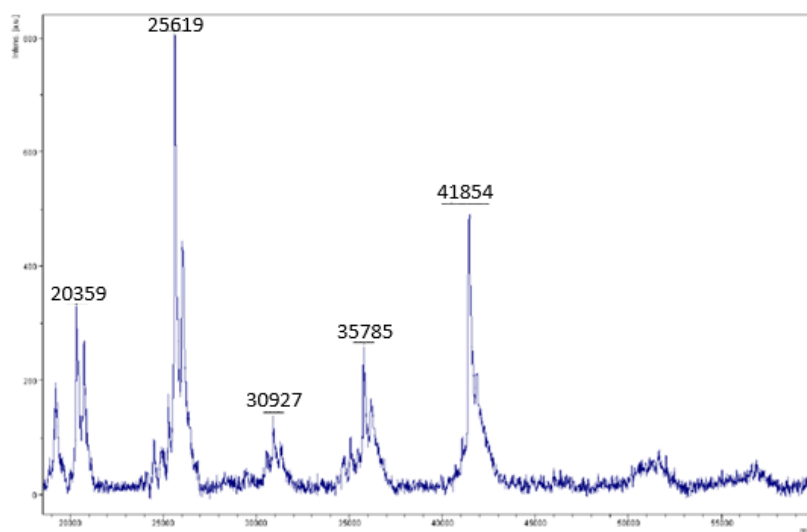
- [60] K. Białkowska, P. Komorowski, M. Bryszewska, y K. Miłowska, «Molecular Sciences Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application», doi: 10.3390/ijms21176225.
- [61] E. Fennema, N. Rivron, J. Rouwkema, C. Van Blitterswijk, y J. De Boer, «Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues», *Trends Biotechnol*, vol. 31, pp. 108-115, 2013, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.003.
- [62] C. Shao, J. Chi, H. Zhang, Q. Fan, Y. Zhao, y F. Ye, «Development of Cell Spheroids by Advanced Technologies», *Adv Mater Technol*, vol. 5, n.º 9, p. 2000183, sep. 2020, doi: 10.1002/ADMT.202000183.
- [63] U. R. Rodgers y A. S. Weiss, «Cellular interactions with elastin», *Pathologie Biologie*, vol. 53, n.º 7, pp. 390-398, 2005, doi: 10.1016/j.patbio.2004.12.022.
- [64] F. J. Arias, V. Rebotó, S. Martín, I. López, y J. C. Rodríguez-Cabello, «Tailored recombinant elastin-like polymers for advanced biomedical and nano(bio)technological applications», en *Biotechnology Letters*, may 2006, pp. 687-695. doi: 10.1007/s10529-006-9045-3.
- [65] S. M. Mithieux y A. S. Weiss, «Elastin», *Adv Protein Chem*, vol. 70, pp. 437-461, ene. 2005, doi: 10.1016/S0065-3233(05)70013-9.
- [66] P. L. San Biagio, F. Madonia, T. L. Trapane, y D. W. Urry, «THE OVERLAP OF ELASTOMERIC POLYPEPTIDE COILS IN SOLUTION REQUIRED FOR SINGLE-PHASE INITIATION OF ELASTOGENESIS», 1988.
- [67] R. E. Sallach *et al.*, «Long-term biostability of self-assembling protein polymers in the absence of covalent crosslinking», 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.082.
- [68] F. W. Keeley, C. M. Bellingham, y K. A. Woodhouse, «Elastin as a self-organizing biomaterial: Use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin», *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 357, n.º 1418. pp. 185-189, 28 de febrero de 2002. doi: 10.1098/rstb.2001.1027.
- [69] F. Pérez Yágüez DIRECTOR y F. Javier Arias Vallejo Valladolid, «Producción y caracterización de nuevos polímeros derivados de la elastina para ingeniería cardiovascular».
- [70] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, y V. Zimmermann, «Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, n.º 33, pp. 5188-5240, ago. 2005, doi: 10.1002/ANIE.200400657.
- [71] R. E. Sallach *et al.*, «Long-term biostability of self-assembling protein polymers in the absence of covalent crosslinking», *Biomaterials*, vol. 31, pp. 779-791, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.082.
- [72] A. , F.-C. A. , Girotti, I. M. , López, Rodríguez-Cabello, y F. J. Arias, «Elastin-like recombinamers: biosynthetic strategies and biotechnological applications.», *Biotechnol J*, vol. 6, n.º 10, pp. 1174-1186, 2011.
- [73] H. C. Kolb, M. G. Finn, y K. B. Sharpless, «Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions», *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 40, n.º 11. pp. 2004-2021, 1 de junio de 2001. doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.

- [74] R. Huisgen, «1.3-Dipolare Cycloadditionen Rückschau und Ausblick», *Angewandte Chemie*, vol. 75, n.º 13, pp. 604-637, jul. 1963, doi: 10.1002/ANGE.19630751304.
- [75] D. C. Kennedy *et al.*, «Cellular consequences of copper complexes used to catalyze bioorthogonal click reactions», *J Am Chem Soc*, vol. 133, n.º 44, pp. 17993-18001, nov. 2011, doi: 10.1021/JA2083027.
- [76] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, y C. Edu, «Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology †».
- [77] I. González De Torre, M. Santos, L. Quintanilla, A. Testera, M. Alonso, y J. C. Rodríguez Cabello, «Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties», *Acta Biomater*, vol. 10, n.º 6, pp. 2495-2505, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.006.
- [78] I. M. El-Sherbiny y M. H. Yacoub, «Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges», doi: 10.5339/gcsp.2013.38.
- [79] Luciane R. Feksa, Eduardo A. Troian, Cristina D. Muller, A. B. Fabian Viegas, y Machado and Virginia C. Rech, «Capítulo 11 Hydrogels for biomedical applications», en *Nanostructures for the engineering of cells, tissues and organs*, Elsevier., 2018, pp. 1-632.
- [80] D. P. Pacheco, L. Zorzetto, y P. Petrini, «4 - Soft tissue application of biocomposites», en *Biomedical Composites (Second Edition)*, Second Edition., L. Ambrosio, Ed., en Woodhead Publishing Series in Biomaterials. , Woodhead Publishing, 2017, pp. 59-82. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100752-5.00004-4>.
- [81] T. Schubert *et al.*, «The enhanced performance of bone allografts using osteogenic-differentiated adipose-derived mesenchymal stem cells», *Biomaterials*, vol. 32, n.º 34, pp. 8880-8891, dic. 2011, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.08.009.
- [82] J. J. Richardson, M. Björnmalm, y F. Caruso, «Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms», *Science (1979)*, vol. 348, n.º 6233, abr. 2015, doi: 10.1126/SCIENCE.AAA2491/ASSET/C9D17684-D3F5-4DCD-A659-D6D2C1B85446/ASSETS/GRAPHIC/348\_AAA2491\_FA.JPEG.
- [83] M. Lopez, C. Vaamonde, y B. y cols Caramés, «Evidencia de mecanismos inflamatorios en la osteoartritis». Accedido: 22 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://reumatologiaclinica.org/es-pdf-13111166>

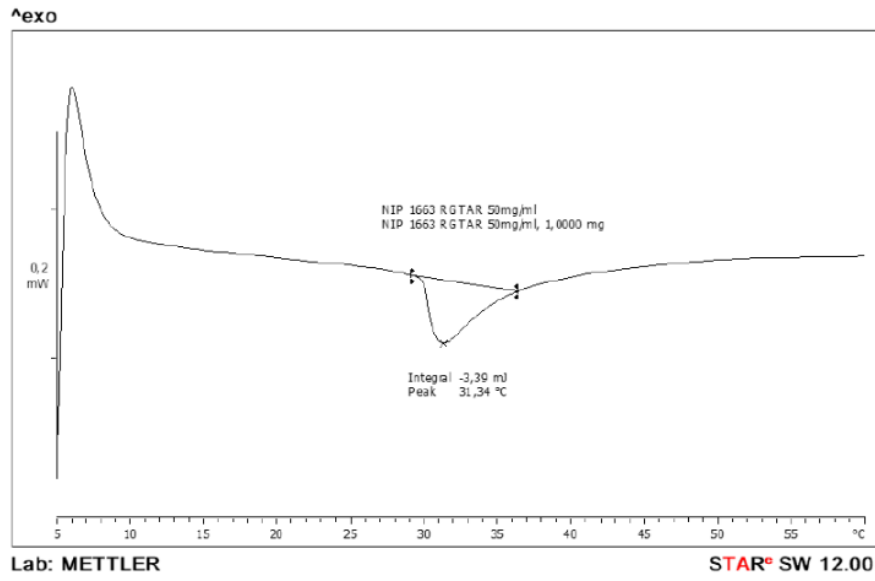
## 8 ANEXOS



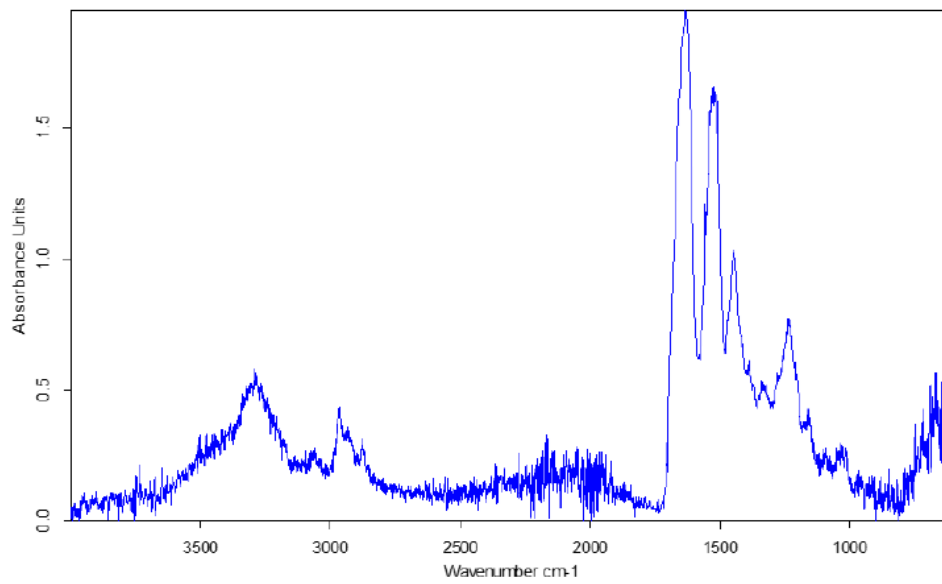
*Figura 8.1. Electroforesis SDS-PAGE del polímero GTAR.*



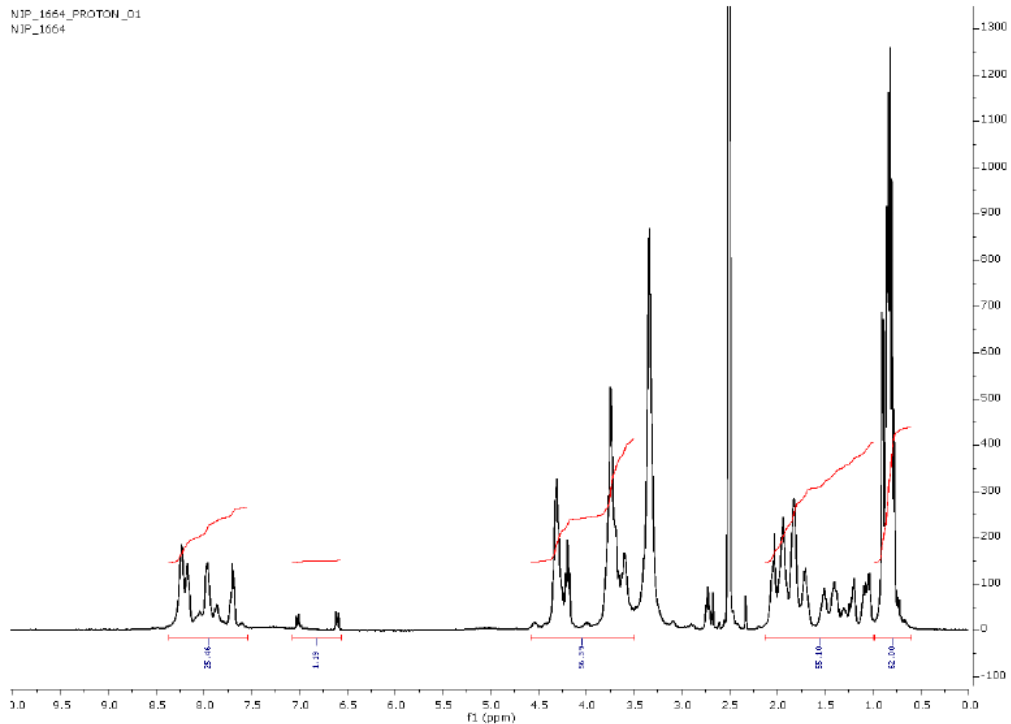
*Figura 8.2. Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del GTAR.*



*Figura 8.3. Termograma DSC del polímero GTAR. TTI 31,34 °C.*

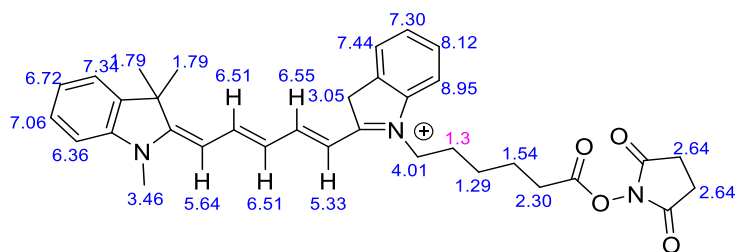


*Figura 8.4. Espectro infrarrojo del polímero GTAR.*

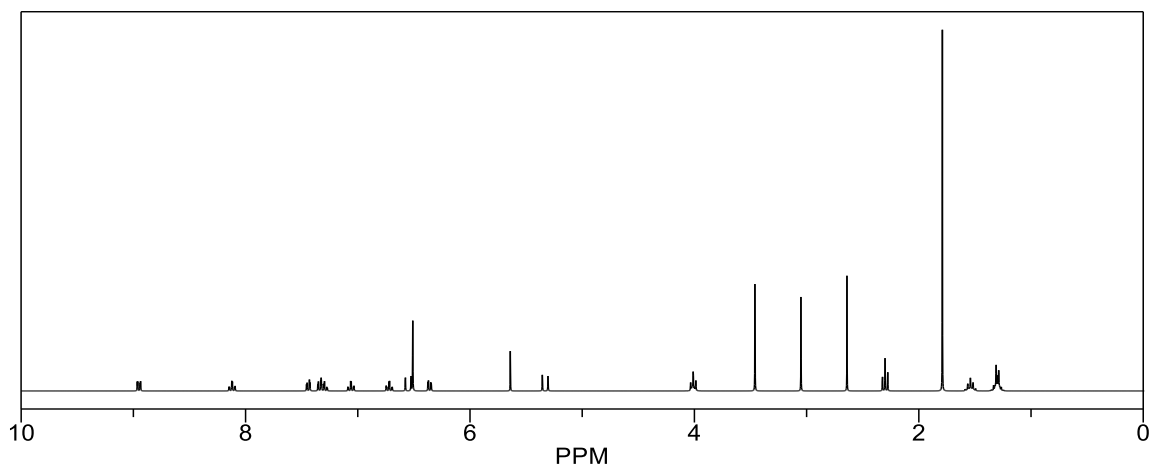


**Figura 8.5. Espectro RMN del polímero GTAR.**

### ChemNMR $^1\text{H}$ Estimation

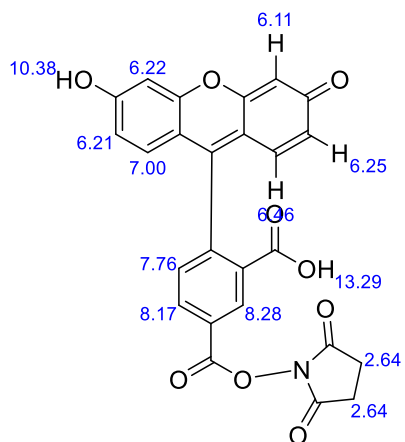


Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**

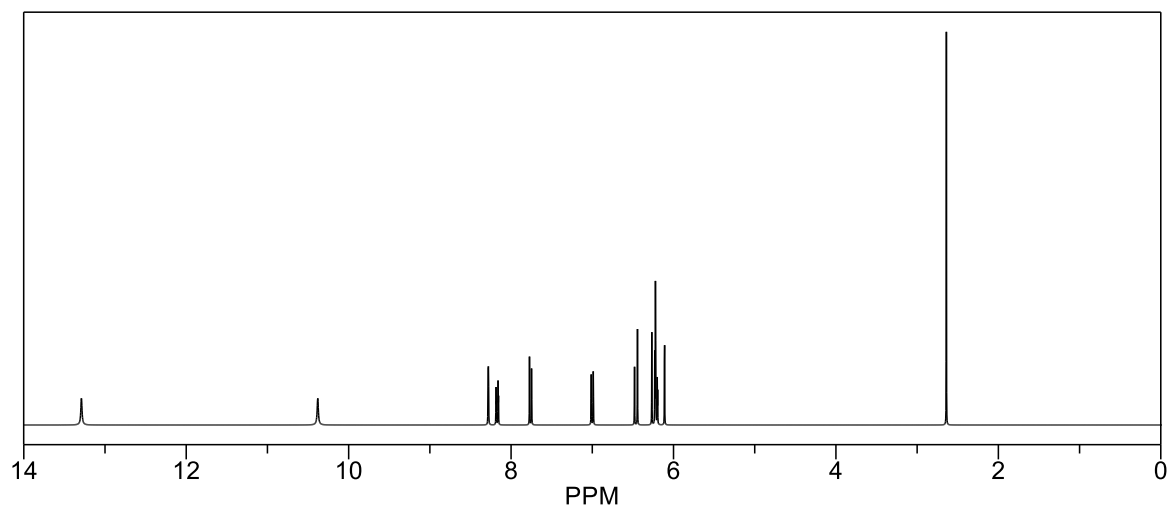


**Figura 8.6. Estimación de espectro  $^1\text{H}$ -NMR del fluoróforo Cy5-NHS. Programa Chemdraw.**

## ChemNMR $^1\text{H}$ Estimation



Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**



**Figura 8.7. Estimación de espectro  $^1\text{H}$ -NMR del NHS-Fluoresceína. Programa Chemdraw.**