



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIERÍA
INDUSTRIAL VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

AUTORA: SARA SERRANO REQUENA

TUTOR: MANUEL MONLEÓN PRADAS

COTUTORES: CRISTINA MARTÍNEZ RAMOS
FERNANDO GISBERT ROCA

Curso Académico: 2020-21

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor Manuel Monleón por darme la oportunidad de realizar mi Trabajo Fin de Grado en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) y a Guillermo Vilariño que no dudó en ponerme en contacto con él cuando le pedí ayuda. A mis cotutores Cristina Martínez y Fernando Gisbert por enseñarme todo lo que he aprendido durante estos meses y tener toda la paciencia del mundo conmigo.

A todo el equipo del CBIT, tanto a los trabajadores como a alumnos con los que he coincidido, por tener siempre un buen consejo y estar dispuestos a ayudar en cualquier momento, gracias por hacer de mi estancia allí una gran experiencia. En especial a Irene Cuenca y Laura Rodríguez por escuchar todos mis agobios cuando algo no salía como esperaba y darme la calma que necesitaba en esos momentos.

No podría olvidarme de mis amigas, con las que empecé esta montaña rusa que es la universidad; Ana Sierra, Marta Saiz y Natalia Samper, gracias por ser parte de mis pilares fundamentales, por tener las palabras perfectas para cualquier situación y seguir juntas a pesar de coger caminos diferentes. A Desirée por haber seguido a mi lado en cada punto de este trabajo y compartir inquietudes en el proceso.

A Ana Fraga, mi apoyo en el laboratorio, mi confidente y sobre todo mi amiga. Has seguido este trabajo conmigo de la mano y no podría agradecerte todo lo que has hecho y haces por mí desde hace mucho tiempo. Gracias de corazón.

Por último, no podría olvidarme de mi familia, mis padres y mi hermana María. Gracias por no cortarme nunca las alas y hacerme creer un poco más en mí cada día. Por apoyarme en todas las decisiones con los mejores consejos, pero dejarme ser yo misma siempre. Tío, por enseñarme que era capaz de esto y mucho más, por estar más orgulloso de mí que yo misma.

Gracias a vosotros estoy escribiendo esto hoy y dentro de poco podré decir que, por fin, soy ingeniera.

RESUMEN

Las patologías que se derivan en el sistema nervioso llevan asociadas la dificultad de regeneración del propio tejido, especialmente cuando se habla del Sistema Nervioso Central (SNC). Es debido a esta problemática que las terapias desarrolladas gracias a la ingeniería tisular pueden mejorar la calidad de vida de los pacientes, así como su autoestima, ya que les brinda una oportunidad para poder recuperarse de una lesión que, a priori, era irreparable. En definitiva, los avances que se realizan en el ámbito de la ingeniería tisular, acorde con la regeneración del sistema nervioso, pueden ayudar a infinidad de pacientes que sufren algún tipo de patología crónica las cuales hoy en día siguen sin tener una cura definitiva; de la misma manera que pueden hacerlo con la recuperación de pacientes con lesiones debido a accidentes laborales o automovilísticos.

Por los motivos expuestos, la propuesta que se ha llevado a cabo en este trabajo consiste en estudiar la posibilidad de regeneración axonal aplicando estimulación eléctrica externa para favorecer la respuesta de las células de soporte y la extensión axonal. Para ello, se ha desarrollado un dispositivo que tiene como propósito guiar el direccionamiento de los axones provenientes del ganglio de la raíz dorsal (DRG) cultivados sobre un soporte de células de Schwann (SCs). El dispositivo consta de una guía de fibras de Ácido poliláctico (PLA) recubiertas de polipirrol (PPy), siendo este un biomaterial electroconductor y, finalmente, fibras de oro dispuestas entre las fibras de PLA que componen dicha guía, todo esto acoplado a un generador de corriente para la estimulación. El propósito de este estudio es analizar la direccionalidad de las neuritas aplicando una estimulación externa y poder analizar si dicha estimulación favorece el crecimiento axonal.

Palabras clave: PLA, PPy, oro, células de Schwann, DRG, estimulación eléctrica, extensión axonal.

RESUM

Les patologies que es deriven al sistema nerviós porten associades la dificultat de regeneració del propi teixit, especialment quan es parla del Sistema Nerviós Central (SNC). És degut a aquesta problemàtica que les teràpies desenvolupades gràcies a l'enginyeria tissular poden millorar la qualitat de vida dels pacients, així com la seua autoestima, ja que els brinda una oportunitat per a poder recuperar-se d'una lesió que, a priori, era irreparable. En definitiva, els avanços que es realitzen en l'àmbit de l'enginyeria tissular, d'acord amb la regeneració del sistema nerviós, poden ajudar a infinitat de pacients que pateixen algun tipus de patologia crònica les quals hui dia segueixen sense tindre una cura definitiva; de la mateixa manera que poden fer-ho amb la recuperació de pacients amb lesions a causa d'accidents laborals o automobilístics.

Pels motius exposats, la proposta que s'ha dut a terme en aquest treball consisteix a estudiar la possibilitat de regeneració axonal aplicant estimulació elèctrica externa per a afavorir la resposta de les cèl·lules de suport i l'extensió axonal. Per a això, s'ha desenvolupat un dispositiu que té com a propòsit guiar l'adreçament dels axons que provenen del gangli de l'arrel dorsal (DRG) cultivats sobre un suport de cèl·lules de Schwann (SCs). El dispositiu consta d'una guia de fibres d'Àcid polilàctic (PLA) recobertes de polipirrol (PPy), sent aquest un biomaterial electroconductor i, finalment, fibres d'or disposades entre les fibres de PLA que componen aquesta guia, tot això acoblat a un generador de corrent per a l'estimulació. El propòsit d'aquest estudi és analitzar la direccionalitat de les neurites aplicant una estimulació externa i poder analitzar si aquesta estimulació afavoreix el creixement axonal.

Paraules clau: PLA, PPy, or, cèl·lules de Schwann, DRG, estimulació elèctrica, extensió axonal.

ABSTRACT

The pathologies that affect the nervous system are associated with the difficulty of regenerating the tissue itself, especially when it comes to the Central Nervous System (CNS). It is due to this problem that therapies developed thanks to tissue engineering can improve the quality of life of patients, as well as their self-esteem, as it gives them a chance to recover from an injury that, a priori, was irreparable. In short, the advances made in the field of tissue engineering, in line with the regeneration of the nervous system, can help countless patients suffering from some kind of chronic pathology which today still have no definitive cure; in the same way that they can do so with the recovery of patients with injuries due to work or car accidents.

For these reasons, the proposal of this work is to study the possibility of axonal regeneration by applying external electrical stimulation to favour the response of the supporting cells and axonal extension. To this end, a device has been developed to guide the guidance of axons from the dorsal root ganglion (DRG) cultured on a support of Schwann cells (SCs). The device consists of a guide of polylactic acid (PLA) fibres coated with polypyrrole (PPy), this being an electroconductive biomaterial and, finally, gold fibres arranged between the PLA fibres that make up the guide, all this coupled to a current generator for stimulation. The purpose of this study is to analyse the directionality of neurites by applying external stimulation and to be able to analyse whether such stimulation favours axonal growth.

Key words: PLA, PPy, gold, Schwann cells, DRG, electrical stimulation, axonal extension.

ÍNDICE GENERAL

Documentos contenidos en el TFG

- Memoria
- Presupuesto

ÍNDICE GENERAL

DOCUMENTO I: MEMORIA

1. MOTIVACIÓN
2. OBJETIVOS
3. ANTECEDENTES
4. JUSTIFICACIÓN
5. NORMATIVA
6. METODOLOGÍA
7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFÍA

DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN
2. CUADRO 1: MANO DE OBRA
3. CUADRO 2: MATERIALES
4. CUADRO 3: MAQUINARIA
5. CUADRO 4: PRECIOS DESCOMPUESTOS
6. PRESUPUESTOS PARCIALES
7. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL

DOCUMENTO I: MEMORIA

ÍNDICE DE LA MEMORIA

1	MOTIVACIÓN.....	10
2	OBJETIVOS.....	11
3	ANTECEDENTES.....	12
3.1.	SISTEMA NERVIOSO. ORGANIZACIÓN Y FUNCIONES.....	12
3.2.	REGENERACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO Y EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	15
3.3.	TERAPIA CELULAR EN EL SISTEMA NERVIOSO.....	16
3.4.	INGENIERÍA TISULAR APLICADA AL SISTEMA NERVIOSO.....	17
3.5.	MATERIALES UTILIZADOS EN EL SISTEMA NERVIOSO.....	19
3.5.1.	Polímeros Conductores.....	20
3.6.	IMPORTANCIA DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA.....	22
4	JUSTIFICACIÓN.....	24
5	NORMATIVA.....	25
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
6.2	OBTENCIÓN Y FABRICACIÓN DE LOS MATERIALES.....	26
6.2.1.	Fibras de PLA.....	26
6.2.2.	Recubrimiento de PPy.....	27
6.2.3.	Fibras de Oro.....	28
6.3	ESTUDIO DE CONDUCTIVIDAD.....	28
6.4	ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	28
6.5	ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA).....	29
6.6	MONTAJE DE LAS FIBRAS EN EL DISPOSITIVO.....	30
6.7	ESTERILIZACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL DISPOSITIVO.....	31
6.8	ENSAYO IN VITRO DEL CULTIVO CELULAR.....	31
6.8.1	Siembra y Cultivo de Células de Schwann (SCs).....	31
6.8.2	Extracción y Siembra de DRG de pollo (cDRG).....	32
6.9	ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL DISPOSITIVO.....	34

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

6.10	CARACTERIZACIÓN CELULAR	35
6.10.1	Técnica de inmunofluorescencia.....	35
6.11	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
7.1	CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA.....	38
7.2	CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA	38
7.3	ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA).....	40
7.4	ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	43
7.5	ENSAYO IN VITRO DEL CULTIVO CELULAR	45
8	CONCLUSIONES	49
9	BIBLIOGRAFÍA	50

1 MOTIVACIÓN

Como dijo Ramón y Cajal: “mientras el cerebro sea un misterio, el universo continuará siendo un misterio”. Esta frase es la que mejor refleja la motivación que me ha hecho realizar este Trabajo Final de Grado (TFG), la necesidad de investigación en el sistema nervioso y cómo los resultados mejoran la calidad de vida de las personas que sufren patologías a este nivel.

Mi predilección por el sistema nervioso comenzó durante el primer año del grado, en la asignatura de Anatomía y Fisiología, al ver lo complejo de su funcionamiento y organización, cómo eso manejaba, al fin y al cabo, todo lo que ocurría en el resto del organismo.

Durante los 4 años del grado, y siempre que me fue posible, realicé mis trabajos de búsqueda bibliográfica y de introducción a la investigación con el objetivo de aprender más sobre los componentes y función del sistema nervioso.

Por otro lado, siempre he tenido claro que quería desarrollar competencias en el ámbito de la investigación y cuando empecé mis estudios universitarios vi que eso era posible. Gracias al profesor de la asignatura Biomateriales y una compañera del grado, conocí el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT), por lo que no dudé en preguntar si sería posible realizar mi TFG allí, concretamente en el ámbito de la regeneración en el sistema nervioso, con el objetivo de seguir aprendiendo sobre este ámbito y experimentar de primera mano lo que significa colaborar en el ámbito de la investigación.

Es por ello, que tras 7 meses que ha durado mi estancia allí, puedo decir, que la investigación no es algo sencillo. Hay que tener mucha paciencia y confianza en las personas con las que trabajas, pero al final, los resultados siempre son satisfactorios y aunque de primeras no funcione todo de la manera que esperas, se puede encontrar la brecha que permita encontrar otro camino para llegar al resultado que tanto estás esperando.

Los conocimientos que he adquirido durante el desarrollo de este trabajo son:

- Fabricación de carriles de fibras de ácido poliláctico.
- Disoluciones de pirrol para el recubrimiento de carriles.
- Caracterización de propiedades.
- Importancia de la estimulación.
- Cultivos celulares.
- Estudio de la viabilidad del sistema mediante técnicas de inmunofluorescencia.
- Análisis de la viabilidad celular.

2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo Final de Grado es crear un dispositivo formado por materiales biocompatibles consiguiendo un sistema conductor por la combinación de diferentes materiales conductores formados por microfibrillas de PLA/PPy y de oro. Estos materiales conductores tienen como objetivo conducir la corriente derivada de la estimulación eléctrica aplicada en el dispositivo. Esta corriente pretende estimular y guiar el cultivo secuencial formado por células de Schwann y neuronas del Ganglio de la Raíz Dorsal de pollo (cDRG) tratando de conseguir al final de la estimulación una mayor extensión y densidad axonal.

Como objetivos secundarios se pueden destacar los siguientes:

- Obtención fibras de PLA recubiertas con un polímero conductor (PPy) que cubra de la manera más homogénea posible las fibras.
- Caracterización eléctrica de los materiales conductores.
- Montaje de un dispositivo estanco y estéril capaz de albergar el cultivo secuencial de las células mencionadas anteriormente.
- Evaluación y caracterización de la adhesión y viabilidad celular del dispositivo *in vitro*, para analizar la interacción con los materiales y la eficacia de la estimulación.

3 ANTECEDENTES

3.1. SISTEMA NERVIOSO. ORGANIZACIÓN Y FUNCIONES

El sistema nervioso (SN) está dividido anatómicamente en: sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está constituido por el encéfalo, el cual está compuesto a su vez por el cerebro, el cerebelo y el bulbo raquídeo, y la médula espinal; mientras que el SNP se compone de los nervios raquídeos, los nervios espinales y los troncos ganglionares o ganglios de la raíz dorsal (Betts et al., 1934). Entre sus funciones principales podemos destacar la coordinación de movimientos tanto conscientes como reflejos, es capaz de percibir estímulos internos y externos, así como analizar información sensorial y provocar respuestas motoras a través de músculos o glándulas (Fortoul, 2013; Martínez, 2015).

El tejido nervioso está compuesto por las células especializadas que forman el sistema nervioso. Estas, se pueden dividir en dos grupos: neuronas y células de la glía. Las neuronas son la unidad celular básica que compone el SN y están compuestas de tres partes diferenciadas: soma o cuerpo celular, axón y dendritas. Las dendritas suelen estar muy ramificadas proporcionando así muchos lugares de comunicación entre neuronas, esto es debido a que la información fluye a través de la neurona desde la dendrita, pasando por el cuerpo celular hasta el axón. De esta manera se puede decir que la neurona tiene una polaridad, la información fluye en una determinada dirección (Betts et al., 1934). Por su parte, el axón, se encarga de conducir los impulsos nerviosos a otras neuronas o a las células musculares, mientras que las dendritas son las receptoras de dichos impulsos nerviosos que provienen de otras neuronas. Esta zona de transmisión del impulso nervioso entre el axón y la dendrita es una zona especializada denominada sinapsis. En dicha sinapsis se emplean sustancias químicas denominadas neurotransmisores y componentes eléctricos para la transmisión de la información (Brodal, 2010).

Muchos axones están envueltos por una sustancia aislante llamada mielina la cual está formada por células gliales. La mielina actúa como aislante formando las denominadas vainas de mielina. En la cubierta de mielina puede haber huecos, esos huecos se denominan nodos de Ranvier y juegan un papel importante en la forma en la que viajan las señales eléctricas por el axón (Betts et al., 1934).

En la figura 1 se observa la estructura típica de una neurona rodeada por oligodendrocitos que forman las vainas de mielina, entre las cuales se encuentran los nodos de Ranvier que son los espacios por donde se produce la bioelectricidad del impulso nervioso.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

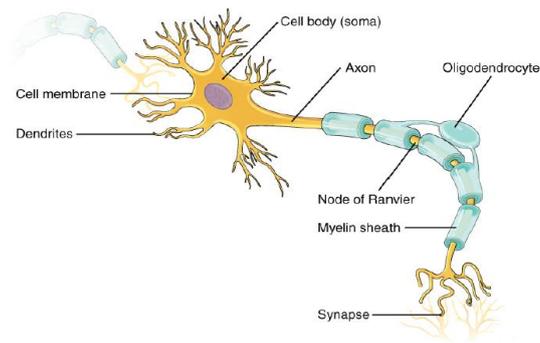


Figura 1. Estructura típica de una neurona (Betts et al., 1934).

La neuroglia o células de la glía son células cuya función principal es la de dar soporte a las neuronas, pero también desempeñan otras funciones como son la de defensa, mielinización, nutrición de las neuronas o protección (Fortoul, 2013).

Existen seis tipos de células gliales, cuatro pertenecen al SNC y dos al SNP, tal y como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1. Tipos de células gliales y su función básica

CÉLULAS DE LA GLIA SNC	CÉLULAS DE LA GLIA SNP	FUNCIÓN BÁSICA
Astrocitos	Células satélite	Soporte
Oligodendrocitos	Células de Schwann	Aislamiento, mielinización
Microglía	-	Soporte inmunológico y fagocitosis
Células endoteliales	-	Creación del líquido cefalorraquídeo (LCR)

- Astrocitos, tienen como función recubrir la superficie de los vasos sanguíneos del cerebro así como establecer contacto entre los cuerpos celulares de las neuronas. Pueden intervenir en procesos más específicos como es el paso de sustancias químicas desde la sangre a las neuronas del SNC o la contribución a la barrera hematoencefálica (BBB). Además, son los encargados de transportar nutrientes hasta las neuronas y proliferar para desarrollar cicatrices para reparar el tejido nervioso tras una lesión.
- Oligodendrocitos, son las células que aíslan los axones en el SNC. Cada una de las ramificaciones que salen del cuerpo de la célula se extiende rodeando el axón y lo aísla creando una vaina de mielina. Un oligodendrocito tiene la capacidad de proporcionar la mielina de varios segmentos del axón o para diferentes axones.
- Microglía, son células cuya función es la de ingerir y digerir los desechos celulares, es decir, actúan como macrófagos en el SNC.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

- Células endimarias, son células que se encargan de filtrar la sangre para producir el líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido que circula por el SNC. Son similares a las células epiteliales ya que forman una única capa de células con conexiones muy estrechas entre las células adyacentes.

En la figura 2 se muestra la organización de las células que componen el SNC; además se puede observar como un único oligodendrocito es capaz de crear diferentes vainas de mielina del axón neuronal de diferentes neuronas.

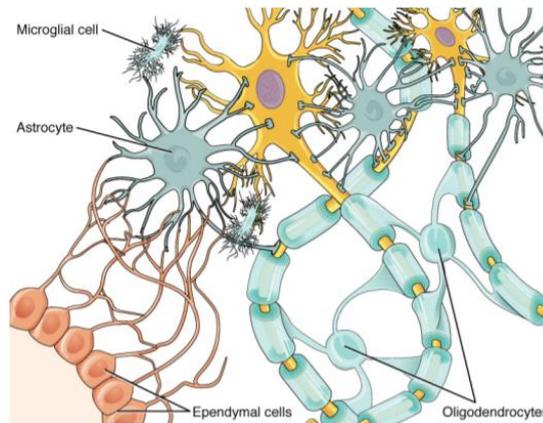


Figura 2. Células de la neuroglía en el SNC (Betts et al., 1934).

- Células satélite, se encargan de proporcionar apoyo a los cuerpos celulares de las neuronas y realizan funciones similares a las de los astrocitos en el SNC.
- Células de Schwann (SCs), son equivalentes a los oligodendrocitos. Se encargan de aislar los axones con mielina pero a diferencia de los oligodendrocitos, una célula de Schwann envuelve un único segmento del axón, por lo que son necesarias varias SCs para formar las vainas de mielina de un axón.

De la misma manera que para el SNC, se muestra en la figura 3 la organización de las células de la neuroglía en el SNP y como se observa para el caso anterior, se puede ver la diferencia en el caso de las vainas de mielina explicadas anteriormente.

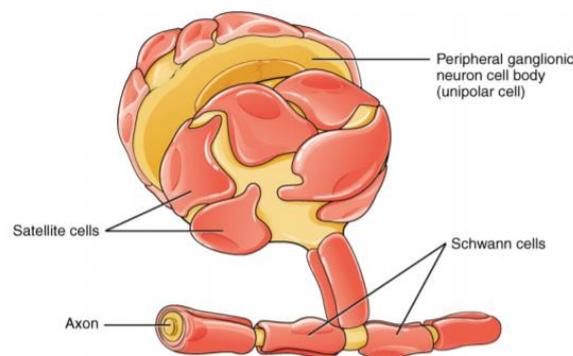


Figura 3. Células de la neuroglía en el SNP (Betts et al., 1934).

3.2. REGENERACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO Y EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Dadas las diferencias estructurales entre el SNP y el SNC, los mecanismos que están envueltos en los procesos de regeneración tras una lesión, son muy diferentes. Además, la desconexión de los haces neuronales se puede deber a diversas situaciones como lesiones traumáticas, interrupción del aporte sanguíneo o enfermedades neurodegenerativas que dañan los cuerpos celulares, somas o axones (Doblado et al., 2021).

Según los estudios que han sido realizados a lo largo de los años, el SNC muestra una ausencia de capacidad de regeneración axonal tras una lesión en comparación con el SNP. Esto se debe a que en el SNC se crea un ambiente hostil para el crecimiento axonal (Schmidt & Leach, 2003). Por otro lado, en el SNP, reestablecer la funcionalidad tras una lesión nerviosa con una longitud mayor de 10 mm suele ser deficiente debido a la insuficiente reinervación axonal en los extremos distales de dicha lesión (Lundborg et al., 1982). Sin embargo, la situación es más prometedora cuando la reconexión de los extremos del axón se realiza en distancias cortas. En este caso la parte distal del axón sufre una degeneración Walleriana, un proceso de degeneración que ocurre en las primeras 18-48 horas de la lesión (Doblado et al., 2021; Faroni et al., 2015). Durante este proceso, las SCs que rodean al axón sobreviven y producen citoquinas proinflamatorias que ayudan al reclutamiento de macrófagos al lugar de la lesión. Estos macrófagos y las SCs se encargan de eliminar los restos axonales y la mielina. Además, los macrófagos también secretan citoquinas y factores de crecimiento creando un entorno favorable que promueve la división y proliferación de las SCs en la zona distal de la lesión (Doblado et al., 2021; Faroni et al., 2015)

Las SCs estimuladas secretan factores de crecimiento, como puede ser el factor de crecimiento nervioso (NGF), favoreciendo así la supervivencia de las neuronas estimulando de la misma manera la regeneración axonal, formando al fin la banda de Bünger (Jessen & Mirsky, 2016). Esta banda consiste en un cilindro formado por SCs y su lámina basal que ayudan a guiar el axón desde el extremo proximal al distal. En condiciones óptimas, el crecimiento puede extenderse a un ritmo de 1-3 mm/día (Griffin et al., 2013). Este proceso de degeneración Walleriana y regeneración a través de la banda de Bünger se puede observar en la figura 4A que se muestra a continuación.

Actualmente, se conoce que la falta de regeneración de axones de manera funcional en el SNC lesionado es debido a un desequilibrio existente entre los mecanismos que promueven y los que inhiben el crecimiento axonal; así como la escasa expresión de factores neurotróficos y la presencia de potentes barreras moleculares que impiden el éxito de esta regeneración. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que los axones lesionados del SNC son capaces de mostrar cierta capacidad regenerativa cuando el entorno es el adecuado (Norbert Pullua & Christoph V. Suschek, 2013; Schmidt & Leach, 2003). Además, también se ha demostrado que las neuronas del SNC tenían la capacidad de regenerarse en presencia de injertos nerviosos procedentes del SNP (David & Aguayo, 1981).

Sin embargo, la mielina y los restos axonales de los oligodendrocitos tras la degeneración y apoptosis persisten en el entorno más tiempo debido a la presencia insuficiente de macrófagos a consecuencia de la BBB, teniendo así, factores inhibitorios del crecimiento de neuritas en el entorno de la lesión más tiempo. Además, los astrocitos se vuelven reactivos y contribuyen a la creación de una cicatriz glial en

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

la zona de la lesión, permaneciendo durante varias semanas o incluso meses y limitando, de esta manera, la regeneración axonal (Doblado et al., 2021; Schmidt & Leach, 2003).

En la figura 4B, se puede observar el proceso de degeneración producido en el SNC tras una lesión.

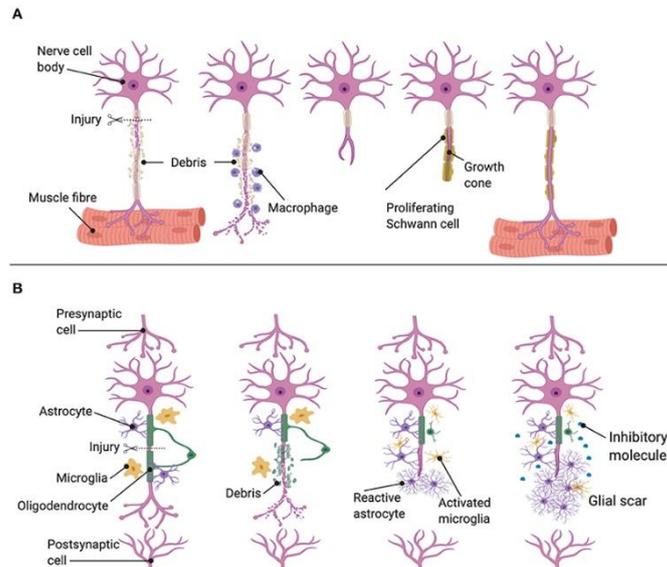


Figura 4. (A) Regeneración en el SNP. (B) Regeneración en el SNC (Doblado et al., 2021).

3.3. TERAPIA CELULAR EN EL SISTEMA NERVIOSO

El uso de la terapia celular para la reparación de lesiones en el sistema nervioso muestra grandes beneficios a la hora de trasplantar tejido o células de la médula espinal a la zona dañada, de esta manera se proporciona un soporte adecuado donde los axones pueden regenerarse, sintetizar factores de crecimiento y sustituir las células muertas tras la lesión (Navarro & Hernández, 2010).

Han sido llevados a cabo trasplantes celulares con células madre embrionarias (ESC) que promovieron la reparación nerviosa en ratones, así como generar precursores similares a las SCs a partir de estas demostrando que expresan la proteína de la mielina en la regeneración de nervios periféricos in vitro. Por otro lado, las células madre neurales (NSC) han demostrado resultados similares a los autoinjertos cuando se sembraban sobre guías nerviosas; este tipo de células se pueden modificar para sobreexpresar factores de crecimiento y mejorar el potencial regenerativo (Faroni et al., 2015; Moraleda et al., 2011; Navarro & Hernández, 2010). Estudios con ESC para la reparación de lesiones medulares han demostrado la capacidad de estas células a diferenciarse en neuronas motoras y recuperar la función, así como otros tipos de células como las células de la glía o células mesenquimales han demostrado favorecer el crecimiento axonal (Prósper et al., 2006).

También ha sido estudiado la capacidad regenerativa de otros tipos de células como las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) o las células madre mesenquimales adultas (MSC), concretamente las derivadas de la médula ósea (BM-MSC), han mostrado similitudes moleculares y funcionales similares a las SCs del propio tejido, por lo que son una fuente prometedora de SCs para la reparación de nervios (Faroni et al., 2015; Navarro & Hernández, 2010).

Para el tratamiento de regeneración de nervios periféricos han sido probados trasplantes de SCs, ya que son capaces de sintetizar y secretar factores neurotróficos y moléculas de adhesión para promover

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

y guiar el crecimiento axonal y la remielinización (Guardo-Gómez et al., 2020; Navarro & Hernández, 2010). Además, las SCs, secretan moléculas de señalización que atraen a los macrófagos formando así un apoyo para la supervivencia neuronal y promoviendo el crecimiento axonal (Min et al., 2021).

En los últimos años se han realizado estudios con Ganglios de la Raiz Dorsal (DRG) provenientes de rata o de pollo para regenerar el sistema nervioso. Estos DRG son neuronas somatosensoriales de la raíz dorsal de la médula espinal que ayudan al estudio del crecimiento, regeneración y degeneración de las neuritas, así como la mielinización tanto en el SNC como en el SNP (Quigley et al., 2009; R&D SYSTEMS, n.d.). Sin embargo estos estudios han mostrado como el cultivo del DRG sobre una plataforma de biomateriales no ayudaba al guiado de los axones salientes del propio explante sino que estos crecían de manera radial (Quigley et al., 2009). En cambio si este cultivo de DRG se apoyaba con la siembra de SCs sobre una plataforma de guiado axonal, dejaba de producirse una extensión radial para producir una extensión axonal guiada y en parte dirigida por las SCs, además de establecer un mayor crecimiento en los estudios realizados con cultivo secuencial que únicamente con la siembra de DRG (Cui et al., 2021; Gisbert Roca, André, et al., 2021; Quigley et al., 2009). La adición de SCs ha demostrado no solo ayudar al aumento en la longitud de las neuritas sino también favorecer el área de crecimiento (Malheiro et al., 2020).

Sin embargo, como se ha comentado, el sistema nervioso es un órgano con una organización estructural muy compleja y a pesar de los numerosos estudios que se han realizado, las células implantadas en los lugares de lesión o degeneración no han sido capaces de establecer conexiones sinápticas como para recuperar la funcionalidad necesaria en el tejido (Prósper et al., 2006). Es por esto que, de la misma manera que cuando se trata de una lesión grande, una guía nerviosa no es capaz de regenerar la lesión de manera satisfactoria, al igual que ocurre con el uso exclusivo de la terapia celular en la zona de la lesión. Los estudios más prometedores hasta la fecha son los que combinan ambas terapias, es decir, el uso de biomateriales como guía para la regeneración nerviosa combinada con la terapia celular (Faroni et al., 2015; Guardo-Gómez et al., 2020). La aplicación de terapias celulares y moleculares combinada con *scaffolds* ha incrementado la capacidad regenerativa en el sistema nervioso (Guardo-Gómez et al., 2020).

En el presente trabajo, se lleva a cabo un cultivo secuencial de SCs con DRG de pollo (cDRG) ya que como se ha citado anteriormente, se ha demostrado que las SCs ayudan a una mayor extensión axonal y promueven el guiado de dichos axones provenientes del explante de DRG.

3.4. INGENIERÍA TISULAR APLICADA AL SISTEMA NERVIOSO

La ingeniería tisular, consiste en el desarrollo de un sustituto funcional para el tejido dañado y tiene tres componentes principales: *scaffold* o andamio para el trasplante y soporte celular, células para crear una matriz funcional y factores bioactivos que regulan la actividad celular (figura 5).

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

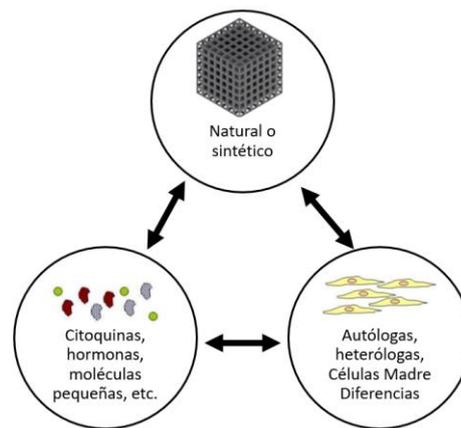


Figura 5. Fundamentos de la ingeniería tisular.

El problema principal de una lesión nerviosa es la alteración del propio tejido por lo que los estudios que se han realizado al respecto, han demostrado que es necesario un puente que conecte la lesión y que sirva de soporte para la regeneración. Además este soporte debe imitar la estructura nerviosa natural consiguiendo cierta porosidad para permitir la migración celular pero imitando las propiedades biológicas del entorno nativo (Tian et al., 2015).

Frente a estas lesiones, se han probado autoinjertos, injertos de donantes cadavéricos o xenoinjertos (injerto animal) (Evans et al., 1994); sin embargo, este tipo de terapias no son tan beneficiosas como se puede pensar ya que afectan factores como la ineficiencia del nervio donante, la incompatibilidad o la necesidad de inmunosupresión para evitar el rechazo. Es por esto por lo que surge la necesidad del uso de la ingeniería tisular con el uso de *scaffolds* y biomateriales con el objetivo de reparar la lesión nerviosa (Langer & Vacanti, 1993).

Mediante la ingeniería tisular lo que se pretende es crear un puente en la longitud de la lesión que ayude a la regeneración del tejido dañado y además se pueda recuperar la función del mismo. Dada la organización del sistema nervioso central, han sido muchas las estrategias que se han llevado a cabo a lo largo de los años para tratar de conseguir estos objetivos y, por lo tanto, muchas las formas desarrolladas para los *scaffolds*.

Diversos estudios han utilizado hidrogeles como *scaffolds* para la regeneración nerviosa en zonas del cerebro, aunque también han sido utilizados para zonas medulares (Cui et al., 2021; Hopkins et al., 2015). También han sido probadas láminas de biomateriales conductores para el sistema nervioso, sin embargo este tipo de andamiajes no guiaban el crecimiento axonal sino que se veía un crecimiento radial de los axones (Quigley et al., 2009). Generalmente, para la regeneración nerviosa, se utilizan *scaffolds* tubulares que permitan la regeneración axonal guiada simulando la estructura que se quiere regenerar (Quigley et al., 2009; Schmidt & Leach, 2003).

Otra de las técnicas utilizadas como *scaffold* para la regeneración nerviosa son las fibras obtenidas por electrospinning tanto de tamaño nanométrico como micrométrico. Se ha demostrado que esta técnica de obtención de fibras satisface todos los requisitos mencionados al principio de este punto para los soportes de regeneración nerviosa. Además es una configuración relativamente sencilla y puede ser aplicada a una gran variedad de biopolímeros tanto sintéticos como naturales (Tian et al., 2015).

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

Durante el presente trabajo, se han utilizado fibras micrométricas de obtenidas por extrusión, ya que estudios previos del grupo demostraron como las fibras micrométricas, concretamente de 10 μm de diámetro favorecían las interacciones célula-célula y célula-biomaterial, mientras que las fibras nanométricas únicamente favorecían las interacciones célula-fibra. Asimismo, se demostró que las microfibras favorecían a una mayor extensión axonal y migración de las SCs (Gisbert Roca et al., 2020).

En conclusión, la estructura ideal de un *scaffold* depende del tejido que se vaya a regenerar, sin embargo, en el caso del sistema nervioso algunas de estas características ideas comprenden aspectos como un soporte multicanal o con multifilamentos, con una siembra previa de células de soporte, factores de crecimiento o incluso la estimulación eléctrica la cual puede ser beneficiosa para la regeneración. Estos conceptos se recogen en la figura 6 que se muestra a continuación.

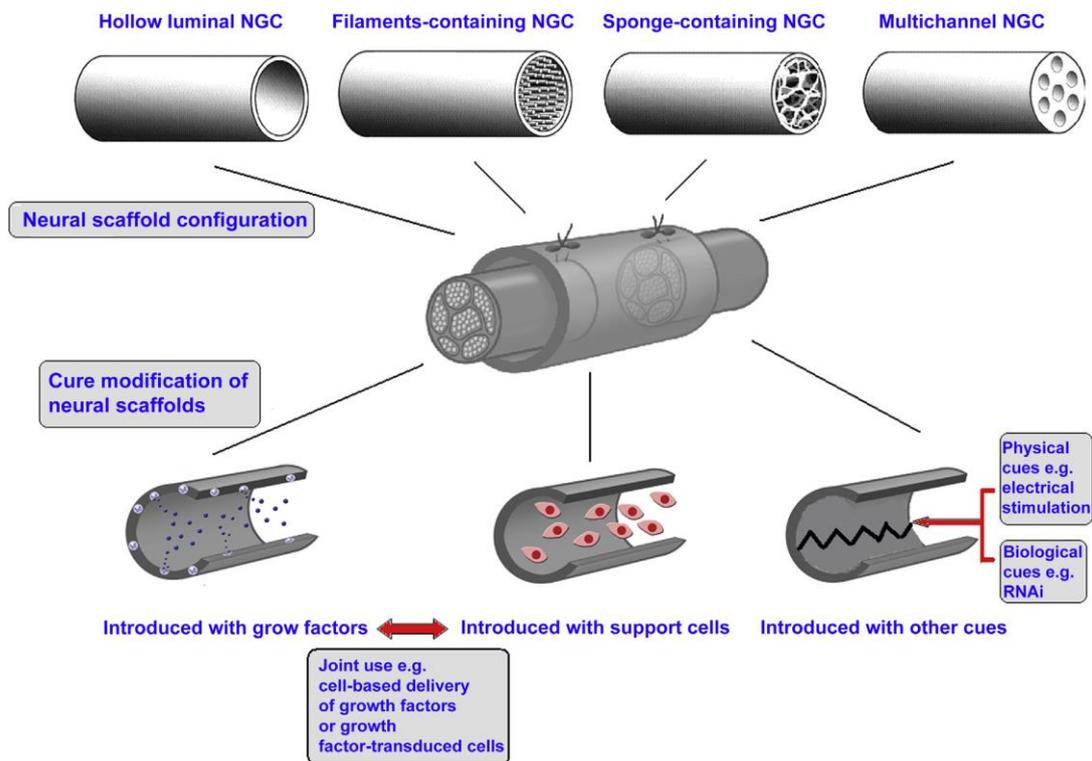


Figura 6. Propiedades ideales de un scaffold para regeneración nerviosa (Gu et al., 2014).

3.5. MATERIALES UTILIZADOS EN EL SISTEMA NERVIOSO

A lo largo de este trabajo se han mencionado las necesidad de introducir biomateriales en el dispositivo de puente para favorecer la regeneración nerviosa. Son muchos los tipos de materiales que se han estudiado a lo largo de los años y por ende su aplicación en el SN.

Por un lado, se han desarrollado estudios con polímeros sintéticos como el ácido poli-glicólico (PGA) el ácido poliláctico (PLA) o la poli-caprolactona (PCL) además de sus copolímeros; pero también con polímeros naturales como puede ser el colágeno, la gelatina o el ácido hialurónico. Sin embargo, estos últimos a pesar de tener un gran potencial ya que favorecen y promueven la adhesión y crecimiento celular además de que se pueden fabricar en multitud, sus propiedades mecánicas son bastante pobres y en muchas ocasiones la degradación es mucho mayor que el ritmo de regeneración del tejido huésped, por lo que pueden no realizar un soporte adecuado para la regeneración (Doblado et al.,

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

2021; Tian et al., 2015). Por ello los materiales sintéticos parecen ser mejor opción para según qué aplicaciones, ya que parecen suplir las carencias de los biomateriales naturales como puede ser el control sobre la biodegradabilidad para asegurar un mejor soporte en la regeneración (Guerra, 2014; Lu et al., 2000)

Materiales sintéticos como los mencionados, han sido implantados in vivo para comprobar la supervivencia celular y el proceso de rechazo, algunos como PCL o el ácido poli-L-láctico co-glicólico (PLGA) se han implantado en la corteza cerebral de ratas para analizar la respuesta por parte de los astrocitos, concluyéndose que en el caso de la PCL se producía una menor respuesta inflamatoria que en el caso del PLGA. El uso de PGA se ha llevado a cabo tras ser sembrado con NSC obteniéndose resultados muy prometedores ya que lograron la conexión anatómica de algunas zonas (Soria et al., 2008).

El PLA se sintetiza a partir del ácido láctico, es un material que llega a resistir temperaturas de hasta 100°C presentando un alto punto de fusión y una temperatura de transición vítrea entre 55-80°C (Serna C. et al., 2011). Se trata de un material biocompatible, biodegradable y bioabsorbible, además su rango de degradación puede depender del grado de cristalización del propio material o de si está o no conjugado con otro material. El PLA puede ser combinado con otros materiales para mejorar sus propiedades mecánicas, de resistencia o su conductividad eléctrica, entre muchas otras (Gabriel & Nava, 2019; Serna C. et al., 2011).

Se ha confirmado que el PLA es un gran biomaterial para la regeneración del sistema nervioso sobre todo en forma de *scaffold* fibroso ya que mejora la función del tejido dañado favoreciendo la unión celular o la administración de fármacos (Doblado et al., 2021; Gabriel & Nava, 2019), siendo probado en ensayos de regeneración de nervio ciático de rata (Guerra, 2014). Pero también se han realizado estudio siendo empleado como conductos guía, *scaffolds* nanofibrosos con diferentes canales o como fibras asignadas en el lumen de conductos tubulares (Doblado et al., 2021).

Por los motivos citados anteriormente en cuanto a las propiedades del PLA y los estudios positivamente desarrollados en el ámbito de la regeneración nerviosa se ha empleado este material durante el presente trabajo para la regeneración de tejido neural.

En la figura 7 se puede observar la estructura molecular del PLA.

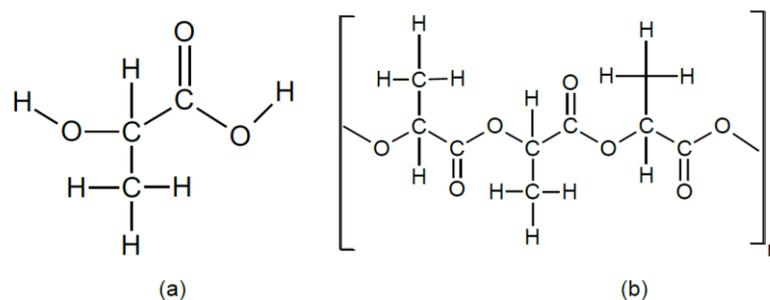


Figura 7. Estructura del (a) ácido láctico y (b) ácido poliláctico (Gabriel & Nava, 2019)

3.5.1. Polímeros Conductores

Una de las propiedades importantes que debe tener un material aplicado a la ingeniería tisular en el caso de la regeneración del tejido nervioso es la conductividad, ya que se ha demostrado que la

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

estimulación eléctrica es beneficiosa para el crecimiento y elongación axonal (Gisbert Roca et al., 2020). Es por ello que, para el caso que aquí compete, es importante utilizar algún material electroconductor que combinado con el PLA sea capaz de conducir la estimulación y promover la regeneración deseada.

Son materiales que combinan las propiedades de los metales y los polímeros convencionales, tienen la capacidad de conducir la carga, grandes propiedades eléctricas y ópticas combinadas con la flexibilidad en el procesamiento y la facilidad de síntesis (Balint et al., 2014). Sin embargo se ha de tener en cuenta que los polímeros conductores, en su gran mayoría, no son biodegradables.

Dentro de los materiales conductores que han sido aplicados en la ingeniería tisular, uno de ellos es el poli (3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), un biomaterial con gran estabilidad eléctrica y química que actualmente se utiliza en biosensores y bioingeniería como pueden ser los electrodos neurales (Balint et al., 2014; Blachowicz & Ehrmann, 2020). El segundo polímero conductor más investigado es la polialanina (PANI), un polímero con gran facilidad de síntesis, bajo coste y buena capacidad conductora y resistente. Sin embargo, tiene baja flexibilidad y procesabilidad que combinadas con la no-biodegradabilidad se ha observado que puede causar inflamaciones crónicas si es implantado. Es por ello, que el PANI se utiliza principalmente como biosensor, sondas neuronales o para administración controlada de fármacos (Balint et al., 2014).

Uno de los emergentes en la regeneración nerviosa, es el grafeno que es capaz de modificarse químicamente para controlar su actividad eléctrica y favorecer la regeneración del tejido nervioso (Cui et al., 2021). Sin embargo, debe ser tratado para incrementar la adhesión celular al material además en sus *scaffolds* 3D puede llegar a presentar una pequeña neuroinflamación, aunque todavía no ha sido evaluado en suficientes ensayos in vivo por lo que presenta un gran potencial de estudio (Bordoni et al., 2020). Otro de los materiales basados en carbono son los nanotubos de carbono (CNT), un material que presenta excelentes propiedades electroconductoras. A pesar de ello, muchos estudios han tratado de mejorar su biocompatibilidad ya que exhiben grandes problemas de seguridad llegando a causa inflamación y daños en el ADN. Debido a esto, los CNT son utilizados normalmente como aditivos en biomateriales para mejorar las propiedades conductoras de los materiales (Bordoni et al., 2020; Xiang et al., 2020). Estos recubrimientos han demostrado favorecer la extensión de las neuritas y la migración celular a lo largo de nanofibras (Blachowicz & Ehrmann, 2020).

Por último, y como objeto de estudio del presente trabajo, el polímero conductor más estudiado con aplicaciones en ingeniería tisular es el polipirrol (PPy), es un material con muy buena biocompatibilidad tanto in vitro como in vivo y buena estabilidad química además de una alta conductividad en condiciones fisiológicas (Balint et al., 2014) aunque no es biodegradable y una vez sintetizado es difícil de procesar debido a sus estructuras altamente reticuladas (Bassi et al., 2020). Puede sintetizarse con diferentes porosidades y superficies lo cual hace que sea un material idóneo para aplicaciones biomédicas (Balint et al., 2014; Bassi et al., 2020).

El PPy ha demostrado, tras numerosos estudios, favorecer la extensión axonal y la adhesión celular cuando es utilizado como *scaffold* en conjunto con otros materiales como el PLA (Gabriel & Nava, 2019; Gisbert Roca, André, et al., 2021; Zou et al., 2016)

En la figura 8 se muestra la estructura química del pirrol y del polipirrol, material objeto de estudio de este trabajo.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

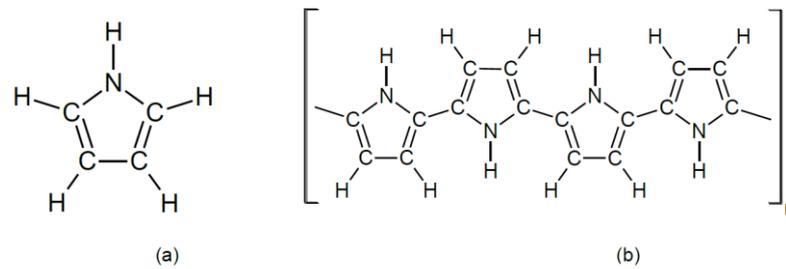


Figura 8. Estructura del (a) pirrol y (b) polipirrol (Gabriel & Nava, 2019).

Por otra parte, como material conductor y objeto de estudio de este TFG, se ha observado que el uso del oro como material en la regeneración nerviosa está aumentando en los últimos años. Aunque todavía no se han hecho muchos estudios al respecto, puede ser fácilmente conjugado con otros materiales y tener una orientación específica para favorecer cierta orientación celular (Chhour et al., 2016; Paviolo & Stoddart, 2017). En el ámbito de la estimulación y modulación de la actividad neural, debido a su excelente conductividad, el oro ha sido empleado para diferentes aplicaciones como la mejora del crecimiento celular de manera satisfactoria (Paviolo & Stoddart, 2017).

Comúnmente se ha utilizado el oro en forma de nanopartículas debido a sus propiedades para la administración controlada de fármacos, su excelente biocompatibilidad y su baja toxicidad (Báez et al., 2021; Cabuzu et al., 2015), aunque estas dos últimas propiedades requieren un control cuidadoso para según qué aplicaciones biológicas (Paviolo & Stoddart, 2017). Algunos estudios de los últimos años, han demostrados que las nanopartículas son capaces de atravesar la BBB e interactuar con el ADN (Cabuzu et al., 2015).

En su aplicación como nanopartículas ha sido probado su beneficio en la regeneración del SNP observando un crecimiento de neuritas 24 horas después de aplicar el tratamiento (Paviolo & Stoddart, 2017), pero también ha sido empleado recubriendo la superficie de un *scaffold* tubular favoreciendo el guiado del crecimiento axonal (Quigley et al., 2009).

En el presente trabajo, se propone el uso de oro en forma de fibras para promover el guiado axonal y favorecer la estimulación eléctrica, dotando al dispositivo de una mayor conductividad combinada con las propiedades conductoras del PPy.

3.6. IMPORTANCIA DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA

Como se ha comentado a lo largo de los anteriores apartados, la regeneración del sistema nervioso compete un gran desafío debido a la escasa reparación intrínseca del mismo, es por ello, que la estimulación eléctrica juega un papel muy importante a la hora de favorecer dicha regeneración. Es aquí donde los materiales conductores ayudan significativamente a la regeneración nerviosa a través de sus propiedades conductoras y la estimulación celular.

La ES muestra numerosos efectos en las células como puede ser la proliferación, migración, diferenciación y en el caso del sistema nervioso un crecimiento axonal. Los beneficios de la ES frente a los métodos bioquímicos se debe a la aplicación instantánea y el control de la dirección, pudiendo regular la frecuencia y el voltaje aplicado. Generalmente, la ES se genera a partir de fuentes de energía externa y es aplicada sobre células o tejidos; sin embargo, estas corrientes se pueden clasificar como

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

corriente continua (DC), alterna (AC), de pulso (PC) y bifásicas (BEC). Por un lado la DC se define como la corriente cuya magnitud y dirección no varía en el tiempo, mientras que la AC cambia periódicamente con el tiempo (Zhu et al., 2019).

Este tipo de estimulación de corriente alterna es la que se ha decidido utilizar a lo largo de este trabajo, con el fin de generar una estimulación lo más homogénea posible a lo largo de todo el dispositivo, tratando de evitar que la corriente estimulara únicamente las células ubicadas sobre las fibras con mayor conductividad.

Estudios previos del grupo, demostraron que aplicar ES sobre *scaffolds* de PLA+PPy beneficiaba sustancialmente la extensión axonal (Gisbert Roca et al., 2020), pero además estudios recientes también han mostrado la influencia de la ES sobre la proliferación, propagación y maduración de SCs y neuritas (Zhou et al., 2018; Zhu et al., 2019; Zou et al., 2016).

No obstante, a pesar de todos los estudios que han demostrado el beneficio de la ES para la regeneración tanto del SNP como del SNC, son pocos los artículos que proporcionan los parámetros de corriente eléctrica lo cual complica la reproducibilidad de esos ensayos y de encontrar los parámetros óptimos para la estimulación.

A pesar de esta dificultad para determinar los valores de corriente, en este estudio se han seguido los parámetros proporcionados por Quigley et al. (2009), variando según convenía alguno de los parámetros para tratar de obtener resultados beneficiosos y significativos.

En la figura 9 que se muestra a continuación podemos ver el claro efecto de combinar fibras de PLA con el efecto del PPy como polímero conductor aplicando ES, donde se aprecia como la ES y el uso de fibras alineadas favorece la alineación de los axones y el crecimiento axonal. Por lo que el propósito que se ha llevado a cabo en el estudio que aquí se desarrolla es similar al que se muestra en la figura adjunta añadiendo los beneficios del uso de oro para aumentar la conductividad del PPy.

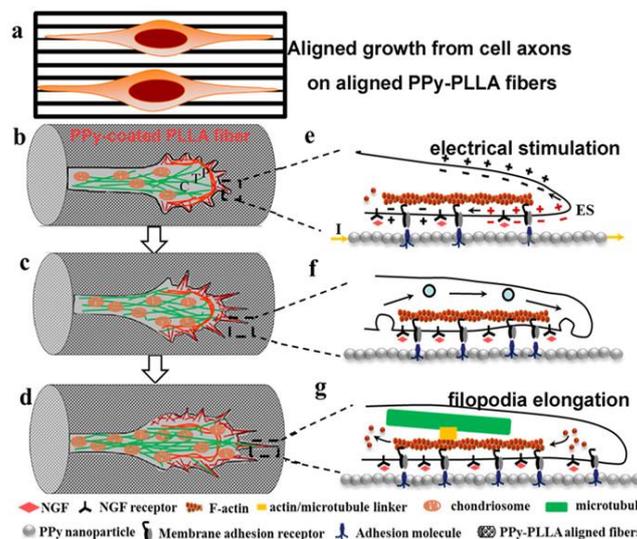


Figura 9. Esquema del proceso de alineación celular en las fibras de PLA+PPy y efecto de la estimulación eléctrica (Zou et al., 2016).

4 JUSTIFICACIÓN

Son muchas las patologías que tienen su origen en el sistema nervioso, pero no es solo la afectación que existe a este nivel, sino el hecho de que una patología en el sistema nervioso puede derivar en diversos problemas a otros niveles; por ejemplo, aquellas que involucran también el tejido epitelial como puede ser el herpes, que tiene su origen a nivel del sistema nervioso pero su sintomatología se refleja en la piel.

Actualmente, las enfermedades del sistema nervioso carecen de una cura definitiva debido a la gran complejidad existente tanto en el tejido nervioso como en su funcionamiento, pero también por el desconocimiento que existe sobre el origen de muchas de estas enfermedades. Por estos motivos, la investigación en la regeneración del sistema nervioso está en continuo desarrollo, cada día se va conociendo un poco más cómo funciona este sistema y se avanza en el progreso hacia nuevas terapias que puedan derivar en la cura definitiva de algunas de estas enfermedades. Debido a esta carencia de cura definitiva, los pacientes que padecen una patología de este nivel pasan por diversos tratamientos que “bloquean”, en el mejor de los casos, el avance de la enfermedad. Sin embargo, cuando una persona es diagnosticada con una enfermedad que afecta al sistema nervioso, es muy probable que deba llevar una medicación para el resto de su vida.

Por estos motivos, el propósito de este trabajo es tratar de cumplir los objetivos marcados para dar un pequeño avance más en la regeneración del tejido nervioso mediante el desarrollo de una guía axonal que favorezca el crecimiento y la alineación de los axones. Para ello, se han escogido materiales biocompatibles y biodegradables, pero además que sean conductores, para utilizar la estimulación eléctrica como factor que favorezca el crecimiento axonal para una regeneración más rápida. Es decir, el uso de esta guía pretende dar una pequeña solución a la escasa regeneración que tiene el sistema nervioso por sí mismo, ya que en caso de una lesión a nivel nervioso donde hay una degeneración del tejido, las primeras horas son cruciales para asegurar su correcta recuperación. Esta guía podría ayudar a solventar estos problemas y apoyar en el caso de que la lesión sea más grande de lo que nuestro organismo es capaz de regenerar por sí solo.

5 NORMATIVA

Debido a la naturaleza de este trabajo, es necesario el cumplimiento de la normativa que enmarca toda la parte experimental que ha sido desarrollada. Esta normativa está extraída del Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo:

- Ley 31/1995, de 8 de noviembre, sobre prevención de riesgos laborales. Real Decreto 5/2000, de 4 de agosto, ley de infracciones y sanciones en el orden social.
- Real Decreto 773/1997 de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual. Normativa sobre el diseño y fabricación de EPI's a partir del 21 de marzo de 2018 es aplicable el Reglamento EPI (UE) 2016/425 del parlamento europeo y del consejo de 9 de marzo de 2018.
- Orden MAM/304/2002, de 8 de febrero, por la que se publican las operaciones de valorización y eliminación de residuos y la lista europea de residuos. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. NTP 571: Exposición a agentes biológicos: equipos de protección individual.
- Real Decreto 656/2017, de 23 de junio, por el que se aprueba el Reglamento de Almacenamiento de Productos Químicos y sus Instrucciones Técnicas Complementarias MIE APQ 0 a 10.
- Real Decreto 349/2003, de 21 de marzo, por el que se modifica el Real Decreto 665/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo, y por el que se amplía su ámbito de aplicación a los agentes mutágenos. Reglamento (UE) Nº 1357/2014 de la Comisión de 18 de diciembre de 2014 por el que se sustituye el anexo III de la Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas.
- Real Decreto 118/2021, de 23 de febrero, por el que se modifica el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. (BOE 24-2-2021). Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE 8-11-2008).

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Durante presente trabajo se ha desarrollado un dispositivo capaz de ser estimulado eléctricamente y compuesto por un cultivo secuencial de células de Schwann de rata (rSCs) y DRG de pollo (cDRG) sembrado sobre un conjunto de fibras conductoras con el fin de guiar el crecimiento axonal aplicando una estimulación eléctrica externa.

Esta corriente alterna producida por el equipo de estimulación pasa a través de las fibras pretendiendo favorecer la adhesión, direccionalidad de los axones y proliferación celular.

Las fibras se montan en una placa de 8 pocillos permitiendo tener 8 muestras dentro del mismo experimento ($n=8$ en cada montaje). Además este dispositivo, denominado Slide, permite obtener un mayor número de resultados en un único montaje haciendo también más sencillo el desarrollo de los experimentos.

6.2 OBTENCIÓN Y FABRICACIÓN DE LOS MATERIALES

6.2.1. Fibras de PLA

Para la obtención de estas fibras, utilizamos una bobina de fibras PLA suministrada por la empresa AITEX donde cada fibra está compuesta por 60 microfibrillas de $10\ \mu\text{m}$ de diámetro. El carril de fibras definitivo está compuesto por 600 microfibrillas de $10\ \mu\text{m}$ de diámetro. Las fibras se disponen paralelamente entre sí creando el carril completo que se empleará posteriormente para el recubrimiento con el polímero conductor.

Estos carriles tendrán una longitud final aproximada de 14 cm y los extremos del conjunto de fibras será sellado con cinta aislante o celo, tal y como se muestra en la figura 10.

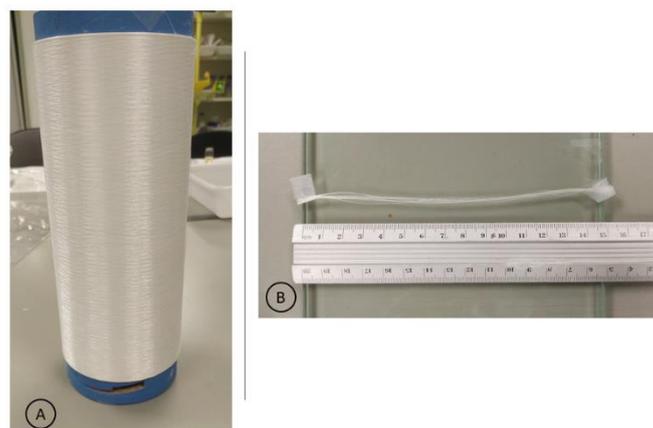


Figura 10. (A) Bobina de fibras de PLA de la empresa AITEX. (B) Carril de microfibrillas de $10\ \mu\text{m}$ de $14\ \text{cm}$ de longitud.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

6.2.2. Recubrimiento de PPy

Para el recubrimiento de las fibras de PLA, se utilizó pirrol (Py) como monómero. El Py está sujeto a oxidación y se polimeriza tanto con solventes acuosos como no acuosos, aunque para este caso se ha utilizado una solución acuosa para cubrir las fibras de PLA.

Se ha llevado a cabo una polimerización química con unas concentraciones determinadas de los compuestos, ya que proporcionan un recubrimiento de PPy más homogéneo alrededor de las fibras. Concentraciones menores a la que se presentan a continuación no mostraban continuidad en el recubrimiento y concentraciones superiores mostraban agregados en la superficie llegando a afectar a la posterior adhesión celular (Gisbert Roca, García-Bernabé, et al., 2021).

En primer lugar se meten las fibras en tubos de centrifuga de 15 mL y se sujetan a las paredes con cinta aislante, posteriormente se meten en un falcon de 50 mL. Seguidamente, preparamos la primera disolución que contiene el monómero 14 mM (Py; 131709, Aldrich) y el electrolito de soporte sodio p-toluenosulfonato 14 mM (pTS; 152536, Aldrich) y lo diluimos en agua destilada. Se añaden 24 mL de esta disolución a cada uno de los falcons que contienen las fibras de PLA y se incuban durante 1 hora a 4°C en vaivén.

Se prepara la segunda disolución que contiene el elemento dopante, es decir, contiene cloruro férrico 38 mM (FeCl₃, 157740, Sigma-Aldrich) diluido en agua destilada. De la misma manera que con la primera disolución, se añaden 24 mL en cada falcon y se deja en vaivén 24h a 4°C.

La reacción química que se produce es la que se puede observar en la figura 11.

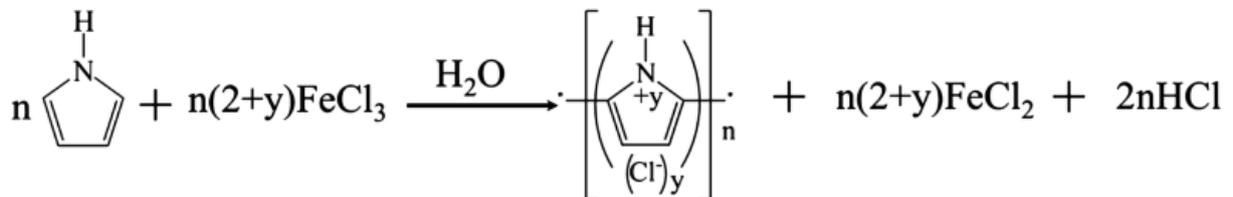


Figura 11. Reacción química de la polimerización de PPy con cloruro férrico (Bassi et al., 2020).

Tras las 24h de polimerización, se procede al lavado de las fibras. Para ello, se realizan 3 lavados en agitación con agua destilada de 3 minutos para eliminar los restos de PPy que quedan en las superficie y se secan a vacío durante 2 días. Tras el proceso de polimerización y los lavados, las fibras quedan como se muestra en la figura 12.



Figura 12. Figuras de PLA recubiertas de PPy (longitud ~14cm).

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

6.2.3. Fibras de Oro

Se utilizaron fibras de oro de 25 μm de diámetro de la empresa GoodFellow (LS543500; AU005121/4, GoodFellow). Estas fibras se colocaron en la parte inferior del carril compuesto de PLA recubierto con PPy, se dispusieron un total de 3 fibras ubicadas paralela e igualmente distanciadas entre sí.

El hecho de colocar las fibras de oro en la parte inferior del carril es debido a que al ser fibras de mayor tamaño, si se colocan en la parte superior crear una especie de relieve que dificulta la siembra de células así como la adhesión y cultivo de las mismas.

Gracias a las propiedades conductoras del oro es posible aplicar parámetros de estimulación menores en el cultivo celular, evitando así posibles daños en las células. El uso de este material es beneficioso ya que, aunque el PPy es conductor, su conductividad es mucho menor llegando a ser más conductor el medio de cultivo (por ser un medio salino) que el propio material. De esta manera lo que se pretende conseguir es que la corriente afecte a las fibras y no al medio de cultivo.

6.3 ESTUDIO DE CONDUCTIVIDAD

Con la finalidad de estudiar la estabilidad de la conductividad en el tiempo, se decidió medir la pérdida de conductividad de las fibras de PLA recubiertas de PPy y ver así cómo aumentaba la resistencia de las fibras en función de su longitud según pasaba el tiempo.

Para ello, se fabricaron 6 muestras de PLA recubiertas con PPy siguiendo las mismas condiciones explicadas anteriormente.

Una vez fabricadas las fibras, se midió su conductividad a lo largo del tiempo a una distancia de 10 cm y aplicando un voltaje de 5V. Los valores de conductividad se obtuvieron empleando un multímetro y se calculó la resistencia empleando la Ley de Ohm (Ecuación 1).

$$V = I \cdot R \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde V es el voltaje medido en voltios (V), I es la corriente en amperios (A) y R es la resistencia en ohmios (σ).

Una vez obtenidos los datos de resistencia, se trató de normalizar por la longitud de medida, es decir por la distancia a la que se colocaban los electrodos a la hora de tomar la medida. Finalmente se obtuvo la resistencia de las fibras en $\text{k}\Omega/\text{cm}$ a lo largo del tiempo.

Obtenidos los resultados de este experimento, se decidió analizar la diferencia entre la estabilidad de la conductividad almacenando las muestras en condiciones atmosféricas, frente a almacenarlas en vacío (101.32Pa). Para lo que se fabricó un total de 12 muestras en las mismas condiciones a las anteriores y se repartieron en cada grupo: vacío (n=6) y condiciones atmosféricas (n=6).

6.4 ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Mediante la espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier se puede reconocer la composición y organización del material a analizar, se emite radiación de infrarrojos en la muestra siendo parte de esta radiación absorbida y otra transmitida. Esta radiación absorbida es característica

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

de los enlaces químicos presentes en las diferentes muestras objeto de estudio, creando un espectro que sirve como huella molecular de cada muestra. Dicha absorción se mide como una función de longitud de onda que generalmente se encuentra entre $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ (Bunker Corporation, 2019).

Se llevó a cabo el análisis de muestras pertenecientes a 3 grupos objeto de estudio, tomándose 4 mediciones de cada una de las muestras y escogiendo la mejor de cada una de ellas para la posterior representación de la gráfica.

- Grupo 1. Fibras de PLA recubiertas con PPy como grupo control.
- Grupo 2. Fibras de PLA recubiertas con PPy degradadas durante 90 días en tampón fosfato (PB) al 0.1M almacenadas en estufa a 37°C .
- Grupo 3. Fibras de PLA recubiertas con PPy degradadas a temperatura ambiente y presión atmosférica durante 180 días. A este grupo se le denominó degradación en condiciones atmosféricas.

Además a modo de comparación, se añadieron también los valores de FTIR correspondientes a los materiales por individual, es decir, el espectro correspondiente al PLA y el espectro correspondiente al PPy obtenidos en estudios previos del grupo.

El análisis por FTIR permite obtener unos espectros propios para cada muestra ya que como se ha mencionado, cada molécula o enlace químico presente en la muestra analizada genera unos valores de transmitancia y absorbancia en unas longitudes de onda concretas. Posteriormente, estos espectros pueden ser analizados para determinar los enlaces presentes en cada muestras tras los procesos de degradación realizados.

6.5 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

El análisis termogravimétrico permite estudiar la degradación térmica de los materiales así como su composición. En este caso, para realizar el estudio de degradación se emplearon 3 muestras ($n=3$) para cada uno de los grupo a analizar, siendo estos grupos:

- Fibras de PLA recubiertas con PPy como grupo control.
- Fibras de PLA recubiertas de PPy tras 90 días de degradación en PB al 0.1M a 37°C .
- Fibras de PLA recubiertas de PPy tras un proceso de degradación de 180 a temperatura ambiente y presión atmosférica.

De la misma manera que se ha mencionado para el FTIR, también se incluyó para este caso el análisis termogravimétrico del PLA y el PPy para poder analizar el conjunto de materiales de manera más exhaustiva y mediante los correspondientes pesos moleculares de cada material se obtuvo la curva teórica de degradación de los materiales.

En primer lugar se realizó una curva en blanco empleando crisoles de platino vacíos mediante el proceso de calentamiento empleado para el estudio, esta curva es restada automáticamente por el software en las medidas siguientes. Seguidamente se pesan los crisoles de platino vacíos con la balanza propia del equipo de TGA, estos crisoles son los que se van a utilizar posteriormente para pesar las muestras. Una vez se han pesados los crisoles vacíos, se introduce la muestra en cada uno de ellos y

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

se pesaron con la balanza interna del equipo, el peso inicial de estas muestras está entre 2 y 5 mg. Por último, se ejecuta el proceso de calentamiento para cada uno de los crisoles. El procedimiento de calentamiento consistió en un barrido directo de 30 a 800°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

A partir de este estudio se obtuvieron tres gráficas para cada uno de los grupos que representan la pérdida de masa en función de la temperatura, escogiendo finalmente una única gráfica de cada uno para el análisis final de los resultados.

6.6 MONTAJE DE LAS FIBRAS EN EL DISPOSITIVO

En primer lugar, el dispositivo de fibras debe cumplir una serie de características para asegurar el correcto cultivo y estimulación de las células. Por ello, se debe garantizar que el dispositivo mantenga las fibras tensas, sea estanco y capaz de mantener los medios de cultivo celular; además de permitir la posterior toma de fotografías en el análisis de inmunofluorescencia.

Para que se comprenda mejor el proceso de montaje del dispositivo se adjunta una foto y de las partes que lo componen en la figura 13.

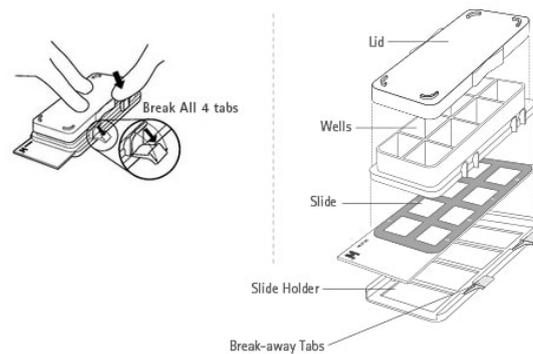


Figura 13. Partes del dispositivo. Imagen de (Millicell® EZ SLIDES | Life Science Research | Merck, n.d.).

En primer lugar se desmonta el dispositivo dejando únicamente la placa base o *slide*, sobre cada línea horizontal de cuatro pocillos se colocan las tres fibras de oro que han sido comentadas en el apartado anterior y la fibra de PLA recubierta con PPy sobre las fibras de oro. Se hace lo mismo con la segunda línea horizontal de cuatro pocillo. De esta manera se tienen 2 carriles por cada dispositivo.

Es importante que el carril completo (formado por las fibras de oro y las fibras de PLA recubiertas de PPy) sobresalgan por ambos lados del dispositivo una longitud aproximada de 2 cm para poder conectar posteriormente el equipo de la estimulación.

Una vez se han montado las fibras sobre la placa del dispositivo y están paralelas entre sí, se procede al sellado. Se coloca la parte que delimita los pocillos sobre la placa base respetando las líneas rosas que marcan el límite de cada uno. Para asegurar que el dispositivo sea lo más estanco posible y pueda retener el medio de cultivo celular, se emplea URGO Grietas Filmogel®, un apósito líquido que solidifica con rapidez a temperatura ambiente y que es capaz de sellar el dispositivo. Además es hidrofóbico y no tóxico para las células.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

Cuando el dispositivo ha sido sellado por el contorno de los pocillos, se deja secar alrededor de 20 minutos para asegurarse que ha solidificado por completo. Tras esto, se termina de montar las partes que quedan del dispositivo y se procede a poner Filmogel en el contorno del dispositivo, teniendo especial atención en las zonas por las que sobresalen las fibras y las esquinas del dispositivo ya que no quedan completamente selladas al realizar el montaje completo y así garantizar un mayor sellado.

De nuevo, se deja solidificar el Filmogel 30 minutos y se añaden 600 μ L de agua mili-Q (agua ultrapura) a cada uno de los pocillos del dispositivo y se deja durante 24 horas para asegurar que el dispositivo está estanco y no hay ningún tipo de fuga del medio.

Si tras las 24 horas se detecta alguna fuga, se retira el agua mili-Q, se seca el dispositivo y se añade una capa de Filmogel en aquellas zonas que han presentado pérdidas.

6.7 ESTERILIZACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL DISPOSITIVO

Dado que el montaje del dispositivo se ha hecho de manera no estéril, es necesario realizar una correcta esterilización de este para proceder a la posterior siembra y cultivo celular.

En primer lugar, se somete el dispositivo a esterilización por radiación ultravioleta (UV) en cabina de flujo laminar. El dispositivo se coloca a 20 cm de la parte superior de la cabina y se esteriliza durante 45 minutos por la parte inferior del dispositivo. A continuación, se esteriliza la parte superior del dispositivo (en la que se realiza la siembra de células) 45 minutos con radiación UV y la parte interior de la tapa del dispositivo.

Una vez ha transcurrido ese tiempo, se realizan 3 lavados rápidos con etanol al 70% (EtOH 70%), en cabina de flujo laminar, añadiendo 600 μ L en cada pocillo para así, asegurar la esterilización de todas las fibras. Por último, se realizan 2 lavados de agua mili-Q estéril para eliminar los posibles restos de EtOH que hayan podido quedar en el dispositivo o entre las fibras.

Para el acondicionamiento previo a la siembra de células se añaden, a cada pocillo, 600 μ L de tampón bloqueo (TB) compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium con alto nivel de glucosa (4.5 g/L) (DMEM; 21331020, Fisher) suplementado con un 10% de suero fetal bobino (FBS; 10270-106/A3381E, Fisher) y un 1% de penicilina/estreptomina (P/S; 15140122, Fisher). Se introduce el dispositivo en el incubador a 37°C durante 24h en atmósfera húmeda y con un 5% de CO₂.

6.8 ENSAYO IN VITRO DEL CULTIVO CELULAR

6.8.1 Siembra y Cultivo de Células de Schwann (SCs)

Durante los ensayos se emplearon células de Schwann de rata (rSCs, P10301, Innoprot). En primer lugar, se descongelaron y expandieron en frascos de cultivo celular hasta conseguir una densidad celular suficiente para realizar el experimento.

En primer lugar se lavan los frascos con tampón fosfato salino (PBS; 10010015, Thermo Scientific) y se tripsinizan las células para revertir las uniones entre células aplicando 1.5 mL de una solución de

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

tripsina/EDTA (T/E; 25200-072, Invitrogen) y se meten los frascos en el incubador a 37°C durante 3 minutos. Una vez pasados los 3 minutos, hay que asegurarse de que las células se han despegado del frasco y si es así, se lava aplicando el doble de volumen al de T/E de tampón bloqueo (TB) para inhibir el efecto de la tripsina. Posteriormente, se recoge el medio con las células en suspensión y se centrifuga a 1080 rpm durante 4 minutos. Una vez finalizada la centrifugación, se descarta el sobrenadante y se recoge el pellet que contiene las células, se resuspende en 1 mL de TB y se procede al conteo de células con ayuda de la cámara Neubauer.

El conteo de celular se realiza para resuspender las células en el volumen necesario de medio de cultivo para hacer la siembra. Cuando se ha calculado el volumen en el que se quiere resuspender las células, se centrifuga el eppendorff de TB que contiene las células a 1080 rpm durante 4 minutos y se descarta el sobrenadante. Finalmente se resuspende el pellet en el volumen calculado de medio de cultivo de SCs que contiene medio de células de Schwann (SCM, kit P60123 Innoprot) suplementado con 5% de FBS, 1% de P/S y 1% de suplemento de crecimiento para células de Schwann (SCGs).

Cabe aclarar que se llevaron a cabo 2 experimentos, por lo que a partir de este punto se denominaran experimento 1 y experimento 2. Debido a condiciones de los experimentos y la cantidad de células que se obtuvieron en cada uno de los experimentos la cantidad de células no fue la misma en ambos experimentos.

En primer lugar, en el experimento 1, se sembraron 10^5 células por gota, depositando un total de 2 gotas de 2 μ L. Es decir, se sembraron $2 \cdot 10^5$ células/pocillo. Para asegurar la adhesión de las células en el carril, se incuban los dispositivos durante 30 minutos a 37°C y a continuación se añaden 600 μ L de medio de cultivo de SCs.

Por otro lado, en el experimento 2, la densidad celular era menor por lo que únicamente se sembraron 10^5 células/pocillo repartidas en 2 gotas de 2 μ L de $5 \cdot 10^4$ células/gota. De la misma manera que se ha explicado antes, se incuban los dispositivos 30 minutos a 37°C y a continuación se añaden 600 μ L de medio de SCs.

Por último, se guardan en el incubador a 37°C hasta la posterior siembra de DRG de pollo (cDRG) 48 horas después de la siembra de rSCs.

6.8.2 Extracción y Siembra de DRG de pollo (cDRG)

En los dos experimentos que fueron llevados a cabo se emplearon huevos de pollo embrionarios que fueron obtenidos del stock del CBIT. Los huevos son embriones de 8 días ya que permiten mayor manejo a la hora de la extracción de los DRG debido a su tamaño ya que es el idóneo para realizar experimentos in vitro porque mantienen un estado no muy avanzado de desarrollo (Cui et al., 2021).

Los huevos se mantienen en el incubador a 37°C hasta el momento de la extracción de los DRG. Además, el material necesario para la extracción de los DRG, tales como pizas y tijeras deben ser previamente esterilizadas en autoclave.

El procedimiento para la correcta extracción de DRG de pollo que se ha seguido en estos experimento se encuentra desarrollada por (Powell et al., 2014) donde se explica el protocolo a seguir para el aislamiento y cultivo de neuronas sensoriales disociadas de embriones de pollo.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

Previo a la extracción, se prepara el medio de cultivo de cDRG y el medio que se utiliza para el lavado de los embriones, todo ello de manera estéril en cabina de flujo laminar. En primer lugar, el medio de cultivo contiene Ham's Nutrient Mixture F12 (HAM F12; MS00ON100L, Biowest), HEPES 1M al 1% (HEPES; 2078442, Gibco), L-Glutamina 200mM (L-glutamina; 25030149, Gibco) al 1%, suplemento N2 al 1%, penicilina/estreptomicina al 1% (P/S) y factor de crecimiento nervioso a una concentración de 10 ng/ml (NGF). Por otro lado, el medio de lavado contiene HAM F12 y HEPES al 1%. Ambos medios se calientan en el baño de agua a 37°C.

Una vez se tiene todo preparado, se selecciona uno de los huevos y se introduce en la cabina de flujo laminar y todas las acciones posteriores se realizan en condiciones de máxima esterilidad. En segundo lugar, se rompe el huevo vertiendo todo su contenido en una placa Petri de vidrio previamente esterilizada y sujetando el cuello del embrión con unas pinzas se corta la cabeza con unas tijeras de punta fina. Seguidamente, el embrión se transfiere a una placa Petri más pequeña de plástico y se añaden unos mililitros de medio de lavado para eliminar posibles restos de sangre y para mantener el tejido húmedo.

A continuación, se coloca el embrión en el equivalente a la posición decúbito supino, es decir, con la parte dorsal apoyada en la placa, tal y como se muestra en la figura 14, se coloca bajo una lupa de disección y con ayuda de unas tijeras de disección se realiza un corte vertical en la línea media del cuerpo del embrión, comenzando desde la cola hasta el cuerpo. Una vez se ha realizado dicho corte, con la ayuda de un juego de dos pinzas se procede a extraer los órganos internos como el corazón, los pulmones o los órganos digestivos; dejando a la vista la columna vertebral para poder realizar la extracción de los DRG.

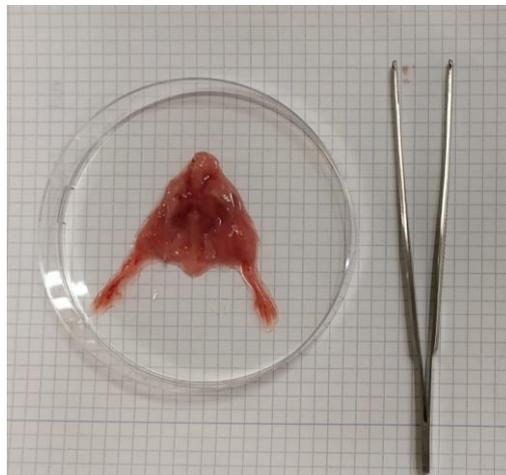


Figura 14. Embrión de pollo de 8 días en posición "decúbito supino".

Los DRG que se extraen provienen de la zona lumbar de la columna vertebral y se extraen agarrando el nervio en desarrollo desde la periferia hacia la columna hasta llegar al DRG y tirar de él. Una vez se ha extraído el DRG, se coloca en una placa Petri de plástico que contiene medio de cultivo de cDRG y se mira bajo la lupa que no haya exceso de tejido anexionado al propio DRG. Se repite el proceso tantas veces como sea necesario hasta obtener el número de DRG que se precise para realizar el experimento.

En la figura 15 se pueden observar los nervios de la raíz dorsal en la parte derecha de la imagen así como un DRG aumentado en la lupa.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

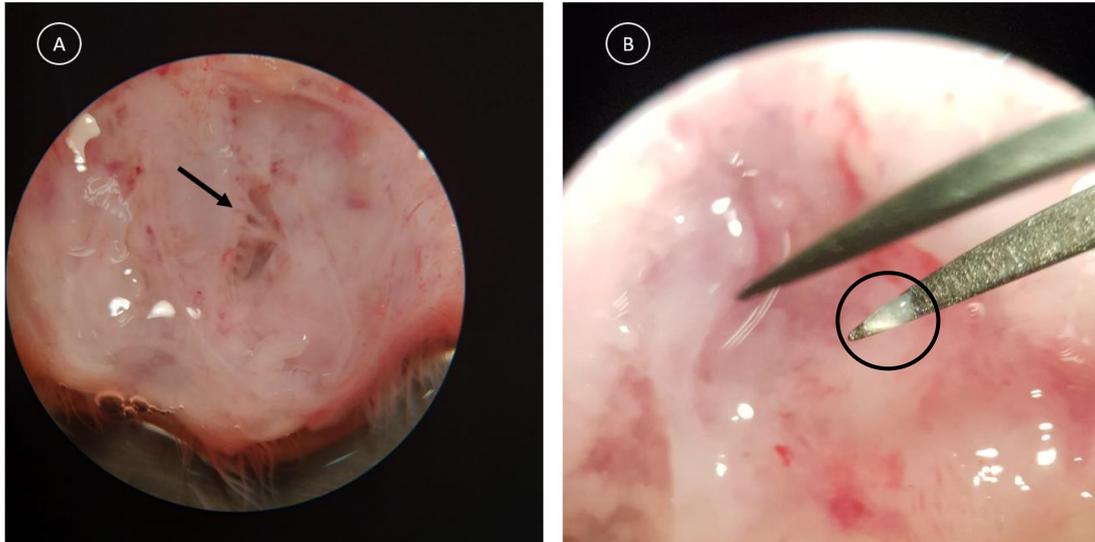


Figura 15. (A) Nervios de la raíz dorsal de donde se extraen los DRG. (B) DRG obtenido de los nervios que se muestran en A.

Dado que los dispositivos están en el incubador con medio de cultivo de rSCs, previo a la siembra de cDRG es necesario sacar los dispositivos y eliminar el medio de cultivo para asegurar que los cDRG se adhieren de manera correcta. Para ello se elimina con una micropipeta el contenido del dispositivo y se siembra un único DRG por pocillo, habiendo un total de 8 DRG en cada dispositivo. Tras la siembra del DRG se guardan en el incubador durante aproximadamente 45 minutos para asegurar su adhesión y, por último, se añaden 750 μ L de medio de cDRG en cada pocillo.

Se vuelven a guardar los dispositivos en el incubador a 37°C y tras 24h se conectan los cables para proceder a la estimulación.

6.9 ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL DISPOSITIVO

Tras la siembra de los cDRG y después de esperar las horas determinadas para la correcta adhesión celular, se procede a conectar los cables al dispositivo para comenzar con la estimulación.

En primer lugar, se sacan los dispositivos del incubador y se colocan dentro de la cabina de flujo laminar, se introducen también los cables que se van a utilizar para la estimulación. Se enrolla el carril formado por las 3 fibras de oro y las fibras de PLA recubiertas con PPy al cable de cobre, quedando ambos carriles enrollados en ambos lados a dos cables de cobre. Estos cables de cobre se conectan a los equipos de estimulación.

Como se ha comentado anteriormente, se llevaron a cabo 2 experimentos, cada uno de ellos siguió un protocolo de estimulación diferente.

En el experimento 1, se siguió un montaje en paralelo aplicando corriente alterna con una frecuencia de 250Hz y una corriente de 2mA/carril. El voltaje se reguló mediante un potenciómetro hasta que se aseguró la corriente total deseada de 8mA. El protocolo de estimulación tenía una duración de 8 horas de estimulación de manera ininterrumpida y 16 horas sin estimulación hasta un total de 4 días comenzando 48h después de la siembra de DRG.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

Por otro lado, en el experimento 2, el protocolo siguió la misma distribución de montaje en paralelo y corriente alterna con una frecuencia de 250Hz. Sin embargo, se aumentó la corriente a 3mA/carril aplicando una corriente total de 12mA. Al igual que en el protocolo anterior, se regula el voltaje con el potenciómetro hasta conseguir la corriente deseada. Al igual que en el caso anterior, el tiempo de estimulación fueron 8 horas ininterrumpidas y 16 horas sin estimulación, pero comenzó 24 horas después de la siembra hasta completar un total de 3 días de estimulación.

En la tabla 2 se recogen de los parámetros seguidos en cada uno de los experimentos como resumen de lo explicado.

Tabla 2. Resumen parámetros estimulación.

	Experimento 1	Experimento 2
Frecuencia	250 Hz	250 Hz
Corriente	2 mA/carril	3 mA/carril
Horas	8h estimulado – 16h no estimulado	8h estimulado – 16h no estimulado
Tiempo de estimulación	4 días	3 días

El esquema del montaje seguido durante la estimulación se puede observar en la figura 16.

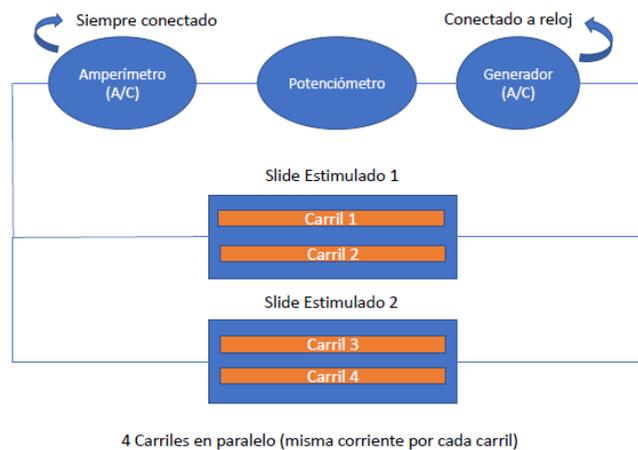


Figura 16. Esquema montaje estimulación.

6.10 CARACTERIZACIÓN CELULAR

6.10.1 Técnica de inmunofluorescencia

Trascurrido el tiempo de co-cultivo y estimulación se procede a realizar una tinción inmunocitoquímica para observar las células mediante microscopía de fluorescencia. En primer lugar se fijan las células para preservar la ultraestructura biológica de las células y la interacción entre ellas y el biomaterial de soporte, para fijar las células se utiliza paraformaldehído al 4% (PFA) y se deja actuar durante 15 minutos.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

Transcurrido ese tiempo, se quita el PFA y se hacen 2 lavados de PB 0.1M de 5 minutos para eliminar los restos de PFA y tras esto, se añade tampón bloqueo (TB) compuesto por PB 0.1M, 10% de Tritón y 1% de Tween 20 y se deja actuar durante 1 hora a temperatura ambiente. El TB nos sirve para bloquear las uniones inespecíficas de las células y permeabilizar la membrana celular.

Una vez transcurrida la hora de acción del TB, se retira y se añade el anticuerpo TUJ1 (neuron-specific class III β -tubulin; MO15013; Neuromics) en dilución 1:500. En este caso el anticuerpo utilizado es un anticuerpo conjugado que contiene el anticuerpo primario y el secundario y se deja actuar durante 2 horas.

A continuación, se añade medio de montaje que contiene 4',6-Diamino-2-Fenolindol (DAPI) y se coloca en cámara húmeda para su visualización en el microscopio de fluorescencia y fotografiado de las muestras.

6.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez obtenidas las imágenes de fluorescencia y para el análisis de los resultados obtenidos, se utilizó el programa Matlab® con un código desarrollado en estudios previos del grupo. El objetivo de este código es, en función de la intensidad, debido a la fluorescencia de la imagen, determinar la longitud axonal del cultivo. Para ello se analizan 3 parámetros:

- La distancia entre el punto que corresponde a la intensidad relativa del centro del cuerpo del DRG y el punto donde esa intensidad se reduce en un 75% (parámetro A).
- La distancia entre el punto que corresponde a la intensidad relativa del borde del cuerpo del DRG y el punto donde esta intensidad se reduce en un 75% (parámetro B).
- El área bajo la curva entre el punto que corresponde a la intensidad relativa del borde del cuerpo del DRG y el punto en el que la intensidad se reduce en un 80% (parámetro C).

Además, para cada uno de los parámetros se tuvo en cuenta el valor tanto de longitud como de área de cada lado del cuerpo del DRG escogiendo el máximo de ellos y la suma de ambos (Gisbert Roca et al., 2020).

Por otro lado, para el análisis de la densidad axonal, es decir, para determinar el área total de axones que ha crecido, se utilizó el software FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012) para el procesamiento de imágenes. Este área se calculó obteniendo el área total de los axones y el DRG, posteriormente se resta el área que ocupa el cuerpo del DRG en la imagen al área total. Para llegar a este análisis se debe realizar un filtrado previo de la imagen además de su conversión a imagen de 8-bit.

En las figuras 17 y 18 se muestra el análisis realizado con FIJI/ImageJ donde se ha marcado el área neuronal total que se aprecia en la imagen y de forma manual el contorno del cuerpo del DRG que será restado al área total de axones para calcular el área axonal que ha extendido obtenida en el cultivo celular.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

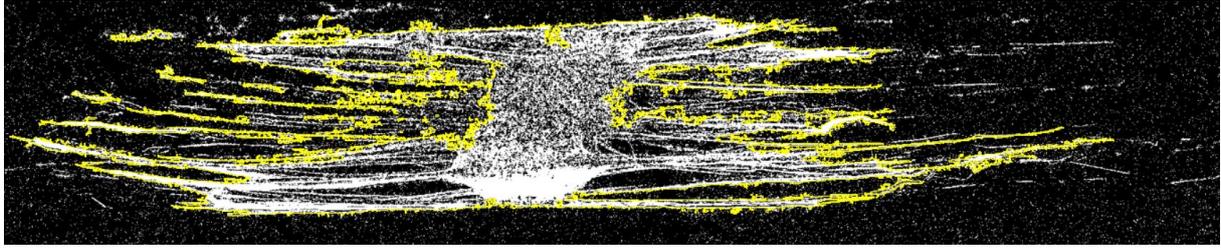


Figura 17. Zona axonal delimitada por FIJI/ImageJ.

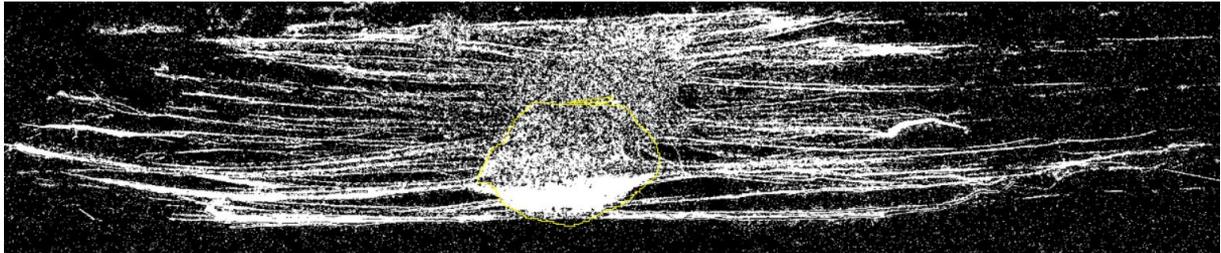


Figura 18. Cuerpo del DRG delimitado con FIJI/ImageJ.

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM). Los datos obtenidos de los diferentes estudios fueron sometidos a la prueba estadística t-test asumiendo una distribución Gaussiana de los datos con el software GraphPad Prism® para analizar diferencias significativas entre las diferentes condiciones. Las diferencias estadísticas han sido indicadas con *, **, *** o **** indicando un p-valor menor de 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001 respectivamente.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA

Acorde al procedimiento de diseño mencionado en el apartado de materiales y métodos, se obtuvieron las fibras de PLA recubiertas con PPy, una vez recubiertas y tras el posterior secado de las mismas, se procedió al montaje del dispositivo con las 3 fibras de oro correspondientes. En la figura 19 se muestra en escala macroscópica la disposición de las en el dispositivo de cultivo celular, a simple vista las fibras de oro no se aprecian ya que se encuentran en la parte inferior del dispositivo dispuestas paralelamente y equiespaciadas entre sí.

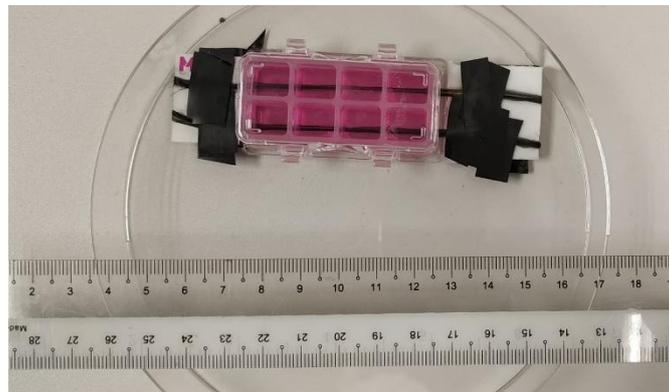


Figura 19. Disposición macroscópica de las fibras en el dispositivo de cultivo.

El dispositivo que ha sido desarrollado permite realizar 8 repeticiones del mismo experimento pudiendo así obtener muestras mayores para el posterior análisis minimizando los recursos. Dentro del montaje, sellado, esterilización y preacondicionamiento del dispositivo, se perfeccionó la técnica ya que en un principio era complicado el sellado completo con Filmogel para conseguir que el *slide* fuera estanco. A pesar de ello, al final el sellado fue eficiente evitando las fugas del medio de cultivo.

Por otro lado, cabe destacar que el proceso de esterilización es un proceso complejo ya que el EtOH acaba “comiéndose” el Filmogel. Es por ello que, aunque a priori parezca que el dispositivo está correctamente sellado, tras la esterilización esto podría no ser así. Dificultando el correcto preacondicionamiento y que no se pueda hacer la siembra celular. Sin embargo, a lo largo del proyecto se fue perfeccionando la técnica, consiguiendo una efectividad total de la esterilización para garantizar que no haya contaminaciones y asegurando el sellado del dispositivo con Filmogel.

7.2 CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA

Una vez obtenidos los materiales, es decir, las fibras de PLA recubiertas con PPy, se realizó un análisis de la resistencia en función de las fibras a lo largo del tiempo con el fin de comprobar que la conductividad era más o menos estable. Este análisis se realizó en primer lugar en condiciones atmosféricas, es decir, presión atmosférica y temperatura ambiente, obteniéndose para un total de 175 días de análisis los resultados que se muestran en la figura 20.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

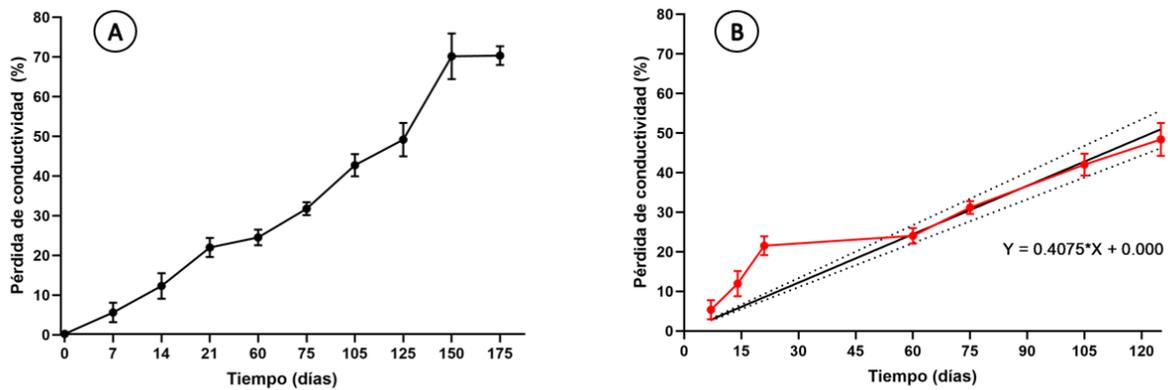


Figura 20. (A) Pérdida de conductividad de las fibras de PLA-PPy (en porcentaje) con respecto al tiempo en un total de 175 días. (B) Regresión lineal del ensayo de pérdida de conductividad, ajustado a los 125 primeros días.

Como se observa en la figura 20A, la conductividad se va perdiendo a lo largo del tiempo en condiciones atmosféricas, llegando a perder en un tiempo de 175 días hasta un 70% de su conductividad inicial, es decir, ha aumentado la resistencia de las fibras al paso de corriente con el tiempo.

Dada la naturaleza de estos resultados, se pudo concluir que es preferible la producción del stock de fibras necesario para cada experimento previo a este, en lugar de fabricar gran cantidad de fibras, almacenarlas e ir utilizándolas según corresponda.

Por otro lado, se realizó el mismo experimento, comparando un grupo de fibras almacenadas en condiciones atmosféricas frente a otro grupos que fue almacenado a temperatura ambiente pero a 101.32 Kilopascales (kPa) de presión, es decir, fueron almacenadas en una bomba de vacío. Tras el análisis de la conductividad en un total de 35 días los resultados obtenidos fueron los que se muestran en la figura 21.

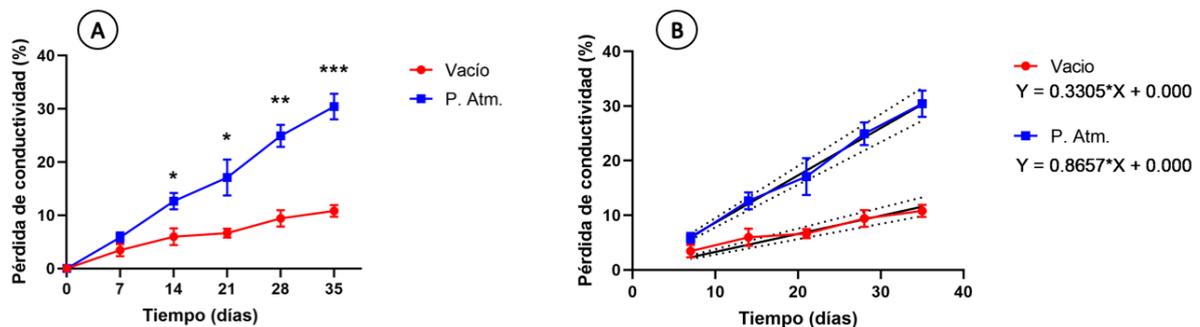


Figura 21. (A) Análisis de pérdida e conductividad comparativa. En azul muestras almacenadas en condiciones atmosféricas y en rojo muestras almacenadas a temperatura ambiente y 101.32kPa. * corresponde con un p -valor <0.05 , ** p -valor <0.01 , *** p -valor <0.001 .

En la figura 21A, se observa una comparativa de los resultados obtenidos del estudio de la pérdida de conductividad en ambos tipos de fibras; siendo la curva roja la que corresponde con el grupo de fibras almacenado a temperatura ambiente y a 101.32 kPa (grupo de vacío) y la curva azul corresponde con

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

el grupo que fue guardado en condiciones atmosféricas. A raíz de estos resultados obtenidos, se puede deducir, que el almacenamiento de las fibras a condiciones de vacío reduce la pérdida de conductividad, siendo esta de un 10% tras 35 días de análisis. Es decir, en 35 días de estudio, el grupo a vacío perdió una cuarta parte de la conductividad que perdieron las fibras en condiciones normales. Es por ello, que parece beneficioso, en el caso de que se fabrique un gran número de fibras de manera inicial, almacenarlas en vacío para preservar al máximo posible la conductividad del carril en la posterior estimulación eléctrica tras la siembra de células.

Además, en las figuras 20B y 21B se ha obtenido la regresión lineal del conjunto con la finalidad de predecir el comportamiento en tiempos futuros de la pérdida de conductividad. Tal y como muestra la ecuación para el grupo de vacío, para un total de 175 días, las muestras a vacío perderían un 44% de su conductividad inicial, frente al 70% que pierde en el caso del estudio en condiciones atmosféricas.

Estos resultados parecen indicar que el hecho de almacenar las fibras en bomba de vacío protege a las fibras frente a agentes ambientales que produzcan efectos de oxidación afectando a las propiedades conductoras del recubrimiento de PPy de las fibras.

Por otro lado, fueron obtenidas las resistencias eléctricas de las combinaciones de ambos materiales, en primer lugar se obtuvo la resistencia de las fibras recubiertas con PPy y en segundo lugar tras incluir las 3 fibras de oro correspondientes al estudio, como se muestra en la tabla 3, donde se recogen los valores de resistencia en función de la longitud.

Tabla 3. Valores de resistencia/longitud para las fibras de PLA+PPy con y sin oro.

MATERIAL	RESISTENCIA/LONGITUD (kΩ/cm)
PLA+PPy	~13.44
PLA+PPy+oro	~8.5 x 10 ⁻⁴

Como se puede observar el hecho de haber combinado el oro con el PPy como materiales conductores, ha disminuido la resistencia del material al paso de corriente. Esta baja resistencia de las fibras combinadas con oro permite que la corriente eléctrica pase a través de las fibras sin generar problemas de pH en el medio, permitiendo así también aplicar corrientes más bajas para la estimulación evitando complicaciones derivadas de aplicar corrientes muy elevadas tanto a las células como a las fibras de PLA+PPy.

A pesar de que las conductividades de otros polímeros utilizados en ingeniería tisular como los estudiados por Balint et al., (2014), pueden ser más elevadas depende también de los tratamientos de dopaje realizados para la obtención de estos tratamientos y la estructura física en que se presenten. Es por ello, que según se ha revisado y los resultados obtenidos en este estudio, la combinación de las propiedades conductoras de PPy y oro presentan características prometedoras en este tipo de aplicaciones, debido a su facilidad de síntesis y a los beneficios eléctricos que aportan para la estimulación del material en el cultivo.

7.3 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

A través del análisis de TGA se estudió la estabilidad de las muestras de PLA-PPy tras diferentes procesos de degradación. Como se puede observar en la figura 22, en la curva que corresponde a la

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

muestra de PPy, hay una pérdida de masa entre 50 y 100°C que es debida, principalmente a la evolución del dopante pTS adsorbido en la muestra y el H₂O (Gisbert Roca, García-Bernabé, et al., 2021). Sin embargo esta pérdida de peso no se observa en las muestras compuestas por ambos materiales (PLA-PPy) ya que la fracción másica del PPy en las muestras es de únicamente un 3,5%. Por otro lado, la pérdida de masa que hay en las muestras de PLA-PPy (control, degradación 90 días y degradación 180 días) entre 300°C y 400°C se debe a la degradación de la cadena polimérica.

La degradación térmica de la cadena polimérica se ve adelantada cuanto más degradado está el material, es por ello que la muestra degradada en PB (curva roja) tiene una degradación térmica de la cadena polimérica que ocurre antes incluso que la muestra de PLA (curva azul claro). Esto se debe a que el recubrimiento de PPy que actuaba como capa protectora se ha perdido pero además el PB ha causado una degradación hidrolítica de la cadena polimérica de PLA. Es decir, tras el tratamiento de las fibras de PLA-PPy con PB, ambos materiales se ven afectados en el proceso de degradación. Sin embargo, en la degradación a temperatura ambiente (curva negra), este proceso no se aprecia en la imagen. En este caso lo que ha ocurrido ha sido únicamente debido a una degradación previa del PPy, por ello, su curva de degradación térmica ocurre más tarde que la curva azul clara correspondiente a la degradación del PLA.

Al hacer un recubrimiento de PPy lo que se hace es retardar la degradación de las fibras de PLA como se observa en la curva de control azul oscura y en la curva teórica de la degradación de los materiales (curva amarilla), esto es debido a que como se observa en la curva del PPy, este degrada más tarde que el PLA. Lo que permite deducir que el recubrimiento de PPy protege de la hidrólisis en el caso de la degradación realizada con PB, pero que además protege de la difusión del residuo, retrasando así la degradación de las fibras en condiciones atmosféricas.

Cabe recalcar que en base a los resultados obtenidos, el material más degradado es el que ha sufrido un tratamiento con PB 0.1M a 37°C en lugar del material que ha sido degradado en condiciones atmosféricas (presión atmosférica y temperatura ambiente).

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

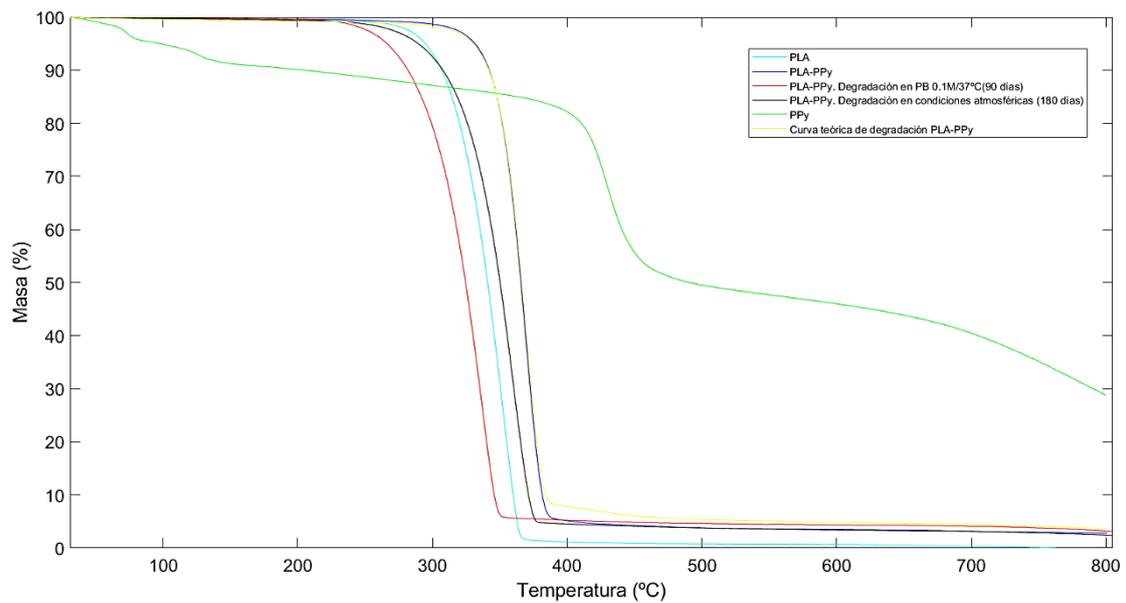


Figura 22. Análisis termogravimétrico. Degradación teórica (amarilla), grupo control PLA (azul claro), grupo control PPy (verde), PLA-PPy control (azul oscuro), PLA-PPy degradado en PB 0.1M a 37°C durante 90 días (rojo) y PLA-PPy degradado 180 días en condiciones atmosféricas (negro).

En la figura 23 se muestra de manera ampliada el rango de pérdida de masa entre 90-100% donde se observa que la curva teórica de degradación de PLA+PPy ocurre más rápido que el resto de muestras, esto es debido al efecto del recubrimiento de PPy sobre las fibras de PLA, aunque esta diferencia con respecto al resto de fibras no es significativa.

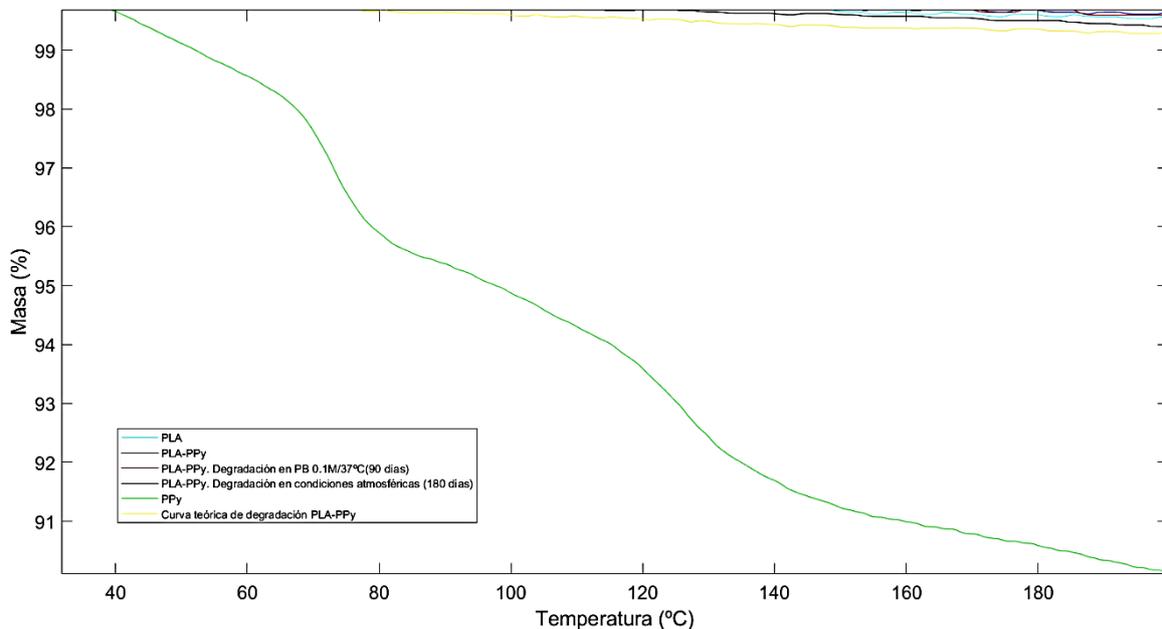


Figura 23. Análisis termogravimétrico ampliado en el rango de pérdida de masa entre 90-100% para todas las muestras.

7.4 ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Gracias al análisis de FTIR realizado, es posible caracterizar y analizar los picos característicos de las estructuras que están sujetas a estudio a lo largo del presente trabajo. En la figura 24 se presentan las curvas de PPy (morada) y PLA (negra), mientras que también existen otras tres curvas que corresponden con las muestras de PLA-PPy (azul), PLA-PPy tras 90 días de tratamiento en PB 0.1M (verde) y PLA-PPy tras una degradación en condiciones atmosféricas (rojo).

En primer lugar, en 1010 cm^{-1} , se observa en todas las muestras de PLA-PPy un pico característico del elemento dopante del PPy, el pTS que se corresponde con la vibración de estiramiento de los enlaces S=O del grupo $-\text{SO}_3^-$, en 1150 cm^{-1} se muestra otro pico característico del dopante que corresponde con la vibración de flexión de los enlaces C-H en el plano (Eva et al., 2006; Raudsepp et al., 2014). En ambos casos, pico se ve atenuado cuando existe un proceso de degradación, viéndose más atenuado en el caso del tratamiento con PB que en las muestras degradadas “al aire”.

Por otro lado, alrededor de 1532 cm^{-1} de longitud de onda, se observa un pico característico del PPy que corresponde, concretamente, con la vibración fundamental del anillo de PPy (Gisbert Roca, García-Bernabé, et al., 2021). Este pico se observa en las muestras de control y de degradación al aire, aunque en el segundo caso se aprecia un poco atenuada, esto lleva a pensar que el proceso de degradación en condiciones atmosféricas ha afectado a la estabilidad del PPy. Sin embargo, en la curva verde, correspondiente al tratamiento de las muestras con PB, este pico es prácticamente inexistente, lo cual concuerda con los resultados analizados previamente en el TGA que indican que el PPy se ha visto completamente afectado por el tratamiento realizado.

Por último, en las muestras degradadas, se observan dos picos inexistentes en el resto de muestras, estos picos corresponden a una longitud de onda aproximada entre 2870 cm^{-1} y 2944 cm^{-1} , estos picos muestran la flexión y tensión de los C-H alifáticos (Fabela-Sánchez et al., 2018). Estos grupos se originan tras una ruptura de los anillos de pirrol, lo que lleva a pensar, que esta rotura es debida a la degradación del PPy producido en las muestras degradadas en las diferentes condiciones.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

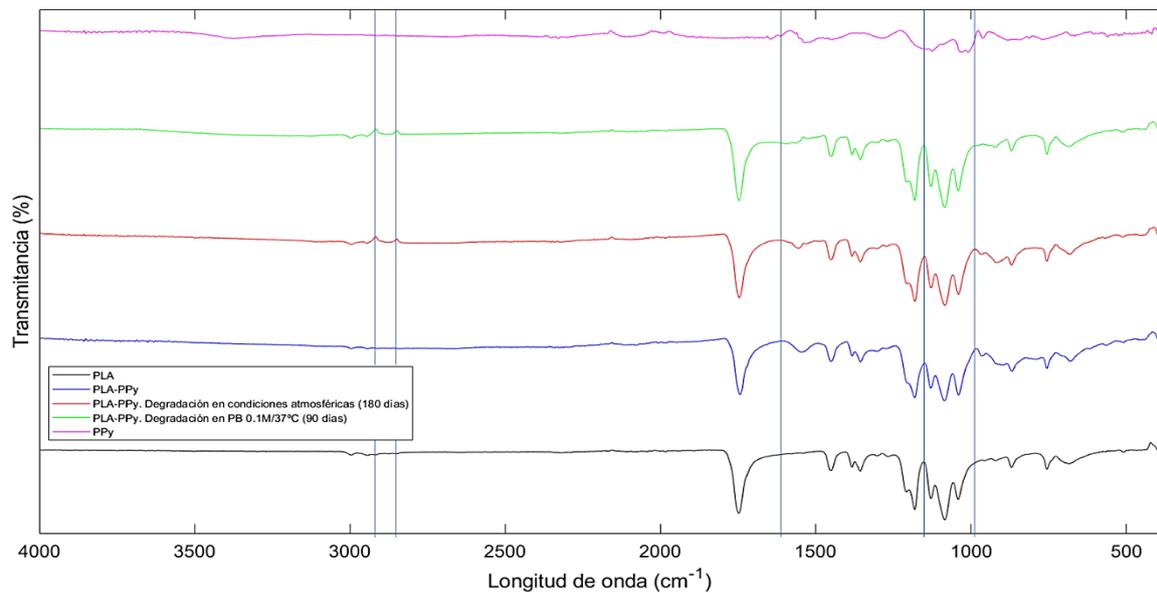


Figura 24. Análisis de FTIR. Grupo control PLA (negro), grupo control PPy (morado), PLA-PPy control (azul), PLA-PPy degradado en PB 0.1M a 37°C durante 90 días (verde) y PLA-PPy degradado 180 días en condiciones atmosféricas (rojo).

En la figura 25, se muestra un análisis de las curvas normalizadas de PPy en las muestras degradadas y control. Es decir, una vez obtenidas las curvas mostradas previamente, se han normalizado por la fracción másica de PLA (96.5%) y restado dicha componente para mostrar los picos que corresponden únicamente a la molécula de PPy en cada caso. Esta figura sirve para evidenciar que el tratamiento de PB sobre las muestras de PLA-PPy ha afectado al recubrimiento de PPy de las fibras, viéndose los picos de esta molécula muy atenuados con respecto a la muestra de control (azul). En el caso de las muestras degradadas en condiciones atmosféricas también se ve una atenuación de los picos pero no tan grande como en el caso anterior, indicando que a pesar de existir una degradación que afecta al PPy, no es tan grande como en el caso anterior.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

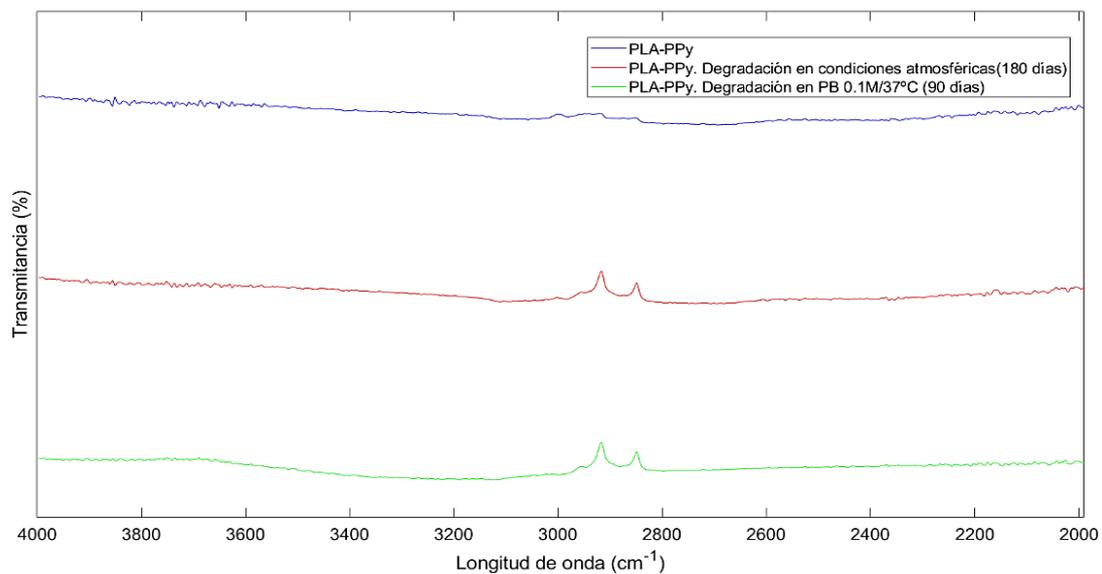


Figura 25. Picos característicos de la fracción de PPy en las muestras compuestas por ambos materiales. PLA-PPy control (azul), PLA-PPy degradado 180 días en condiciones atmosféricas (rojo) y PLA-PPy degradado en PB 0.1M a 37°C durante 90 días (verde).

7.5 ENSAYO IN VITRO DEL CULTIVO CELULAR

Con el objetivo de analizar la extensión y densidad axonal tras el cultivo y estimulación de los dispositivos se utilizó la técnica de inmunofluorescencia descrita previamente, a través de las imágenes obtenidas es posible determinar si la estimulación eléctrica es beneficiosa o no para este dispositivo, y, en caso de no serlo, poder determinar líneas futuras de estudio donde la estimulación muestre beneficios para el cultivo. Para dicho análisis, y como ya ha sido previamente mencionado, se utilizó un análisis de Matlab® desarrollado en estudios previos del grupo y el programa FIJI/ImageJ.

Además, cabe recordar que se realizaron dos experimentos (experimento 1 y experimento 2), para los cuales se aplicaron condiciones diferentes de estimulación y cultivo, es por ello, que se realizará un análisis de cada uno de los experimentos por separado. En ambos casos se sembraron SCs ya que como se ha mencionado, ha sido demostrado que la siembra de SCs en el cultivo celular combinado con DRG es beneficioso para promover la extensión axonal pero además para favorecer la neurogénesis (Gisbert Roca, André, et al., 2021).

En primer lugar, en el experimento 1, tras los 6 días de cultivo donde los últimos 4 días se aplicó estimulación eléctrica, no se observan diferencias significativas entre el grupo denominado control y el grupo estimulado. Lo que se observó en las imágenes fue que los axones habían llegado al límite del pocillo que albergaba el cultivo en ambos grupos, pudiendo ser debido a las 48 horas que se dejó entre la siembra y el inicio de la estimulación, así como por establecer un tiempo de cultivo total demasiado largo como para apreciar diferencias entre ambos grupos.

En la figura 26, se muestra un ejemplo de las imágenes obtenidas por microscopia, a partir de estas imágenes se realizó el análisis de los parámetros que se describe a continuación, ya que aunque a

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

simple vista se pueden obtener conclusiones de los resultados obtenidos, se ha preferido hacer un análisis paramétrico que sustente lo que se ve a simple vista.

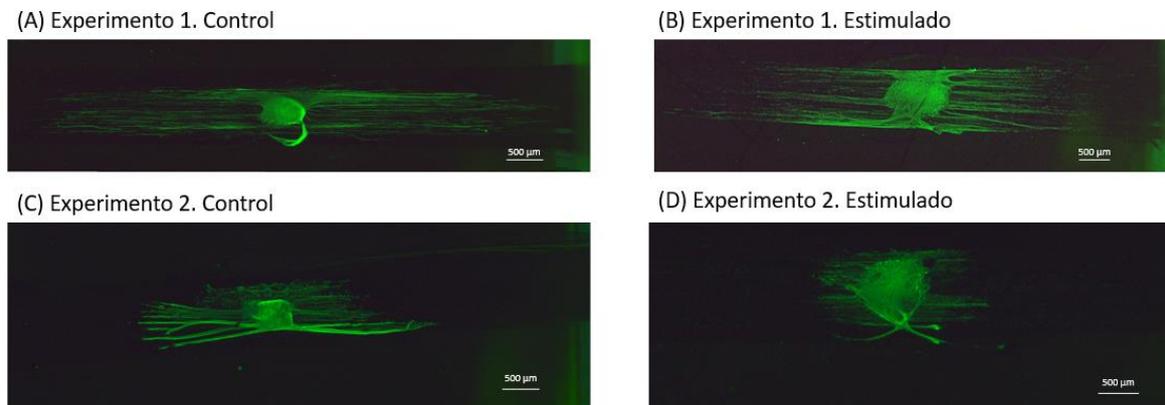


Figura 26. Imágenes de inmunofluorescencia de ambos experimentos realizados. (A) Grupo control del experimento 1, (B) grupo estimulado del experimento 1, (C) grupo control del experimento 2 y (D) grupo estimulado del experimento 2. La barra de escala es de 500 µm

Como se observa en la figura 27A podemos ver el análisis de los parámetros que determinan la longitud axonal del cultivo y de la misma manera que se apreciaba a simple vista, no hay diferencias significativas en ninguno de los parámetros que analizan la longitud. Por otro lado, en la figura 27B el parámetro C, que analiza el área bajo la curva desde el borde del cuerpo del DRG tampoco muestra diferencias significativas.

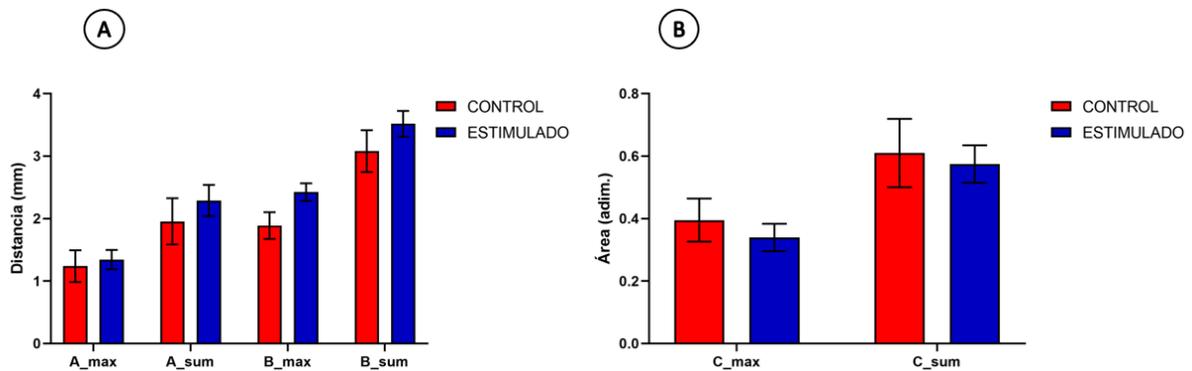


Figura 27. Comparación de los parámetros de longitud axonal y área bajo la curva de intensidad analizados con Matlab® del experimento 1.

Por otro lado, tal y como muestra la figura 28, donde se ha realizado el análisis de la densidad axonal o el área total de los axones con FIJI/imageJ, se aprecia lo mismo que veíamos en los anteriores parámetros, no hay diferencias significativas entre ambos grupos.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

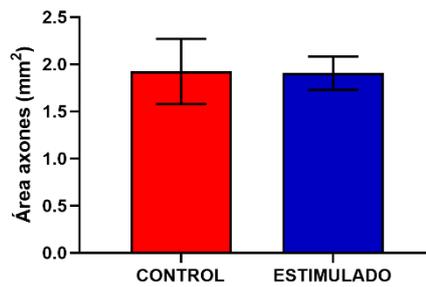


Figura 28. Comparación del análisis del área axonal analizado con Fiji/ImageJ del experimento 1.

En el segundo experimento, cabe recordar que se llevó a cabo un cultivo total de 4 días donde la estimulación se aplicó los 3 últimos días del cultivo. Además, se modificaron los parámetros de estimulación, aumentando la corriente con la finalidad de determinar si la estimulación provocaba algún tipo de efecto en el cultivo.

Al contrario que en el experimento anterior, como se puede observar en el análisis de parámetros que se muestra en la figura 29, sí que se observaron diferencias significativas en cada uno de los parámetros analizados, tanto los que evalúan la longitud como el área bajo la curva de intensidad. Sin embargo, los resultados muestran que la estimulación ha afectado de manera negativa al cultivo, probablemente la corriente fuera demasiado elevada y acabó matando las células del cultivo, ya que en las imágenes de la inmunofluorescencia se observa un pequeño crecimiento axonal lo que evidencia que el equipo de estimulación funciona y que las células sembradas estaban vivas inicialmente.

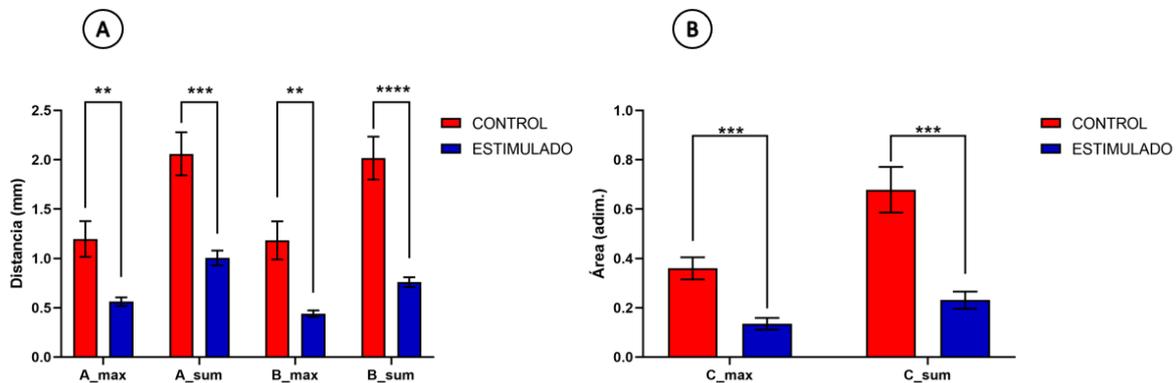


Figura 29. Comparación de los parámetros de longitud axonal y área bajo la curva de intensidad analizados con Matlab del experimento 2. * corresponde con un p-valor<0.05, ** p-valor<0.01, *** p-valor<0.001 y **** p-valor<0.0001.

Asimismo, también se realizó el análisis del área axonal total de las muestras, donde tal y como se puede ver en la figura 30, y como era de esperar debido a los resultados previamente analizados, la densidad axonal es mucho menor en el caso de la estimulación, evidenciando lo que se había comentado previamente, la estimulación eléctrica, en este caso ha afectado de manera negativa a la extensión y densidad axonal.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

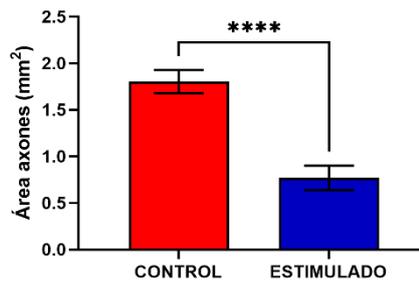


Figura 30. Comparación del área axonal analizada con FIJI/ImageJ del experimento 2. **** corresponde con un p -valor < 0.0001 .

De manera análoga a lo que se ha comentado anteriormente, debido a esta disposición de las fibras y como se ha podido observar, este dispositivo permite que la corriente de estimulación pase a través de las fibras sin afectar al medio de cultivo salino. Además, se ha podido probar el hecho de que las fibras favorecen la alineación durante el proceso de extensión axonal, permitiendo un direccionamiento de los axones a través de las fibras evitando así, un crecimiento radial de estos.

Estos resultados ponen de manifiesto el hecho de que el equipo de estimulación funciona correctamente y el dispositivo está bien conectado al equipo ya que, aunque de manera negativa, se han observado resultados que permiten establecer líneas futuras para el cultivo y estimulación. Es decir, para posteriores ensayos, sería conveniente disminuir la corriente aplicada en los dispositivos para poder observar bien el efecto de la estimulación. Además, recientemente el equipo se encuentra realizando ensayos de biología molecular para analizar los genes que se encuentran sobreexpresados tras la estimulación de las células, de esta manera se podrá determinar qué tipo de células predominan y no analizar únicamente la extensión.

8 CONCLUSIONES

Los materiales y cultivos realizados a lo largo del presente Trabajo Fin de Grado han sido analizados y caracterizados lo cual ha permitido obtener las siguientes conclusiones, de acuerdo con los resultados obtenidos:

- Mediante el almacenamiento a temperatura ambiente y 101.32kPa es posible conservar durante más tiempo las propiedades conductoras del PPy frente al almacenamiento en condiciones atmosféricas que reduce notablemente dichas propiedades.
- El tratamiento con PB 0.1M en estufa a 37°C y durante 90 días afecta de manera notable a ambos materiales (tanto PLA como PPy), tal y como muestran los análisis realizados con TGA y FTIR, mientras que la degradación realizada en condiciones atmosféricas durante el doble de tiempo no es tan agresiva, afectando únicamente al PPy, lo cual también se observa en el análisis de pérdida de conductividad.
- El uso de fibras como estructura de cultivo ha favorecido el alineamiento de los axones evitando así el crecimiento radial de los axones que nacen del DRG como cabía esperar debido a la bibliografía consultada.
- El uso de fibras de oro como material conductor para apoyar la estimulación ha favorecido los protocolos de estimulación aplicados ya que no se precisan intensidades tan elevadas para conseguir una estimulación que mejore el crecimiento axonal y la migración de las SCs.
- El hecho de haber esperado 48 horas para la adhesión celular ha impedido observar diferencias entre el grupo control y el grupo estimulado. Por lo que en el caso que aquí se expone y debido a las limitaciones del dispositivo, reducir el tiempo de adhesión a 24h ha permitido observar diferencias entre ambos grupos (control y estimulado)
- Los parámetros de estimulación utilizados han afectado de manera negativa al cultivo, de manera que el grupo de muestras estimuladas han extendido menos que el grupo sin estimular. Por ello, para estudios futuros, sería conveniente realizar un estudio donde se empleasen valores menores corriente de estimulación, para poder ver un efecto positivo de la estimulación sobre el cultivo.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Báez, D. F., Gallardo-Toledo, E., Oyarzún, M. P., Araya, E., & Kogan, M. J. (2021). The Influence of Size and Chemical Composition of Silver and Gold Nanoparticles on in vivo Toxicity with Potential Applications to Central Nervous System Diseases. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 16*, 2187–2201. <https://doi.org/10.2147/ijn.s260375>
- Balint, R., Cassidy, N. J., & Cartmell, S. H. (2014). Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, *10*(6), 2341–2353. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.015>
- Bassi, M. A., Lopez, M. A., Confalone, L., Gaudio, R. M., Lombardo, L., & Lauritano, D. (2020). Polypyrrole as Electrically Conductive Biomaterials: Synthesis, Biofunctionalization, Potential Applications and Challenges. In *Nature* (Vol. 388, pp. 539–547).
- Betts, J. G., Desaix, P., Johnson, E., Johnson, J. E., Korol, O., Kruse, De., Poe, B., Wise, J. A., Womble, M., & Young, K. A. (1934). II. Anatomy and physiology. In *Acta Oto-Laryngologica* (Vol. 19, Issue S20). <https://doi.org/10.3109/00016483409122096>
- Blachowicz, T., & Ehrmann, A. (2020). Conductive electrospun nanofiber mats. *Materials*, *13*(1). <https://doi.org/10.3390/ma13010152>
- Bordoni, M., Scarian, E., Rey, F., Gagliardi, S., Carelli, S., Pansarasa, O., & Cereda, C. (2020). Biomaterials in neurodegenerative disorders: A promising therapeutic approach. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093243>
- Brodal, P. (2010). The Central Nervous System. In Oxford (Ed.), *The central Nervous System* (Fourth Edi).
- Bunker Corporation. (2019). *Guía sobre espectroscopía FT-IR | Bruker*. CONCEPTOS BÁSICOS DE LA ESPECTROSCOPIA Guía de Espectroscopía Infrarroja. <https://www.bruker.com/es/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>
- Cabuzu, D., Cirja, A., Puiu, R., & Grumezescu, A. (2015). Biomedical Applications of Gold Nanoparticles. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *15*(16), 1605–1613. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150414144750>
- Chhour, P., Naha, P. C., Cheheltani, R., Benardo, B., Mian, S., & Cormode, D. P. (2016). *Nanomaterials in Pharmacology*. April. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3121-7>
- Cui, Z. K., Li, S. Y., Liao, K., Wang, Z. J., Guo, Y. L., Tang, L. S., Tang, S. B., Ma, J. H., & Chen, J. S. (2021). Characteristics of neural growth and cryopreservation of the dorsal root ganglion using three-dimensional collagen hydrogel culture versus conventional culture. *Neural Regeneration Research*, *16*(9), 1856–1864. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.306097>
- David, S., & Aguayo, A. J. (1981). Axonal elongation into peripheral nervous system “bridges” after central nervous system injury in adult rats. *Science*, *214*(4523), 931–933. <https://doi.org/10.1126/science.6171034>
- Doblado, L. R., Martínez-ramos, C., & Pradas, M. M. (2021). *Biomaterials for Neural Tissue Engineering*. 3(April). <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.643507>

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

- Eva, H., Lin, T., Wang, H., & Kaynak, A. (2006). The effects of dye dopants on the conductivity and optical absorption properties of polypyrrole. *Synthetic Materials*, 156, 1194–1202. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2006.08.006>
- Evans, P. J., Midha, R., & Mackinnon, S. E. (1994). The peripheral nerve allograft: A comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. *Progress in Neurobiology*, 43(3), 187–233. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)90001-9)
- Fabela-Sánchez, O., Salgado-Ceballos, H., Medina-Torres, L., Álvarez-Mejía, L., Sánchez-Torres, S., Mondragón-Lozano, R., Morales-Guadarrama, A., Díaz-Ruiz, A., Olayo, M. G., Cruz, G. J., Morales, J., Ríos, C., & Olayo, R. (2018). Effect of the combined treatment of albumin with plasma synthesised pyrrole polymers on motor recovery after traumatic spinal cord injury in rats. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(1). <https://doi.org/10.1007/s10856-017-6016-2>
- Faroni, A., Mobasser, S. A., Kingham, P. J., & Reid, A. J. (2015). Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 82, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.010>
- Fortoul, T. (2013). *Histología y Biología Celular-Fortoul*. https://www.academia.edu/39017432/Histologia_y_Biologia_Celular_Fortoul_2a_ed_bo oksmedicos
- Gabriel, F., & Nava, F. (2019). *Procesamiento de fibras electrohiladas dispersas compuestas de polipirrol en ácido poliláctico*.
- Gisbert Roca, F., André, F. M., Más Estellés, J., Monleón Pradas, M., Mir, L. M., & Martínez-Ramos, C. (2021). BDNF-Gene Transfected Schwann Cell-Assisted Axonal Extension and Sprouting on New PLA-PPy Microfiber Substrates. *Macromolecular Bioscience*, 2000391. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000391>
- Gisbert Roca, F., García-Bernabé, A., Compañ Moreno, V., Martínez-Ramos, C., & Monleón Pradas, M. (2021). Solid Polymer Electrolytes Based on Polylactic Acid Nanofiber Mats Coated with Polypyrrole. *Macromolecular Materials and Engineering*, 306(2), 1–14. <https://doi.org/10.1002/mame.202000584>
- Gisbert Roca, F., Más Estellés, J., Monleón Pradas, M., & Martínez-Ramos, C. (2020). Axonal extension from dorsal root ganglia on fibrillar and highly aligned poly(lactic acid)-polypyrrole substrates obtained by two different techniques: Electrospun nanofibres and extruded microfibrils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1959–1969. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.181>
- Griffin, J. W., Hogan, M. C. V., Chhabra, A. B., & Deal, D. N. (2013). Peripheral nerve repair and reconstruction. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*, 95(23), 2144–2151. <https://doi.org/10.2106/JBJS.L.00704>
- Gu, X., Ding, F., & Williams, D. F. (2014). Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 35(24), 6143–6156. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.064>
- Guardo-Gómez, V., Fajardo-Perdomo, M. A., Muñoz, A. L., & Gómez, L. A. (2020). Tissue engineering for nervous regeneration: A review. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 58(1), 50–60. <https://doi.org/10.4067/S0717-92272020000100050>
- Guerra, G. G. L. (2014). *Descelularización de nervio ciático de rata y su posterior*

recelularización “in vitro” con células de Schwann.

- Hopkins, A. M., DeSimone, E., Chwalek, K., & Kaplan, D. L. (2015). 3D in vitro modeling of the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 125, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.11.003>
- Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *Journal of Physiology*, 594(13), 3521–3531. <https://doi.org/10.1113/JP270874>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260, 920–926.
- Lu, L., Peter, S. J., D. Lyman, M., Lai, H. L., Leite, S. M., Tamada, J. A., Uyama, S., Vacanti, J. P., Robert Langer, & Mikos, A. G. (2000). In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*, 21(18), 1837–1845. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00047-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00047-8)
- Lundborg, G., Dahlin, L. B., Danielsen, N., Gelberman, R. H., & Longo, F. M. (1982). Nerve Regeneration in Silicone Chambers: Influence of Gap Length and of Distal Stump Components. *Experimental Neurology*, 76, 361–375.
- Malheiro, A., Morgan, F., Baker, M., Moroni, L., & Wieringa, P. (2020). A three-dimensional biomimetic peripheral nerve model for drug testing and disease modelling. *Biomaterials*, 257(July), 120230. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120230>
- Martinez, A. (2015). Anatomía del sistema nervioso. *Anatomía*, 27. http://recursosbiblio.url.edu.gt/publicjlg/Libros_y_mas/2015/08/biop/cap/03.pdf
- Millicell® EZ SLIDES | Life Science Research | Merck.* (n.d.). Retrieved May 24, 2021, from <https://www.merckmillipore.com/ES/es/life-science-research/cell-culture-systems/cell-growth/ez-slides/8Dab.qB.IO8AAAFB2PVb3.rb,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>
- Min, Q., Parkinson, D. B., & Dun, X. P. (2021). Migrating Schwann cells direct axon regeneration within the peripheral nerve bridge. *Glia*, 69(2), 235–254. <https://doi.org/10.1002/glia.23892>
- Moraleda, J. M., Blanquer, M., Gómez-Espuch, J., Iniesta, F., Hurtado, V., Ángel Pérez-Espejo, M., Javier Rodríguez-Lozano, F., & Martínez, S. (2011). Terapia con células madre en enfermedades neurodegenerativas. *Artículo de Revisión Rev Hematol Mex*, 12(3), 144–148. www.clinicaltrials.gov,
- Navarro, X., & Hernández, J. (2010). Terapia Celular Para La Reparación De Las Lesiones De La Médula Espinal. *Revista Sobre Ruedas*, 75, 16–22.
- Norbert Pullua & Christoph V. Suschek. (2013). Tissue Engineering. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 12, pp. 222–255). Springer Berlin Heidelberg.
- Paviolo, C., & Stoddart, P. R. (2017). Gold nanoparticles for modulating neuronal behavior. In *Nanomaterials* (Vol. 7, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/nano7040092>
- Powell, S., Vinod, A., & Lemons, M. L. (2014). Isolation and culture of dissociated sensory neurons from chick embryos. *Journal of Visualized Experiments*, 91, 1–2. <https://doi.org/10.3791/51991>
- Prósper, F., Gavira, J. J., Herreros, J., Rábago, G., Luquin, R., Moreno, J., Robles, J. E., & Redondo, P. (2006). Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre. *Anales*

- Del Sistema Sanitario de Navarra*, 29, 219–234.
https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272006000400018&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Quigley, A. F., Razal, J. M., Thompson, B. C., Moulton, S. E., Kita, M., Kennedy, E. L., Clark, G. M., Wallace, G. G., & Kapsa, R. M. I. (2009). A conducting-polymer platform with biodegradable fibers for stimulation and guidance of axonal growth. *Advanced Materials*, 21(43), 4393–4397. <https://doi.org/10.1002/adma.200901165>
- R&D SYSTEMS. (n.d.). *Protocol for Culturing Embryonic Chick Dorsal Root Ganglion Neurons: R&D Systems*. Retrieved May 25, 2021, from <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/protocol-culturing-embryonic-chick-dorsal-root-ganglion-neurons>
- Raudsepp, T., Marandi, M., Tamm, T., Sammelseg, V., & Tamm, J. (2014). Electrochimica Acta Influence of ion-exchange on the electrochemical properties of polypyrrole films. *Electrochimica Acta*, 122, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.08.083>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmidt, C. E., & Leach, J. B. (2003). Neural tissue engineering: Strategies for repair and regeneration. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5, 293–347. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.5.011303.120731>
- Serna C., L., Rodríguez de S., A., & Albán A., F. (2011). Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. *Ingeniería y Competitividad*, 5(1), 16. <https://doi.org/10.25100/iyc.v5i1.2301>
- Soria, J. M., Barcia-González, J., Andrades, J. A. Soria, J. M. et al. (2008) ‘Uso de biomateriales en medicina regenerativa , aspectos básicos y aplicaciones en el Sistema Nervioso Use of biomaterials in regenerative medicine , basic aspects and applications in the Nervous System’, Trauma, pp. 15–22., Romero, J., Monleón Pradas, M., & García Verdugo, J. M. (2008). Uso de biomateriales en medicina regenerativa , aspectos básicos y aplicaciones en el Sistema Nervioso Use of biomaterials in regenerative medicine , basic aspects and applications in the Nervous System. *Trauma Foundation Mapfre*, 20(1), 15–22.
- Tabla de coeficientes de amortización lineal. - Agencia Tributaria.* (n.d.). Retrieved June 21, 2021, from https://www.agenciatributaria.es/AEAT.internet/Inicio/_Segmentos_/Empresas_y_profesionales/Empresas/Impuesto_sobre_Sociedades/Periodos_impositivos_a_partir_de_1_1_2015/Base_imponible/Amortizacion/Tabla_de_coeficientes_de_amortizacion_lineal_.shtml
- Tian, L., Prabhakaran, M. P., & Ramakrishna, S. (2015). Strategies for regeneration of components of nervous system: Scaffolds, cells and biomolecules. In *Regenerative Biomaterials* (Vol. 2, Issue 1, pp. 31–45). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/rb/rbu017>
- Xiang, C., Zhang, Y., Guo, W., & Liang, X. J. (2020). Biomimetic carbon nanotubes for neurological disease therapeutics as inherent medication. In *Acta Pharmaceutica Sinica B*

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL
APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

(Vol. 10, Issue 2, pp. 239–248). <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.11.003>

Zhou, Z., Liu, X., Wu, W., Park, S., Miller, A. L., Terzic, A., & Lu, L. (2018). Effective nerve cell modulation by electrical stimulation of carbon nanotube embedded conductive polymeric scaffolds. *Biomaterials Science*, 6(9), 2375–2385. <https://doi.org/10.1039/c8bm00553b>

Zhu, R., Sun, Z., Li, C., Ramakrishna, S., Chiu, K., & He, L. (2019). Electrical stimulation affects neural stem cell fate and function in vitro. *Experimental Neurology*, 319(April), 112963. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.112963>

Zou, Y., Qin, J., Huang, Z., Yin, G., Pu, X., & He, D. (2016). Fabrication of Aligned Conducting PPy-PLLA Fiber Films and Their Electrically Controlled Guidance and Orientation for Neurites. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(20), 12576–12582. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b00957>

DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

INTRODUCCIÓN.....	57
CUADRO 1: MANO DE OBRA.....	57
CUADRO 2: MATERIALES.....	57
CUADRO 3: MAQUINARIA.....	59
CUADRO 4: PRECIOS DESCOMPUESTOS.....	60
PRESUPUESTOS PARCIALES.....	66
PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL.....	68

INTRODUCCIÓN

En este documento se exponen los resultados obtenidos tras realizar los cálculos pertinentes que corresponden al presupuesto del proyecto, cuya finalidad es analizar la viabilidad económica de este. El presupuesto que se presenta a continuación está dividido en capítulos que corresponden con los diferentes apartados planteados en el punto de “materiales y métodos” del documento memoria. Además, los recursos se han clasificados en cuatro grupos básicos: mano de obra, materiales, maquinaria y equipos de protección individual (EPIs). Tras el cálculo de los recursos de cada grupo se han redactado los cuadros de precios descompuestos y presupuestos parciales. En último lugar, se presenta el presupuesto de ejecución material por contrata y el presupuesto general.

A continuación, se especifican los códigos empleados para referirse a los recursos:

Tabla 1. Aclaración códigos de los recursos.

Código	Descripción
MO.	Mano de Obra
MAT.	Materiales
MAQ.	Maquinaria
EPI.	Equipos de protección individual

CUADRO 1: MANO DE OBRA

A continuación se exponen los costes correspondientes a los diferentes profesionales que han trabajado en el presente proyecto. Cabe aclarar que a pesar de que se ha considerado a la autora del documento como ingeniera biomédica, no ha recibido ninguna retribución económica por el trabajo realizado.

Tabla 2. Cuadro mano de obra.

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio (€)	Cantidad	Precio total (€)
1	MO.1	Horas	Graduada en ingeniería biomédica	12,00	267,50	3.210,00
2	MO.2	Horas	Tutor responsable del proyecto	45,00	45,00	2.025,00
3	MO.3	Horas	Cotutora responsable del proyecto	20,00	79,00	1.580,00
4	MO.4	Horas	Cotutor responsable del proyecto	20,00	127,00	2.540,00
Precio total de la mano de obra						9.355,00

CUADRO 2: MATERIALES

En la siguiente tabla se muestran los costes de los diferentes materiales empleados para el desarrollo del proyecto descrito.

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL
 APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

Tabla 3. Cuadro materiales.

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio (€)	Cantidad	Precio total (€)
1	EPI.01	ud	Bata de laboratorio	23,90	2,00	47,80
2	EPI.02	ud	Caja guantes de latex (100 uds)	5,85	2,00	11,70
3	EPI.03	ud	Caja guantes de nitrilo (100 uds)	41,10	1,00	41,10
4	EPI.04	ud	Máscara para gases	30,60	1,00	30,60
5	MAT.01	ud	Bolsas zip	0,12	12,00	1,44
6	MAT.02	m	Papel de aluminio	0,11	2,00	0,22
7	MAT.03	ud	Placa Petri	1,95	30,00	58,50
8	MAT.04	ud	Pinzas laboratorio	8,99	1,00	8,99
9	MAT.05	ud	Tubos falcon 50mL	0,12	80,00	9,60
10	MAT.06	ud	Tubos falcon 15 mL	0,10	80,00	8,00
11	MAT.07	ud	Puntas de micropipeta 100-1000µL	0,03	300,00	9,00
12	MAT.08	ud	Puntas de micropipeta 2-200µL	0,04	30,00	1,20
13	MAT.09	ud	Puntas de micropipeta 5-20µL	0,01	20,00	0,26
14	MAT.10	ud	Filmogel URGO (3,25mL)	15,41	14,00	215,74
15	MAT.11	mL	Pyrrrole (Py)	0,85	1,20	1,02
16	MAT.12	g	Sodium p-toluenesulfonate (pTS)	0,73	3,20	2,34
17	MAT.13	g	Iron (III) chloride (FeCl ₃)	0,37	7,60	2,81
18	MAT.14	ud	Kit medio de cultivo de células de Schwann	145,00	1,00	145,00
19	MAT.15	ud	Caja Millicell EZ Slide	140,00	2,00	280,00
20	MAT.16	µL	Beta tubulin monoclonal Antibody ALEXA FLUOR 488 Conjugated	3,34	20,00	66,80
21	MAT.17	µL	DAPI	3,43	20,00	68,60
22	MAT.18	ud	Flascon cultivo T75	1,45	12,00	17,40
23	MAT.19	ud	Eppendorf 1mL	0,07	20,00	1,40
24	MAT.20	ud	Micropipeta 100-1000µL	75,00	1,00	75,00
25	MAT.21	ud	Micropipeta 2-200µL	75,00	1,00	75,00
26	MAT.22	ud	Micropipeta 5-20µL	75,00	1,00	75,00
27	MAT.23	m	Fibras de PLA	0,20	104,00	20,80
28	MAT.24	m	Fibras de Oro	5,95	31,20	185,64
29	MAT.25	L	Agua miliQ (agua ultrapura)	0,20	0,20	0,04
30	MAT.26	mL	HEPES (20mL)	1,93	3,60	6,95
31	MAT.27	mL	L-glutamina (20mL)	2,17	1,20	2,60
32	MAT.28	mL	Suplemento N2 (50mL)	18,32	1,20	21,98
33	MAT.29	mL	Penicilina/estreptomicina (P/S)(100mL)	0,36	3,20	1,15
34	MAT.30	ng	NGF (20µg)	0,01	0,12	0,00
35	MAT.31	mL	HAM F12 w/o L-glutamine(500mL)	0,05	360,00	19,44
36	MAT.32	mL	Phosphated buffered saline (PBS)	0,08	80,00	6,08

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

37	MAT.33	mL	Trypsina/EDTA (500mL)	0,09	32,00	2,75
38	MAT.34	L	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-high glucose (Biowest)	40,00	0,16	6,40
39	MAT.35	mL	Suero fetal bovino (FBS)	1,43	100,00	143,00
40	MAT.36	mL	Paraformaldehido (PFA) (200mL)	0,17	48,00	8,16
41	MAT.37	L	Phosphated buffered (PB)	20,31	0,28	5,61
42	MAT.38	mL	Tritón X-100	1,05	4,00	4,20
43	MAT.39	mL	Tween 20 (50mL)	2,96	0,40	1,18
44	MAT.40	L	Etanol (ET0002025) (25L)	9,88	0,28	2,77
45	MAT.41	ud	Huevos pollo E8	0,00	48,00	0,00
46	MAT.42	L	Agua destilada (H2Od)	0,20	6,40	1,28
47	MAT.43	ud	Punta pipeta 25 mL	0,47	16,00	7,52
48	MAT.44	ud	Punta pipeta 5 mL	0,19	20,00	3,80
49	MAT.45	ud	Puntas pipeta 10 mL	0,21	20,00	4,12
50	MAT.46	ud	Células Schwann rata (innoprot) (500000 células)	525,00	8,00	4200,00
Precio total cuadro de materiales						5910,00

CUADRO 3: MAQUINARIA

Para conocer el coste de la maquinaria que ha sido utilizada, se hace uso de la amortización. La amortización permite dar un coste relativo al uso de la máquina en función de su vida útil y del uso dado. Debido a la naturaleza electrónica de la mayoría de recursos empleados, se ha seleccionado como periodo de amortización (Pa) los 10 años que establece la Agencia Tributaria española para equipos electrónicos (*Tabla de Coeficientes de Amortización Lineal. - Agencia Tributaria, n.d.*).

En el cuadro de maquinaria, se ha estimado el coste de cada uno de los quipos mediante la ecuación que se muestra a continuación:

$$A = \frac{C * T_{uso}}{P_a} \quad \text{Ecuación I}$$

Donde A corresponde con la amortización del equipo, C es el coste del equipo, Pa es el periodo amortizado y Tuso es el tiempo que se ha utilizado el equipo.

Tabla 4. Cuadro maquinaria.

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio (€)	Cantidad	Precio total (€)
1	MAQ.01	Horas	Balanza de precisión con pantalla. Mettler Toledo, modelo XS104	0,29	2,00	0,58
2	MAQ.02	Horas	Servicio de microscopia y lupa (IBMCP-UPV)	11,00	10,00	110,00
3	MAQ.03	Horas	Neubauer	0,01	0,40	0,00

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

4	MAQ.04	Horas	Microscopio óptico invertido con cámara integrada	3,44	0,40	1,38
5	MAQ.05	Horas	Centrifugadora Eppendorf, modelo 5804R	3,63	0,40	1,45
6	MAQ.06	Horas	Espectrofotómetro ALPHA FT-IR (Bruker)	4,28	1,00	4,28
7	MAQ.07	Muestras	TGA-SDTA 851/Mettler Toledo (TGA)	70,00	9,00	630,00
8	MAQ.08	Días	Vaivén mini rocker-shaker (biosan)	0,98	192,00	188,16
9	MAQ.09	Horas	Incubador CO2 5% Thermo Fisher Scientific	2,12	960,00	2035,20
10	MAQ.10	Horas	DC power supply HY3003D-3	0,82	387,00	317,34
11	MAQ.11	Horas	Fluke 45 Dual Display Multimeter	1,26	387,00	487,62
12	MAQ.12	Horas	Cabina flujo laminar	0,17	54,00	9,18
13	MAQ.13	Horas	Nevera 4°C	0,63	192,00	120,96
Precio total cuadro de maquinaria						3906,15

CUADRO 4: PRECIOS DESCOMPUESTOS

En el siguiente cuadro se muestran los precios descompuestos; esta tabla ha sido dividida según los capítulos y subcapítulos correspondientes con el procedimiento experimental del presente proyecto y con el objetivo de simplificar el posterior análisis de presupuesto parcial.

Tabla 5. Cuadro precios descompuestos.

Nº	Descripción capítulo					
1. Fabricación carriles PLA-PPy						
1.1	Fibras de PLA	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Fibras de PLA	26,00	m	0,20	5,20	
	Graduada en ing. Biomédica	4,00	Horas	12,00	48,00	
	Costes indirectos	3,00	%	53,20	1,60	
	Recursos auxiliares	3,00	%	54,80	1,64	
Total del capítulo 1.1						56,44
1.2	Recubrimiento con PPy	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Pyrrole (Py)	0,30	mL	0,85	0,26	
	Sodium p-toluenesulfonate (pTS)	0,80	g	0,73	0,58	
	Ion (III) chloride (FeCl3)	1,90	g	0,37	0,70	
	Balanza de precisión	0,50	Horas	0,29	0,15	
	Vaivén	48,00	Horas	0,98	47,04	
	Nevera 4°C	48,00	Horas	0,63	30,24	

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

	Agua destilada	1,60	L	0,20	0,32	
	Graduada en ing. Biomédica	5,00	Horas	12,00	60,00	
	Costes indirectos	3,00	%	79,29	2,38	
	Recursos auxiliares	3,00	%	141,67	4,25	
Total del capítulo 1.2						145,92
2. Montaje del dispositivo con fibras PLA-PPy y oro						
2.1	Montaje del dispositivo	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Caja Millicell EZ Slide	0,50	ud	140,00	70,00	
	Filmogel URGO (3,25mL)	3,50	ud	15,41	53,94	
	Fibras de Oro	7,80	m	5,95	46,41	
	Graduada en ing. Biomédica	3,00	Horas	12,00	36,00	
	Agua miliQ (agua ultrapura)	0,02	L	0,20	0,00	
	Costes indirectos	3,00	%	206,35	6,19	
	Recursos auxiliares	3,00	%	212,54	6,38	
Total capítulo 2.1						218,92
3. Esterilización del dispositivo						
3.1	Proceso de esterilización	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Cabina de flujo laminar	3,00	Horas	0,17	0,51	
	Etanol	0,07	L	9,88	0,69	
	Agua miliQ (agua ultrapura)	0,03	L	0,20	0,01	
	DMEM	0,02	L	40,00	0,92	
	FBS	2,50	mL	1,43	3,58	
	P/S	0,25	mL	0,36	0,09	
	Graduada en ing. Biomédica	3,00	Horas	12,00	36,00	
	Cotutor responsable del proyecto	3,00	Horas	20,00	60,00	
	Costes indirectos	3,00	%	101,79	3,05	
	Recursos auxiliares	3,00	%	104,85	3,15	
Total capítulo 3.1						107,99
4. Cultivo celular						
4.1	Siembra células de Schwann	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Células de Schwann (500000 células)	2,00	ud	525,00	1050,00	
	Kit medio de cultivo de células de Schwann	0,40	ud	145,00	58,00	
	Centrifugadora Eppendorf, modelo 5804R	0,10	Horas	3,63	0,36	
	Neubauer	0,10	Horas	0,01	0,00	
	Microscopio óptico invertido con cámara integrada	0,10	Horas	3,44	0,34	

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

	Cabina de flujo laminar	2,00	Horas	0,17	0,34	
	Incubador CO2 5% Thermo Fisher Scientific	96,00	Horas	2,12	203,52	
	FBS	22,50	mL	1,43	32,18	
	DMEM	0,02	L	40,00	0,92	
	P/S	0,25		0,36	0,09	
	Try/EDTA	8,00	mL	0,09	0,72	
	PBS	20,00	mL	0,08	1,60	
	Graduada en ing. Biomédica	2,00	Horas	12,00	24,00	
	Cotutora responsable del proyecto	2,00	Horas	20,00	40,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1412,07	42,36	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1454,44	43,63	
Total capítulo 4.1						1498,07
4.2	Siembra DRG de pollo	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Huevos pollo E8	12,00	ud	0,00	0,00	
	HAM F12	90,00	mL	0,05	4,50	
	HEPES	0,90	mL	1,93	1,74	
	Suplemento N2	0,30	mL	18,32	5,50	
	P/S	0,30	mL	0,36	0,11	
	NGF	0,03	ng	0,01	0,00	
	L-glutamina	0,30	mL	2,17	0,65	
	Cabina de flujo laminar	8,00	Horas	0,17	1,36	
	Incubador CO2 5% Thermo Fisher Scientific	48,00	Horas	2,12	101,76	
	Graduada en ing. Biomédica	8,00	Horas	12,00	96,00	
	Cotutor responsable del proyecto	8,00	Horas	20,00	160,00	
	Costes indirectos	3,00	%	371,61	11,148 369	
	Recursos auxiliares	3,00	%	382,76	11,482 8201	
Total capítulo 4.2						394,24
5. Estimulación eléctrica						
5.1	Estimulación eléctrica del dispositivo	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	DC power supply HY3003D-3	96,00	Horas	0,82	78,72	
	Fluke 45 Dual Display Multimeter	96,00	Horas	1,26	120,96	
	Cabina flujo laminar	0,50	Horas	0,17	0,09	
	Incubador CO2 5% Thermo Fisher Scientific	96,00	Horas	2,12	203,52	
	Graduada en ing. Biomédica	0,50	Horas	12,00	6,00	

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL
 APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

	Cotutor responsable del proyecto	0,50	Horas	20,00	10,00	
	Costes indirectos	3,00	%	419,29	12,58	
	Recursos auxiliares	3,00	%	431,86	12,96	
Total capítulo 5.1						444,82
6. Caracterización celular						
6.1	Inmunotinción	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Paraformaldehído (PFA) 4%	12,00	mL	0,17	2,04	
	Phosphated buffered (PB)	0,07	L	20,31	1,40	
	Tween 20 (50mL)	0,10	mL	2,96	0,30	
	Triton X-100	1,00	mL	1,05	1,05	
	Beta tubulin monoclonal Antibody ALEXA FLUOR 488 Conjugated	5,00	µL	3,34	16,70	
	DAPI	5,00	µL	3,43	17,15	
	Servicio de microscopia y lupa (IBMCP-UPV)	2,50	Horas	11,00	27,50	
	Graduada en ing. Biomédica	3,50	Horas	12,00	42,00	
	Cotutora responsable del proyecto	1,00	Horas	20,00	20,00	
	Cotutor responsable del proyecto	5,00	Horas	20,00	100,00	
	Costes indirectos	3,00	%	38,64	1,16	
	Recursos auxiliares	3,00	%	229,30	6,88	
Total capítulo 6.1						236,18
7. Caracterización propiedades de los materiales						
7.1	Análisis termogravimétrico (TGA)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	TGA-SDTA 851/Mettler Toledo (TGA)	9,00	Muestras	70,00	630,00	
	Graduada en ing. Biomédica	2,00	Horas	12,00	24,00	
	Cotutor responsable del proyecto	2,00	Horas	20,00	40,00	
	Cotutora responsable del proyecto	2,00	Horas	20,00	40,00	
	Costes indirectos	3,00	%	734,00	22,02	
	Recursos auxiliares	3,00	%	756,02	22,68	
Total capítulo 7.1						778,70
7.2	FTIR	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Espectrofotómetro ALPHA FT-IR (Bruker)	1,00	Horas	4,28	4,28	

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

	Graduada en ing. Biomédica	1,50	Horas	12,00	18,00	
	Cotutor responsable del proyecto	1,00	Horas	20,00	20,00	
	Costes indirectos	3,00	%	42,28	1,27	
	Recursos auxiliares	3,00	%	43,55	1,31	
Total capítulo 7.1						44,85
7.2	Medidas de conductividad	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	DC power supply HY3003D-3	3,00	Horas	0,82	2,46	
	Fluke 45 Dual Display Multimeter	3,00	Horas	1,26	3,78	
	Graduada en ing. Biomédica	3	Horas	12	36	
	Costes indirectos	3	%	42,24	1,2672	
	Recursos auxiliares	3	%	43,51	1,3052 16	
Total capítulo 7.2						44,81
8. Costes informática						
8.1	Software	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Matlab® R2020a Versión estudiante	1,00	Licencia	69,00	69,00	
	Graph Pad Prism 9	3,00	Licencia	13,50	40,50	
	Microsoft Office 365 Personal	1,00	Licencia	69,00	69,00	
	Fiji ImageJ	1,00	Licencia	0,00	0,00	
	Costes indirectos	3,00	%	178,50	5,36	
	Recursos auxiliares	3,00	%	183,86	5,52	
Total capítulo 8.1						189,37
9. Equipos de protección individual y seguridad						
9.1	EPIs (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por ud (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Bata de laboratorio	2,00	ud	23,90	47,80	
	Máscara de gases	1,00	ud	30,60	30,60	
	Caja de guantes de látex (100 uds)	2,00	ud	5,85	11,70	
	Caja de guantes de nitrilo (100 uds)	1,00	ud	41,10	41,10	
	Costes indirectos	3,00	%	131,20	3,94	
Total capítulo 9.1						135,14
10. Material inventariable/fungible						
10.1	Material inventariable/fungible	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Micropipeta 100-1000µL	1,00	ud	75,00	75,00	

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

	Micropipeta 2-200µL	1,00	ud	75,00	75,00	
	Micropipeta 5-20µL	1,00	ud	75,00	75,00	
	Puntas de micropipeta 100-1000µL	300,00	ud	0,03	9,00	
	Puntas de micropipeta 2-200µL	30,00	ud	0,04	1,20	
	Puntas de micropipeta 5-20µL	20,00	ud	0,01	0,20	
	Punta pipeta 25 mL	16,00	ud	0,47	7,52	
	Punta pipeta 5 mL	20,00	ud	0,19	3,80	
	Puntas pipeta 10 mL	20,00	ud	0,21	4,20	
	Pinzas laboratorio	1,00	ud	8,99	8,99	
	Tubo falcon 50 mL	80,00	ud	0,12	9,60	
	Tubo falcon 15 mL	80,00	ud	0,10	8,00	
	Eppendorf 1 mL	20,00	ud	0,07	1,40	
	Placa petri	30,00	ud	1,95	58,50	
	Papel de aluminio	2,00	m	0,11	0,22	
	Bolsas zip	12,00	ud	0,12	1,44	
	Flascon cultivo T75	12,00	ud	1,45	17,40	
	Costes indirectos	3,00	%	356,47	10,69	
Total del capítulo 10.1						367,16
11. Reuniones del proyecto						
11.1	Reuniones de planificación	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Graduada en ing. Biomédica	25,00	Horas	12,00	300,00	
	Tutor responsable del proyecto	30,00	Horas	45,00	1.350,00	
	Cotutor responsable del proyecto	35,00	Horas	20,00	700,00	
	Cotutora responsable del proyecto	35,00	Horas	20,00	700,00	
	Costes indirectos	3,00	%	2.350,00	70,50	
	Recursos auxiliares	3,00	%	2.420,50	72,62	
Total del capítulo 11.1						3.193,12
11.2	Reuniones de resultados	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Graduada en ing. Biomédica	25,00	Horas	12,00	300,00	
	Tutor responsable del proyecto	15,00	Horas	45,00	675,00	
	Cotutor responsable del proyecto	25,00	Horas	20,00	500,00	
	Cotutora responsable del proyecto	30,00	Horas	20,00	600,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1.575,00	47,25	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1.622,25	48,67	
Total del capítulo 11.2						2.170,92

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

11.3	Redacción y correcciones	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Graduada en ing. Biomédica	95,00	Horas	12,00	1.080,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1.080,00	32,40	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1.112,40	33,37	
Total del capítulo 11.3						1.145,77

PRESUPUESTOS PARCIALES

La tabla que se muestra en este apartado contiene los presupuestos agrupados por capítulos indicándose también el número de veces que se ha realizado cada subcapítulo, permitiéndonos obtener así el coste total del proyecto desglosado por capítulos.

Tabla 6. Presupuestos parciales.

nº código	Descripción capítulo				
1	1. Fabricación carriles PLA-PPy				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
1.1	Fibras de PLA	ud	4	56,44	225,76
1.2	Recubrimiento con PPy	ud	4	145,92	583,68
Presupuesto parcial del Capítulo 1					809,44
2	2. Montaje del dispositivo con fibras de PLA-PPy y oro				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
2.1	Montaje del dispositivo	ud	4	218,92	875,68
Presupuesto parcial del Capítulo 2					875,68
3	3. Esterilización del dispositivo				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
3.1	Proceso de esterilización	ud	4	107,99	431,96
Presupuesto parcial del Capítulo 3					431,96
4	4. Cultivo celular				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
4.1	Siembra células de Schwann	ud	4	1498,07	5.992,28
4.2	Siembra DRG de pollo	ud	4	394,24	1.576,96
Presupuesto parcial del Capítulo 4					7.569,24
5	5. Estimulación eléctrica				

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL
 APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
5.1	Estimulación eléctrica del dispositivo	ud	4	444,82	1.779,28
Presupuesto parcial del Capítulo 5					1.779,28
6	6. Caracterización celular				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
6.1	Inmunotinción	ud	4	236,18	944,72
Presupuesto parcial del Capítulo 6					944,72
7	7. Caracterización propiedades de los materiales				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
7.1	Análisis termogravimétrico (TGA)	ud	1	778,7	778,70
7.2	FTIR	ud	1	44,85	44,85
7.3	Medidas conductividad	ud	1	44,81	44,81
Presupuesto parcial del Capítulo 7					868,36
8	8. Costes informática				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
8.1	Software	ud	1	189,37	189,37
Presupuesto parcial del Capítulo 8					189,37
9	9. Equipos de protección individual y seguridad				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
9.1	EPIs	ud	1	135,14	135,14
Presupuesto parcial del Capítulo 9					135,14
10	10. Material inventariable/fungible				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
10.1	Material inventariable/fungible	ud	1	367,16	367,16
Presupuesto parcial del Capítulo 10					367,16
11	11. Reuniones del proyecto				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
11.1	Reuniones de planificación	ud	1	3.193,12	3.193,12
11.2	Reuniones de resultados	ud	1	2.170,92	2.170,92

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IN VITRO PARA GUIAR EL CRECIMIENTO AXONAL
 APLICANDO ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA EXTERNA

11.3	Redacción y correcciones	ud	1	1.145,77	1.145,77
Presupuesto parcial del Capítulo 11					6.509,81

PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL

Presupuesto de ejecución material, por contrata y base de licitación

1.	Fabricación carriles PLA	809,44€
2.	Montaje del dispositivo con fibras PLA-PPy y oro	875,68€
3.	Esterilización del dispositivo	431,96€
4.	Cultivo celular	7569,24€
5.	Estimulación eléctrica	1779,28€
6.	Caracterización celular	944,72€
7.	Caracterización propiedades de los materiales	868,36€
8.	Costes informática	189,37€
9.	Equipos de protección individual y seguridad	135,14€
10.	Material inventariable/fungible	367,16€
11.	Reuniones del proyecto	6509,81€
Total:		20.480,16 €

El presupuesto de ejecución material asciende a la cantidad de **VEINTE MIL CUATROCIENTOS OCHENTA EUROS CON DIECISÉIS CÉNTIMOS**

Presupuesto de ejecución material	20.480,16€
Gastos generales (13 %)	2.662,42 €
Beneficio industrial (0%)	23.142,58 €

El presupuesto de ejecución material asciende a la cantidad de **VEINTITRÉS MIL CIENTO CUARENTA Y DOS EUROS CON CINCUENTA Y OCHO CÉNTIMOS**

Presupuesto de ejecución por contrata	23.142,58 €
IVA (21%)	4.859,94 €
Presupuesto base de licitación	28.002,52 €

El presupuesto de base de licitación asciende a la cantidad de **VEINTIOCHO MIL DOS EUROS CON CINCUENTA Y DOS CÉNTIMOS**