



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Física

**Generación y detección de ondas mecánicas en
Matrices hidrogel preformado mediante elementos
piezoeléctricos para su uso en mecano biología celular**

Autor: David Lorenzo Calvo

*Tutor/es: Luis Quintanilla Sierra, José Carlos Rodríguez Cabello,
Ángel Carmelo Prieto Colorado*

AGRADECIMIENTOS:

Quisiera dedicar este espacio para agradecer a las personas que han hecho posible este trabajo.

En primer lugar, dada la interdisciplinaridad del trabajo, quiero agradecer a Diana Juanes Gusano por su enorme dedicación y diligencia para sacar este proyecto adelante.

Dado que soy estudiante de Física, si no hubiera sido por sus conocimientos y habilidades en el uso de cultivos celulares este trabajo no podría haberse realizado; por lo que la estaré eternamente agradecido por todo el tiempo y dedicación que ha invertido para que yo pudiera aprender este nuevo campo.

Quiero agradecer a mi tutor Luis Quintanilla Sierra por toda su paciencia, ilusión y experiencia, que han sido de gran ayuda para la realización de este proyecto.

Finalmente, quiero agradecer a todo el equipo de BIOFORGE tanto estudiantes como profesores por estar ahí para resolver cualquier problema o duda que surgía, sin ellos no hubiera sido posible.

En especial a José Carlos Rodríguez Cabello por hacer posible esta ilusionante oferta de TFG para alumnos de Física.

Índice

Capítulo 1 Introducción y motivación.....	5
Resumen/Abstract	5
1-1. Matriz extracelular y su interacción con las células.	5
1-2. Componentes fundamentales de la MEC	7
1-3. Interacción entre células y su microentorno	9
1-4. Implementación del “scaffold” mediante hidrogeles basados en ELRs (Elastin-like Recombinamers)	11
 Capítulo 2 Objetivos.....	 13
 Capítulo 3 Materiales y métodos	 15
3-1. Material Básico	15
3-2. Equipo de trabajo en Frio	18
3-3. Equipos relacionados con el cultivo de células en esterilidad	19
3-4. Piezoeléctrico	21
3-5. Equipos.....	26
3-6. Hidrogel.....	30
3-7. Células	33
3-8. Métodos experimentales	35
 Capítulo 4 Procedimiento experimental.....	 43
4-1. Caracterización preliminar del hidrogel	43
4-2. Cultivo celular bajo estimulación mecánica	48
4-3. Resultados	53
4-4. Mejoras futuras del experimento	58

Capítulo 5 Conclusiones	61
Bibliografía	63
Apéndice A: Datasheet del dispositivo piezoeléctrico PABCW fabricado por Thorlabs	66

Capítulo 1

Introducción y motivación

Resumen / Abstract

Es bien conocido que las células interactúan de manera muy significativa con el entorno en el que se encuentran inmersas ante una gran variedad de estímulos que incluyen las corrientes eléctricas, las ondas mecánicas, los campos magnéticos y, por supuesto, las reacciones químicas con sustancias presentes en la matriz extracelular (MEC).

Es por esto que es importante encontrar formas de simular estas condiciones de manera experimental y reproducible.

En este sentido nuestro experimento propone el uso de hidrogeles como emulador de la MEC y planteamos crear los estímulos mecánicos a los que las células reaccionan mediante elementos insertados en el gel en el momento de su formación.

Poder llevar a cabo medir estas respuestas celulares en un ambiente de laboratorio es un gran avance en muchas áreas de la biofísica, pero en este trabajo nos centraremos en la respuesta a ondas mecánicas, campo de estudio de la mecanobiología celular.

1-1. Matriz extracelular y su interacción con las células.

La matriz extracelular es una red tridimensional (1) que engloba a todas las células mamíferas (Fig 1). Actúa como un medio biofísico para diferentes actividades celulares (2) en la que se encuentra la transmisión de ondas mecánicas a la membrana basal.

Esta transmisión de ondas se hace a través de las integrinas (3), activando los mecanismos exigentes celulares.

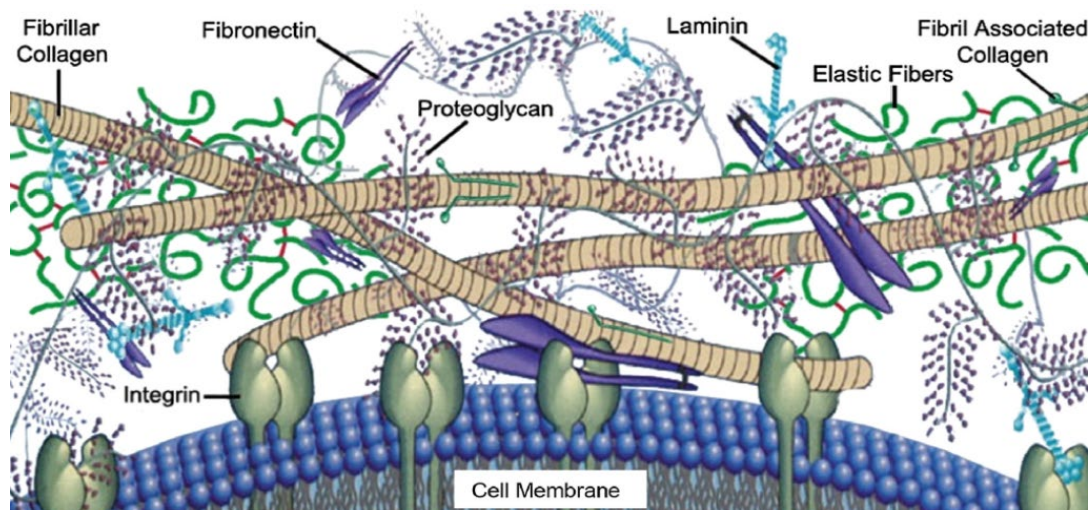


Figura 1: Dibujo representativo de la MEC indicando los puntos enlace de las células con las biomoléculas de la MEC y los principales componentes que forman la MEC.

Las integrinas son moléculas fundamentales para la adhesión de las células a la MEC.

Al adherirse a una molécula externa a la célula quedan adheridas impidiendo que la célula se aleje de ese punto (4).

Fundamentalmente se encuentran a lo largo de la superficie de la membrana plasmática pero su cantidad y grado de adhesión depende de cada célula.

En algunos de los casos esta adhesión puede funcionar lateralmente y en grupo lo cual aumenta significativamente el grado de adhesión que sufre las células, estas adhesiones más fuertes se le llaman uniones focales (5).

Además de las adhesiones focales también las integrinas se pueden asociar en agregados aún mayores llamados hemidesmosomas.

Gracias a la existencia de las integrinas las células tienen una continuidad estructural mecánica entre su interior y su exterior lo que les permite adaptarse a las condiciones de su entorno.

La respuesta ante estos estímulos recibidos mediante las integrinas (y sus asociaciones como las adhesiones focales) (6) es variada según cual sea el estímulo recibido, pero va desde alteración en la forma y química de la célula, hasta alteración de la composición de la membrana para cambiar su grado de adhesión.

La capacidad selectiva de controlar el grado de adhesión en cada momento de las células alterando el número de integrinas en su membrana es fundamental para entender los procesos de migración celular y cicatrización o regeneración de tejidos (7).

Un caso práctico de la utilización de estas adhesiones anteriormente explicadas se da en la mecanotransducción celular (Figura 2).

La mecanotransducción celular es el proceso mediante el cual las células reaccionan a los estímulos mecánicos.

Consiste en convertir el estímulo mecánico en una secuencia química usando la distorsión generada en la membrana.

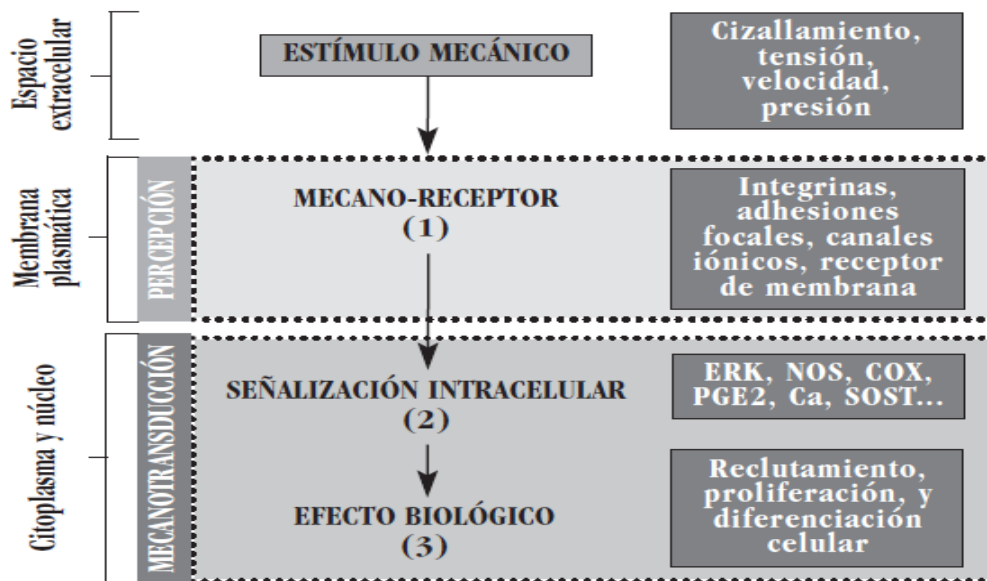


Figura 2: Fases del proceso estímulo-efecto en la propagación de ondas mecánicas en tejidos orgánicos.

Para realizar esta tarea las células poseen canales sensibles mecánicamente con un flujo de iones que varía según las señales recibidas. El cambio de estos iones produce en una primera fase una alteración de la química celular y en una fase final una respuesta en deformación del citoesqueleto.

La alteración del citoesqueleto puede aumentar o disminuir la adhesión celular con la matriz extracelular e incluso producir movimientos celulares.

1-2. Componentes fundamentales de la MEC

Otros trabajos se han centrado más en la naturaleza estructural de la MEC y en cómo actúan las diferentes biomoléculas presentes en la misma.

En lo que a este enfoque de la MEC se refiere cabe destacar las proteínas de tipo fibroso: La elastina y el colágeno.

Los estudios llevados a cabo sobre la elastina han puesto en evidencia sus increíbles propiedades mecánicas. Es debido a que tienen estas propiedades mecánicas únicas que la función de la elastina en los diferentes tejidos del cuerpo es permitir que estos tejidos puedan estirarse y contraerse sin perder su forma a lo largo del tiempo (8).

Una molécula de elastina puede sobrevivir a miles de millones de ciclos de estiramiento y recuperación sin sufrir un fallo en el tejido y sin que se produzca una deformación irreversible (9).

La gran fiabilidad de la elastina es muy superior a cualquier sustituto de la misma que se haya podido crear sintéticamente por lo que es esencial su estudio para entender el porqué de su elasticidad.

Asimismo, la elastina es de utilidad debido a su capacidad de adherirse con otros compuestos diferentes o con otras moléculas de elastina formando fibras y tejidos que mantienen gran parte de estas propiedades mecánicas extraordinarias (10).

Junto a la elastina otro componente importante para estudiar el funcionamiento de la MEC es el colágeno.

El colágeno es la proteína con mayor presencia en el cuerpo y es el componente más abundante de la MEC.

Su función en el cuerpo es dar rigidez y resistencia a los órganos o tejidos donde se encuentra, creando una estructura sobre la cual diferentes sustancias como la elastina anteriormente citada pueda adherirse formando así las fibras y los tejidos tridimensionales que determinan las propiedades microscópicas.

El colágeno normalmente se estructura en aminoácidos con una triple repetición formando una estructura helicoidal triple, sin embargo, la variedad de tipos de colágeno presentes en diferentes organismos vivos es enorme.

Las diferentes posibilidades de estructurarse provocan una gran variedad de tejidos muy diferentes unos de otros pese a tener una estructura microscópica relativamente similar.

Al unirse la elastina, el colágeno y otros componentes proteicos fibrosos se pueden obtener una gran variedad de tejidos como piel, hueso o tendones.

En especial en lo que a las propiedades mecánicas se refiere, esta contribución se hace más evidente ya que se ha comprobado en diversos estudios que el colágeno es en gran parte el responsable directo del comportamiento rígido y resistente de los tejidos.

De esta manera los tejidos ricos en colágeno tienen una mayor resistencia y capacidad para almacenar energía sin deformarse a cambio de romperse ante deformaciones pequeñas del material.

En contraposición también se ha comprobado que los tejidos con una alta concentración de elastina apenas se pueden oponer a fuerzas que intentan deformarlos, pero en cambio pueden soportar enormes deformaciones antes de romperse.

Este comportamiento simplificado depende de manera intrínseca de cual sea el entrecruzamiento (crosslinking) entre los distintos componentes con la MEC por lo que es de interés entender cómo se relacionan y se asocian estos compuestos.

El mismo tipo de sustancias alterando las proporciones o el orden de entrelazamiento cambia intrínsecamente las propiedades de los tejidos obtenidos lo que dificulta su estudio.

1-3. Interacción entre células y su microentorno.

Se han realizado varios trabajos que estudian la relación entre la MEC y las células sobre los que cabe destacar los llevados a cabo en la Universidad de Pennsylvania por equipos Interdepartamentales en los que han colaborado biofísicos, ingenieros, físicos y Biólogos Moleculares.

En ellos se concluye que las células tienen mecanismos para discernir la naturaleza rígida o flexible de la matriz en la que se encuentran inmersas (MEC) diferenciando igualmente si la MEC es consistente o fluida y generando respuestas que conllevan deformación física de la estructura celular adaptándose a la estructura del entorno (11).

Queda pues abierto el campo de estudio relativo a la distancia a la que las células pueden ser capaces de captar los estímulos citados y responder a los mismos.

Dentro del estudio de la forma en la que las células obtienen información de su microentorno se destacan las conclusiones obtenidas respecto a la evidencia de que las células madre mesenquimales se ven afectadas por la elasticidad de la matriz a la que están adheridas (12).

Se han llegado a observar cambios en la organización del citoesqueleto en un tiempo de horas e incluso cambiando su expresión génica aumentando el tiempo a días.

Este cambio de la expresión génica según las condiciones en las que se encuentren estas células podría explicar el método utilizado por las células madre para “saber” qué tipo de tejido producir en función de la parte del cuerpo en la que estén.

La obtención de estos resultados ha abierto en los últimos años a un cambio del paradigma de la interacción mediante la matriz extracelular, durante muchos años se estudió la matriz únicamente como un medio por el cual los estímulos externos al organismo se propagaban y se sentían, pero sin embargo la caracterización de la matriz extracelular nos ha permitido descubrir interacciones entre células usando la dicha matriz (13).

Un experimento que corrobora esta afirmación es la contracción, alineamiento y reorganización de mioblastos al encontrarse a 100 μm o menos de distancia sintiendo

su presencia lateral e incluso llegando a organizarse en miotubos (myotubes), fibras formadas por la fusión de células musculares llamadas mioblastos.

Para la formación de los miotubos no es necesario un contacto directo debido a la mediación de la matriz como intermediaria de la información de la posición relativa de unas células respecto a otras.

Por consiguiente, para estudiar el comportamiento de las células no sirve con controlar las condiciones externas, sino que el micro ambiente en el que se encuentran estas células es también importante (14).

La acción entre unas células y otras interaccionando mecánicamente a través de la matriz produce efectos importantes y por eso ha de ser modulada.

Una vez expuesto algunas ideas generales que caracterizan la matriz extra celular, estamos en condiciones de hablar sobre el campo particular de la Mecanobiología celular.

Como ejemplo concreto consideremos el tejido óseo.

Para que se establezcan estas respuestas frente a los estímulos mecánicos es necesaria la existencia de células Oseas sensibles a estas vibraciones.

Hay evidencia de que las células osteoplastias son las encargadas de esta función por su abundancia y por qué forman una red de canalículos óseos los cuales son perfectos para interaccionar con el resto de células propagándose así el efecto de la onda mecánica al conjunto de la estructura.

En particular los experimentos con células óseas (15) han sido exitosos en la medida de que no sólo han sido capaces de medir una cierta respuesta morfológica como era esperable en esta clase de experimentos, sino que aplicando una vibración directamente en la membrana celular se ha apreciado un aumento significativo de la sintonización de algunos compuestos químicos (16).

Esto se hace evidente para el óxido nítrico (17) del cual se ha observado una concentración de 10nmol frente a los 0 nanomoles medidos en estático, al ser estimulado durante una hora con ondas mecánicas.

El experimento pone en evidencia que la acción de estas ondas no solo afecta únicamente a la membrana y al citoesqueleto condicionando su morfología, sino que el estímulo es suficiente como para cambiar el metabolismo de las células alterando su química interna de manera débil pero apreciable.

1-4. Implementación del andamiaje “scaffold” mediante hidrogeles basados en ELRs (Elastin-like Recombinamers).

Una vez explicada la MEC vamos a hablar de los materiales ELRs (Elastin-like recombinamers) (18) con los que vamos a emular la matriz extracelular para observar cómo se comportan las células en un tejido (19).

Estos materiales empiezan a estudiarse en el S.XX a partir del descubrimiento de la habilidad para autoensamblarse de la elastina.

En especial cabe destacar los ELRs basados en la secuencia de aminoácidos VPGVG (Val-Pro-Gly-Val-Gly) (20) los cuales tienen la cualidad de ser solubles en agua por debajo de 25°C, pero está en estado agregado a por encima de esta temperatura.

Dentro de las distintas formas en que podemos tener los ELRs, vamos a centrarnos en los hidrogeles para entender el sustrato de nuestros cultivos celulares:

Su principal cualidad como su nombre indica es su alto contenido en agua, este alto contenido en agua ayuda a emular las condiciones de la MEC.

No obstante, hay muchas otras variables importantes que debe cumplir un sustituto para la matriz extracelular (21). Algunas de las propiedades más significativas son la elasticidad, rigidez, la nano topografía de los poros (22) y las zonas de adhesión entre otras.

Para alcanzar estas propiedades físicas los ELRs sufren un proceso de entrecruzamiento entre sus diferentes componentes.

Este entrecruzamiento puede ser de origen físico o covalente, dependiendo fundamentalmente de que segmentos recombinantes se hayan usado.

Los segmentos recombinantes usan son fundamentalmente plásmidos (ADN Bacteriano) (23) que se usa para replicar y reproducir las secuencias de polímero que queremos.

Hay varios métodos para controlar el entrecruzamiento entre los que se destaca el uso de enzimas, iones e interacciones hidrofóbicas.

Todas estas tienen un denominador común, usan las lisinas presentes en los polímeros para controlar el peso molecular resultante.

Fundamentalmente sea cual sea el método de entrecruzamiento se obtendrán geles biocompatibles (24), pero en muchas ocasiones no tendrán puntos de adhesión por lo que no servirán para los propósitos de este experimento.

Por suerte gracias a las herramientas actuales de modificación genética se pueden producir cambios específicos en la secuencia de recombinación que nos permite tener

geles en los que se pueden adherir células entre otras aplicaciones específicas según cual sea el tratamiento genético.

Capítulo 2

Objetivos

El conjunto de experimentos que hemos llevado a cabo ha tenido como objetivo establecer una metodología y protocolo para generar estímulos mecánicos en el propio sustrato (scaffold) en el que están adheridas las células.

Comprobar si vibraciones de amplitudes del orden de pocas decenas de nanómetros y distintas frecuencias dan lugar a algún tipo de respuesta celular.

En nuestro trabajo hemos emulado la MEC por medio de un hidrogel basado en ELRs, que presenta propiedades mecánicas adecuadas para que células de tipo fibroblasto lleven a cabo procesos celulares fundamentales.

Desarrollar estos métodos de manera satisfactoria es de gran trascendencia, pues permite afrontar el objetivo de estudio salvando las complicaciones inherentes al experimento.

Principalmente los requisitos de esterilidad necesarios para el cultivo celular con la incorporación de componentes eléctricos (en nuestro caso un dispositivo piezoeléctrico) que sean capaces de generar estímulos mecánicos que pueden provocar una respuesta celular.

Además de la complejidad que acabamos de exponer, hemos de destacar la enorme sensibilidad del sistema a distintos parámetros, tales como humedad, esterilización, reducida resistencia mecánica.

El interés final de desarrollar esta tecnología está, por un lado, en mejorar la caracterización y comprensión de la matriz extracelular.

Por otro lado, esta información también sería susceptible de ser utilizada para crear metodologías que permitan generar alineamientos preferentes en los sistemas celulares lo cual nos permitirá generar una mayor variedad de tejidos como pueden ser el tejido neuronal, muscular y conectivo que tendrían una aplicación inmediata en la medicina.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3-1. Material Básico

3-1.1. Taladro:

Un taladro y un juego de brocas, en especial se usan brocas de pequeño tamaño de 3 y 4 mm de diámetro ya que se necesita mucha precisión para el experimento

3-1.2. Recipientes:

Para realizar los experimentos es necesario una gran variedad de recipientes, muchos de ellos además deben ser estériles. Por ello, la mejor solución es utilizar recipientes de un solo uso de plástico.

Clasificándolos por su tamaño y forma podemos distinguir varios tipos:

3-1.2_A. Eppendorfs:

Son pequeños recipientes de entre 0,5 y 3 ml de capacidad (Fig 3) de gran utilidad para pipetear pequeños volúmenes y para mantener la esterilidad.

Se suelen usar para almacenar material durante cortos periodos de tiempo



Figura 3. Eppendorfs de 1,5 ml

3-1.2_B. Falcon:

Recipiente más alargado que el eppendorf y de mayor capacidad, entre 5 y 50 ml (Fig 4).

Se usa en situaciones similares a las de los eppendorf, pero cuando las cantidades de material son mucho más grandes.



Figura 4. Falcon de 50 ml

3-1.2_C. Matraz:

se suelen utilizar para contener grandes cantidades de material durante largos periodos de tiempo.

3-1.3. Micropipetas y puntas:

Equipo de gran precisión que sirve para trasladar líquidos de un recipiente a otro (Fig 5).

Hay modelos con capacidad de 1000, 500 y 200 microlitros (Figura x).



Figura 5. Micropipetas y puntas de varias capacidades

La capacidad de la pipeta se puede variar mecánicamente mediante un tornillo giratorio que hace que solo se pueda absorber la cantidad de líquido deseada.

Junto a las micropipetas están las puntas que suelen de ser de plástico y son necesarias para poder usar la pipeta.

Estas puntas en ocasiones pueden ser estériles; Una caja de puntas estériles se consigue mediante el uso de la autoclave. Las puntas estériles siempre han de abrirse y usarse en una campaña para conservar la esterilidad.

La precisión de las micropipetas es muy grande, entorno al microlitro.

3-1.4. Placas de Cultivo Celular:

También llamada placas de pocillos, son cajas de plástico herméticamente cerradas y estériles desde su fabricación. Dentro de estas placas hay unos pocillos circulares donde se pueden cultivar células.

Además, el fondo del pocillo es transparente y suficientemente fino como para poder observar con un microscopio el interior del mismo sin tener que cambiarlo de recipiente.

3-1.5. Silicona: Es una sustancia química de gran utilidad como adhesivo ya que cuando se seca actúa en cierta medida como un pegamento.

En nuestro caso la usaremos como aislante en los contactos eléctricos del dispositivo piezoeléctrico ya que tiene una buena resistencia a la humedad, al calor y a la electricidad.

3-1.6. Vortex: Es un equipo que se utiliza para mezclar disoluciones. Consiste en una pieza de plástico con un hueco circular donde poder poner el recipiente que quieres agitar colocado sobre una placa metálica que vibra el aplicar presión.

Usarlo con regularidad es muy importante ya que para muchos procesos químicos la no homogeneidad de los reactivos puede resultar en grandes cambios en las propiedades de los productos, en especial cuando tratamos con disoluciones ya que es común que aparezcan precipitados no deseados con el paso del tiempo.

3-2. Equipo de trabajo en Frio

3-2.1. Sala de Frio:

Es una sala la cual tiene un aislamiento mejorado para que no entre el calor exterior en la misma, en la que se conecta un equipo que controla la temperatura de la sala a 4°C.

Esta sala es especialmente útil en los procesos de larga duración en los que la temperatura sea necesariamente baja. Como inconveniente esta sala no tiene campana por lo que no se puede realizar experimentos en esterilidad en la misma.

3-2.2. Acumulador de frio:

También llamado placa eutéctica es un recipiente cerrado herméticamente que contiene un conjunto de sustancias en proporción eutéctica, es decir, una mezcla de varios componentes cuyo punto de fusión es menor que cualquiera de los componentes por separado.

Esto hace que pueda enfriarse a muy bajas temperaturas y que en contacto con otro elemento al que deseamos enfriar tarde mucho hasta que se caliente el acumulador.

3-2.3. Recipientes de poliespan:

El poliespan es un aislante térmico ligero y barato por lo que es perfecto como recipiente para transportar objetos o sustancias muy frías como puede ser el nitrógeno líquido. Además de estas propiedades también es impermeable por lo que puede llenarse de hielo sin peligro de que al derretirse el agua salga del recipiente.

3-2.4. Máquina de Hielo:

Proporciona pequeños fragmentos de hielo picado.

Este hielo es usado fundamentalmente para mantener componentes químicos en temperaturas bajas mientras se está realizando un experimento.

También es útil cuando queremos mantener un recipiente a una temperatura menor a la de un frigorífico, pero mayor que la de un congelador, por lo que se puede almacenar en hielo colocado en un frigorífico teniendo en cuenta de que como las temperaturas son mayores que 0°C se acabará derritiendo el hielo y habrá que remplazarlo.

3-3. Equipos relacionados con el cultivo de células en esterilidad

3-3.1. Incubadora:

Es un equipo muy importante para el cultivo celular ya que te permite fijar y mantener en el tiempo unas condiciones ambientales en las que realizar tu experimento.

En especial las variables más importantes que se pueden fijar gracias a las incubadoras son:

La temperatura: Suele fijarse a 37°C ya que es la temperatura más común a la que suelen proliferar las células, además este parámetro es muy estable por lo que las perturbaciones son mínimas pese a que el desarrollo de la actividad celular pueda absorber o emitir calor al ambiente.

Composición del aire: La composición de la atmosfera de una incubadora es esencial para el desarrollo de las células ya que estas tienen procesos de respiración, en especial los parámetros más importantes fijados por la incubadora son la concentración de CO₂ y la humedad.

3-3.2. Centrifugadora:

La centrifugadora es un elemento necesario en el cultivo de células ya que se normalmente todos los compuestos están inmersos en líquidos por lo que para separar el medio celular líquido de las células que flotan en el mismo se necesita un proceso de centrifugación.

El equipo consiste en un eje rotativo en el cual se pueden insertar varias muestras. Una vez el equipo está en funcionamiento las muestras rotan alrededor de un eje fijo por lo que sufren una fuerza radial que separa los compuestos presentes en la muestra en función de la densidad de los mismos.

Una consideración importante a la hora de usar el equipo es que al rotar a una gran velocidad es necesario que el peso este equilibrado respecto del eje para que no se tensione el eje del equipo, esto se consigue añadiendo recipientes de contrapeso de un peso parecido situados en la posición contraria respecto a la simetría creada por el eje de rotación.

Como los recipientes son de plástico y el peso de las células es despreciable frente al medio líquido, con poner un recipiente con el mismo volumen de agua como medio tenga tu muestra se alcanza el equilibrio necesario para usar el dispositivo

3-3.3. Campana de flujo:

Una campana de flujo es una versión mejorada de una campana de extracción con la particularidad de que se añade un cristal móvil que tapa casi la totalidad del interior exceptuando la parte inferior por donde se puede meter las manos para manipular el experimento.

Como complementación a esta lámina de vidrio hay en el suelo de la cavidad pegado al cristal una extracción de aire por lo que la única entrada de contaminación aérea tiene una extracción inmediata protegiendo el interior y haciendo casi imposible una contaminación más allá de una mala manipulación o de una contaminación previa de los elementos que metamos en la campana.

3-3.4. Flask:

Un flask es un recipiente especial para el cultivo y almacenamiento de células (fig 6).

Sus principales características es su pequeña abertura para evitar contaminaciones y que es largo y casi plano para que tenga una gran superficie donde se puedan adherir las células pudiendo así alcanzarse un mayor número de células antes de alcanzar la saturación del número de células que pueden adherirse en su superficie, también llamado confluencia.



Figura 6. Recipientes Flask con medio para células

3-3.5. Bomba de absorción:

Cuando se trabaja con células es común tener que retirar líquidos de una placa manteniendo la esterilidad y sin eliminar las células adheridas o los sólidos que pueda haber en el mismo.

Para esto las propias campanas tienen incorporadas una.

3-3.6. Autoclave:

La autoclave es un equipo básico en todo laboratorio que trate con elementos biológicos, es el método más eficaz para esterilizar un objeto.

Su funcionamiento consiste en someter al objeto que se desea esterilizar a unas condiciones de alta presión, humedad y temperatura.

Típicamente se llega a unos 130 ó 150 grados centígrados y entre 2 y 3 atmosferas de presión. Estas condiciones son más que suficientes, junto al vacío que se genera al expulsar el vapor, para eliminar cualquier residuo biológico.

3-4. Piezoeléctrico

Es un cristal que ante la presencia de un campo eléctrico sufre una deformación debido a la presencia de fuerzas internas en el material.

Son cristales que carecen de simetría por lo que la acción de un campo eléctrico produce una separación del centro de masas de las cargas positivas y negativas lo que en última instancia produce un comportamiento similar a un dipolo. La aparición de estos dipolos produce fuerzas internas que comprimen o expanden el cristal.

Este efecto ocurre también al contrario ya que si comprimes un piezoeléctrico aparecerá una diferencia de potencial en el cristal.

El piezoeléctrico es un dispositivo es fundamentalmente capacitivo (Fig 7) que presenta elementos parásitos resistivos e inductivos.

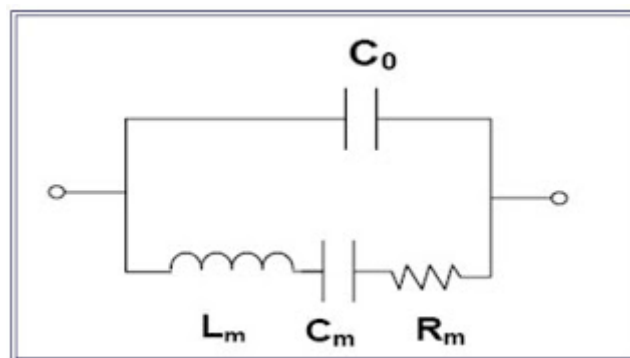


Figura 7. Esquema del circuito de un piezoeléctrico

Esta relación entre deformación y tensión se produce mediante procesos fundamentalmente reversibles por lo que cuando se retira el estímulo el cristal vuelve al estado inicial sin cambios permanentes en primera aproximación.

Cabe destacar que hay piezoeléctricos naturales incluso en nuestro cuerpo lo cual hace más interesante el estudio de las células ante este tipo de estímulos.

Un ejemplo de biopiezoelectricidad se da en el hueso seco

Debido a la alta presencia de colágeno la cual tiene dipolos moleculares cuasipermanentes los cuales en condiciones de orientación producen este comportamiento piezoeléctrico (25). Se cree que este comportamiento ejerce la función de sensor de fuerza biológico para el cuerpo.

Para realizar los experimentos hemos usado un piezoeléctrico fabricado por Thorlabs, modelo PA3BCW. (Fig 8)

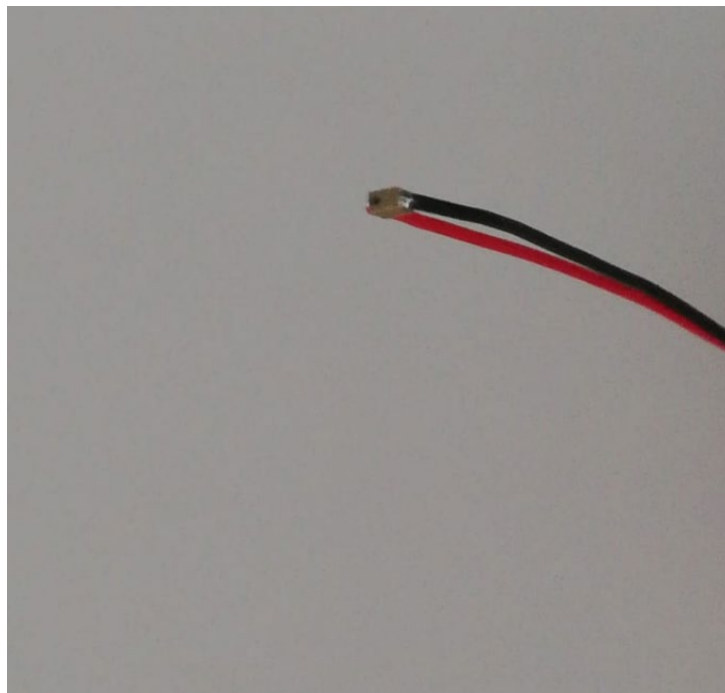


Figura 8. Dispositivo piezoeléctrico usado

Este piezoeléctrico consiste en láminas de cerámica piezoeléctrica situadas unas encima de las otras. Entre una lámina y otra hay intercalados electrodos interdigitados (Fig 9) que actúan como elementos en paralelo eléctricamente.

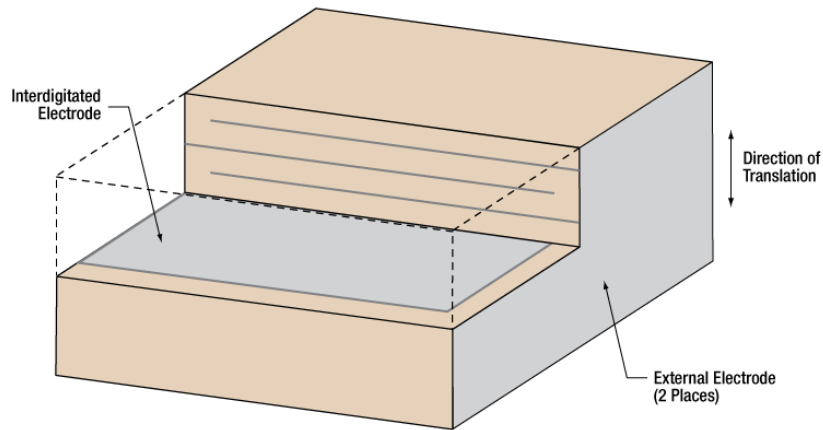


Figura 9. Esquema de la organización de los electrodos del piezoeléctrico

Ensamblados al cristal piezoeléctrico hay dos cables unidos a los electrodos, como es común el cable rojo tiene que ir a los potenciales positivos mientras que el cable negro va conectado a tierra(Fig 10).

El dispositivo presenta las siguientes propiedades, las cuales han sido medidas a 25°C salvo en los apartados donde indica lo contrario.

PA3BCW ^a	
Drive Voltage Range	0 - 100 V
Displacement (Free Stroke) at 100 V	1.0 $\mu\text{m} \pm 15\%$
Hysteresis	<15% (See Graph on Next Page)
Load (Recommended)	36 N (8 lbs)
Blocking Force at 100 V	90 N (20 lbs)
Resonant Frequency ^b	920 kHz (No Load)
Impedance at Resonant Frequency ^b	900 m Ω
Anti-Resonant Frequency ^b	1200 kHz
Dissipation Factor	<2.0%
Capacitance	13.5 nF $\pm 15\%$
Operating Temperature	-25 to 130 °C
Curie Temperature	230 °C
External Electrodes	Screen-Printed Silver
Dimensions	Width 1: 1.5 mm ± 0.1 mm
	Width 2: 1.5 mm ± 0.1 mm
	Length: 1.0 mm $\pm 5 \mu\text{m}$

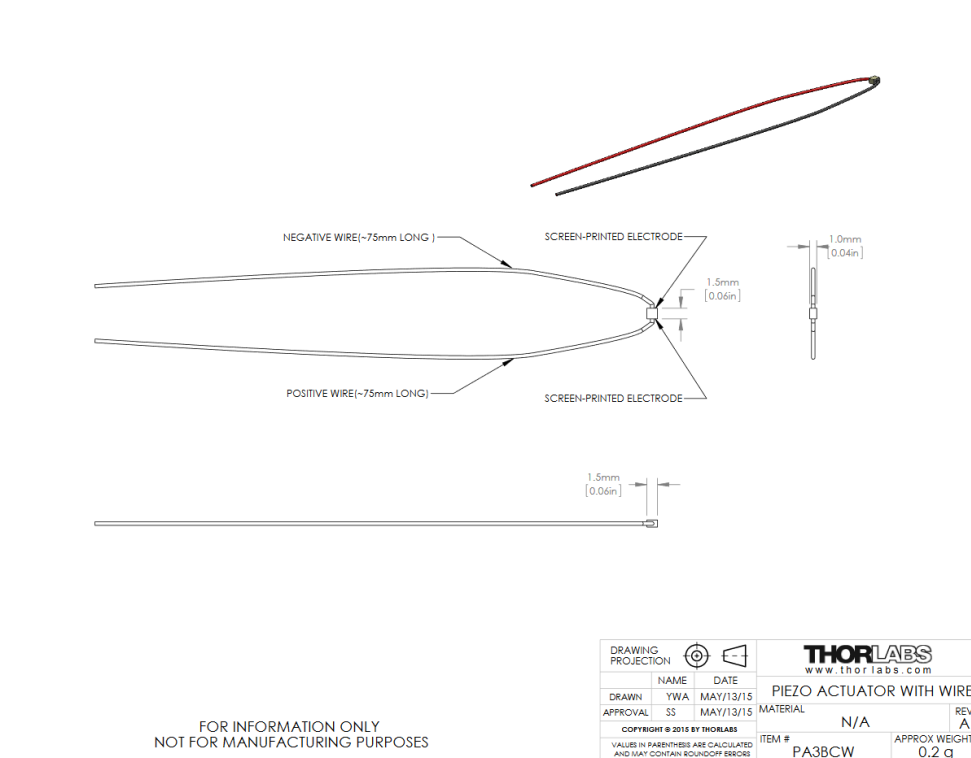


Figura 10. Dimensiones del piezoeléctrico

La Figura 11 muestra la característica de transferencia de mecanotransducción del dispositivo: La transformación de una señal eléctrica en desplazamiento mecánico.

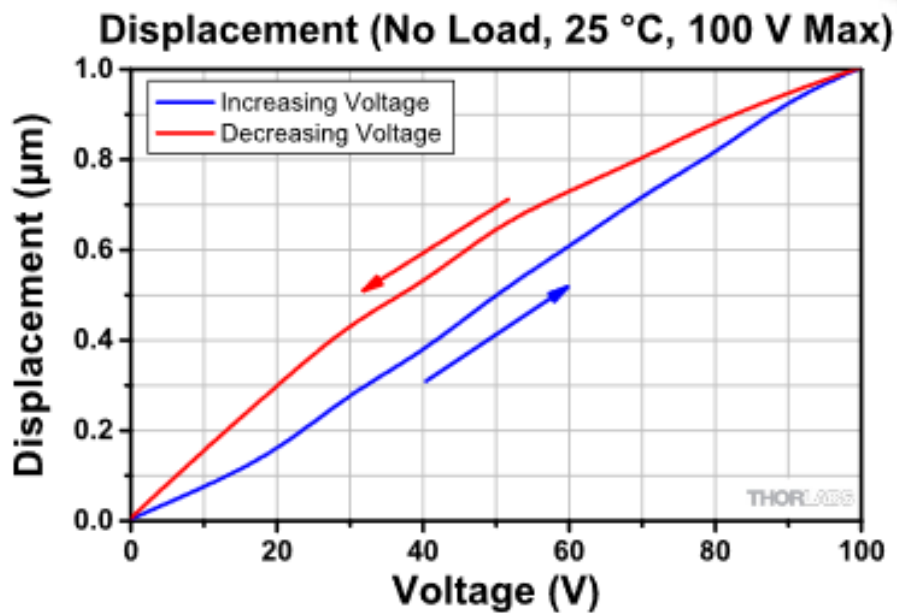


Figura 11. Desplazamiento del piezoeléctrico en función de la tensión aplicada

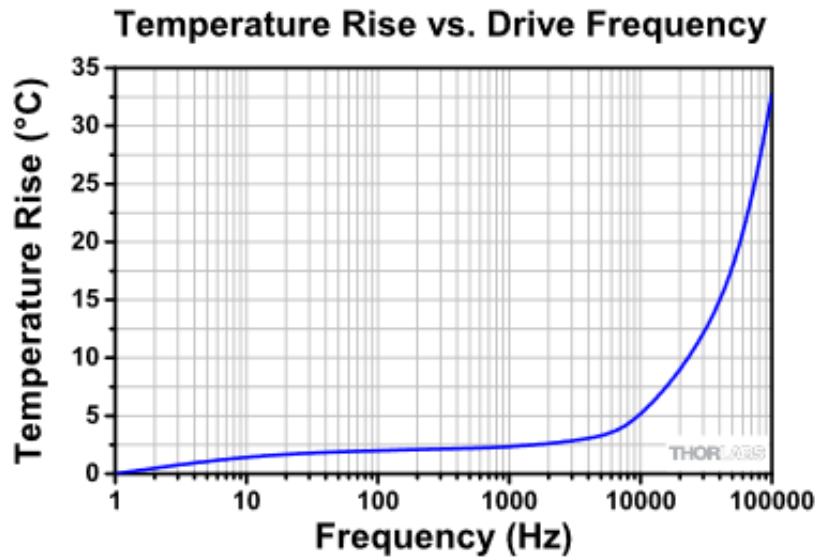


Figura 12. Aumento de la temperatura del piezoeléctrico después de aplicar una onda sinusoidal de 0 a 100 V durante 10 min en función de la frecuencia.

La operación del dispositivo piezoeléctrico implica la generación de calor que produce un aumento de temperatura.

El calentamiento del cristal piezoeléctrico observado (Fig 12) se debe a su coeficiente de pérdidas dieléctricas, este coeficiente da cuenta del efecto que ocurre cuando aplicamos una corriente alterna a un dieléctrico no ideal.

Si el dieléctrico fuera ideal la corriente adelantaría la tensión en 90° , pero en nuestro caso donde tenemos un dieléctrico no ideal.

Al haber pérdidas, la corriente adelanta la tensión en solo $90^\circ - \delta$, siendo δ el ángulo de pérdida dieléctrica.

Cuando la corriente y la tensión están fuera de fase en el ángulo de pérdida dieléctrica se pierde energía o potencia eléctrica generalmente en forma de calor.

Este desfase depende de la frecuencia aplicada y una manera de medir la magnitud de este efecto es con la gráfica antes mencionada.

El factor de disipación, FD, está dado por $FD = \tan \delta$ y el factor de pérdida dieléctrica, FP, se define como $FP = K \tan \delta$

3-5. Equipos

3-5.1. Osciloscopio:

Es un dispositivo electrónico básico para visualizar y medir señales eléctricas en el dominio del tiempo.

Hemos usado el modelo PM 3206 15 MHz de la marca PHILIPS.

3-5.2. Generador de formas de onda:

Aplica el estímulo eléctrico al piezoeléctrico. Tiene dos terminales para conectar el lado positivo y el negativo del circuito.

La fuente además posee varias posibles formas de onda que administrar al circuito, la posibilidad de aplicar un nivel de continua y controladores manuales de la frecuencia y amplitud de tensión pico a pico aplicado que pueden fijarse con mucha precisión dentro de un rango de operación.

El equipo utilizado es el modelo 2MHz PULSE-FUNCTION GENERATOR GF-232 de la marca PROMAX.

3-5.3. Microscopio Óptico:

Es un equipo que utiliza el comportamiento de la luz (fotones) para visualizar un objeto de una forma amplificada con aumentos que van de x4 al x40.

Para obtener estos aumentos se dispone de un “revolver” con diferentes lentes que permite cambiar los aumentos según las necesidades del experimento.

Uno de los problemas de este tipo de microscopía es que solo enfoca a una única distancia a la vez por lo que no es la ideal para ver imágenes de superficies irregulares.

En nuestro caso hemos utilizado un microscopio de la casa Nikon, de modelo TI-SH-W fabricado en Japón, con un controlador de disparo de la marca Sutter Instrument para iluminar los objetos que queremos observar.

3-5.4. SEM:

Esta técnica de microscopía electrónica utiliza la interacción de los electrones con la materia para crear una imagen de muy alta resolución.

El equipo funciona acelerando electrones mediante un campo eléctrico.

Una vez que los electrones han sido acelerados salen del cañón y se usan lentes condensadoras y un objetivo para formar una imagen.

Los voltajes de aceleración utilizados son varían entre 100 voltios si son muestras muy aislantes hasta 30000 voltios para muestras conductoras y resistentes.

Cuanto mayor sea el voltaje aplicado mayor será la resolución, pero mayor será también el efecto sobre la muestra.

Los electrones acelerados salen del cañón, y se enfocan mediante las lentes condensadora y objetiva, cuya función es reducir la imagen

Para poder observar la muestra de hidrogel hay que primero congelarla y partirla para así poder observar la sección transversal de la misma.

Las fotos han sido tomadas con el equipo FEI-Quanta-200-FEG de la compañía estadounidense FEI Company, usando el modo de bajo vacío (low vacuum mode).

3-5.5. Reómetro:

La Reología es la ciencia de la medida de las deformaciones tanto elásticas como inelásticas que sufre un material fluido que se ve sometido a esfuerzos de compresión o cizalladura.

Permite medir el comportamiento viscoelástico de los materiales.

En nuestro caso, nuestro equipo aplica estímulos en cizalla.

Un reómetro consta de dos partes fundamentales:

En la parte superior se coloca una geometría.

Hay varios tipos de geometrías, aunque son muy habituales las geometrías circulares planas.

En la parte inferior hay una placa plana donde se coloca la muestra la cual puede calentarse a diferentes temperaturas según cual sean las condiciones en las que queramos realizar el estudio (fig 13).



Figura 13. Reómetro sin geometría y con geometría

Cabe destacar que se usan muestras de muy poco tamaño por lo que el equipo tiene una calibración muy fina para poder medir estas magnitudes con la suficiente precisión.

Como consecuencia de esta gran precisión el equipo es también muy sensible a un mal uso del mismo por lo que hay que tener en mente varias precauciones antes de usarlo como que la geometría no toque en ningún momento la superficie inferior del reómetro en ningún momento a parte de varios calibrados antes de hacer las medidas.

La principal magnitud que se mide en un ensayo reológico de un material viscoelástico es el módulo complejo de cizalladura G^* (Fig14) que da cuenta de las propiedades viscoelásticas del material.

Al ser una magnitud compleja se pueden considerar su parte real e imaginaria:

$$G^* = G' + j G''$$

Donde G' es la parte real y se denomina módulo de almacenamiento, da cuenta de la cantidad de energía mecánica que el material almacena de manera elástica y reversible.

G'' es la parte imaginaria y tiene el nombre de módulo de pérdidas y da cuenta de la energía perdida de manera irreversible.

El factor de pérdidas $\tan \delta$, se define como la relación entre G'' y G' .

$\tan \delta \equiv G''/G'$, siendo $\tan \delta$ el ángulo de desfase entre la señal de entrada y la salida ($\delta=0^\circ$ si es completamente elásticas).

Tanto G' como G'' se mide en Pascales.

Medidas de Oscilación

Medición de propiedades viscoelásticas como G' , G'' y tangente de δ con respecto al tiempo, la temperatura, la frecuencia y la deformación

- Módulo Complejo $|G^*|^2 = G'^2 + G''^2$
- Módulo de almacenamiento G'
- Módulo de pérdidas G''
- $\tan \delta$ (ángulo de fase)

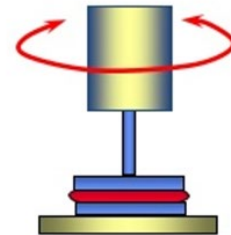


Figura 14. Esquema de geometría plato-plato en un reómetro de cizalla.

Todas nuestras medidas se han realizado a 37°C ya que es la temperatura a la que van a estar las células.

Hemos utilizado el equipo AR2000ex de la casa TA INSTRUMENTS

3-5.6. Balanza de laboratorio con vitrina para vientos:

Equipo de alta precisión que es capaz de medir una masa con una precisión de 0,1mg. Esta precisión se consigue en parte porque tiene una vitrina que protege al objeto de la medida de perturbaciones exteriores como el viento.

Además de esto para asegurar la precisión necesaria ya que medimos masas muy pequeñas, la balanza está situada encima de una mesa anti vibraciones que atenúa en gran medida el efecto de las mismas en nuestras medidas.

El modelo utilizado es el XS105 del fabricante METTLER TOLEDO

3-5.7. PHmetro:

Es un sensor que mide el pH de una disolución, es decir, la concentración de iones de hidrogeno que hay en la disolución. Es un equipo muy fino que hay que tener mucho cuidado al manejar, en especial ya que al tratarse de disoluciones acuosas es importante limpiar el phmetro después de cada medida.

Los phmetros además han de ser calibrados siempre antes de realizar una medida, en el equipo utilizado en mi caso el calibrado se realiza con 3 tampones de pH conocido y constante los cuales se toman como referencia para hacer una escala a tres puntos.

El phmetro usado es de la marca CRINSON, modelo pH-meter BASIC 20+.

3-6. Hidrogel:

Un hidrogel consiste en una red 3D de cadenas flexibles las cuales por su disposición espacial y por la naturaleza química de los grupos funcionales que posee tiene un comportamiento hidrofílico.

Este comportamiento hidrófilo queda reflejado en su comportamiento en ambientes húmedos, ya que el gel es capaz de absorber agua (Fig 15) aumentando su volumen y cambiando sus propiedades físicas ya que aumenta su elasticidad y se hace más blando.

El comportamiento mecánico del gel es viscoelástico.

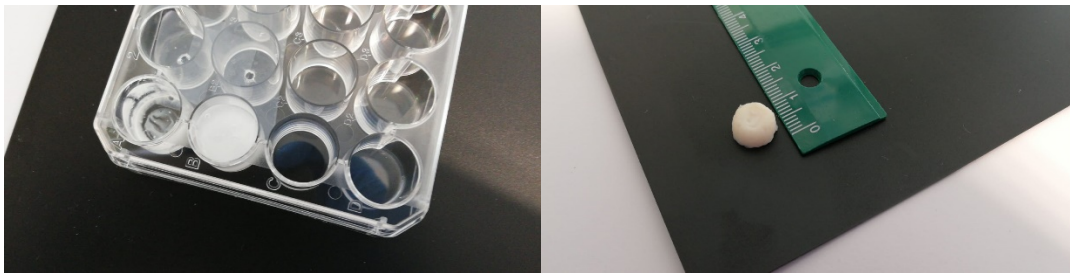


Figura 15. Gel hidratado y gel deshidratado

Las características del gel, están dadas por su comportamiento microscópico a través del entrecruzamiento ocurre debido a diferentes fuerzas intermoleculares como enlaces de hidrogeno, o atracción dipolo-dipolo entre muchas otras por lo que se hace realmente complicado hacer una aproximación teórica del comportamiento de estos materiales.

En nuestro caso estamos usando hidrogeles basados en ELRs, estos geles pueden ser físicos o químicos.

Los que hemos usado en nuestros experimentos son de tipo químico, es decir, el entrecruzamiento producido en el polímero es de tipo covalente.

El interés de estos materiales es muy grande en algunos campos de la ciencia en especial en el campo de la biología ya que son materiales realmente biocompatibles en especial estos materiales se usan en lentes de contacto, liberación controlada de

fármacos y fabricación de vendajes para heridas entre otros usos debido a la gran biocompatibilidad de los mismos.

En nuestro caso hemos elegido este material a la hora de cultivar células.

Para poder modular correctamente sus propiedades mecánicas y bioactivas, favoreciendo los procesos celulares fundamentales.

Las cadenas que forman el esqueleto del hidrogel están formadas por ELRs, en nuestro experimento hemos utilizado tecnología ELRs, específicamente hemos usado los polímeros VKV y HRGD6 para llevar a cabo el gel deseado.

Expresado de manera monomérica el VKV tiene la siguiente secuencia (26):

MESLLP VG VPGVG [VPGKG(VPGVG)₅]₂₃VPGKG VPGVG VPGVG VPGVG VPGV.

Expresado de manera monomérica el HRGD6 tiene la siguiente secuencia:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMESLLP
[(VPGIG)₂(VPGKG)(VPGIG)₂]₂AVTGRGDSPASS[(VPGIG)₂(VPGKG)(VPGIG)₂]₂.

Este polímero incluye una secuencia bioactiva (RGD) que favorece la adhesión celular.

Donde cada letra se refiere a los siguientes aminoácidos

V=valina, P=prolina, G=glicina, K=lisina

El proceso de bioproducción mediante técnicas de recombinación de ambos polímeros se puede resumir en los siguientes pasos:

Primero se realiza una modificación en el ADN de las bacterias que vamos a usar para sintetizar nuestro polímero.

El ADN de una bacteria se encuentra en plásmidos, es decir, es un ADN circular el cual tiene la información fundamental que controla el comportamiento de las bacterias.

Estos plásmidos se extraen y se purifican con herramientas tanto químicas como físicas de filtrado hasta obtener el ADN puro.

Una vez que tenemos este ADN puro se añaden insertos de ADN recombinante que potencian dos facetas, por un lado, una gran reproducción de los plásmidos que van a

formar las cadenas poliméricas que necesitamos, VKV o HRGD6, y por otro lado una resistencia positiva a un antibiótico en concreto.

Posteriormente se hace un cultivo de bacterias en presencia de estos plásmidos modificados y se realiza una selección con el antibiótico específico al cual las bacterias modificadas tienen resistencia. Esto actúa como filtro matando las colonias de bacterias que no han sufrido la modificación que queremos y manteniendo solo las que van a producir nuestro polímero.

Estas bacterias se extraen y se cultivan en unas grandes incubadoras hasta obtener una alta cantidad de biomasa. Cuando se tiene suficiente cantidad de bacterias se usan métodos físicos para romper la membrana bacteriana y posteriormente se hace un filtrado del polímero separándolo del resto de material del interior de las bacterias que es desechado.

Este proceso tiene un bajo rendimiento por lo que para conseguir unas pocas decenas de gramos de polímero se necesita un tanque de decenas de litros en las que cultivar las bacterias.

Una vez tenemos nuestro polímero hay que entrelazarlo para obtener un hidrogel estable.

En particular en nuestro caso hemos usado un hidrogel formado a partir de una reacción click.

Este tipo de reacciones tienen como características principales su alto rendimiento y rapidez, amplio alcance por lo que se puede realizar en grandes cantidades relativamente grandes para ser una reacción química y sobretodo la ausencia de subproductos que puedan afectar al resultado final.

Esta última cualidad se consigue gracias por un lado a una la existencia de una gran cantidad de grupos activos químicamente y por otro lado a estereometría específica, ambas propiedades en conjunto hacen que muy pocas moléculas puedan no reaccionar de la manera deseada y por lo tanto formar subproductos no previstos.

Los polímeros VKV y HRGD6 utilizados no tienen a priori estos grupos funcionales para realizar una click por lo que se someten a un proceso de modificación química.

3-7. Células:

Las células son la unidad mínima de la cual están formados todos los seres vivos. Su principal característica es su habilidad para auto replicarse la cual se aprovecha para realizar cultivos celulares.

En este experimento solo usaremos un único tipo de célula, el fibroblasto. Estos fibroblastos se obtienen a partir de tejido de mamífero.

Los fibroblastos son células comunes en el tejido conectivo y su función en el organismo es la síntesis y el mantenimiento de la matriz extracelular del tejido conectivo.

Esta matriz extracelular es fundamental a la hora de transmitir información a través del cuerpo y entre unas células y otras por lo que estas células son en principio buenas candidatas a la hora de reaccionar a todo tipo de estímulos tanto mecánicos como eléctricos o químicos.

Los fibroblastos tienen una actividad muy alta tanto en cuanto a su proliferación como a la secreción de sustancias para mantener el ambiente de la matriz extracelular.

En lo que a proliferación se refiere en condiciones ideales cada 30 horas se duplica el número de células y en cultivos celulares es común que se alcance la confluencia y ya no tengan espacio para poder duplicarse más.

Una vez que se ha alcanzado la confluencia, se extraen las células para los experimentos en concreto que quieran realizarse y las restantes vuelven a dividirse hasta volver al estado de confluencia.

Este proceso se puede realizar entre 20 y 50 veces según la edad del mamífero del cual se hayan extraído las células, lo cual pone en evidencia la vitalidad de estas células.

La morfología de los fibroblastos suele ser alargada y fina, aunque es muy variada ya que depende del órgano en el que se encuentre, es decir, del ambiente exterior y del tipo de células que le rodeen.

Cuantitativamente el tamaño del núcleo es de 15 μm frente a un citoplasma de unos 100 μm de largo y 20 μm de ancho cuando están adheridas a una superficie (fig 16).



Figura 16. Fibroblastos adheridos

Una característica singular de este tipo de células es la existencia de la proteína actinina α la cual interacciona con el colágeno y con otras proteínas de adhesión que se encuentran en casi todos los compuestos biológicos.

La capacidad de adhesión, en especial la adhesión del colágeno, hace que sean fundamentales en todos los procesos de regeneración y cicatrización en la dermis por lo que el uso de estas células en aplicaciones médicas y de biotecnología están al orden del día (27).

En estos cultivos celulares se ha utilizado como medio celular el HFF mínimo, HFF son las siglas de human foreskin fibroblasts.

Este medio es fundamentalmente agua en la que se ha disuelto diferentes sustancias para favorecer el crecimiento de microorganismos, células o pequeñas plantas.

Principalmente las sustancias disueltas con aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa, suero, antibióticos y factores de adhesión.

En nuestro caso como estamos tratando con células es necesario mantener un pH neutro por lo que se añaden sustancias como proteínas que regulan el pH según la concentración de CO_2 del ambiente, en nuestro caso el pH se neutraliza con una concentración del 10%

3-8. Métodos experimentales

3-8.1. Modificación Química VKV-Ciclo

Previo a utilizar los geles explicados con anterioridad hay que realizar un proceso químico para que se produzca el entrecruzamiento deseado.

La reacción consistirá en mezclar el polímero VKV+24K (lisinas)+ Ciclo (ciclooctino) para obtener VKV-Ciclo.

El proceso se realizará a temperatura ambiente durante 48 horas con una concentración del 60% de lisinas y usando como disolvente DMF (dimetilformamida)

Primero usamos los pesos moleculares de los diferentes compuestos por lo que determinamos que para modificar 5 gramos de VKV necesitaremos 0,35g de ciclooctano.

Una vez hechos los cálculos primero se pesa el ciclo necesario y se mezcla con el VKV en un matraz circular, posteriormente el matraz circular es tapado en su abertura por un globo lleno de un gas inerte (Fig 17), en nuestro caso hemos usado nitrógeno puro.



Figura 17. Uso de globos para conseguir una atmósfera inerte

Purgamos el aire del interior usando el globo y dos agujas que permiten que salga el aire del interior haciendo que el aire dentro del matraz carezca de toda humedad ya que cualquier molécula de agua reaccionaría con la molécula rompiéndola.

Una vez el aire interior ha sido expulsado se añade mediante una aguja el DMF, unos 10 ml por gramo a disolver.

Esta disolución se deja con el globo de nitrógeno puesto y con un agitador magnético durante 48 horas hasta que esté completamente mezclado y reaccionado.

Esta disolución se pasa a falcon especiales para reacciones orgánicas en los que se echa el doble de dimetil ether que disolución inicial teníamos es decir 100 ml de ether en total.

En cuanto se mezcla con el ether el polímero precipita inmediatamente

Repartimos la disolución entre varios falco de manera equilibrada para ponerlos en una centrifugadora.

Se centrifuga durante 10 min a 1000 revoluciones por minuto a 7 grados para evitar la evaporación del ether.

Retiramos el ether y añadimos 10 ml de cetona para realizar otra centrifugación análoga. Después retiramos la cetona y volvemos a centrifugar con cetona otra vez en las mismas condiciones.

Gracias a la cetona eliminamos el DMF.

Filtramos el polímero y lo ponemos a remover durante 24 horas en la sala fría.

Finalmente, solo resta hacer un filtrado final para eliminar posibles sustancias contaminantes mediante diálisis.

Metemos todo el polímero en tripas de diálisis y lo sellamos.

Estas tripas de diálisis son puestas en un cubo de 25 litros de agua ultra pura durante 48 horas y posteriormente se congela el polímero para poder liofilizar para eliminar cualquier resto de humedad.

Una vez se ha liofilizado ya tenemos el polímero final (Fig 18) lo suficientemente puro y estéril para poder usarlo.

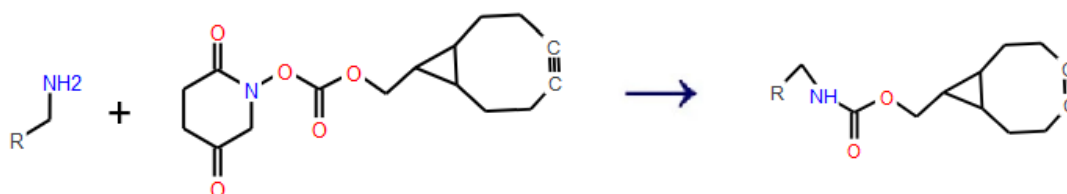


Figura 18. Esquema de la modificación química para conseguir el grupo ciclo

El material HRGD6-N3 ya estaba sintetizado previamente por lo que no fue necesario realizar su modificación química, pero también hay que realizar un procedimiento análogo al ya descrito del VKV.

Como resultado de este proceso obtenemos VKV-Ciclo y HRGD6-NH3 con los cuales ya podemos realizar nuestra reacción click.

Una de las ventajas de realizar esta reacción click está en las propiedades del polímero final.

Principalmente en su comportamiento frente a la temperatura debido a su solubilidad en frío.

Es por esto en gran medida que la reacción VKV-ciclo+HRGD6-NH3 es muy conveniente ya que tiene una propiedad muy poco usual y muy útil experimentalmente. Estos polímeros disueltos en un medio acuoso se comportan como líquidos a bajas temperaturas, menores de 5 °C, y se solidifican al calentarse en contra de lo que ocurre con la inmensa mayoría por no decir la totalidad de materiales.

Esto se debe fundamentalmente a la solubilidad del polímero en el disolvente y su variación con la temperatura.

Este comportamiento es muy bueno para tratar con células porque nos aseguramos que el hidrogel no va a deshacerse debido al calor ya que necesita frío para alcanzar una fase líquida.

3-8.2. Realización de los Geles incluyendo el dispositivo piezoeléctrico

Antes de empezar a realizar el experimento es importante realizar algunos pasos previos.

A lo largo de todo el experimento la esterilidad es un elemento fundamental por ello el primer paso es esterilizar el material a utilizar.

Primero autoclavamos una broca de 3,5 mm de diámetro que usaremos para modificar una placa de pocillos. Esterilizamos usando etanol unos alicates que usaremos para el mismo menester. Cogemos una placa de pocillos de 24 pocillos y en una campana estéril adaptamos la placa para poder usar el piezoeléctrico.

Esta adaptación consiste en quitar la tapa superior y taladrar agujeros en la superficie que hay entre pocillos para así hacer un agujero por donde puedan pasar los cables.

Los cables que saldrían por la parte inferior de la placa necesitan además más espacio para poder salir por un lateral por lo que en la zona donde se han hecho los agujeros de taladro se quita con los alicates una sección rectangular de plástico para dejar pasar así los cables.

Este corte con los alicates no compromete la esterilidad de la placa de pocillos pues es exterior a la zona hermética sin embargo el agujero de taladro sí que rompe la zona hermética por lo que la placa de pocillos deberá estar en todo momento en una campana bien sea de flujo o simple.

Se retiran los desechos que hayan surgido al taladrar con unas pinzas con cuidado de que no entren en los pocillos.

Además de esta configuración también se ha probado taladrar los agujeros en la parte inferior del pocillo o en la parte superior taladrando la tapa y posteriormente tapando los agujeros con celo. En el primer caso (Fig 19 a), el agujero creado al pasar el cable hace que el hidrogel pierda agua. Esa deshidratación producida cuando el gel todavía está formándose hace que desaparezca en su totalidad.

En el segundo caso (Fig 19 b), al poner los cables por arriba e intentar abrir la tapa para manipular los geles la tensión producidas por el cable desgarrar el gel ya que no tiene suficiente consistencia por lo que acaba inutilizado, es por esto que la configuración final (Fig 19 c), ha sido elegida como la más eficiente pese a sus riesgos de contaminación.

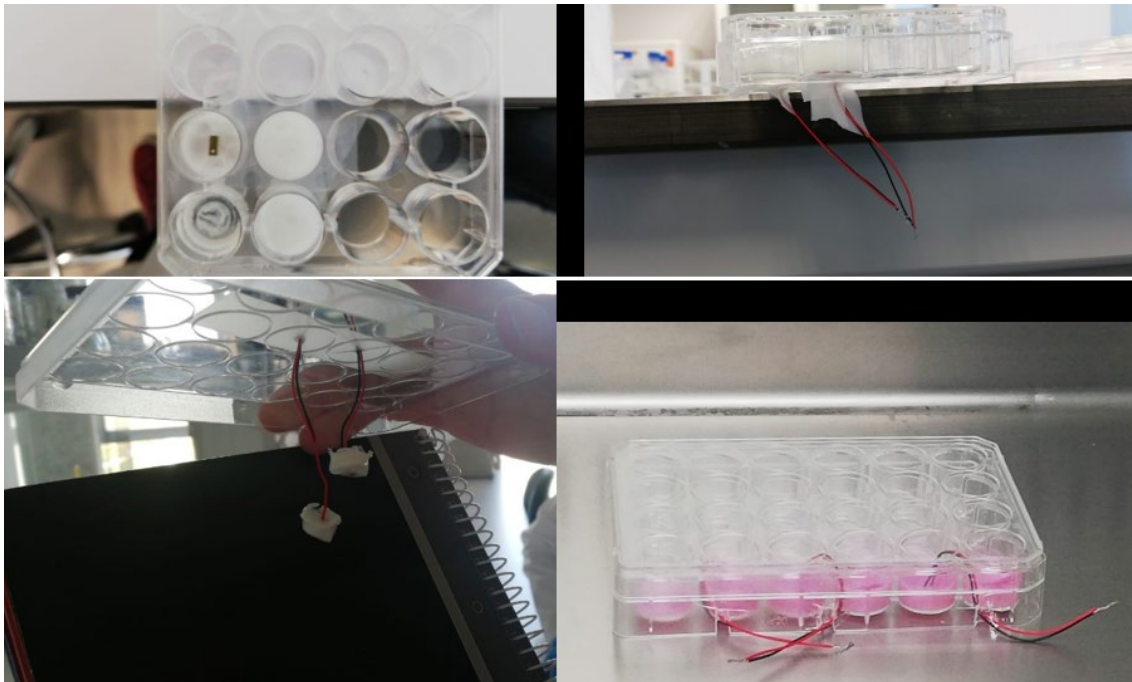


Figura 19. Diferentes configuraciones de los agujeros para los cables, de izquierda a derecha a) Agujero abajo, b) Vista lateral de agujero abajo, agujero arriba c), d) configuración final.

Finalmente, se abre la placa de pocillo y se pone a esterilizar durante 40 min con luz ultravioleta, es importante destacar que la luz es más efectiva cuanto se está más cerca de la fuente por la que es recomendable subir la placa con algún objeto.

En nuestro caso, usamos una caja de poliespan para asegurarnos de que el ultravioleta es efectivo.

Con la placa esterilizada, ya podemos centrarnos en la esterilización del piezoeléctrico.

Esterilizaremos el dispositivo piezoeléctrico con un baño en etanol puro durante 20 min y lo dejaremos secar durante 10 min.

Para evitar estropear el dispositivo, previo a este baño usaremos silicona para tapar con una pequeña gota esférica las dos conexiones de los cables con el cuerpo del dispositivo.

Una vez tenemos las dos partes estériles hay que ensamblarlas para realizar el experimento.

Metemos el piezoeléctrico en los pocillos y doblamos los cables para que pasen por los agujeros previamente taladrados. La tensión de los cables hace que no los podamos colocar de una manera correcta en los pocillos ya que deben estar lo más centrados posible y muy cerca de la superficie inferior del pocillo, pero sin estar en contacto.

Esto junto a que la manipulación de los cables hace mover el piezoeléctrico lo que desgarraría el hidrogel hace necesario que usemos silicona tanto en el agujero de taladro como en la sección recortada con los alicates para fijar la posición del piezoeléctrico.

Este paso es una fuente de contaminación importante debido a la no esterilidad de la silicona.

Una vez se seca la silicona ya tendríamos nuestra placa de pocillos lista para realizar el hidrogel en ella.

Ahora pasemos a explicar los pasos para realizar el hidrogel:

Primero hay que pesar la cantidad de polímero que queremos teniendo en cuenta de que los geles se hacen de 2 ml cada uno y con una concentración de 75mg/ml.

Por lo que para un gel de 2 ml necesitaremos 75 mg de HRGD6-N3 y 75mg de VKV-Ciclo.

Una vez hemos pesado el polímero con la balanza y en esterilidad lo disolvemos en medio para células (HFF-1 mínimo) y como hemos comentado anteriormente en las propiedades de estos polímeros lo disolvemos en frío usando un recipiente de poliespan y hielo.

Este proceso de disolución tarda aproximadamente un día por lo que este es el primer paso antes incluso de modificar la placa de pocillos.

Una vez tenemos el polímero disuelto homogéneamente estamos en condiciones de realizar la reacción click.

Esta reacción ha de realizarse en una campana de flujo ya que es crucial no contaminar el gel.

Primero ponemos un acumulador de frío debajo de la placa de pocillos para mantener los pocillos fríos y que la reacción sea controlada y progresiva, no instanea y inhomogenea.

Usando puntas estériles y congeladas ponemos en un eppendorf enterrado en hielo 1 ml de disolución VKV-Ciclo y 1 ml de HRGD6-N3. Una vez que se ponen en contacto la reacción comienza, normalmente se dejarían en ese eppendorf durante 4 ó 5 min incubando en hielo y cada 30 segundos se mezclaría usando un vortex para homogeneizar la reacción. En nuestro caso al estar en una campana de flujo que no está en una sala fría la reacción es más rápida por lo que solo se deja 1 minuto y medio y se mezcla con vortex una sola vez.

Es crucial que la temperatura de la punta sea baja por lo que las puntas se entierran en hielo el minuto que dura la incubación para evitar que se calienten, además de que los eppendorf donde se haga la incubación tienen que estar enfriados previamente y durante la incubación en todo momento.

Cualquier choque térmico hará que el gel se solidifique en cuestión de segundos por lo que los cambios de temperatura han de ser suaves.

Una vez pasado el tiempo se pipetea del eppendorf al pocillo y se deja unos minutos sin mover la placa hasta que el gel adquiere más consistencia.

Una vez el gel adquiere resistencia podemos repetir el proceso en el resto de pocillos hasta obtener el número de geles deseados, teniendo en cuenta que para cada gel que queramos crear habrá que usar un eppendorf de incubación diferente.

3-8.3. Tinción para la visualización de las células

La tinción tiene varias fases que explicaré brevemente:

Fijación: El objetivo de este proceso es que el sistema deje de evolucionar y que se mantenga en el estado actual durante varios días. Una vez realizada la fijación ya no es necesario proceder en absoluta esterilidad.

Primero retiro el medio células y lavo con PBS calentado a 37°C 2 veces para eliminar restos, añado una solución de paraformaldehído al 3,7% y lo dejo actuar durante una hora. Pasado el tiempo retiro la disolución y lavo 2 veces con PBS.

Tinción Faloidina (PHALLOIDIN-ALEXA FLUOR 488): El objetivo es teñir el citoplasma de un color verde para poder visualizarlo.

Cubrimos el gel con Tritón X-100 0,1% disuelto en PBS durante 10 min, retiramos y lavamos 2 veces con PBS.

Añadimos 400 µL por pocillo de BSA al 1% durante 30 min, retiramos el BSA y ahora echamos 300 µL por pocillo de una disolución de Faloidina (5 µ L de Faloidina por 200 µL de PBS) y la dejamos 20 min en oscuridad, a partir de este momento los geles deberán estar siempre en oscuridad y tapados por papel de aluminio.

Tinción Dapi: El objetivo es teñir el núcleo celular de un color azul para poder visualizarlo.

Retiramos la tinción de Faloidina y lavamos con PBS dos veces, añadimos una disolución Dapi a 300 µm e n PBS y se deja 5 min en oscuridad.

Finalmente retiramos el Dapi y lavamos 3 veces con PBS, dejando el PBS la última vez para evitar que los hidrogeles se sequen.

Capítulo 4

Procedimiento experimental para realizar un Cultivo Celular bajo estimulación mecánica

4-1. Caracterización preliminar del hidrogel:

Antes de hacer los ensayos con células es importante conocer la morfología y las propiedades mecánicas del gel con el que vamos a trabajar.

Para ello hemos realizado varios ensayos previos de caracterización con el objetivo de analizar si el material es el indicado o no para el experimento.

4-1.1. PHmetria:

Como el hidrogel va a estar en contacto con células es fundamental que el pH sea lo más cercano a neutro.

En caso contrario sería necesario un ajuste de pH de las disoluciones antes de formar el gel con la reacción click para que el resultado sea lo más cercano a un pH 7.

La medida del pH se realiza sobre una disolución de VKV-ciclo disuelto en medio para células y para una disolución de HRGD6-N3 disuelto en el mismo disolvente.

La disolución debe ser homogénea de modo que se pueda apreciar si el pH del medio que es neutro se ve modificado al disolver el polímero.

Las medidas experimentales obtenidas han sido:

7,04 para el VKV-Ciclo y 7,12 para el HRGD6-N3, las cuales se encuentran dentro del rango aceptable por lo que no es necesaria ningún ajuste de pH previo.

4-1.2. SEM:

Las condiciones a las que se han tomado las imágenes han sido siempre:

5000 voltios de aceleración, y en cuanto a la magnificación se refiere va entre x44 y x80000, siendo en las imágenes x10000 y x20000 en las que mejor se puede distinguir el tamaño de poro.

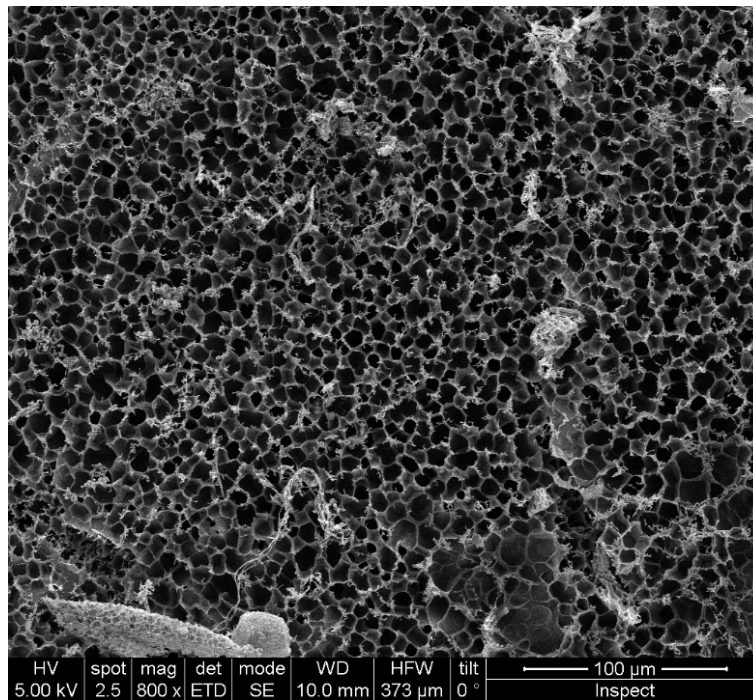


Figura 20. a. Imagen de la sección transversal del hidrogel con x800 de magnificación

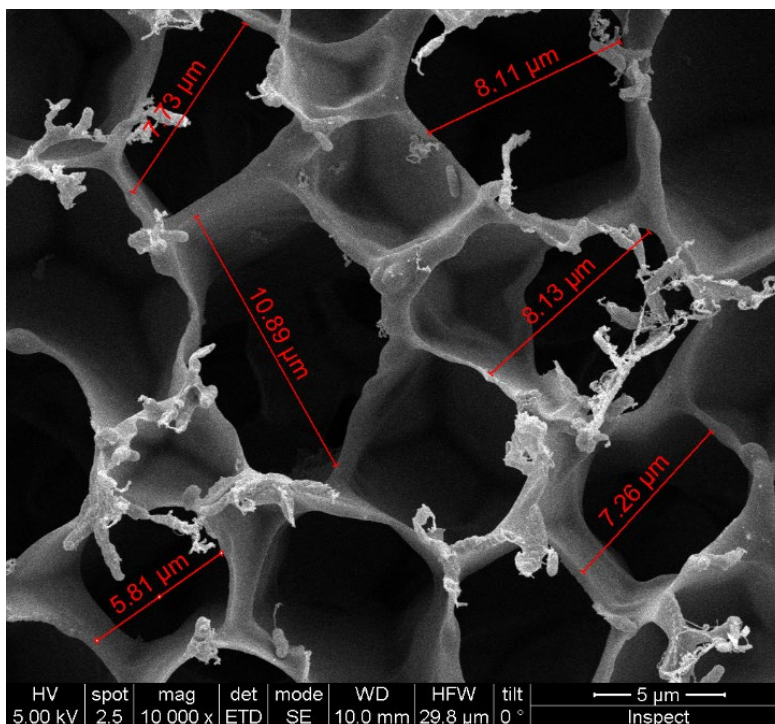


Figura 20. b. Imagen de la sección transversal del hidrogel con 10000 de magnificación en las que se puede apreciar el tamaño de poro

A partir de estas fotos (Fig 20) obtenemos el tamaño medio de poro es $8,3 \mu\text{m}$ con una desviación de $\pm 3,5 \mu\text{m}$.

Como se aprecia en algunas de las fotos los poros tiene orificios internos lo que indica que hay comunicación entre los poros, no son poros aislados unos de otros.

Esta existencia de comunicación entre poros favorece la migración de celular.

4-1.3. Reología:

Las características reológicas van a determinar:

Cómo van a propagarse las vibraciones mecánicas por el material.

Si la consistencia del mismo va a ser la suficiente como para que las células puedan adherirse y también si el material va a poder sostener el dispositivo piezoeléctrico y aguantar sus deformaciones sin deformarse o, incluso, fracturarse.

Para realizar la prueba antes hay que preparar la muestra.

Primero, una vez se ha formado completamente, y sin dejar tiempo a que empiece a deshidratarse se separa del pocillo usando pinzas con cuidado de no deformarlo ni fracturarlo.

Después se coloca en un falcon lleno de agua y se mantiene cerrado hasta que se realice la prueba para evitar que se pierda la humedad.

Con las muestras preparadas ya podemos empezar a realizar las pruebas.

En primer lugar, para determinar la región lineal de viscoelasticidad realizamos un barrido de la amplitud de deformación (strain) a la frecuencia de 1Hz entre 0.01 y 20 %.

Seleccionando una amplitud concreta dentro de la zona lineal, se realiza un barrido de la frecuencia de la señal de entrada entre 0.1 Hz y 10 Hz.

Como puede verse en las gráficas $|G^*|$ frente deformación (Fig 21), $|G^*|$ permanece constante para todas las amplitudes del estímulo aplicado.

Ello indica que permanecemos siempre en la región lineal de viscoelasticidad.

Así, elegimos una deformación del 1% para realizar las medidas donde la amplitud del estímulo aplicado permanece constante en ese valor y se varía la frecuencia.

En las gráficas (Fig 22) se observa la evolución de G' y G'' y δ con la frecuencia.

A frecuencias bajas se ve una zona débilmente dependiente con la frecuencia. Cuando la frecuencia, aumenta ambos módulos lo hacen.

A la frecuencia de 1 Hz se obtienen los siguientes valores:

$$G' = 493 \text{ Pa} \quad G'' = 4.5 \text{ Pa} \quad \delta = 0.5^\circ$$

A la vista de estos valores, podemos concluir:

- $G' \gg G''$ (dos órdenes de magnitud) lo que indica un comportamiento como buen de hidrogel elástico.

- El valor de $|G^*| \approx G'$ (cientos de Pa) indica que se trata de un hidrogel blando.

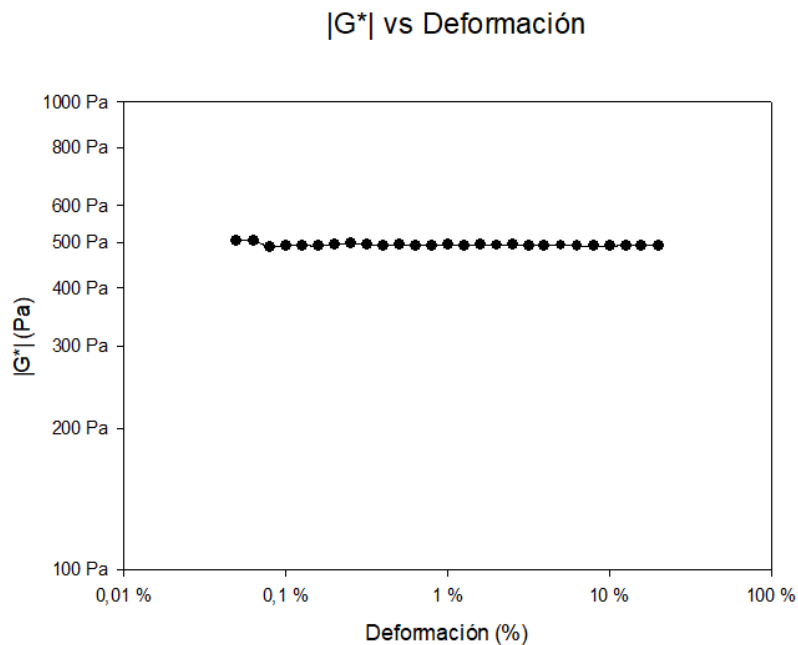


Figura 21. Barrido en Deformación, Módulo de elasticidad vs deformación.

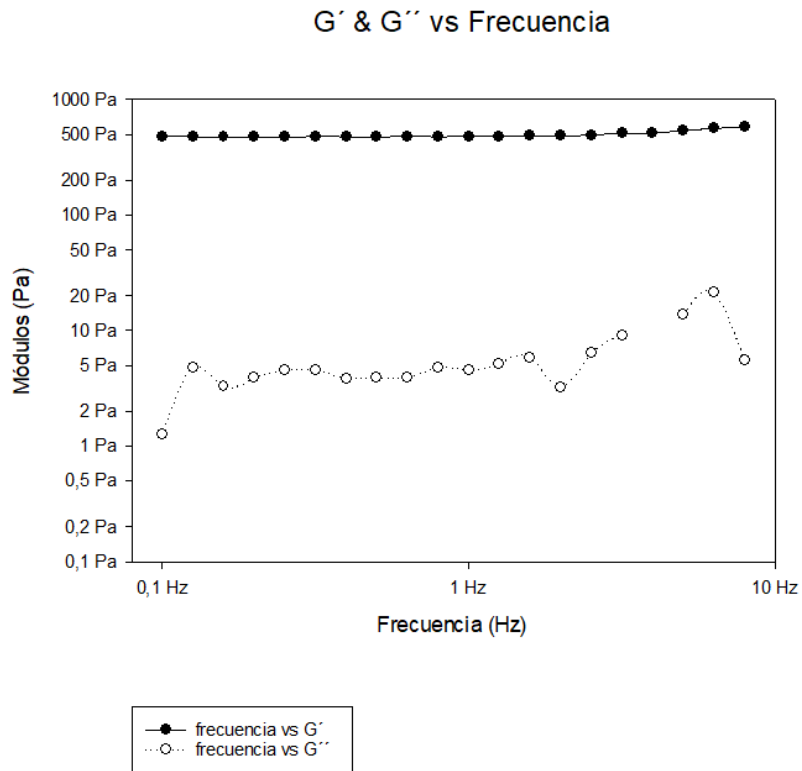


Figura 22.a. Barrido en frecuencia: módulos vs frecuencia

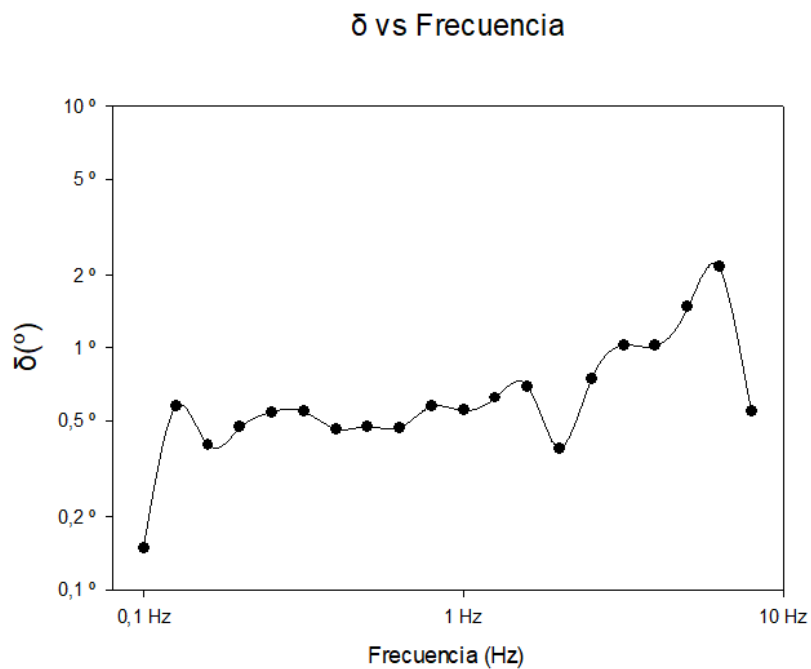


Figura 22.b. Barrido en frecuencia, Angulo de desfase vs frecuencia

4-2. Cultivo celular bajo estimulación mecánica

Una vez tenemos nuestro gel formado completamente (Fig 23) con el dispositivo dentro lo dejamos durante 1 día en una incubadora a 37°C para que pierda algo de líquido y gane consistencia.

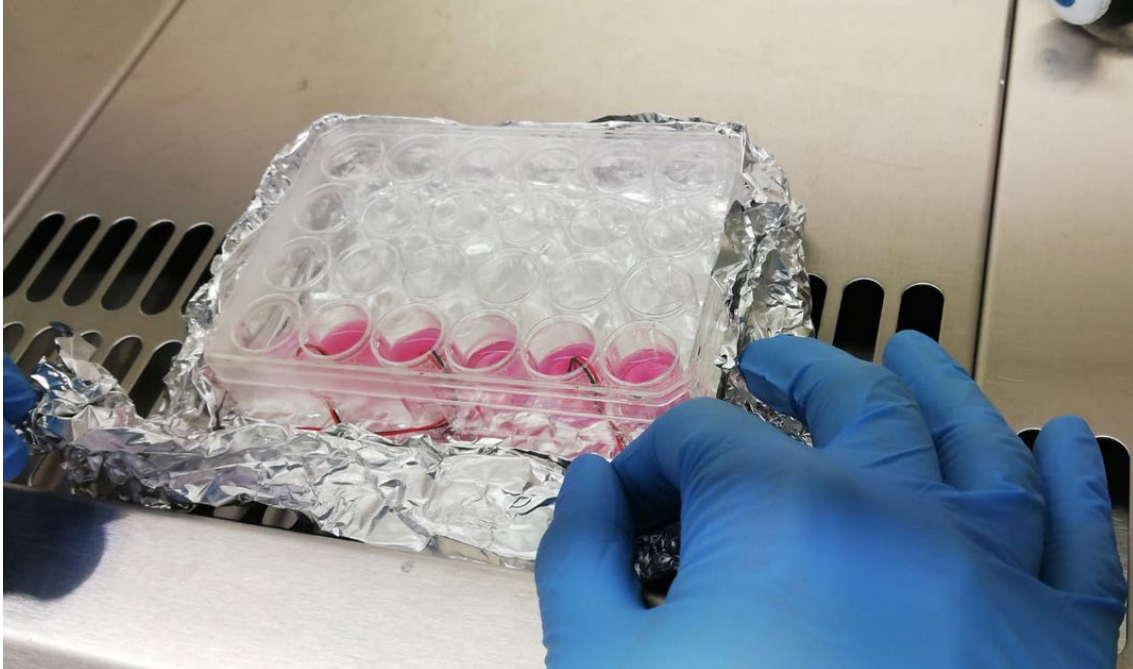


Figura 23. Geles antes de que se cultiven células

Después se cultivan células en su superficie, unas 50000 células por pocillo.

Las células están inicialmente en un Flask (Fig 24) donde se han dividido hasta llegar a confluencia.

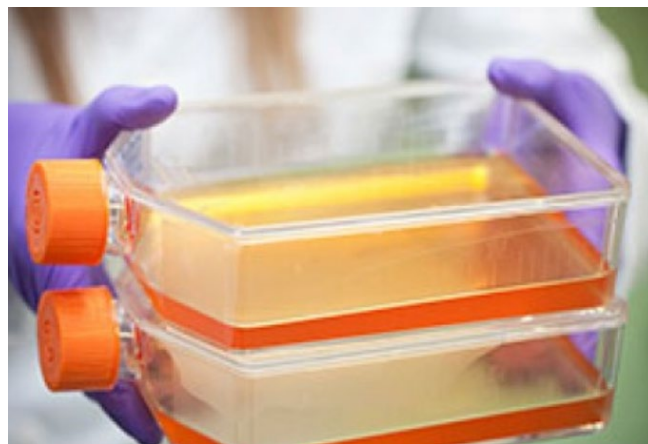


Figura 24. Flask para cultivo celular

Se retira el medio de ese Flask y se reemplaza por 6 ml de Tripsina.

Este químico atacará a las células haciendo que se despeguen; después de 5 min actuando, se neutraliza echando medio en una cantidad entre 2 y 3 veces la cantidad de tripsina usada, por ejemplo, unos 15 ml.

Se echa en un número par de falcons todo el líquido y se centrifuga durante 15 min a 3000 revoluciones por minuto equilibrando el peso de la centrifugadora con los diferentes recipientes.

Pasado este tiempo todas las células habrán precipitado en un “pellet” de células y podremos retirar el líquido sobrante.

Se vuelven a resuspender las células en 10 ml de medio agitándolo usando un vortex.

Retiramos 10 μ L de medio y añadimos 10 μ L de trypan blue.

Gracias a este reactivo podremos echarlas en una Cámara de Neubauer con la cual podremos medir la concentración de células que hay en la disolución obtenida.

Valores típicos para la concentración están en torno a las 600000 células por mililitro.

Conociendo la concentración se calcula de manera directa cuanto volumen de la misma hay que echar en lo pocillos para obtener las 50000 células por pocillo deseadas.

Estas células se dejan adhiriéndose a la superficie del gel durante un día en una incubadora a 37°C.

Como el hidrogel ahora tiene células la incubadora tiene que fijar una concentración de CO₂ al 10% para que el tampón salino que lleva equilibre el pH para que sea neutro.

De esta manera el ambiente es el idóneo para la fijación y división de las células.

Pasado las 24 horas con las células ya fijadas aplicamos una tensión a los piezoeléctricos usando un generador de funciones.

Es ahora cuando comienza el experimento propiamente dicho.

Previamente a usar el generador de funciones hemos medido con un osciloscopio que la onda generada es la queremos, prestando especial atención a que el offset aplicado sea el suficiente como para que la onda siempre se aplique con potencial positivo ya que un potencial negativo estropearía el dispositivo.

Las principales variables con las que se puede jugar en experimento son el tiempo que funciona el piezoeléctrico, la forma de onda, la amplitud de la onda y la frecuencia usada.

Se aplica tensión utilizando un tono puro con diferentes valores de amplitud y frecuencia.

Los valores utilizados en los experimentos varían entre 0,8 a 155 Hz de frecuencia, la amplitud es siempre de 4 voltios pico a pico.

Utilizando la gráfica expuesta en el apartado del dispositivo piezoeléctrico podemos calcular la amplitud de la vibración generada por el mismo. Para nuestro caso de 4 Voltios pico a pico tenemos una oscilación del tamaño del dispositivo de alrededor de 30 nm.

El piezoeléctrico estimula el cultivo celular durante 24 horas en un incubador con regulación de CO₂ (Fig 25), pasadas las cuales paramos el piezoeléctrico y sacamos las células del incubador.



Figura 25. Interior del incubador. Dispone de una entrada de gases para crear una atmósfera rica y controlada de CO₂.

Preparación para la visualización de células:

Para visualizar las células en el gel (Fig 26), tendremos que usar una tinción química para poder distinguirlas del gel en el que están adheridas.



Figura 26. Geles después de aplicar la vibración mecánica

Los geles se almacenan en frío y oscuridad.

La tinción puede ser observada durante 5 ó 6 días.

La visualización de geles en el microscopio óptico (Fig 27) es compleja porque su superficie no es completamente regular lo cual hace que al enfocar un único plano no se vea nítida toda la imagen.

Además, tenemos una estructura tridimensional, con dificultad para enfocar en profundidad.

Pese a ello, al usar la tinción es posible tener imágenes de calidad suficiente para identificar las células, aunque no se vean con absoluta nitidez.

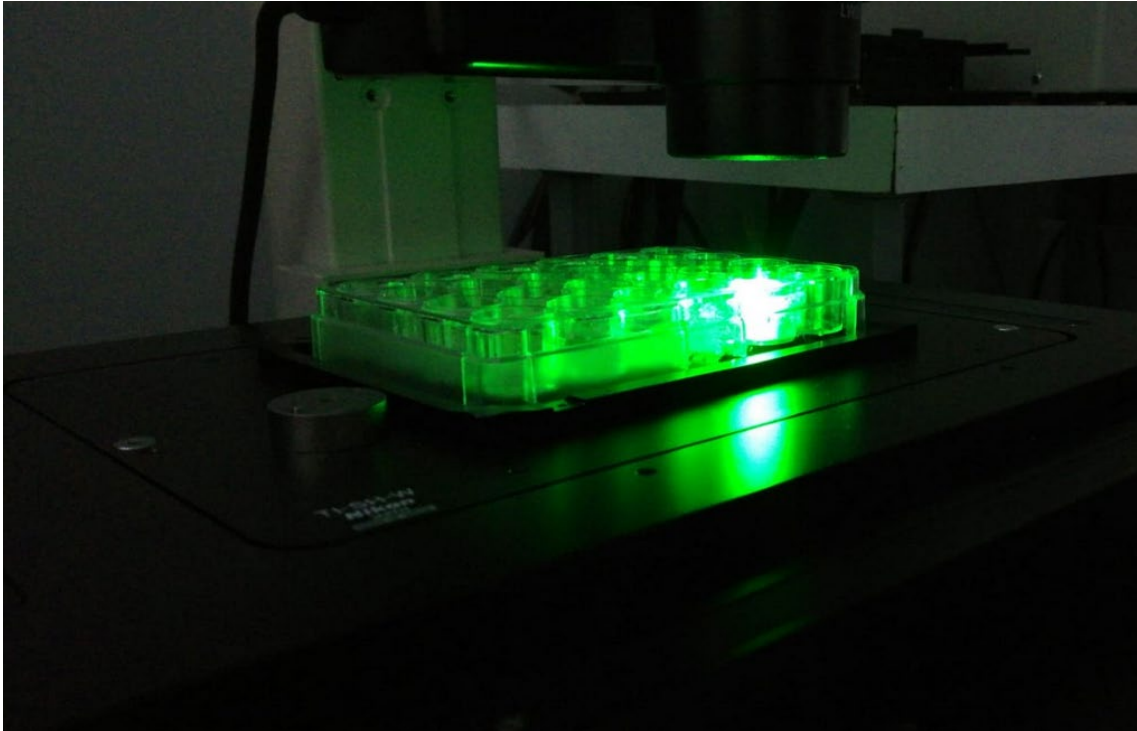


Figura 27.a. Visualización del medio de cultivo

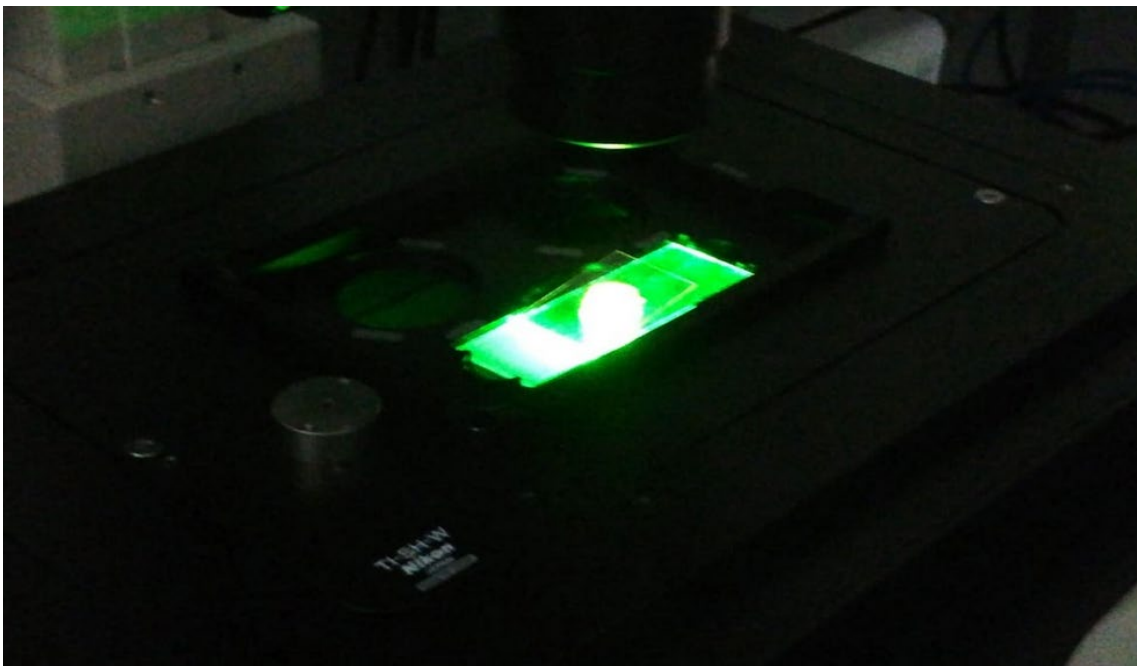


Figura 27.b. Visualización de los hidrogeles

4-3. Resultados:

Los principales resultados que se han obtenido a partir del experimento son las fotografías realizadas mediante microscopía óptica.

La tinción realizada tiñe de verde el citoplasma y de azul los núcleos, pudiéndose observar así las células en su totalidad.

Es de interés observar detenidamente la tinción verde pues es en la forma del citoplasma donde se puede observar cómo se han adherido las células al hidrogel.

Se han realizado dos muestras controles:

Un hidrogel sin piezoeléctrico y un hidrogel con piezoeléctrico, pero sin vibrar.

En ambos casos, se han sembrado células en su superficie.

Los resultados se muestran en las figuras 28.a y 28.b respectivamente.

Puede observarse una distribución uniforme de células, sin apreciarse ningún tipo de ordenamiento asociado a la nueva presencia física del dispositivo piezoeléctrico.

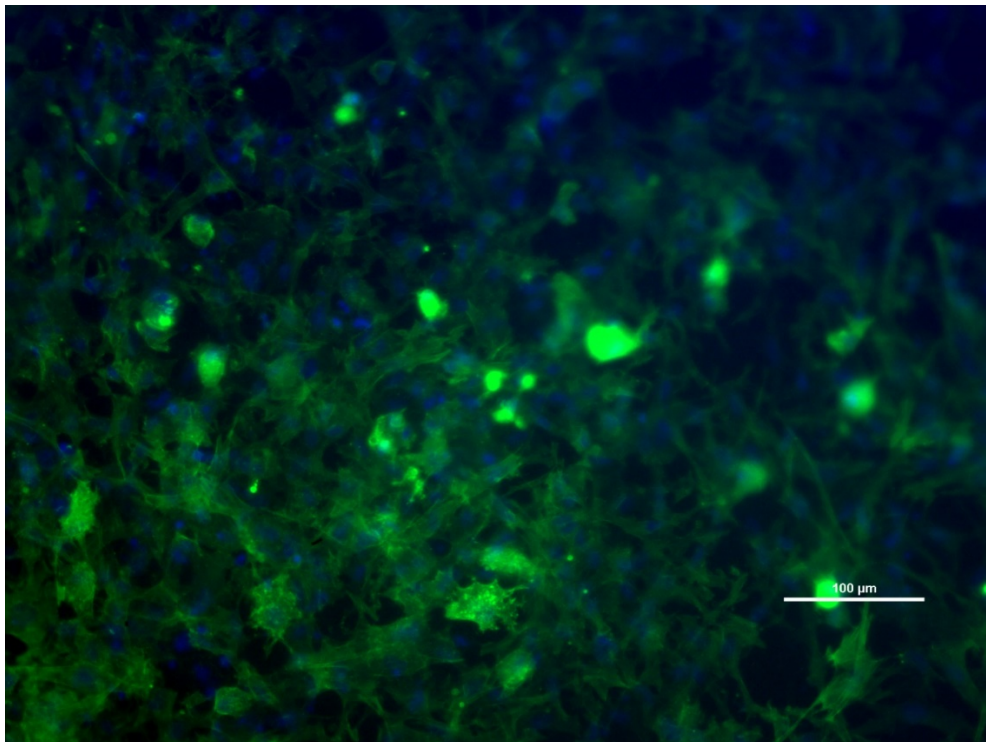


Figura 28.a. Imagen de células adheridas en un gel sin piezoeléctrico.

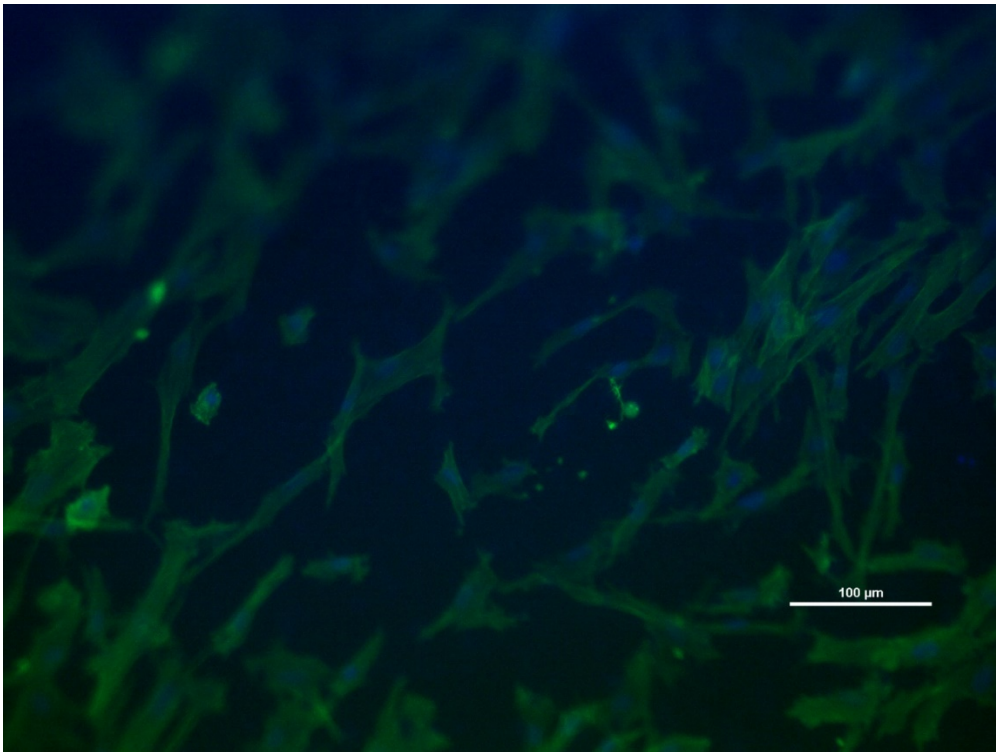


Figura 28. b. Imagen de células adheridas en un gel con piezoeléctrico, pero sin estar en funcionamiento.

Posteriormente se han realizado fotografías con el dispositivo piezoeléctrico funcionando con diferentes condiciones.

La señal eléctrica aplicada ha sido en todos los casos una señal sinusoidal.

Todos los experimentos se han realizado con una amplitud de 4 voltios pico a pico y 24 horas de duración, variando únicamente la frecuencia aplicada (1 Hz ,15 Hz y 155 Hz).

En las figuras 29, 30 y 31 se muestran las fotos tomadas por microscopía óptica correspondientes a esas frecuencias.

En la figura 29 en la que se ven las células sometidas a una vibración de frecuencia 1 Hz.

Pese a que la frecuencia es muy baja se pueden observar algunos efectos.

En cuanto a la densidad de células se puede decir que se ha mantenido constante respecto a los blancos prácticamente, sobretodo viendo el gel en conjunto en el microscopio no hay ninguna zona sin células por lo que no se ha producido migración celular apreciable.

Sin embargo, en cuanto a la forma se observa una gran cantidad de células cuyo citoplasma es redondeado lo que indica una baja adhesión. Se puede concluir que hay efecto sobre las células para esta frecuencia, aunque sea menos visible que en los otros dos casos.

En la figura 30 podemos observar que para una frecuencia de 15 Hz la densidad de células es muy reducida, además de esto las pocas células que se observan tienen una forma redondeada que indica poca adhesión con el gel.

Es posible por lo tanto que este tono puro de 15 Hz afecte a la adhesión de las células o la integridad del gel de forma fundamental provocando en última instancia la separación de las células del gel.

En la figura 31 observamos las células sometidas a una vibración de frecuencia 155 Hz.

Además de esto se puede apreciar como el citoplasma es muy alargado lo que indica buena adhesión y una ligera ordenación local en dirección arriba-izquierda (noroeste).

Se observan grandes regiones del gel sin células en la cercanía del piezoeléctrico por lo que es muy probable que la vibración haya matado a algunas células, las cuales han desaparecidos al realizar el proceso de tinción.

Las zonas con mayor densidad celular en este caso han sido alejándose del foco, hacia los bordes del pocillo.

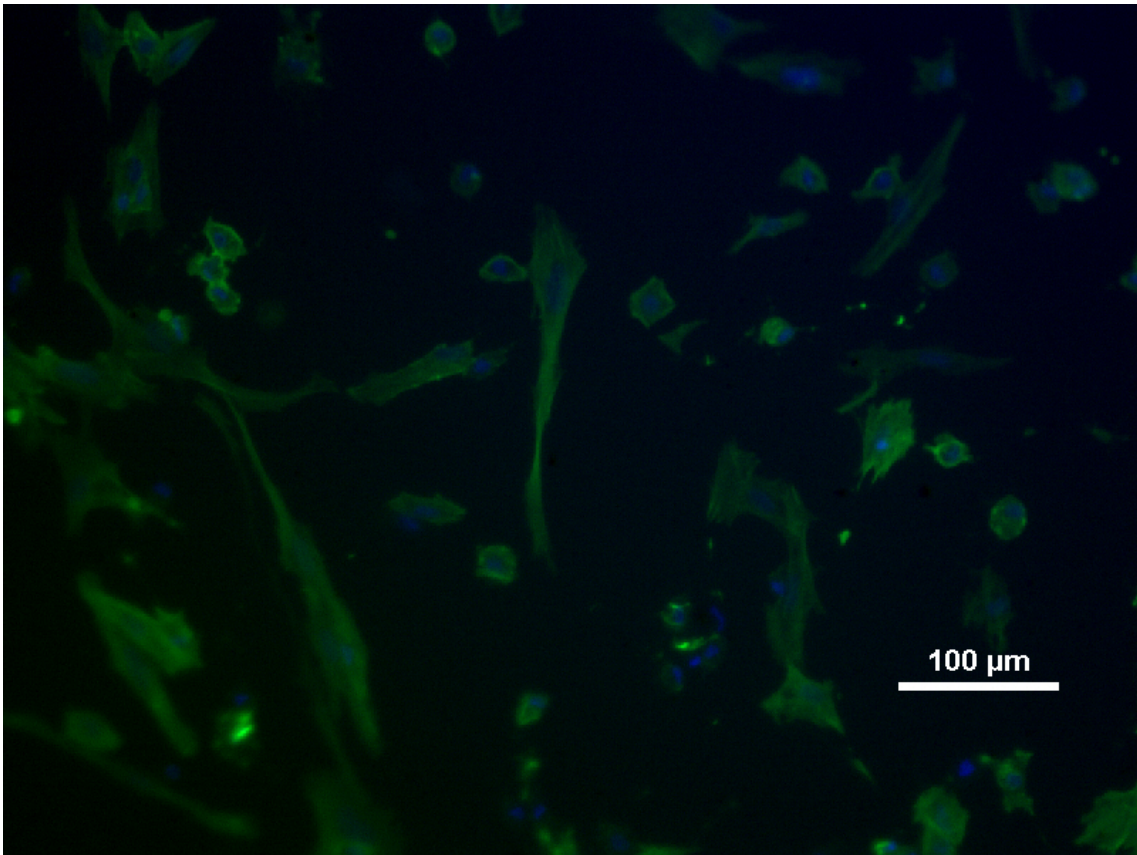


Figura 29. Imagen de células adheridas en un gel con piezoeléctrico sometido a una onda sinusoidal de 4 voltios pico a pico y 1 Hz de frecuencia durante 24 horas.

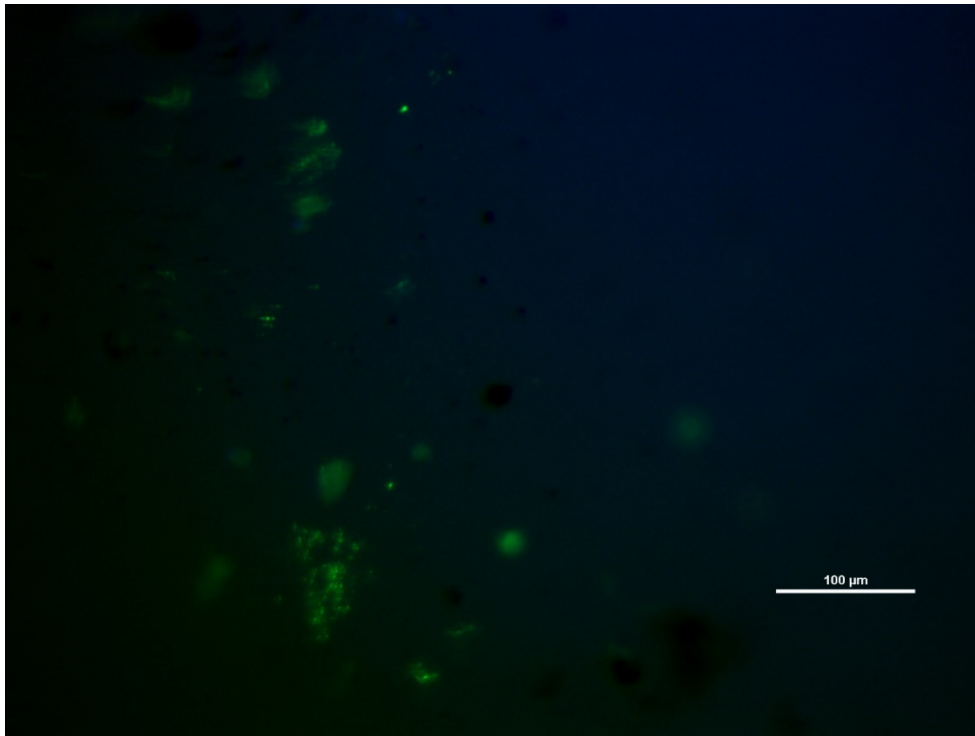


Figura 30. Imagen de células adheridas en un gel con piezoeléctrico sometido a una onda sinusoidal de 4 voltios pico a pico y 15 Hz de frecuencia durante 24 horas.

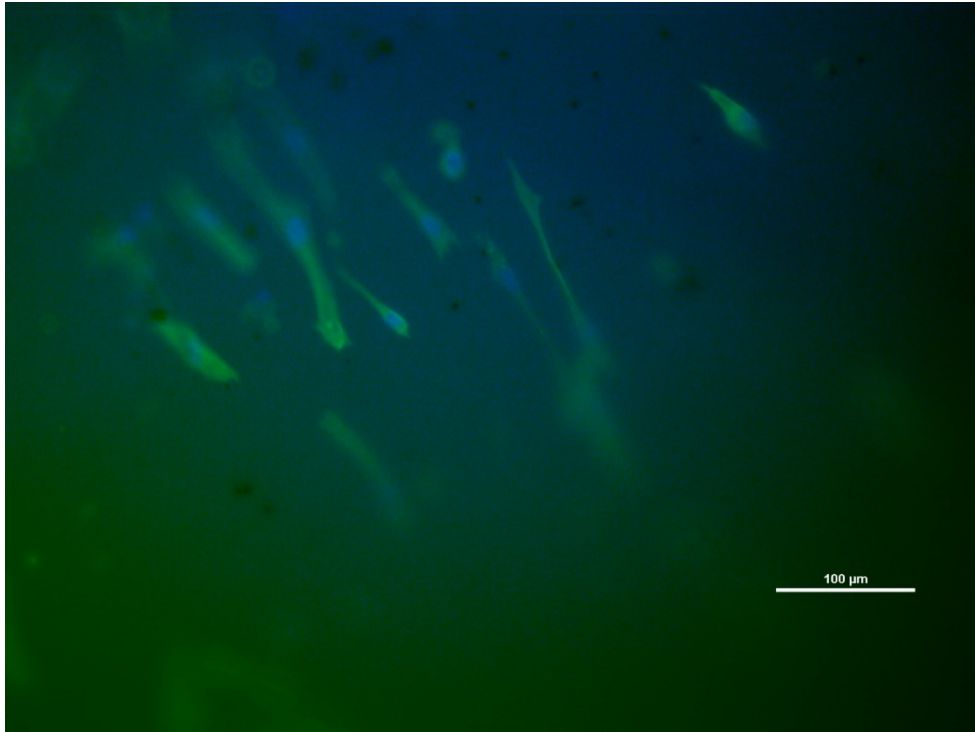


Figura 31. Imagen de células adheridas en un gel con piezoeléctrico sometido a una onda sinusoidal de 4 voltios pico a pico y 155 Hz de frecuencia durante 24 horas.

Para analizar los resultados hay que incluir en la discusión el proceso de deshidratación del gel durante el cultivo a pesar de la presencia de una bandeja con agua dentro del incubador para aportar humedad al ambiente.

La presencia del piezoeléctrico vibrando hace que este proceso de deshidratación sea más irregular que en un caso normal.

Puede relacionarse con el ligero aumento de temperatura del hidrogel, unas pocas décimas, debido al funcionamiento del piezoeléctrico.

Esto afecta a los geles haciendo que la deshidratación sea más irregular y, en líneas generales, haciendo que la superficie superior del gel disminuya más que en el caso normal dificultando así la visualización de las células.

Debido a lo limitado del tiempo y de los dispositivos piezoeléctricos disponibles, únicamente hemos realizado un cultivo celular en cada condición de excitación.

4-4. Mejoras futuras del experimento.

Para terminar este capítulo queremos destacar algunas posibles líneas de optimización del experimento:

-Modificación de la placa de pocillos.

Ya que la modificación se realiza de una manera manual, hay cierta variación entre un experimento y otro lo que puede afectar a los resultados.

Es de vital importancia que todas las placas de pocillos sean lo más parecidas posibles.

Además, el piezoeléctrico debe estar en la misma posición todas las veces, lo cual a la hora de realizarse experimentalmente no es sencillo.

-Hidrogel.

El hidrogel llega a cambiar de forma por la acción de las ondas mecánicas.

Se debe a las propiedades mecánicas del gel, en el cual producimos deformaciones inelásticas permanentes.

Sería recomendable realizar este experimento usando concentraciones de polímero mayores.

-Visualización.

La superficie de los geles dista enormemente de ser plana por lo que se hace de enorme necesidad de microscopia que pueda enfocar en profundidad como, por ejemplo, un microscopio con focal.

-Variables.

Además de los parámetros característicos, distintas amplitudes de la señal mecánica, barrido más amplio de frecuencia, variar la cantidad de células por pocillo, el tiempo que se deja para que se adhieran, el tiempo que se aplica el estímulo mecánico entre otras magnitudes a considerar.

-Estadística.

Sería necesario realizar un análisis estadístico exhaustivo repitiendo cada experimento un número considerable de veces para así poder obtener resultados más fiables.

Capítulo 5

Conclusiones

Se ha cumplido el objetivo fundamental del TFG que es crear una metodología para obtener geles con un dispositivo eléctrico insertado que genera estímulos mecánicos.

Se ha demostrado que es viable el uso de esta metodología para experimentos en esterilidad y se ha comprobado que las ondas mecánicas producidas afectan a los cultivos celulares.

Después de llevar a cabo una revisión de la bibliografía, hemos seleccionado un polímero ELR disponible en la biblioteca del grupo de investigación BIOFORGE para la realización de un sustrato que emule las características de la MEC para cultivos celulares.

En concreto se trata de un hidrogel realizado mediante química click usando los polímeros VKV y HRGD6.

Se ha caracterizado morfológica y mecánicamente mediante SEM y reología.

A lo largo del TFG presentamos todos los detalles experimentales de la metodología, tanto a nivel de procedimientos como de materiales y equipos, que hemos implementado para llevar a cabo dichos cultivos celulares.

Como conclusión, hemos observado cualitativamente que las ondas mecánicas de amplitud constante y frecuencia variable generadas afectan a los cultivos celulares, al comparar los resultados obtenidos con los cultivos control realizados.

Dado lo limitado del abanico de experimentos realizados y dificultades encontradas acabamos el trabajo proponiendo varias líneas de mejora para futuros trabajos que puedan continuar esta línea de investigación del grupo.

Bibliografía

- [1] Luo BH, Carman CV, Springer TA. 2007. "Structural basis of integrin regulation and signaling". *Annual review of immunology*
- [2] Pedro García Barreno. 2009. "Mecanotransducción. Una aproximación tensegridal". *Real academia nacional de farmacia*
- [3] Jonathon M. ,Muncie Valerie , M. Weaver. 2018 . "Extracellular matrix and egg coats". *Academic Press*
- [4] Jakus A., Laronda M., Rashedi A., Robinson C., Lee C., Jordan S., Orwig K., Woodruff T. , Shah R. 2017. "Tissue Papers from Organ-Specific Decellularized Extracellular Matrices ". *Adv Funct Mater*
- [5] Lisa D. Muiznieks, Fred W. Keeley . 2012 . "Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrousprotein perspective".*Elsevier BV*
- [6] Guilak F., Alexopoulos L. ,G. Haider, M. A., Ting-Beall H. P. , Setton L. A. .2005. "Zonal uniformity in mechanical properties of the chondrocyte pericellular matrix: Micropipette aspiration of canine chondrons isolated by cartilage homogenization". *Ann.Biomed. Eng.* 33
- [7] Melinda Larsen Vira V. , Artym J. , Angelo Green Kenneth , M. Yamada . 2016. "The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signalling". *Frontiers in Bioscience* 14, 1023-1067
- [8] Maurice Godfrey . 2009 . "Asthma and COPD (Second Edition) ". *Elsevier Science Publishing Co Inc*
- [9] Amnon Buxboim, Irena L. Ivanovska , Dennis E. Discher . 2010. "Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus: how deeply do cells 'feel' outside and in?" . *Journal of Cell Science*
- [10] Marijnissen WJCM, van Osch GJVM, Aigner J, van der Veen SW , Hollander AP , Verwoerd-Verhoef HL .2002."Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering".*Biomaterials* 23:1511-7
- [11] Joshi H., Morley S.C. . 2019 . "Cells under stress: The mechanical environment shapes inflammasome responses to danger signals" . *Journal of Leukocyte Biology*
- [12] Lin C, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J , al. Sclerostin . 2009. "mediates bone response to mechanical

- [13] Delgado-Calle J, Riancho JA, Klein-Nulend J. 2012 . "New insights into human SOST mechanotransduction: rol of nitric oxide". *J Bone Miner Res* 27 Suppl 1.
- [14] Hadjipanayi E., Mudera V. , Brown R. A. . 2009. "Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness". *Journal Tissue Eng. Regen. Med.* 3
- [15] Delgado-Calle J. , Riancho J. 2013. "Mecanobiología celular y molecular del tejido óseo". *Revista De Osteoporosis Y Metabolismo Mineral*
- [16] Hadjipanayi E. , Mudera V. , Brown R. A. .2009 . "Guiding cell migration in 3D a collagen matrix with graded directional stiffness". *Cell Motil. Cytoskeleton* 66
- [17] Jagodzinski M., Hankemeier S., van Griensven M., Bosch U., Krettek C. , Zeichen J. .2006. "Influence of cyclic mechanical strain and heat of human tendon fibroblasts on HSP-72". *Eur. J. App. Physiol.* 96
- [18] Arturo Ibañez Fonseca , Matilde Alonso, Filippo Cipriani, Israel Gonzalez de Torre, J. Carlos Rodriguez Cabello. 2017. "Elastin-like polymers: properties, synthesis, and applications". *Wiley Online library*
- [19] Alicia Fernández-Colino Frederic Wolf Hans Keijdener . 2018. "Macroporous click-elastin-like hydrogels for tissue engineering applications". *El servier*
- [20] Norris S.C.P. , Delgado S.M. , Kasko A.M. .2019. "Mechanically robust photodegradable gelatin hydrogels for 3D cell culture and: In situ mechanical modification". *Polymer Chemistry*
- [21] Martin L, Alonso M, Girotti A, Arias FJ, Rodriguez-Cabello JC. "Synthesis and characterization of macroporous thermosensitive hydrogels from recombinant elastin-like polymers. *Biomacromolecules*" 2009;10:3015–22.
- [22] Ossipov DA, Hilborn J. . 2006 . "Poly(vinyl alcohol)-based hydrogels formed by click chemistry". *Macromolecules* 39:1709–18.
- [23] Girotti A, Reguera J, Rodriguez-Cabello JC, Arias FJ, Alonso M, Matestera A. . 2004 . "Design and bioproduction of a recombinant multi(bio)functional elastin-like protein polymer containing cell adhesion sequences for tissue engineering purposes". *J Mater Sci Mater Med* 15:479–84.
- [24] Wenge U, Ehrenschwender T, Wagenknecht H-A. 2013 . "Synthesis of 20-O-propargyl nucleoside triphosphates for enzymatic oligonucleotide preparation and "click" modification of DNA with Nile red as fluorescent probec. *Bioconjug. Chem* 24:301–4
- [25] Minary-Jolandan M. , Yu Min-Feng. 2009. "Nanoscale characterization of isolated individual type I collagen fibrils: Polarization and piezoelectricity". *Nanotechnology.* 20 (8): 085706.
- [26] Israel González de Torre, Mercedes Santos, Luis Quintanilla, Ana Testera, Matilde Alonso, José Carlos Rodríguez Cabell .2014. "Elastin-like recombinamer

catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties ". Elsevier Ltd

[27] Sriram G, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M. 2015. "Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro". *European journal of cell biology*. 94: 483-512

Apéndice A

Datasheet del dispositivo piezoeléctrico PA3BCW fabricado por Thorlabs



Description

The PA3BCW piezoelectric chip consists of stacked piezoelectric ceramic layers (which are mechanically in series) that are sandwiched between interdigitated electrodes (which are electrically in parallel). It offers a maximum displacement of $1.0 \mu\text{m} \pm 15\%$. A red wire is attached to the electrode that should receive positive bias, and a black wire is attached to the electrode that should be grounded.

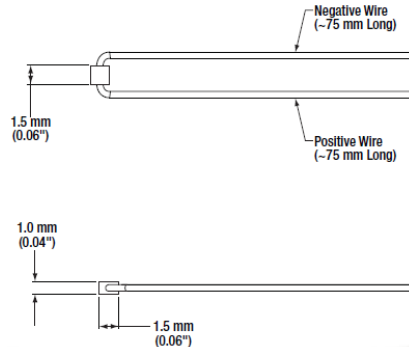
Specifications

PA3BCW ^a	
Drive Voltage Range	0 - 100 V
Displacement (Free Stroke) at 100 V	$1.0 \mu\text{m} \pm 15\%$
Hysteresis	<15% (See Graph on Next Page)
Load (Recommended)	36 N (8 lbs)
Blocking Force at 100 V	90 N (20 lbs)
Resonant Frequency ^b	920 kHz (No Load)
Impedance at Resonant Frequency ^b	900 m Ω
Anti-Resonant Frequency ^b	1200 kHz
Dissipation Factor	<2.0%
Capacitance	13.5 nF $\pm 15\%$
Operating Temperature	-25 to 130 °C
Curie Temperature	230 °C
External Electrodes	Screen-Printed Silver
Dimensions	Width 1: 1.5 mm ± 0.1 mm Width 2: 1.5 mm ± 0.1 mm Length: 1.0 mm $\pm 5 \mu\text{m}$



- a. All specifications are quoted at 25 °C, unless otherwise stated.
- b. These specifications are for the unwired chip.

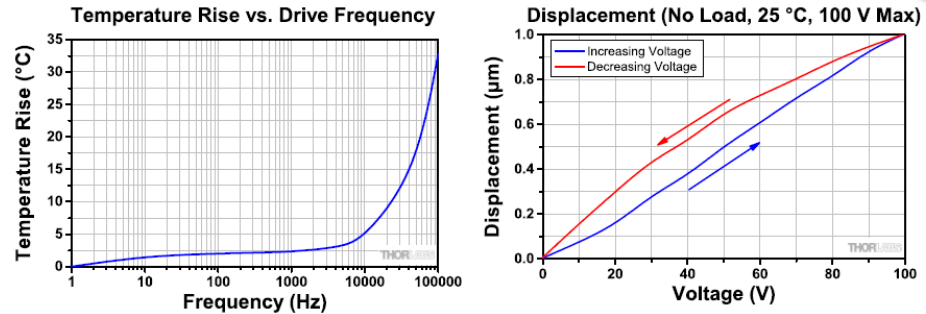
Drawing



Specifications Subject to Change without Notice

May 27, 2015
CTN002636-S01, Rev A

Typical Performance Plots



These temperature rises were measured after applying a sine-wave drive voltage ranging from 0 to 100 V at the specified frequency for 10 minutes.

Operation

Electrical Considerations

- The electrode attached to the red wire should be positively biased, and the electrode attached to the black wire should be grounded. The maximum drive voltage is 100 V. Exceeding 100 V will decrease the device's lifespan and may cause mechanical failure. Reverse biasing the device may cause mechanical failure.
- If it becomes necessary to reattach the wires to the electrodes, use a soldering iron at a temperature no greater than 370 °C (700 °F) for a maximum of 2 seconds per spot. Solder to the middle of the electrode, keeping the spot as small as possible.

Attaching Devices to the Piezo

- Any epoxy which cures at a temperature lower than 80 °C is safe to use. We recommend Thorlabs Item Numbers 353NDPK or TS10. Loctite Hysol 9340 is also usable.
- Loads should only be attached to the central area of the largest face since the edges do not translate. Attaching a load to the smaller faces may lead to mechanical failure.

Storage Instructions

- Do not store the device at temperatures above 80 °C.
- Do not store the device in humid environments. The relative humidity (RH) should be less than 40%.
- Do not immerse the device in organic solvents.
- Do not use the device around combustible gases or liquids.