



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIERÍA
INDUSTRIAL VALENCIA

TRABAJO FIN DE MASTER EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE DIFERENCIACIÓN 3D BIOIMPRESA EMPLEANDO AGREGADOS CELULARES DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS DEL TEJIDO ADIPOSO

AUTOR: ALEJANDRO LÓPEZ CUQUERELLA

TUTOR: GUILLERMO VILARIÑO FELTRER

COTUTORES: CARMEN ESCOBEDO LUCEA
ANDRÉS SANZ GARCÍA

Curso Académico: 2020-21

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a Guillermo, Carmen y Andrés por haberme guiado durante la realización del Trabajo Fin de Máster. A Guillermo, por las correcciones y los consejos que me ha dado en el proceso de dar forma a esta memoria. A Carmen, por todo lo que me ha enseñado sobre la biología celular, por toda la ayuda prestada en la formación experimental y por las correcciones aportadas en la realización de la memoria. Y a Andrés, por la formación tecnológica que me ha proporcionado, como por las dudas que me ha ido resolviendo.

También quisiera dar las gracias a Néstor, Sara, Andrea e Inma, por todo el apoyo que han supuesto estos meses. Compartir tiempo con ellos, tanto en el laboratorio como en los descansos, ha hecho que la estancia en la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia haya sido muy amena.

Por último, me gustaría dar las gracias a mi familia y a mis amigos, por ese apoyo incondicional que han supuesto y siguen suponiendo en mi vida. Quisiera dedicar este trabajo, con el cual culmino mi etapa académica, a mis padres y a mi hermana, cuyo continuo interés por mi bienestar y formación han favorecido mis logros.

RESUMEN

Las plataformas de cultivo bidimensionales han sido el sistema de cultivo celular *in vitro* por excelencia desde comienzos del siglo XX. No obstante, su incapacidad de reproducir fielmente el ambiente *in vivo* del organismo ha hecho que surjan, en los últimos años, plataformas de cultivo tridimensionales que tienden a biomimetizar mejor el nicho celular. Además, esta tendencia también se ha visto marcada por el creciente interés en la defensa del bienestar animal y en la reducción del uso de modelos animales en la investigación.

El objetivo del presente trabajo ha sido la creación de una plataforma de cultivo celular 3D para llevar a cabo ensayos de diferenciación de células madre mesenquimales. A largo plazo, estos modelos se pretenden utilizar para el estudio de enfermedades, procesos de desarrollo y la evaluación de medicamentos.

Los agregados celulares de la plataforma de cultivo, en forma de esferoides, se han producido mediante 3 técnicas: *hanging drops*, una solución comercial y mediante un sistema de moldes de elaboración propia. El método de *hanging drops* fue descartado debido al bajo número de esferoides producido, así como a su heterogeneidad y a la posibilidad de dar lugar a más de un esferoide por microgota. La solución comercial, en cambio, ha permitido la formación de esferoides homogéneos y proporcionales a la densidad celular sembrada, así como una gran cantidad de esferoides por siembra, lo que aumenta la reproducibilidad y robustez del sistema. El molde diseñado durante la realización de este TFM se ha revelado como un buen sistema alternativo, arrojando resultados similares a la solución comercial en cuanto a la cantidad de esferoides formados por siembra y la homogeneidad entre ellos, pero con un coste económico mucho más reducido.

Los esferoides resultantes fueron mezclados con hidrogel de gelatina-alginato para la fabricación de la biotinta. Mediante la extrusión de esta biotinta con una bioimpresora de extrusión por mecanismo neumático, se consiguió generar la plataforma de cultivo celular 3D. Dicha plataforma ha servido para comenzar a realizar ensayos de diferenciación de células madre mesenquimales que están actualmente en marcha en el laboratorio.

Palabras clave: plataforma de cultivo celular 3D, diferenciación celular, bioimpresión 3D, agregados celulares, esferoides, biotinta, células madre mesenquimales humanas del tejido adiposo

RESUM

Les plataformes de cultiu bidimensionals han sigut el sistema de cultiu cel·lular in vitro per excel·lència des de començaments del segle XX. No obstant això, la seua incapacitat de reproduir fidelment l'ambient in vivo de l'organisme ha fet que sorgisquen, en els últims anys, plataformes de cultiu tridimensionals que tendeixen a biomimetitzar millor el nínxol cel·lular. A més, aquesta tendència també s'ha vist marcada pel creixent interès en la defensa del benestar animal i en la reducció de l'ús de models animals en la investigació.

L'objectiu del present treball ha sigut la creació d'una plataforma de cultiu cel·lular 3D per a dur a terme assajos de diferenciació de cèl·lules mare mesenquimals. A llarg termini, aquests models es pretenen utilitzar per a l'estudi de malalties, processos de desenvolupament i l'avaluació de medicaments.

Els agregats cel·lulars de la plataforma de cultiu, en forma d'esferoides, s'han produït mitjançant 3 tècniques: *hanging drops*, una solució comercial i mitjançant un sistema de motles d'elaboració pròpia. El mètode de *hanging drops* va ser descartat a causa del baix nombre d'esferoides produït, així com a la seua heterogeneïtat i a la possibilitat de donar lloc a més d'un esferoide per microgota. La solució comercial, en canvi, ha permès la formació d'esferoides homogenis i proporcionals a la densitat cel·lular sembrada, així com una gran quantitat d'esferoides per sembra, la qual cosa augmenta la reproductibilitat i robustesa del sistema. El motle dissenyat durant la realització d'aquest TFM, s'ha revelat com un bon sistema alternatiu, llançant resultats similars a la solució comercial quant a la quantitat d'esferoides formats per sembra i l'homogeneïtat entre ells, però amb un cost econòmic molt més reduït.

Els esferoides resultants van ser mesclats amb hidrogel de gelatina-alginat per a la fabricació de la biotinta. Mitjançant l'extrusió d'aquesta biotinta amb una bioimpressora d'extrusió per mecanisme pneumàtic, es va aconseguir generar la plataforma de cultiu cel·lular 3D. Aquesta plataforma ha servit per a començar a realitzar assajos de diferenciació de cèl·lules mare mesenquimals que estan actualment en marxa en el laboratori.

Paraules clau: plataforma de cultiu cel·lular 3D, diferenciació cel·lular, bioimpressió 3D, agregats cel·lulars, esferoides, biotinta, cèl·lules mare mesenquimals humanes del teixit adipós.

ABSTRACT

Two-dimensional culture platforms had been the most used *in vitro* cell culture platform since 20th century beginning. Nevertheless, they do not recreate *in vivo* tissue microenvironment accurately. In order to mimic cell niche more precisely, three-dimensional culture platforms have emerged over the last years. Furthermore, this tendency has grown because of the increasing interest in animal welfare and in the reduction of animal testing when possible.

The main goal of this project has been the development of a cell differentiation 3D platform for human adipose-derived stem cells. In the long-term, these platforms could be used for disease's studies, development processes and drugs assessment.

Cell aggregates, formed as spheroids, were produced using three techniques: *hanging drops*, a commercial product and a self-made molds system. *Hanging drops* method was dismissed due to low spheroids production ratio, low heterogeneity and due to the possibility of forming multiple spheroids in the same microdrop. On the other hand, the commercial solution has allowed the production of homogeneous spheroids proportional to the seeded cell density, as well as a large number of spheroids per seed, increasing the reproducibility and robustness of the system. The designed mold system made during this TFM revealed a great alternative platform for spheroids synthesis. It allowed spheroids formation similar to the ones generated with the commercial device, in terms of homogeneity among spheroids diameters and the production ratio, but with a much lower economic cost.

The fabricated spheroids were mixed with a gelatin-alginate hydrogel in order to produce the bioink. By extruding the bioink with a pneumatic extrusion-based bioprinter, the 3D culture platform was made. This 3D platform allowed the start of human adipose-derived stem cells differentiation assays that are currently being made in the laboratory.

Keywords: 3D cell culture platform, cellular differentiation, 3D bioprinting, cell aggregates, spheroids, bioink, human adipose-derived stem cells

ÍNDICE GENERAL

DOCUMENTOS CONTENIDOS EN EL TFM

- **DOCUMENTO I.** Memoria
- **DOCUMENTO II.** Presupuesto

ÍNDICE DE LA MEMORIA

1. Introducción	1
2. Motivación, justificación y objetivos	21
3. Materiales y métodos	24
4. Resultados y discusión	49
5. Conclusiones	67
6. Líneas futuras	69
7. Bibliografía	70

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1. Introducción	1
2. Mano de obra, materiales y maquinaria	1
3. Precios descompuestos.....	3
4. Presupuestos parciales	9
5. Presupuesto de ejecución material	9

DOCUMENTO I. MEMORIA

ÍNDICE DE LA MEMORIA

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CULTIVOS CELULARES.....	1
1.2. PLATAFORMAS DE CULTIVO CELULAR 3D.....	2
1.2.1. SUPERFICIES DE ULTRABAJA ADHERENCIA	2
1.2.2. INSERTOS DE CULTIVO CELULAR.....	3
1.2.3. SCAFFOLDS POROSOS.....	4
1.2.4. SCAFFOLDS FIBROSOS	4
1.2.5. SISTEMAS MICROFLUÍDICOS	5
1.3. BIOIMPRESIÓN 3D	6
1.3.1. BIOIMPRESIÓN POR INYECCIÓN DE TINTA.....	7
1.3.2. BIOIMPRESIÓN POR EXTRUSIÓN.....	8
1.3.3. BIOIMPRESIÓN ASISTIDA POR LÁSER	8
1.3.4. BIOIMPRESIÓN POR ESTEREOLITOGRAFÍA.....	9
1.4. BIOTINTAS	10
1.4.1. HIDROGELES.....	10
1.4.2. MICROCARRIERS.....	13
1.4.3. AGREGADOS CELULARES.....	14
1.4.4. COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA.....	16
1.5. CÉLULAS MADRE.....	17
1.5.1. DESARROLLO, FORMACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE	17
1.5.2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y TEJIDO ADIPOSO.....	19
CAPÍTULO 2. MOTIVACIÓN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	21
2.1. MOTIVACIÓN.....	21
2.2. JUSTIFICACIÓN.....	21
2.3. OBJETIVOS	22
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
MATERIALES.....	24
3.1. SOLIDWORKS	24
3.2. BIOIMPRESORA 3D	26
3.3. REPETIER-HOST.....	28
MÉTODOS.....	29
3.4. PREPARACIÓN MEDIO DE CULTIVO PARA HASC	29
3.5. DESCONGELACIÓN Y SIEMBRA CELULAR.....	30
3.6. CAMBIO DEL MEDIO DE CULTIVO CELULAR.....	30
3.7. PASE CELULAR.....	30
3.8. CONGELACIÓN CELULAR.....	31
3.9. RECUENTO CELULAR.....	31

3.10. FORMACIÓN ESFEROIDES.....	32
3.10.1. HANGING DROPS.....	32
3.10.2. AGGREWELL 800	33
3.10.3. MOLDES PROPIOS.....	35
3.11. PREPARACIÓN DE LA BIOTINTA GELATINA-ALGINATO	38
3.12. CONFIGURACIÓN DE BIOIMPRESIÓN	39
3.13. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	40
3.13.1. EXTRACCIÓN ARN.....	40
3.13.2. OBTENCIÓN ADN COMPLEMENTARIO	41
3.13.3. PCR CUANTITATIVA	42
3.14. TINCIÓN CÉLULAS VIVAS/MUERTAS	42
3.15. CRIOCORTES DE ESFEROIDES.....	43
3.16. PREPARACIÓN DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	44
3.17. ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.....	44
3.17.1. ANÁLISIS IMÁGENES.....	44
3.17.2. PROCESAMIENTO IMÁGENES.....	45
3.18. MANTENIMIENTO DE LA ASEPSIA.....	46
3.18.1. SALA BLANCA.....	46
3.18.2. CABINA FLUJO LAMINAR.....	47
3.18.3. AUTOCLAVADO.....	47
3.19. GESTIÓN DE LOS RESIDUOS	48
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.1. MODELOS SOLIDWORKS.....	49
4.2. FORMACIÓN ESFEROIDES.....	51
4.2.1. HANGING DROPS.....	51
4.2.2. AGGREWELL™ 800.....	53
4.2.3. MOLDES DE ELABORACIÓN PROPIA.....	53
4.2.4. COMPARATIVA DE LOS TRES MODELOS.....	54
4.3. SELECCIÓN TAMAÑO ÓPTIMO DE ESFEROIDE PARA BIOIMPRESIÓN	56
4.3.1. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR EMPLEANDO ALAMAR BLUE	57
4.3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	57
4.4. VALIDACIÓN CALIDAD CELULAR PARA BIOIMPRESIÓN	60
4.5. BIOIMPRESIÓN	61
4.5.1. SCRIPTS.....	61
4.5.2. PLATAFORMA BIOIMPRESA.....	63
4.6. VIABILIDAD CELULAR TRAS LA BIOIMPRESIÓN	65
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	67
CAPÍTULO 6. LÍNEAS FUTURAS	69
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. SUPERFICIES DE CULTIVO DE ULTRABAJA ADHERENCIA, CON FONDO REDONDEADO (ARRIBA) Y PLANO (ABAJO). MODIFICADO DE (BU ET AL., 2020).....	3
FIGURA 2. INSERTOS DE CULTIVO CELULAR. MODIFICADO DE (KURODA ET AL., 2015; AGARWAL ET AL., 2021). .	3
FIGURA 3. ESQUEMA DE CREACIÓN DE UN SCAFFOLD POROSO MEDIANTE LIOFILIZACIÓN. MODIFICADO DE (DEL AGUA ET AL., 2018).	4
FIGURA 4. MATRIZ EXTRACELULAR NATURAL (A-B), MATRIZ EXTRACELULAR OBTENIDA POR ELECTROSPINNING (C-D), Y COMPONENTES DE UN SISTEMA DE ELECTROSPINNING (DERECHA). MODIFICADO DE (JUN ET AL., 2018; TAN Y ZHOU, 2019).....	5
FIGURA 5. SISTEMA MICROFLUÍDICO VISTO DESDE ARRIBA (IZQUIERDA) Y EN SECCIÓN TRANSVERSAL (DERECHA). CREADO CON BIORENDER Y MODIFICADO DE (WANG ET AL., 2015).	6
FIGURA 6. TIPOS DE BIOIMPRESIÓN 3D Y SUS MECANISMOS.	6
FIGURA 7. MECANISMOS DE BIOIMPRESIÓN 3D POR INYECCIÓN. MODIFICADO DE (MALDA ET AL., 2013).	7
FIGURA 8. MECANISMOS DE BIOIMPRESIÓN 3D POR EXTRUSIÓN. MODIFICADO DE (MALDA ET AL., 2013).....	8
FIGURA 9. MECANISMO DE BIOIMPRESIÓN ASISTIDA POR LÁSER. MODIFICADO DE (DABABNEH & OZBOLAT, 2014).....	9
FIGURA 10. BIOIMPRESIÓN 3D POR ESTEREOLITOGRAFÍA CON PLATAFORMA DE FABRICACIÓN DESCENDENTE (IZQUIERDA) Y ASCENDENTE (DERECHA). MODIFICADO DE (BILLIET ET AL., 2012).....	10
FIGURA 11. CLASIFICACIÓN DE LOS HIDROGELES SEGÚN SU ORIGEN.....	11
FIGURA 12. UNIDADES ESTRUCTURALES DEL ALGINATO. MODIFICADO DE (AXPE Y OYEN, 2016).	12
FIGURA 13. BIOTINTA CON MICROCARRIERS. MODIFICADO DE (OZBOLAT, 2017).	14
FIGURA 14. PANEL CON LOS DIFERENTES TIPOS DE AGREGADOS CELULARES. EN LA IMAGEN A SE MUESTRA UNA IMAGEN SEM DE UN ESFEROIDE CELULAR Y EN LA B SE MUESTRA LA DEPOSICIÓN DE ESFEROIDES A TRAVÉS DE UNA JERINGUILLA. LA IMAGEN C SE CORRESPONDE CON UNA JERINGUILLA CARGADA DE PELLET CELULAR Y LA D CON UNA HEBRA CELULAR. MODIFICADO DE (HOSPODIUK ET AL., 2017).	15
FIGURA 15. FLUJO DE TRABAJO PARA LA PRODUCCIÓN DE DECM. DEL CORAZÓN PORCINO (A) SE EXTRAE UNA MUESTRA DE TRABAJO (B). LA MUESTRA ES DESCELULARIZADA MEDIANTE DETERGENTES (C), ES LIOFILIZADA (D) Y SOMETIDA A UN PROCESO DE DIGESTIÓN (E) PARA OBTENER LA BIOTINTA EN ESTADO GEL Y EN SOLUCIÓN (F). MODIFICADO DE (DAS ET AL., 2019).	16
FIGURA 16. ETAPAS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO TRAS LA FECUNDACIÓN. DIVISIÓN CELULAR DESDE CIGOTO A BLASTOCISTO (A), Y FENÓMENO DE GASTRULACIÓN (B). CREADO CON BIORENDER Y MODIFICADO DE (WIKIMEDIA COMMONS, 2020).	18

FIGURA 17. IMAGEN DE MICROSCOPÍA ÓPTICA DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO (IZQUIERDA) Y DEL TEJIDO ADIPOSO PARDO (DERECHA). MODIFICADO DE (ESTEVE RÀFOLS, 2014).	20
FIGURA 18. INTERFAZ DE SOLIDWORKS	24
FIGURA 19. VENTANA DE CROQUIS (A), Y DE OPERACIONES (B) EN SOLIDWORKS.	25
FIGURA 20. ESQUEMA DE FAB@HOME ORIGINAL (IZQUIERDA) Y FAB@HOME MODIFICADA PARA BIOIMPRESIÓN (DERECHA).	26
FIGURA 21. CONEXIONES DE LOS COMPONENTES A LA ELECTRÓNICA DE LA BIOIMPRESORA.	27
FIGURA 22. INTERFAZ DE REPETIER-HOST.....	28
FIGURA 23. SISTEMA DE ESTERILIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.	29
ECUACIÓN 1. RECUENTO CELULAR CON CÁMARA DE NEUBAUER.	31
FIGURA 24. CÁMARA DE NEUBAUER CARGADA CON UNA MUESTRA (IZQUIERDA) Y PATRÓN DE LA CÁMARA (DERECHA).	32
FIGURA 25. SISTEMA PARA LA FORMACIÓN DE ESFEROIDES MEDIANTE <i>HANGING DROPS</i>	33
FIGURA 26. ESTRUCTURA DE LA PLACA DE AGGREWELL PARA LA FORMACIÓN DE ESFEROIDES. CADA POCILLO ESTÁ FORMADO POR MULTITUD DE MICROPOCILLOS DE FORMA PIRAMIDAL DONDE SE FORMAN LOS ESFEROIDES.	33
ECUACIÓN 2. ESTIMACIÓN CELULAR POR POCILLO SEGÚN DENSIDAD CELULAR DE ESFEROIDE.	34
ECUACIÓN 3. ESTIMACIÓN NÚMERO TOTAL DE ESFEROIDES POR POCILLO SEMBRADO.	35
FIGURA 27. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE LOS MOLDES CAD.....	35
FIGURA 28. IMPRESORA 3D PRUSA I3 MK3S UTILIZADA PARA EL PROTOTIPADO, JUNTO CON EL VISUALIZADOR DEL PROGRAMA DE LAMINADO PRUSASLICER.	36
FIGURA 29. SISTEMA DE VACÍO UTILIZADO PARA LA PRODUCCIÓN DE LOS MOLDES DE PDMS (A), JUNTO CON LOS PASOS DE LLENADO DE LOS MOLDES (B), ELIMINACIÓN DEL AIRE (C) Y CURADO POR CALOR (D).	37
FIGURA 30. MONTAJE DE LOS MOLDES DE PDMS SOBRE LA PLACA DE VIDRIO.....	38
FIGURA 31. BIOTINTA DE GELATINA - ALGINATO CON ESFEROIDES CELULARES EN SUSPENSIÓN. CREADO CON BIORENDER.	39
FIGURA 32. BIOIMPRESORA EN MODO ENFRIAMIENTO (A) Y EN MODO CALENTAMIENTO (B), VISTO DESDE LA VENTANA DE CURVE TEMPERATURE DE REPETIER-HOST. NÓTESE QUE LA LÍNEA AZUL SE CORRESPONDE CON LA TEMPERATURA AMBIENTE Y LA LÍNEA ROJA CON LA TEMPERATURA EN EL CABEZAL DE BIOIMPRESIÓN.....	40
FIGURA 33. MECANISMO DE FUNCIONAMIENTO DEL ENSAYO DE CÉLULAS VIVAS/MUERTAS.	43
FIGURA 34. INTERFAZ DE IMAGEJ. LA BARRA DE HERRAMIENTAS (ARRIBA), IMAGEN CARGADA EN EL PROGRAMA (IZQUIERDA) JUNTO CON LA HERRAMIENTA DE LÍNEA, EN AMARILLO, SIENDO UTILIZADA Y EL PANEL DE RESULTADOS (DERECHA)	45
FIGURA 35. CONVERSIÓN DE PÍXELES A MICRÓMETROS EN IMAGEJ.	45
FIGURA 36. MONTAJE DE LAS DOS IMÁGENES EN ESCALA DE GRISES A SUPERPONER, JUNTO CON LA IMAGEN SUPERPUESTA A COLOR.	46
FIGURA 37. SISTEMAS DE MANTENIMIENTO DE LA ASEPSIA. ENTRADA A UNA SALA BLANCA (A), AUTOCLAVE (B) Y CABINA DE FLUJO LAMINAR (C).....	47

FIGURA 38. MODELOS INICIALES DE SOLIDWORKS.....	50
FIGURA 39. MODELO DEFINITIVO PARA LA CREACIÓN DEL MOLDE DEL PATRÓN CIRCULAR DE PDMS, EN SOLIDWORKS (IZQUIERDA) Y YA FABRICADO (DERECHA). EL ELEMENTO CENTRAL CUENTA CON LAS MICROCAVIDADES DE FORMA PIRAMIDAL EN UNO DE SUS EXTREMOS Y EN EL OTRO, UN CONDUCTO POR DONDE INTRODUCIR UN HILO Y ASÍ AJUSTAR ESTE ELEMENTO CON EL ANILLO CÓNICO EXTERIOR.	50
FIGURA 40. MOLDE DEL ANILLO EXTERNO DE PDMS EN SOLIDWORKS (IZQUIERDA) Y MOLDE DEFINITIVO YA FABRICADO (DERECHA).	51
FIGURA 41. MUESTRA DE ALGUNOS ESFEROIDES FORMADOS POR EL MÉTODO DE LOS <i>HANGING DROPS</i>	52
FIGURA 42. ESFEROIDE DENTRO DE UNA MICROCAVIDAD DE LA PLACA DE AGGREWELL (IZQUIERDA) Y CONJUNTO DE ESFEROIDES RECOLECTADOS DE UN POCILLO DE LA PLACA DE AGGREWELL (DERECHA). BARRAS DE ESCALA: AMBAS 100 μ M.	53
FIGURA 43. MOLDE DE AGAROSA PRODUCIDO A PARTIR DE MOLDES DE PDMS (IZQUIERDA) Y MOLDES DE AGAROSA ENCAJADOS PERFECTAMENTE EN UNA PLACA DE 12 POCILLOS (DERECHA).....	54
FIGURA 44. MOLDE DE AGAROSA ANTES DE LA SIEMBRA (A) Y TRAS LA FORMACIÓN DE ESFEROIDES (B).	54
FIGURA 45. FORMACIÓN DE ESFEROIDES MEDIANTE EL MÉTODO DE <i>HANGING DROPS</i> AL QUINTO DÍA (A-C) Y MEDIANTE LA SOLUCIÓN COMERCIAL A LAS 48 HORAS (D-E). LA SOLUCIÓN COMERCIAL SE CORRESPONDE CON DENSIDADES CELULARES DE 1000 (D) Y 2000 (E). BARRA DE ESCALA (D-E): 200 μ M.....	55
FIGURA 46. COMPARATIVA DE LOS DIÁMETROS DE LOS ESFEROIDES FORMADOS POR LA SOLUCIÓN COMERCIAL Y CON LOS MOLDES DE AGAROSA (A), E IMÁGENES DE MICROSCOPÍA DE ESFEROIDES FORMADOS CON LA SOLUCIÓN COMERCIAL (B) Y CON LOS MOLDES DE AGAROSA (C).EL NÚMERO DE MUESTRAS TOMADAS ES DE N=20 Y N=16, PARA LA SOLUCIÓN COMERCIAL Y LA SOLUCIÓN DE AGAROSA, RESPECTIVAMENTE. BARRA DE ESCALA (B-C): 200 μ M.	56
FIGURA 47. DIÁMETRO DE LOS ESFEROIDES EN FUNCIÓN DE SU DENSIDAD CELULAR. EN ORDEN CRECIENTE DE DIÁMETROS, EL NÚMERO DE MUESTRAS TOMADAS FUE N=20, N=13, N=17 Y N=15.	56
FIGURA 48. REDUCCIÓN DE RESARZURINA EN LOS ESFEROIDES CELULARES. EL NÚMERO DE MUESTRAS PARA TODAS LAS CONDICIONES ES N=9.	57
FIGURA 49. PROLIFERACIÓN CELULAR EN ESFEROIDES DE 1000, 2000, 2500 Y 3000 CÉLULAS. LAS FLECHAS MUESTRAN, EN CADA CONDICIÓN, CÉLULAS MARCADAS CON KI-67, ES DECIR, CÉLULAS QUE ESTÁN PROLIFERANDO.....	58
FIGURA 50. FORMACIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR EN LOS ESFEROIDES.	59
FIGURA 51. ESPECTROFOTÓMETRO UTILIZADO JUNTO CON LOS VALORES DE EXTRACCIÓN DEL ARN PARA ESFEROIDES DE DENSIDAD CELULAR 1000 (1-3), 2500 (4) Y 3000 (5).....	60
FIGURA 52. SCRIPT DE POSICIONAMIENTO DEL CABEZAL.	61
FIGURA 53. SCRIPT DE PURGA DE LA BIOTINTA.	62
FIGURA 54. SCRIPT DEL PATRÓN DE BIOIMPRESIÓN JUNTO CON LOS PRINCIPALES DESPLAZAMIENTOS: IR AL PUNTO DE INICIO DE LA BIOIMPRESIÓN, REALIZAR LAS LÍNEAS HORIZONTALES Y REALIZAR LAS LÍNEAS VERTICALES.....	63
FIGURA 55. ESTRUCTURA BIOIMPRESA CON LA BIOTINTA DE CÉLULAS SIN FORMAR AGREGADOS CELULARES. LAS ZONAS SOMBRADAS SE CORRESPONDEN CON LA PARTE LÍMITE DE LA BIOTINTA CON LA SUPERFICIE DEL PLATO DE BIOIMPRESIÓN. DESDE ESA ZONA SOMBRADA HACIA EL INTERIOR, SE APRECIAN GRAN CANTIDAD	

DE PEQUEÑAS FORMAS CORRESPONDIENTES CON LAS CÉLULAS PRESENTES EN EL INTERIOR DE LA GELATINA-ALGINATO.	64
FIGURA 56. ESTRUCTURA BIOIMPRESA CON AGREGADOS CELULARES EN FORMA DE ESFEROIDES.	64
FIGURA 57. REJILLA CUADRADA DE 3X3 BIOIMPRESA (A), DETALLE DE BIOIMPRESIÓN CON CÉLULAS SIN FORMAR AGREGADOS CELULARES (B) Y CON LOS ESFEROIDES OBTENIDOS (C).....	65
FIGURA 58. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR UTILIZANDO TINCIÓN LIVE (A) - DEAD (B), Y TINCIÓN CON HOECHST 33342 (C).	66

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA HASC.....	29
TABLA 2. REACTIVOS NECESARIOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE AGAROSA.	37
TABLA 3. REACTIVOS, JUNTO CON SUS CANTIDADES, PARA FORMACIÓN DE LA MEZCLA MAESTRA.	41
TABLA 4. PROGRAMA DE TEMPERATURA PARA LA SÍNTESIS DE ADNC.	42

ÍNDICE DE ECUACIONES

ECUACIÓN 1. RECUENTO CELULAR CON CÁMARA DE NEUBAUER.....	32
ECUACIÓN 2. ESTIMACIÓN CELULAR SEGÚN DENSIDAD DE ESFEROIDE.....	34
ECUACIÓN 3. ESTIMACIÓN NÚMERO TOTAL DE ESFEROIDES POR POCILLO SEMBRADO.....	35

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADNc – Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN – Ácido ribonucleico

CAD – Diseño asistido por ordenador (siglas del inglés *Computer-Aided Design*)

CAM – Fabricación asistida por ordenador (siglas del inglés *Computer-Aided Manufacturing*)

dECM – Matriz extracelular descelularizada (siglas del inglés *decellularized ExtraCellular Matrix*)

DMSO – Dimetilsulfóxido

ECM – Matriz extracelular (siglas del inglés *ExtraCellular Matrix*)

FBS – Suero fetal bovino (siglas del inglés *Fetal Bovine Serum*)

hASC – Células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (siglas del inglés *human Adipose-derived Stem Cell*)

IPA – Isopropanol o alcohol isopropílico (siglas del inglés *IsoPropyl Alcohol*)

mL – Mililitro

μL - Microlitro

NaCl – Cloruro sódico

PBS – Tampón fosfato salino (siglas del inglés *Phosphate Buffered Saline*)

PDMS – Polidimetilsiloxano

PFA – Paraformaldehído

r.c.f. – Fuerza centrífuga relativa o fuerza G (siglas del inglés *Relative Centrifugal Force*)

r.p.m. – Revoluciones por minuto

SDS – Sodio dodecil sulfato

T25 – Matraces de cultivo celular con una superficie de 25cm²

T75 – Matraces de cultivo celular con una superficie de 75cm²

% v/v – Porcentaje volumen volumen

% w/v – Porcentaje peso volumen

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. CULTIVOS CELULARES

Los cultivos celulares consisten en la extracción de células de un animal o una planta y su crecimiento en un ambiente artificial favorable (ECACC, s.f.; Thermo Fisher Scientific, s.f.). Estos cultivos se denominan primarios cuando se obtienen directamente de un tejido y proliferan hasta ocupar la superficie de cultivo, fenómeno conocido como confluencia celular. Alcanzada la confluencia, las células necesitan subcultivarse para poder seguir creciendo. Tras este subcultivo, las células del cultivo primario pasan a denominarse línea celular.

Los cultivos de células son indispensables para una gran variedad de aplicaciones que van desde la investigación al uso industrial (Ravi et al., 2015). Desde que en 1953 Gey estableciera la primera línea celular a partir de células obtenidas de una biopsia a Henrietta Lacks (Skloot, 2010), el número de líneas celulares es cada vez mayor gracias a los avances científicos. Las plataformas de cultivo en 2D, donde se siembra una monocapa de células en un sustrato plano, ha sido el método utilizado por excelencia para la investigación desde comienzos del siglo XX (Ferreira et al., 2018). Pese a ser un método fácil, con buena relación coste-efectividad y estar ampliamente extendido, presenta ciertas limitaciones significativas. Una de las principales limitaciones es que los sistemas de cultivo bidimensionales no mimetizan el ambiente tridimensional en el que se encuentran las células *in vivo*. Esto puede conllevar un comportamiento celular distinto al que realmente se da en el interior del cuerpo (Chaicharoenaudomrung et al., 2019).

En el ámbito de la evaluación de la efectividad y seguridad de los medicamentos, primero se realizan las investigaciones preclínicas *in vitro* y cuando estas son satisfactorias, se pasan a modelos en animales. Finalmente, si los modelos en animales tienen éxito, se pasa a probar el medicamento en ensayos clínicos en personas. Conforme se pasa del nivel de ensayos *in vitro* al de ensayos en animales, y de este a los ensayos clínicos, las tasas de éxito del fármaco a probar se van reduciendo. Una de las posibles causas de estos fallos, como se comentaba anteriormente, es la diferencia entre la estructura conseguida en estos sistemas de cultivo 2D y las estructura 3D que se da *in vivo*. El deterioro en el descubrimiento de nuevos medicamentos está motivando un cambio de paradigma a nivel preclínico, pasando de los cultivos monocapa tradicionales a plataformas de cultivo 3D (Boutin et al., 2018). Por ello, es necesario el desarrollo de plataformas de cultivo 3D que proporcionen un entorno más adecuado a las células que tenga en cuenta las interacciones célula-célula y las interacciones de las células con la matriz extracelular. Los sistemas de cultivo 3D permiten biomimetizar ciertas características cruciales como son morfología, diferenciación, polaridad, tasa de proliferación, expresión génica y perfil genómico.

El uso de estas plataformas amplía el espectro entre los cultivos 2D y los modelos animales (Koledova, 2017). Esto cobra gran importancia ya que la Agencia Europea del Medicamento (EMA) apoya la implantación del principio de las 3 R para el uso ético de animales para pruebas científicas en la Unión Europea (UE). Además, la Directiva 2010/63/UE hace de obligatorio cumplimiento que las empresas encargadas del desarrollo, fabricación y prueba de medicamentos apliquen el principio de las 3 R (A.E.M.P.S., 2021). Dicho principio implica:

- **Reemplazar** el uso de animales por métodos que no requieran uso animal, siempre que sea posible.
- **Reducir** al mínimo el número de animales utilizados de tal forma que ese número permita obtener resultados científicos válidos.
- **Refinar** las técnicas para minimizar el estrés y mejorar el bienestar de los animales de estudio utilizados.

1.2. PLATAFORMAS DE CULTIVO CELULAR 3D

El interés en el cambio de paradigma de cultivos bidimensionales a tridimensionales ha dado como resultado la aparición de una gran diversidad de plataformas de cultivo celular 3D basándose en diferentes tecnologías para su fabricación. Las plataformas más destacables son:

- Superficies de ultrabaja adherencia
- Insertos de cultivo
- *Scaffolds* porosos y *scaffolds* fibrosos
- Sistemas microfluídicos
- Bioimpresión 3D

Esta última será introducida en mayor profundidad que el resto de las plataformas de cultivo tridimensional dado que es la elegida para el desarrollo de este trabajo.

1.2.1. SUPERFICIES DE ULTRABAJA ADHERENCIA

Las superficies de ultrabaja adherencia están hechas generalmente de poliestireno y son tratadas con un recubrimiento polimérico, no citotóxico, que se une covalentemente a la superficie. Estos recubrimientos evitan la adhesión de las células a la superficie, favoreciendo su unión y formando agregados celulares tridimensionales. Este tipo de plataformas se pueden encontrar tanto comercialmente como realizarse en el laboratorio. En el estudio realizado por Gao et al. (2018), se obtuvieron superficies de ultra baja adherencia de forma económica a partir de geles de agarosa. En el estudio se demuestra que concentraciones de agarosa superiores a 0,3% son necesarias para que las células sembradas no se adhieran al propio gel y así puedan formar agregados celulares tridimensionales. En la Figura 1 se muestran dos superficies de cultivo celular de ultrabaja adherencia, tanto con fondo redondeado como plano. En ambos casos, se aprecia que, transcurrido un tiempo de la siembra celular, al ser la superficie de muy baja adherencia, las células tienden a agruparse.

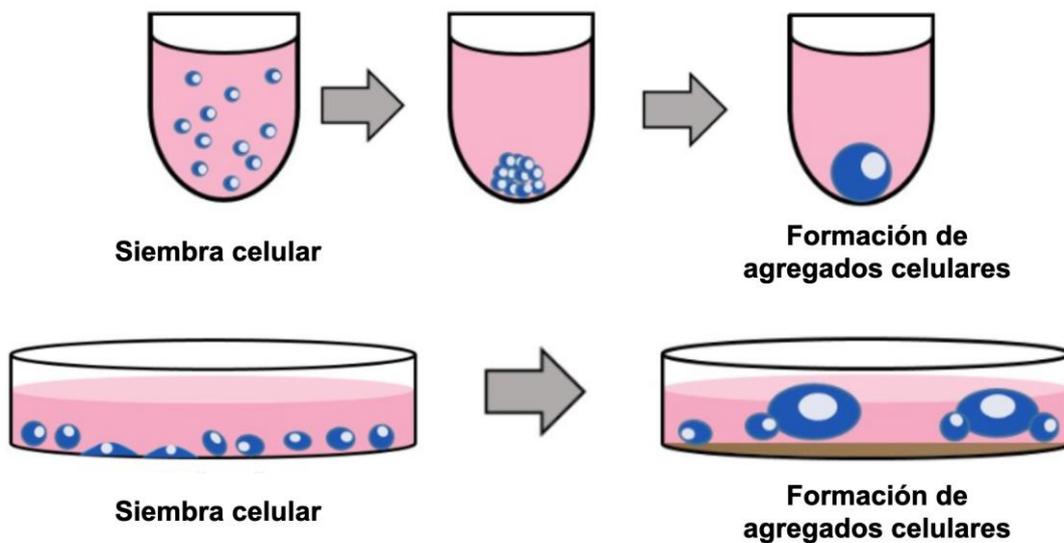


Figura 1. Superficies de cultivo de ultrabaja adherencia, con fondo redondeado (arriba) y plano (abajo). Modificado de (Bu et al., 2020).

1.2.2. INSERTOS DE CULTIVO CELULAR

Los insertos de cultivo celular son contenedores circulares, generalmente de policarbonato, utilizados para la producción de modelos celulares tridimensionales. Estos insertos se ubican en el interior de los pocillos de las placas de cultivo. En el fondo de los insertos, una membrana con poros de diámetro variable determinará la aplicación del modelo. Poros de pequeño tamaño se utilizan para el transporte de moléculas como hormonas, factores de crecimiento, medicamentos, e incluso para la interacción célula-célula. Mientras que tamaños de poro algo mayores son utilizados para estudios de migración celular. En la [Figura 2](#) se muestran dos insertos de cultivo. En el primero, las células A tienen un efecto paracrino sobre las células B, es decir, liberan moléculas de señalización que llegan a estas ([Kuroda et al., 2015](#)). En el segundo, se muestra una estructura formada por un tipo celular, seguido de la membrana porosa y otro tipo celular. Esta pretende ser un modelo que recapitula una estructura del organismo ([Agarwal et al., 2021](#)).

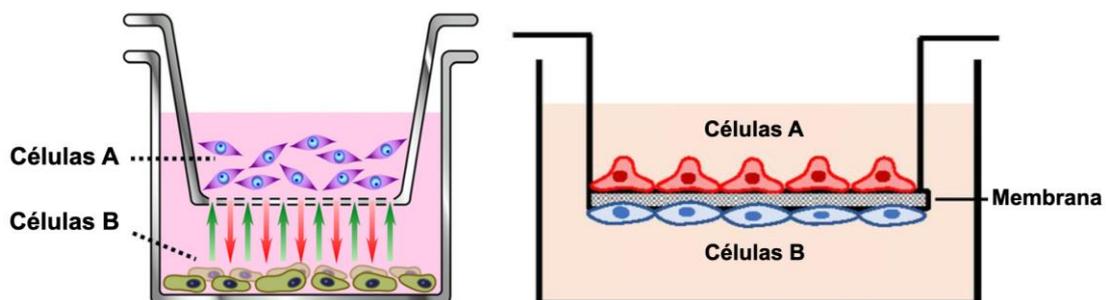


Figura 2. Insertos de cultivo celular. Modificado de ([Kuroda et al., 2015](#); [Agarwal et al., 2021](#)).

1.2.3. SCAFFOLDS POROSOS

Los *scaffolds* porosos resultan de gran utilidad ya que permiten la carga y liberación de medicamentos, así como la proliferación celular y la liberación de oxígeno y nutrientes (Lü et al., 2015). Una de las técnicas utilizadas para la fabricación de estas microestructuras porosas es la liofilización o *freeze-drying*, útil en *scaffolds* porosos fabricados con hidrogel. Dicha técnica consiste en la eliminación del disolvente del hidrogel, ya sea agua u otro disolvente orgánico, transformándolo de hielo directamente a vapor mediante sublimación a baja presión y temperatura. De esta manera, se pueden obtener hidrogeles con una porosidad mayor del 90% y tamaños de poro desde los 20 a los 400 micrómetros. En la [Figura 3](#) se muestra un esquema de dicha técnica de fabricación por liofilización. Se introduce en un recipiente el material que va a actuar como *scaffold* poroso y se liofiliza. Es decir, las partículas de agua que conforman dicho material se congelan y a continuación pasan a estado gaseoso. Estas moléculas de agua son las que actuarán como porógenos; estructuras utilizadas para la formación de poros en la ingeniería de tejidos.

Los *scaffolds* porosos son útiles, por ejemplo, en aplicaciones relacionadas con hueso ya que la porosidad en este tipo de tejido es importante. Aunque el tamaño de los osteoblastos, células presentes en este tejido, es de 10 a 50 micras, este tipo de células prefieren poros de mayor tamaño. Este mayor tamaño de poro permite la infiltración de macrófagos, la eliminación de bacterias y favorece la infiltración de otras células así como la migración, colonización y vascularización in vivo. Estudios como los realizados por Cheng et al. (2016) demuestran que un mayor tamaño de poro favorece la formación de tejido óseo. En este estudio utilizaron *scaffolds* porosos de magnesio, otra alternativa para la fabricación. Utilizando dos tamaños de poro observaron que los de mayor tamaño favorecían una mejor formación de hueso maduro al promover la vascularización. Esto se debía a la formación de nuevos vasos que proporcionaban el oxígeno y nutrientes suficientes para favorecer la actividad de los osteoblastos.

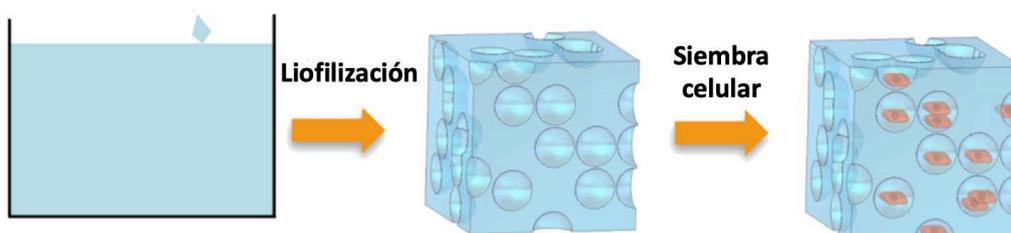


Figura 3. Esquema de creación de un scaffold poroso mediante liofilización. Modificado de (Del Agua et al., 2018).

1.2.4. SCAFFOLDS FIBROSOS

Este tipo de *scaffolds* se fabrican típicamente mediante técnicas de *electrospinning*. Dicha técnica consiste en la aplicación de un voltaje a una jeringuilla cargada de un determinado material. El material disuelto dentro de la jeringuilla es eyectado, en la dirección del campo eléctrico, formando

fibras sobre una superficie colectora. Estos *scaffolds* fibrosos generados, utilizados durante décadas, tienen la capacidad de biomimetizar la matriz extracelular de los tejidos. Esto hace que la técnica de *electrospinning* tenga un gran potencial para la formación de tejidos de manera sintética (Jun et al., 2018). La Figura 4 recoge en el lado izquierdo cuatro imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido. Por un lado, las imágenes A y B se corresponden con matriz extracelular de tendón y músculo, respectivamente. Por el otro, las imágenes C y D se corresponden con dos estructuras fibrosas realizadas mediante *electrospinning*. Como se puede apreciar, dicha técnica es capaz de recrear la matriz extracelular con bastante similitud. En el lado derecho de la figura se puede observar un sistema de electrospinning. Se encuentra formado por una fuente de voltaje, una jeringuilla para la aplicación del material (hilador lineal) y un colector de fibras. La solución polimérica sin carga y contenida dentro del recipiente del material, es eyectada y transferida a la superficie colectora, conectada a tierra.

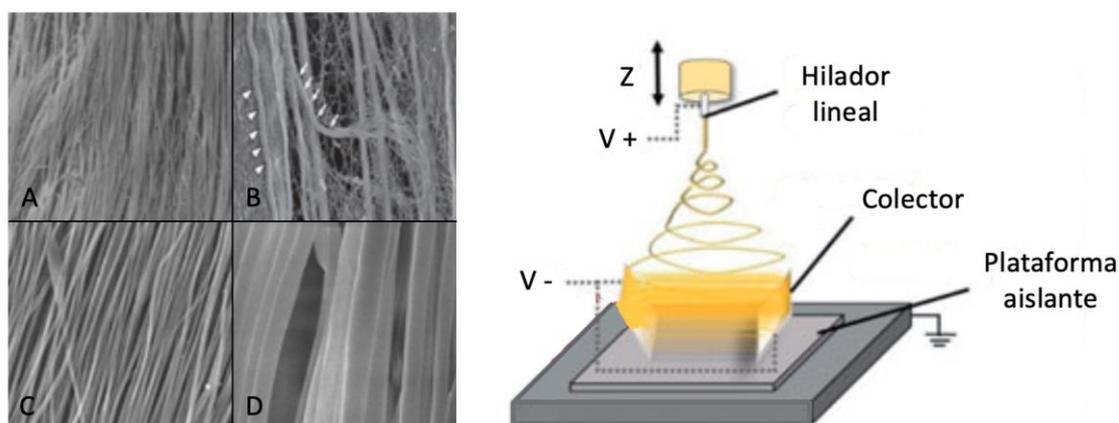


Figura 4. Matriz extracelular natural (A-B), matriz extracelular obtenida por electrospinning (C-D), y componentes de un sistema de electrospinning (derecha). Modificado de (Jun et al., 2018; Tan y Zhou, 2019).

1.2.5. SISTEMAS MICROFLUÍDICOS

Los sistemas microfluídicos son sistemas microfabricados capaces de biomimetizar las interacciones dinámicas del microambiente *in vivo* de algunos tejidos del cuerpo. Además de recapitular las funciones biológicas de las células, son capaces de reproducir el comportamiento bioquímico, biomecánico y bioeléctrico del microambiente. Esto hace que este tipo de plataformas de cultivo celular sea interesante para el desarrollo celular y la evaluación de nuevos fármacos (Wang et al., 2015).

En la Figura 5, se puede observar un sistema microfluídico formado por diferentes microcanales. En este ejemplo, los canales centrales se han utilizado uno para la siembra celular y el otro para el flujo constante de sangre. La comunicación entre estos dos canales centrales se hace por medio de una membrana porosa. Esta membrana permite el paso de nutrientes y oxígeno desde el canal sanguíneo al canal celular. Los otros canales se han utilizado a modo de actuadores neumáticos, ejerciendo

compresión y tracción sobre los canales centrales. Este ejemplo puede biomimetizar un modelo del epitelio alveolar o del epitelio intestinal, por ejemplo.

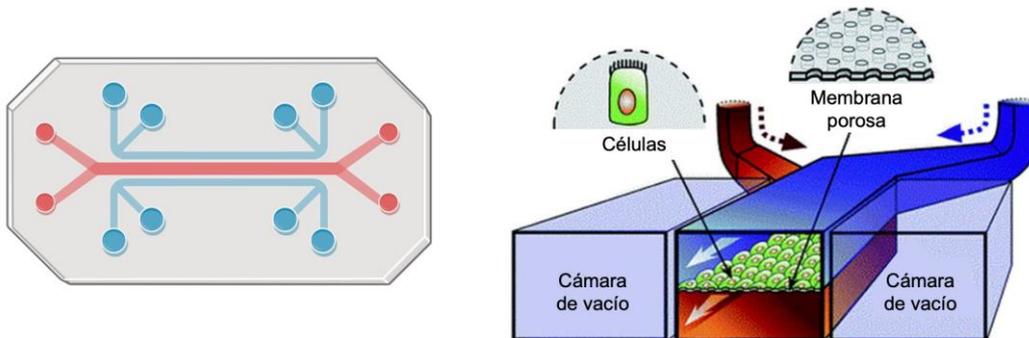


Figura 5. Sistema microfluídico visto desde arriba (izquierda) y en sección transversal (derecha). Creado con Biorender y modificado de (Wang et al., 2015).

1.3. BIOIMPRESIÓN 3D

En las últimas décadas las tecnologías de fabricación aditiva han tenido una gran relevancia. Una de estas técnicas de fabricación es la bioimpresión 3D donde materiales biológicos, señales bioquímicas y células vivas son depositados capa a capa de forma precisa para fabricar estructuras 3D biomiméticas (Murphy y Atala, 2014). La bioimpresión permite una precisión de deposición del biomaterial que es necesario para crear modelos tisulares que imiten estructuras humanas reales (Agarwala, 2016).

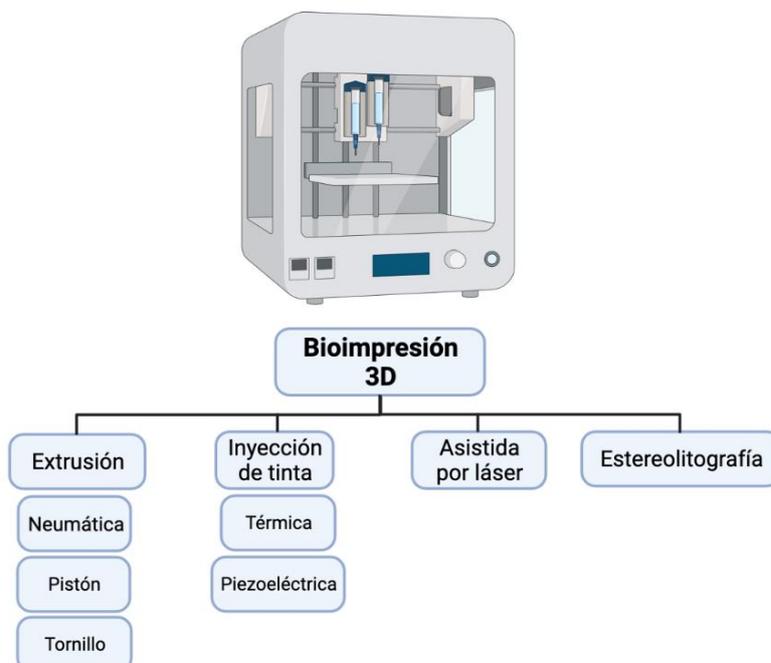


Figura 6. Tipos de bioimpresión 3D y sus mecanismos.

En el sentido estricto, la bioimpresión 3D consiste en la deposición de biotintas cargadas celularmente para la fabricación de estructuras vivas más o menos complejas (Gu et al., 2020). Las técnicas de bioimpresión están adquiriendo gran relevancia en los últimos años debido a las ventajas que presentan en el campo de la ingeniería tisular. Aunque los métodos de la ingeniería de tejidos convencionales permiten desarrollar ciertos tejidos de manera funcional, cuando se trata de tejidos complejos o compuestos, estos métodos no son suficientes. Algunas de las limitaciones de los métodos convencionales son la fabricación de *scaffolds* de forma inadecuada, la disponibilidad reducida de biomateriales para la construcción de tejido, y de los métodos para la deposición de varios tipos celulares de forma precisa en los *scaffolds* (Seol et al., 2014). Dentro de la bioimpresión 3D destacan cuatro tecnologías: bioimpresión por extrusión, por inyección de tinta, asistida por láser, y por estereolitografía (Figura 6).

1.3.1. BIOIMPRESIÓN POR INYECCIÓN DE TINTA

Se trata de una técnica sin contacto en la que se fabrican estructuras de 2 y 3 dimensiones mediante la deposición de gotas (picolitros) de biotinta. Para la generación de las gotas se pueden utilizar distintos mecanismos como métodos térmicos y actuadores piezoeléctricos, entre otros (Figura 7) (Seol et al., 2014). En los mecanismos por calor, el cabezal se calienta eléctricamente para que las gotas sean expulsadas de forma controlada. Se ha demostrado que la temperatura apenas se eleva entre 4 y 10 grados por lo que la viabilidad celular no se ve comprometida (Xie et al., 2020). En el mecanismo piezoeléctrico, un cristal piezoeléctrico se encuentra en el interior del cabezal y, a la hora de imprimir, se aplica un voltaje al cristal produciendo un cambio de forma que dará lugar a las gotas de biotinta.

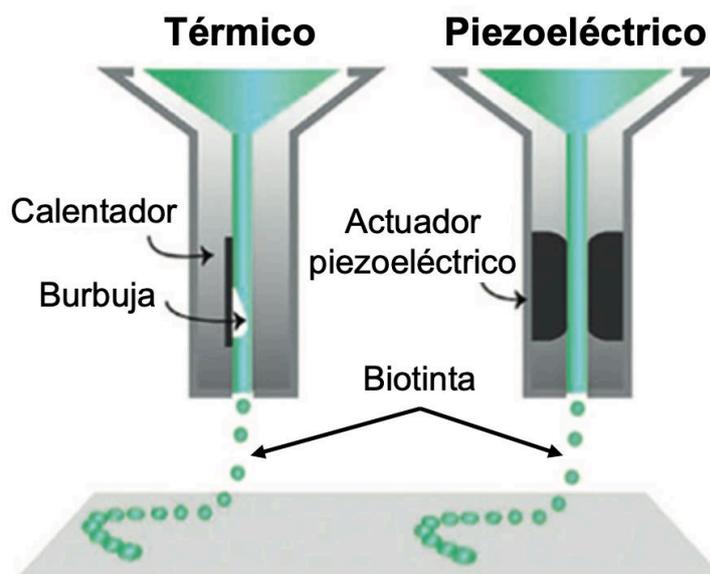


Figura 7. Mecanismos de bioimpresión 3D por inyección. Modificado de (Malda et al., 2013).

1.3.2. BIOIMPRESIÓN POR EXTRUSIÓN

Estos sistemas depositan filamento de forma continua de un material conformado por células mezcladas con hidrogel, a través de una boquilla de pequeño tamaño para fabricar estructuras en dos y tres dimensiones. Los hidrogeles cargados de células pueden dispensarse mediante presión neumática, mediante sistemas de émbolo/pistón como jeringuillas o mediante tornillos giratorios (Figura 8). El sistema de impresión neumático, mecanismo elegido para este trabajo, es un método muy extendido en el que se utiliza aire comprimido para extruir la biotinta. En el sistema de pistón y el de tornillo giratorio, la cantidad de biotinta suministrada es controlada por el desplazamiento lineal del pistón y la velocidad de giro del tornillo, respectivamente. Una vez impresa una capa, esta se solidifica bien química o físicamente y la fabricación de estructuras tridimensionales es fruto del apilamiento de capas.

Un aspecto importante de la bioimpresión por extrusión es la utilización de una mayor selección de biomateriales ya que los biomateriales de gran viscosidad pueden ser impresos por esta técnica. Además, se pueden utilizar diferentes densidades celulares y la viabilidad celular mediante este método de bioimpresión es típicamente superior al 90% (Gu et al., 2020; Seol et al., 2014).

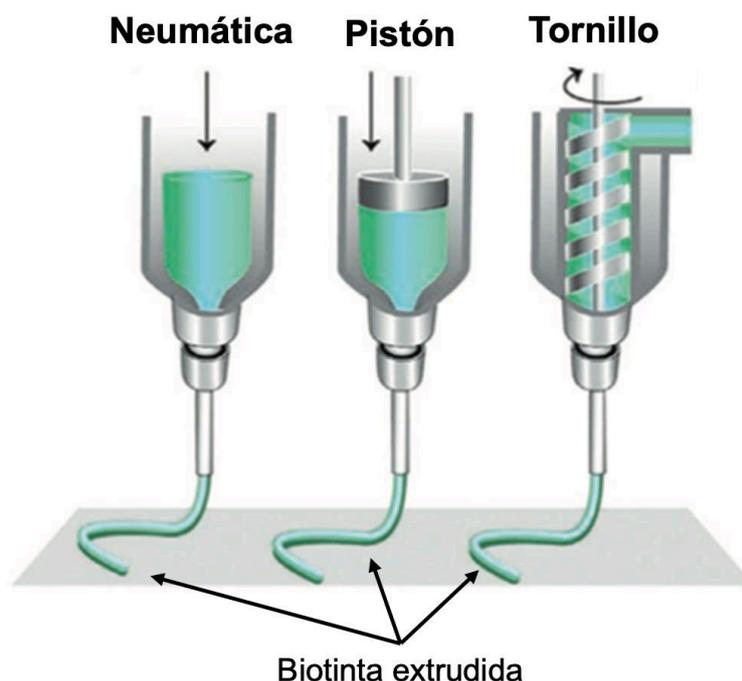


Figura 8. Mecanismos de bioimpresión 3D por extrusión. Modificado de (Malda et al., 2013)

1.3.3. BIOIMPRESIÓN ASISTIDA POR LÁSER

Esta técnica de bioimpresión consiste en la deposición de células individuales desde la biotinta a un sustrato o lámina colectora (Figura 9). Para ello, un haz láser concentrado incide sobre una de las

caras de la lámina donante. En la cara opuesta de la lámina donante, se encuentra la biotinta con las células en suspensión. El mecanismo de impresión consiste en que el haz láser incide sobre la lámina donante induciendo una burbuja en la biotinta. Acto seguido, esta burbuja producirá que una célula de la biotinta sea desplazada de esta a la lámina colectora. Mediante la repetición sucesiva de este proceso se forma la geometría celular deseada (Dababneh y Ozbolat, 2014; Gu et al., 2020).

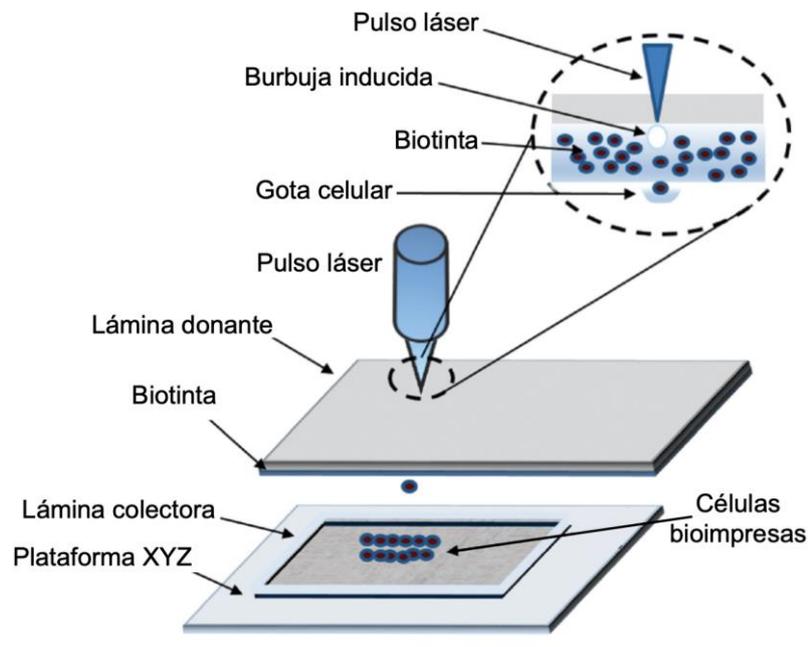


Figura 9. Mecanismo de bioimpresión asistida por láser. Modificado de (Dababneh & Ozbolat, 2014).

1.3.4. BIOIMPRESIÓN POR ESTEREOLOGRAFÍA

Se trata de una de las técnicas más utilizadas en la fabricación aditiva. Esta técnica consiste en la curación o solidificación de un polímero líquido fotosensible utilizando típicamente una fuente de luz ultravioleta o haces de electrones. De esta forma se aporta la energía necesaria para inducir la reacción química, dando como resultado el enlace de las distintas cadenas formando un polímero entrecruzado (Bártolo, 2011). El polímero fotosensible líquido se encuentra en una cuba donde las distintas capas de este se exponen de forma secuencial a la fuente de irradiación y, por ello, se van solidificando de forma selectiva. Una molécula fotoiniciadora, presente en la resina, reacciona a la radiación incidente, activa la reacción de polimerización localmente y como resultado cura o solidifica las zonas expuestas. Tras el desarrollo de la primera capa, se aplica una nueva película de resina, esta es irradiada y curada. Mediante la repetición sucesiva de este proceso se elabora la estructura deseada (Schmidleithner y Kalaskar, 2018). Como se muestra en la Figura 10, este tipo de bioimpresión se puede realizar con plataformas de fabricación tanto descendentes como ascendentes.

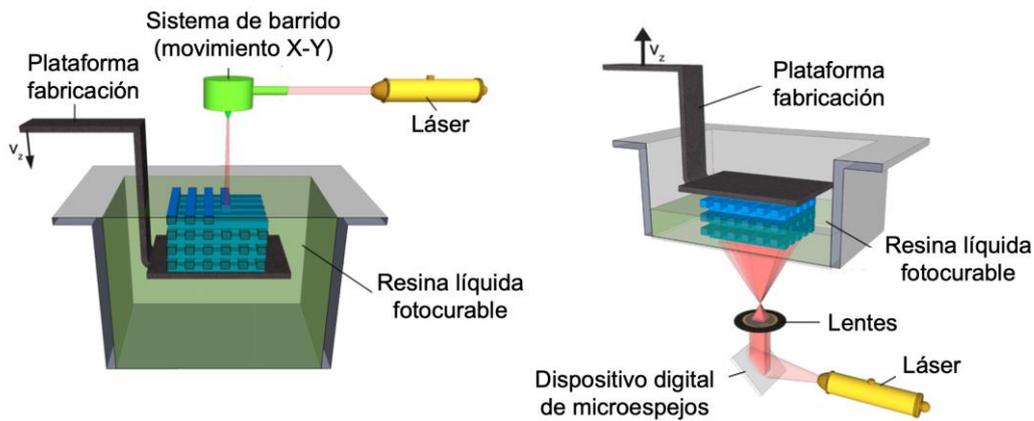


Figura 10. Bioimpresión 3D por estereolitografía con plataforma de fabricación descendente (izquierda) y ascendente (derecha). Modificado de (Billiet et al., 2012).

1.4. BIOTINTAS

Las biotintas son células y otros materiales biocompatibles que, mediante técnicas de bioimpresión, son capaces de formar tejidos vivos. Esto se consigue mediante la deposición espacial controlada de la biotinta. Para la formación de la biotinta adecuada se deben tener en cuenta multitud de factores. Los principales parámetros para considerar en una biotinta son la imprimibilidad (del inglés *printability*), la biocompatibilidad y las propiedades mecánicas.

- **Imprimibilidad.** Es la capacidad de formación de la biotinta, es decir, cómo de viscosa es y la velocidad con la que pasa de estado sol (fase líquida) a estado gel (fase sólida). A la hora de bioimprimir, hay que encontrar el equilibrio entre la viscosidad de la biotinta, la velocidad a la que se producen los desplazamientos, la boquilla a utilizar y la presión con la que se extruye la misma, entre otros aspectos.
- **Biocompatibilidad.** La biotinta debe ser capaz de mantener una gran viabilidad celular, favoreciendo el crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Bedell et al., 2020).
- **Propiedades mecánicas.** Es importante que la biotinta tenga la rigidez suficiente para ser capaz de soportar el material celular, así como las capas bioimpresas apiladas encima.

Las biotintas pueden estar basadas en *scaffolds*, si las células son bioimpresas junto con un material de acompañamiento, o libres de *scaffolds*, si únicamente se depositan las células. Los tipos de biotintas más característicos, detallados a continuación, son hidrogeles, *microcarriers*, componentes de matriz extracelular descelularizada, y agregados celulares.

1.4.1. HIDROGELES

Los hidrogeles son redes tridimensionales de materiales poliméricos hidrofílicos entrecruzados, capaces de absorber grandes cantidades de líquidos entre sus cadenas poliméricas (Łabowska et al.,

2021). La cantidad de agua que es capaz de absorber un hidrogel puede llegar a ser de hasta 1000 veces mayor que su peso en seco. El procedimiento habitual de uso de hidrogeles como biotintas consiste en imprimir la biotinta de hidrogel con células, para proceder a su posterior entrecruzamiento. Dicho entrecruzamiento es el proceso por el cual se forma una red polimérica tridimensional al unir mediante enlaces las distintas cadenas de polímeros. Se trata de un proceso de estabilización por el cual las cadenas poliméricas pierden su capacidad de moverse de forma independiente. Como resultado de este entrecruzamiento, el hidrogel se vuelve mecánicamente más resistente y menos flexible. En el proceso de bioimpresión, las células se mezclan en la fase líquida del hidrogel y este se entrecruza tras la extrusión de la biotinta, afectando así lo menos posible a las células y manteniendo la mayor viabilidad celular posible que si el entrecruzamiento se hiciera anteriormente. Los hidrogeles pueden ser clasificados por su origen en naturales o sintéticos. En la [Figura 11](#) se recogen los hidrogeles más característicos y, a continuación, se profundiza en el alginato, la gelatina y la agarosa al ser los utilizados para el desarrollo de este trabajo. Una mezcla de gelatina-alginato se utilizará para el desarrollo de la biotinta, mientras que la agarosa se utilizará como molde para la formación de agregados celulares, como se detallará más adelante.

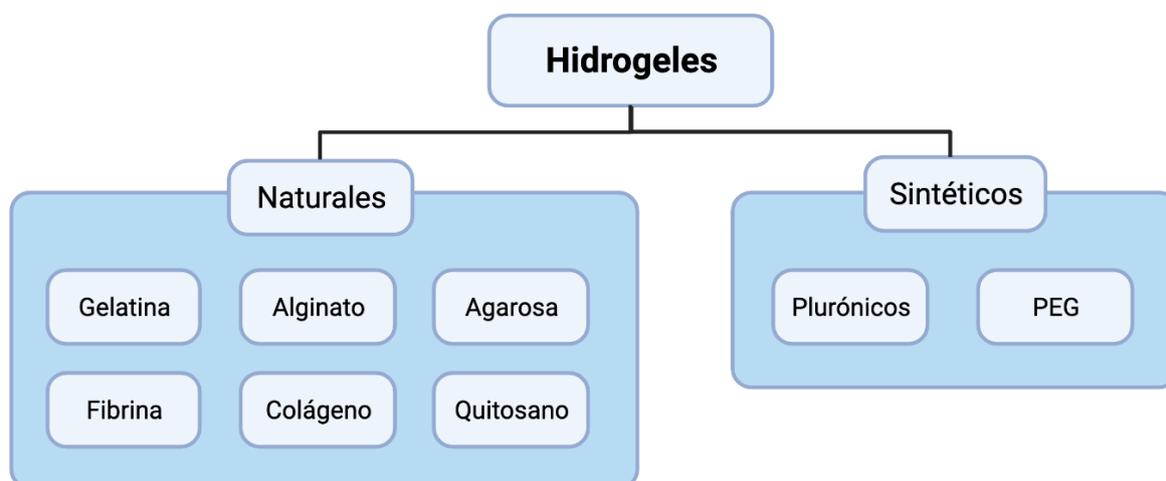


Figura 11. Clasificación de los hidrogeles según su origen.

Alginato

El alginato o ácido algínico se trata de un biopolímero que se extrae generalmente de las sales de alginato sódico presentes en las paredes celulares de algas pardas. El alginato está compuesto por la unión continuada de dos monómeros; el ácido beta-D-manurónico y el ácido alfa-L-gulurónico ([Figura 12](#)). Se trata de un polisacárido cargado negativamente, soluble, que favorece el crecimiento celular. Los bloques de monómero G favorecen la formación de gel mientras que los bloques MG y M están relacionados con la flexibilidad ([Axpe y Oyen, 2016](#)).

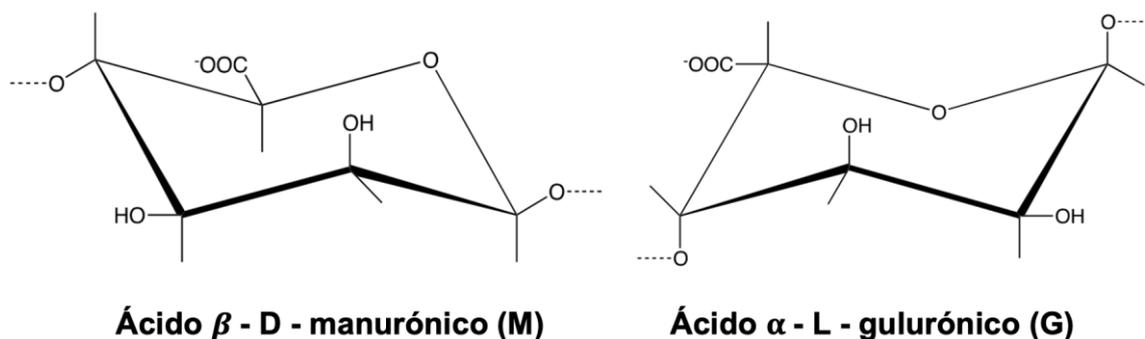


Figura 12. Unidades estructurales del alginato. Modificado de (Axpe y Oyen, 2016).

Es un biomaterial bastante bueno para la bioimpresión debido a la capacidad de su red para la inclusión de moléculas de agua y otras moléculas. La porosidad del material también es importante ya que influye en la viabilidad celular. A mayor tamaño de poro, mayor capacidad de difusión de los nutrientes y, por tanto, mayor viabilidad. Un aspecto a tener en cuenta cuando se imprime con alginato es que la viscosidad disminuye al aumentar la tensión de cizalladura. La temperatura también afecta al proceso ya que a medida que aumenta, disminuye la viscosidad.

Gelatina

La gelatina se trata de un tipo de proteína que se obtiene de la hidrólisis de colágeno de origen animal, del tejido conectivo y de los huesos. Debido a su biocompatibilidad, a la ausencia de respuesta inmune en el organismo, su perfil de degradación y su ausencia de toxicidad, es utilizado tanto en la industria alimentaria como para aplicaciones biomédicas. Es uno de los materiales más utilizados en los cultivos celulares debido a su capacidad de retención de secuencias de colágeno. Esto permite la creación de un microambiente adecuado para la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular.

Agarosa

Este biopolímero natural se utiliza como biotinta debido a su baja temperatura de gelificación de 32°C, su biocompatibilidad y sus propiedades mecánicas. No obstante, en este proyecto no será utilizado como biotinta si no como molde para la formación de agregados celulares. El uso de hidrogeles para la fabricación de moldes con micropocillos se ha demostrado que es de utilidad para la formación de esferoides celulares. Esto ocurre porque mantienen una elevada viabilidad celular debido a las propiedades biofísicas de los hidrogeles que biomimetizan la matriz extracelular (Mirab et al., 2019). La agarosa es de gran interés para este propósito ya que es de origen natural, barata, no tóxica y es capaz de repeler a las células haciendo que se unan entre ellas formando esferoides. Además, la agarosa es permeable a las moléculas de aire y otras moléculas, favoreciendo la difusión de nutrientes.

Una vez las estructuras de biotinta son impresas, es importante que la gelación se mantenga en el tiempo. Es decir, la estructura se mantenga en estado sólido mediante algún procedimiento de entrecruzamiento:

- **Entrecruzamiento físico.** Cada vez más se utiliza este tipo de entrecruzamiento ya que no se utilizan agentes entrecruzantes. Esto resulta de gran utilidad ya que el uso de agentes puede afectar a la viabilidad de las células incorporadas, provocando toxicidad. Existen diferentes métodos de entrecruzamiento físico, destacando los enlaces iónicos, hidrofóbicos y puentes de hidrógeno. El entrecruzamiento iónico implica la unión de las cadenas poliméricas mediante uniones no covalentes. Este entrecruzamiento se da cuando iones de diferente carga son atraídos electrostáticamente y dan lugar a la red polimérica entrecruzada. En cuanto al *crosslinking* mediante interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, tienden a ser dependientes de la temperatura por lo que variaciones de esta alteran las propiedades reológicas del hidrogel.
- **Entrecruzamiento químico.** El entrecruzamiento químico se da por la unión covalente de las cadenas poliméricas, proporcionando una mejor estabilidad que por métodos físicos. La fotopolimerización es uno de los métodos más extendidos. El *crosslinking* se inicia por la presencia de un fotoiniciador que se excita por la presencia de luz y comienza el proceso de entrecruzamiento. Es importante tener en cuenta que el uso de estos fotoiniciadores debe ser utilizado a concentraciones bastante reducidas para que no resulten tóxicos para las células.
- **Entrecruzamiento enzimático.** En este tipo de entrecruzamiento, mediante el uso de enzimas como la trombina y la transglutaminasa, se consigue la estabilización del hidrogel. Ambas enzimas mencionadas son enzimas dependientes de iones de calcio.

1.4.2. MICROCARRIERS

Los *microcarriers* (microvehículos celulares) son partículas que han sido diseñadas para favorecer la adhesión y la supervivencia de células adherentes (Figura 13). Gracias a su tamaño, entre 50 micras y unas pocas centenas de micras, sirven como superficie para la proliferación celular. Debido a su baja densidad, los *microcarries* son muy utilizados en la proliferación cuantiosa de células en biorreactores ya que se encuentran en suspensión en el medio de cultivo. Frente a los cultivos tradicionales, se ha demostrado que el uso de *microcarriers* mantiene mejor el fenotipo de una amplia variedad de tipos celulares. Los *microcarriers* pueden ser encapsulados en hidrogeles aumentando la resistencia mecánica de estos geles y permite un buen anclaje celular y superficie de expansión. Además, se ha demostrado que el uso de estos hidrogeles con *microcarriers* cargados de células favorecen la adhesión, la viabilidad y la proliferación de células como las mesenquimales. En estudios como el de [Levato et al. \(2014\)](#) fabricaron constructos a partir de biotintas formadas por *microcarriers* en combinación con hidrogeles. Para favorecer la respuesta de las células al material de las microesferas, en este caso de ácido poliláctico (PLA), funcionalizaron la superficie de estas incorporando colágeno de tipo I.

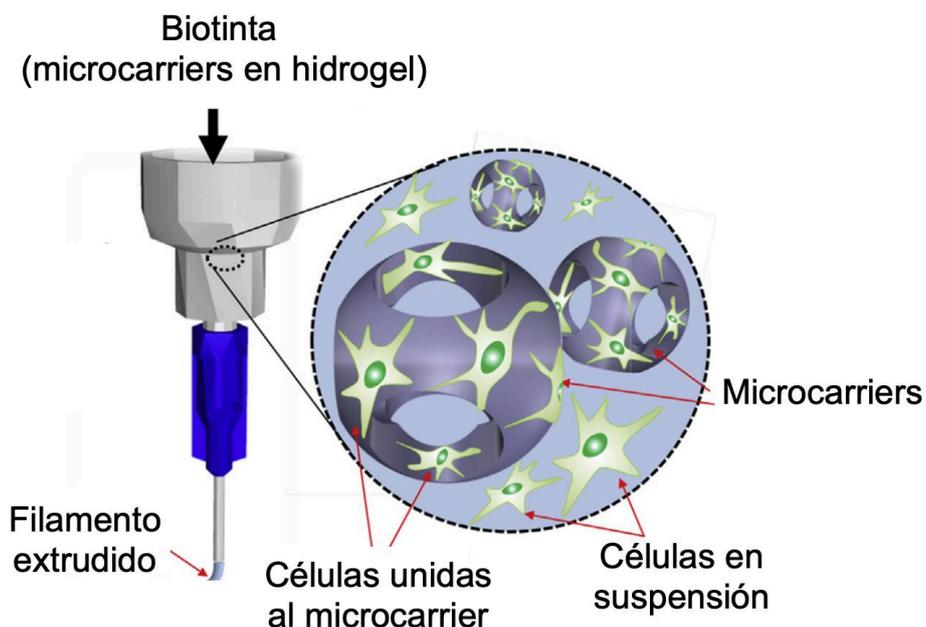


Figura 13. Biotinta con microcarriers. Modificado de (Ozbolat, 2017).

1.4.3. AGREGADOS CELULARES

Los agregados celulares son utilizados en la actualidad como un tipo de biotinta. Estos agregados pueden clasificarse en esferoides tisulares, pellets celulares o hebras tisulares (Figura 14). La formación de estos agregados celulares se debe en gran medida a una proteína transmembrana llamada cadherina que participa en la adhesión entre las células.

Esferoides

Los esferoides celulares son agregados de células de forma esférica que presentan un gran potencial como bloques de construcción en la bioimpresión tisular. La formación de estos agregados celulares se puede conseguir mediante diversas técnicas. Una de las más comunes es la creación de moldes de hidrogel con micropocillos donde las células se van uniendo en el fondo de estos, en el transcurso de los tres primeros días. También existen soluciones comerciales como las superficies de ultrabaja adherencia, útiles para la formación de esferoides. Otra técnica destacada es la de “gota colgante” o *hanging drop*, donde una gota de suspensión celular es pipeteada sobre una placa de cultivo, la cual es invertida para que la gota quede colgando y se forme así el esferoide por gravedad. Estos métodos se desarrollarán en mayor profundidad en la metodología del trabajo. Los esferoides son el eje central de este proyecto ya que se pretende poner a punto un modelo 3D diferenciando estos agregados de células madre de grasa humana. Por ello, dichos esferoides se cargarán en la biotinta de gelatina-alginato utilizada en este TFM.

Pellets

Los *pellets* celulares se forman principalmente por fuerzas centrífugas o gravitacionales que concentran las células en el fondo de un tubo cónico de centrifugado. Esta técnica es un método sencillo de formación de agregados celulares sin la necesidad de sistemas complejos. No obstante, este método presenta cierta limitación ya que el transporte de medio y oxígeno es limitado y la viabilidad celular se ve reducida significativamente tras las primeras 24 horas (Hospodiuk et al., 2017).

Hebras

Las hebras tisulares son pequeños cilindros tisulares utilizados para bioimpresión. En los estudios realizados por Akkouch et al. (2015) fabricaron estas hebras mediante la producción de un conducto de hidrogel usando una boquilla coaxial. Una vez el conducto era creado, este se rellenaba inyectando pellet celular lentamente y se sellaba el extremo opuesto para que no se saliera. Al rellenar el conducto, se sellaba el otro extremo y se dejaba incubar el tiempo necesario para que se formara un único agregado celular cilíndrico. Transcurrido este tiempo, se aplicaba un compuesto que fuera capaz de disolver la cubierta de hidrogel y dejar así al descubierto la hebra celular que se formaba.

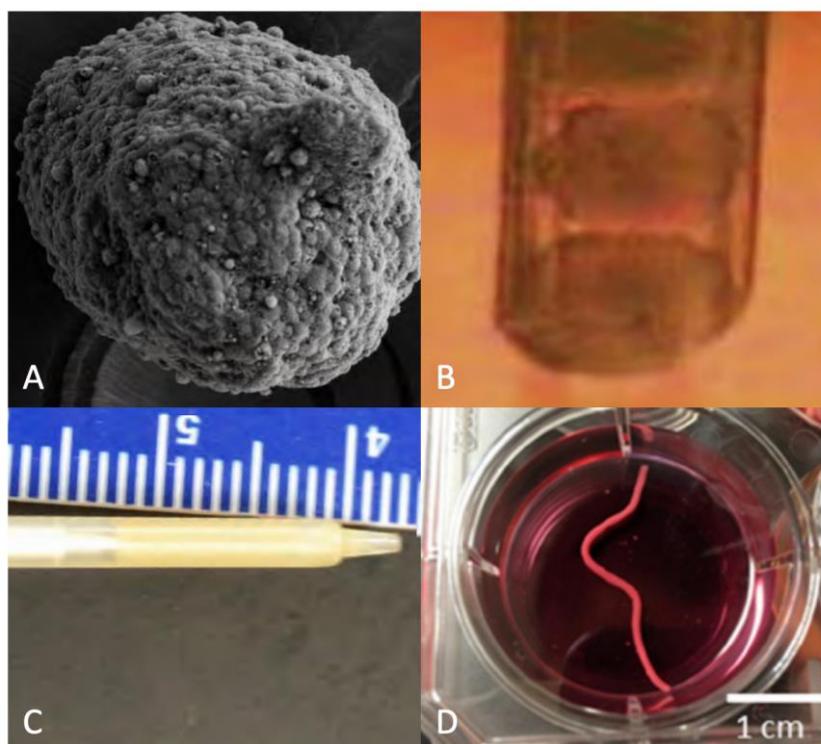


Figura 14. Panel con los diferentes tipos de agregados celulares. En la imagen A se muestra una imagen SEM de un esferoide celular y en la B se muestra la deposición de esferoides a través de una jeringuilla. La imagen C se corresponde con una jeringuilla cargada de pellet celular y la D con una hebra celular. Modificado de (Hospodiuk et al., 2017).

1.4.4. COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA

La matriz extracelular (ECM) consiste en una red tridimensional presente entre las células del organismo. Juega un papel importante en la vida ya que recubre las células del organismo proporcionando protección y sostén. Además, favorece la comunicación celular, así como la unión célula-célula, y es fundamental en la división celular y en el movimiento de las mismas. Está compuesta por una gran variedad de macromoléculas, principalmente agua, proteínas y polisacáridos. No obstante, la cantidad presente de estas moléculas varía tanto entre tejidos como dentro del mismo tejido; dicho de otro modo, es heterogénea. La matriz extracelular está típicamente formada por elastina, laminina, colágeno, fibronectina, ácido hialurónico y proteoglicanos.

Para la preparación de la matriz extracelular descelsularizada (dECM), se requiere el uso de procesos químicos, físicos y enzimáticos, pero sin dañar la ECM. La evaluación de la descelsularización se hace mediante ensayos de cuantificación del ADN. Una vez obtenida la dECM, esta se disuelve a la concentración deseada, adquiriendo una apariencia similar a un hidrogel y haciéndola idónea para bioimpresión. Además, el uso de dECM es óptimo ya que, al mantener la ECM intacta, conserva las propiedades mecánicas y el microambiente adecuado para la proliferación y diferenciación celular. En el estudio realizado por [Das et al. \(2019\)](#), fabricaron este tipo de biotintas a partir de tejido cardíaco porcino. La descelsularización del tejido se hizo mediante la aplicación de procesos químicos utilizando diferentes detergentes, como el sodio dodecil sulfato (SDS) y el tritón x-100. Se lavaba con tampón fosfato salino (PBS) y tras un proceso de liofilizado y digestión, se preparaba la concentración deseada de la biotinta de matriz descelsularizada. En la [Figura 15](#) se recoge el flujo de trabajo a seguir para la obtención de biotintas basadas en componentes de matriz descelsularizada.

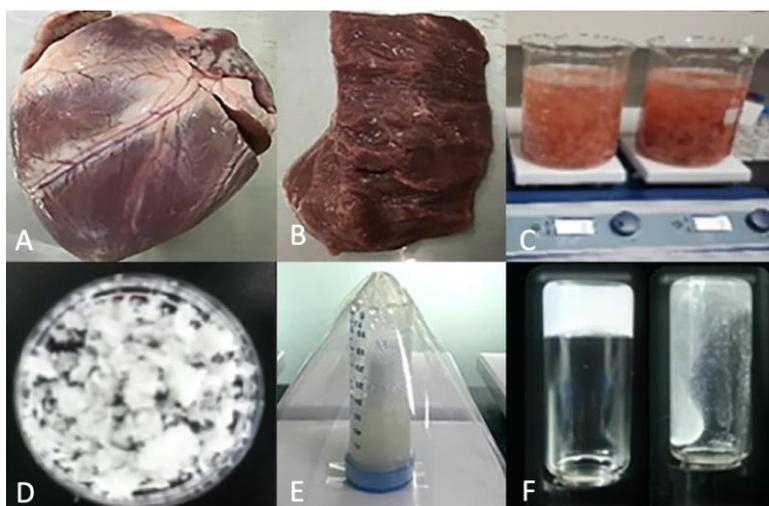


Figura 15. Flujo de trabajo para la producción de dECM. Del corazón porcino (A) se extrae una muestra de trabajo (B). La muestra es descelsularizada mediante detergentes (C), es liofilizada (D) y sometida a un proceso de digestión (E) para obtener la biotinta en estado gel y en solución (F). Modificado de (Das et al., 2019).

1.5. CÉLULAS MADRE

A continuación, se detallan las células madre, su proceso de formación y la clasificación de estas. Posteriormente, se profundiza en mayor medida en las células madre mesenquimales humanas del tejido adiposo al ser estas las utilizadas en el desarrollo del proyecto.

1.5.1. DESARROLLO, FORMACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE

Las células madre son aquellas células a partir de las cuales se desarrollan los distintos tipos celulares que darán lugar a un individuo. Este tipo de células se encuentran presentes en todos los organismos vivos pluricelulares como, por ejemplo, los seres humanos. Cobran gran relevancia ya que pueden dividirse para dar lugar a células hijas que sean nuevas copias idénticas, fenómeno conocido como autorrenovación, o diferenciarse en distintos linajes celulares (Mummery et al., 2014).

Para entender mejor los distintos tipos de células madre existentes, es necesario conocer los primeros desarrollos celulares (Figura 16). Tras la fecundación, el cigoto resultante de la unión del espermatozoide con el óvulo sufre una serie de divisiones mitóticas a lo largo de los días. Después del tercer día tras la fecundación, se forma un agregado de entre 16 y 32 células llamado mórula. Las células que conforman dicha mórula presentan forma redondeada y, conforme se dan divisiones sucesivas, se forma una esfera con un mayor número de células denominada blastocisto. Esta forma esférica, aunque tenga apariencia sólida, en su interior presenta una cavidad rellena de líquido; el blastocele. La capa externa del blastocisto está compuesta por una única capa de células, el trofoblasto, y, debajo de esta capa, en uno de los extremos se encuentra una aglomeración de células que se denomina masa celular interna.

Esta masa celular interna es la que dará lugar al desarrollo embrionario y son la fuente de las células madre embrionarias. La masa celular interna se diferencia en dos capas celulares, el epiblasto y el hipoblasto, conformando el disco embrionario bilaminar. El hipoblasto dará lugar al saco vitelino, fundamental para la nutrición del embrión. En el proceso conocido como gastrulación, el epiblasto se divide en las tres líneas germinales que darán lugar a los órganos del individuo: el endodermo, el mesodermo y el ectodermo (Freshney, 2015; Jones y Lopez, 2014).

- **Endodermo.** Es la hoja embrionaria a partir la cual se desarrollarán el aparato digestivo y respiratorio. Es decir, da lugar al epitelio del intestino y de órganos asociados como los pulmones, el hígado y el páncreas.
- **Mesodermo.** Es la capa de la gástrula a partir la cual se desarrollarán los músculos, los huesos y la dermis. Desarrolla la mesénquima embrionaria que dará lugar a tejido conectivo, estructuras de soporte como hueso, cartílago, músculo y tejido vascular, y el sistema hematopoyético.

- **Ectodermo.** Es la capa de la gástrula a partir la cual se desarrollarán la epidermis, el pelo, las uñas, los ojos y el sistema nervioso, entre otros. Da lugar a la superficie externa del epitelio como es la epidermis o el epitelio bucal.

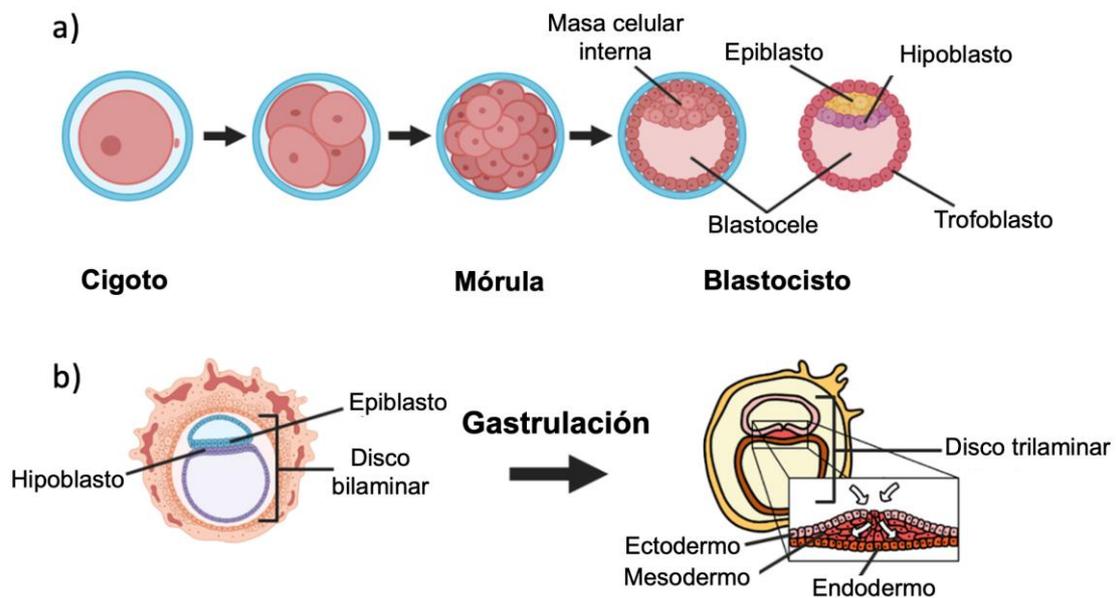


Figura 16. Etapas del desarrollo embrionario tras la fecundación. División celular desde cigoto a blastocisto (a), y fenómeno de gastrulación (b). Creado con Biorender y modificado de (Wikimedia Commons, 2020).

Las células madre pueden clasificarse en base a dos criterios: según su origen o según su potencialidad. Según su origen, las células madre pueden ser embrionarias si se encuentran en embriones, después de las primeras divisiones celulares tras la fecundación del óvulo, o adultas, si sólo se encuentran en los tejidos de un ser desarrollado en su fase adulta. Las células madre embrionarias se obtienen de la masa celular interna de embriones tempranos en la fase de blastocisto y expandiéndolas sucesivamente in vitro (Wankhade et al., 2016). Según su potencialidad, las células madre se clasifican de la siguiente manera:

- **Células madre totipotentes:** son aquellas células madre que pueden dar lugar a cualquier linaje celular embrionario o adulto, incluyendo las líneas germinales y estructuras no embrionarias conectadas al feto, como puede ser la placenta. Las células madre totipotentes pueden obtenerse del cigoto o de sus subsiguientes divisiones, antes de que alcance el linaje trofoectodermo, hecho que ocurre alrededor del cuarto día tras la fertilización. Es decir, desde la fase de cigoto a la de mórula. En las sucesivas divisiones, las células se agrupan en distintas líneas celulares: la masa celular interna, formada por el epiblasto y el hipoblasto; y, por otro lado, el trofoblasto.

Mientras que las células del epiblasto sí son pluripotentes, las del hipoblasto y trofoblasto no son ni totipotentes ni pluripotentes. Además, las células totipotentes dejan de existir cuando se forma la masa celular interna.

- **Células madre pluripotentes:** son aquellas células madre que pueden dar lugar a cualquier tipo celular embrionario o adulto, pero no a las estructuras no embrionarias como la placenta o el saco vitelino. Es decir, las células madre embrionarias son pluripotentes.
- **Células madre multipotentes:** son aquellas células madre capaces de dar lugar a multitud de linajes celulares, pero no a todos los tipos. Estas células madre sólo forman los tipos celulares presentes en el órgano o tejido en el que se encuentran.
- **Células madre unipotentes:** son aquellas células madre capaces de dar lugar únicamente a otro tipo celular. Por ejemplo, las espermatogonias son células madre unipotentes que darán lugar, mediante procesos de diferenciación, a los espermatozoides.
- **Células madre pluripotentes inducidas:** [Takahashi y Yamanaka \(2006\)](#) descubrieron este nuevo tipo de células a las que acuñaron como células madre pluripotentes inducidas. Este tipo de células se obtienen mediante la reprogramación celular de células adultas diferenciadas, como por ejemplo los fibroblastos obtenidos de una biopsia de piel. La característica fundamental de estas células es que muestran una expresión génica, perfil epigenético y potencial de diferenciación para dar lugar a cualquier tipo de célula del cuerpo como hacen las células madre embrionarias ([Doss y Sachinidis, 2019](#)).

1.5.2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y TEJIDO ADIPOSO

Las células madre mesenquimales son células madre multipotentes, capaces de autorrenovarse por división y de diferenciarse en multitud de tipos celulares de tejidos como el óseo, cartilaginoso, adiposo, conectivo y muscular. Son capaces de diferenciarse a células derivadas de las tres líneas germinales, es decir, del endodermo, mesodermo y ectodermo.

Pueden ser obtenidas de diferentes fuentes como la médula ósea, el tejido adiposo o la pulpa dental ([Ferraro et al., 2016](#)). Presentan una morfología similar a los fibroblastos, y se piensa que juegan un papel importante en la construcción de la estructura tridimensional de huesos y órganos, así como en la reparación de pequeñas cantidades de tejido dañado.

Recientemente, se ha comenzado a obtener típicamente del tejido adiposo subcutáneo de personas, favorecido por el incremento de la incidencia de la obesidad en la población. Mediante un procedimiento de liposucción se extraen y aíslan las células madre mesenquimales. Dicho método de obtención es menos invasivo que si se obtuvieran de la médula ósea. Además, en un gramo de tejido adiposo se pueden encontrar alrededor de $5 \cdot 10^3$ células mesenquimales, cantidad 500 veces mayor que la encontrada en un gramo de médula ósea ([Mizuno, 2009](#)).

Las células madre mesenquimales del tejido adiposo residen *in vivo* en microambientes tridimensionales específicos del tejido. Estos microambientes, denominados nichos, mantienen la troncalidad de las células. Los nichos de células madre están compuestos por redes entrecruzadas e hidratadas de proteínas de ECM, glúcidos y citoquinas. De esta manera, los estudios de investigación con estas células deberán emplear materiales que sean capaces de biomimetizar estos nichos (Liu et al., 2013).

Las células madre derivadas del tejido adiposo se encuentran en la zona perivascular del tejido adiposo blanco, donde se encuentran depósitos de grasa subcutánea. Puesto que son fáciles de aislar, abundantes y no presenta controversia ética, han adquirido una gran relevancia en aplicaciones en medicina regenerativa (Wankhade et al., 2016).

El tejido adiposo está constituido principalmente por células de grasa denominadas células adiposas o adipocitos. Estos adipocitos sintetizan y almacenan grandes glóbulos de lípidos. Se encuentra principalmente bajo la piel, pero también puede localizarse en depósitos aislados entre músculos, en los intestinos e incluso en los pliegues de membranas. La grasa localizada en el tejido adiposo proviene de la ingesta de alimentos ricos en grasas o es producida por el propio organismo. En la especie humana podemos encontrar dos tipos diferentes de tejido adiposo: tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo.

El tejido adiposo blanco es el más común, representa hasta un 20% del peso total de un individuo normal adulto y, en mamíferos, se encuentra localizado mayoritariamente en dos regiones: en la zona subcutánea y en la región abdominal (Cedikova et al., 2016). Proporciona aislamiento térmico, es la principal reserva energética utilizada por el organismo en momentos de inanición o elevado ejercicio físico, y protege mecánicamente determinados órganos vitales (Esteve Ràfols, 2014). Cuando se da un aporte energético excesivo, o el gasto energético se ve reducido, el exceso de energía se deposita en el tejido adiposo blanco como triacilglicéridos. Por el contrario, cuando los músculos y otros tejidos necesitan energía, determinadas hormonas se unen a los adipocitos y producen la hidrólisis de triacilglicéridos, liberando ácidos grasos y glicerol, en un proceso conocido como lipólisis. Estos ácidos grasos son transportados por la sangre a los diferentes tejidos, donde son oxidados para obtener energía. El tejido adiposo es también una fuente de numerosas hormonas, fundamentales en diferentes procesos metabólicos y en la función endocrina.

El tejido adiposo pardo es muy abundante en recién nacidos, mientras que en los individuos adultos apenas hay pequeñas cantidades. Tiene propiedades termogénicas, es decir, genera calor y, a diferencia del tejido adiposo, consume energía en vez de almacenarla. Su color pardo, como sus propiedades termogénicas, se deben a la abundante presencia de mitocondrias en este tejido. En la Figura 17 se muestran imágenes de microscopía óptica de ambos tipos de tejido adiposo.

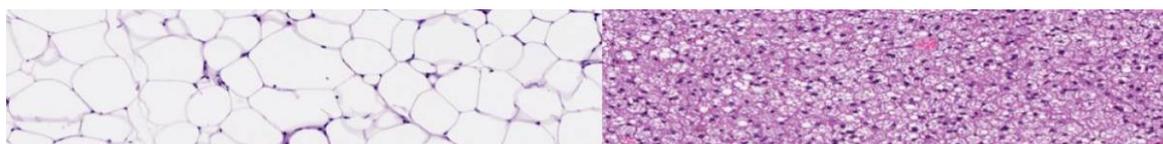


Figura 17. Imagen de microscopía óptica del tejido adiposo blanco (izquierda) y del tejido adiposo pardo (derecha). Modificado de (Esteve Ràfols, 2014).

CAPÍTULO 2. MOTIVACIÓN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. MOTIVACIÓN

Los conocimientos adquiridos a lo largo del grado y del máster en Ingeniería Biomédica me han dotado de las herramientas suficientes, así como de una visión global, para poder tener el perfil profesional adecuado para llevar a cabo este proyecto. Por un lado, las asignaturas con un enfoque más biológico, me han facilitado las nociones fundamentales para conocer los distintos tipos celulares y comprender su funcionamiento. La asignatura de ingeniería tisular, tanto del grado como del máster, me ha introducido aquellos procesos ingenieriles para el desarrollo de estructuras de soporte o *scaffolds*, como son la liofilización, el *electrospinning* o la bioimpresión 3D.

Por otro lado, con las asignaturas orientadas al diseño he aprendido a manejar diferentes programas de diseño asistido por ordenador. Este aprendizaje ha permitido materializar ideas produciéndolas mediante distintas técnicas de fabricación, tanto aditivas como sustractivas.

2.2. JUSTIFICACIÓN

El descubrimiento de nuevos medicamentos supone un elevado empleo de tiempo y de recursos económicos. Un gasto económico significativo en el desarrollo de estos medicamentos se debe a la elevada tasa de abandono de candidatos a fármacos en los ensayos clínicos. Si bien es cierto que estas tasas se podrían mejorar refinando el diseño experimental y las prácticas realizadas, existe una causa más señalable a todo esto. Esta causa es la gran diferencia que típicamente existe entre los modelos realizados *in vitro* y lo que sucede realmente *in vivo*. Es decir, la incapacidad de los modelos de cultivo utilizados de biomimetizar las estructuras presentes en los tejidos *in vivo* del organismo (Verjans et al., 2017).

En el marco ético de la investigación biomédica, existe un interés creciente por reemplazar el uso de modelos animales por otros modelos. Tal es su importancia que la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo recoge la implementación del principio de las 3 Rs, mencionado anteriormente en la introducción, cuyo objetivo es reemplazar, reducir y refinar el uso de estos. Dicha directiva, junto con el interés de prohibir aquellos animales que no proporcionan evidencia científica, ha hecho que las instituciones de investigación hayan optado por la búsqueda de modelos alternativos al uso de animales.

Existe un incremento en la incidencia de ciertas enfermedades como es el caso de la obesidad, cada vez más común en la sociedad. Por todo lo expuesto, surge la necesidad de desarrollar nuevas plataformas de cultivo celular tridimensionales mejores a las utilizadas tradicionalmente. En primera instancia, para poder llevar a cabo modelos de diferenciación celular que se asemejen al estado del nicho celular *in vivo*. Más a largo plazo, estos modelos deberán permitir el estudio de enfermedades como la obesidad temprana.

2.3. OBJETIVOS

Las principales finalidades de las plataformas de cultivo 3D son el estudio del cáncer, estudios de diferenciación celular e ingeniería tisular, y la evaluación dinámica de candidatos a medicamento antes de llevar a cabo los ensayos clínicos (Ravi et al., 2015). El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de una plataforma de cultivo celular 3D *in vitro* para la realización de estudios de diferenciación de células madre mesenquimales del tejido adiposo. La culminación de este trabajo permitiría, a más largo plazo, la creación de modelos de estudio de la obesidad temprana y la evaluación de fármacos para combatirla.

Para el desarrollo de este trabajo final de máster se han definido los siguientes subobjetivos:

- **Expandir y manipular cultivos celulares** de células madre mesenquimales del tejido adiposo para llevar a cabo la formación de agregados celulares en forma de esferoides.
- **Bioimprimir diferentes geometrías en 3D**. Mediante la programación en lenguaje Gcode se establecerá el movimiento de la máquina, la temperatura de bioimpresión y la apertura y cierre de la válvula solenoide del sistema neumático de extrusión.
- **Diseñar mediante CAD un sistema de cultivo alternativo para la formación de esferoides**. Se comparará el rendimiento de dicho sistema alternativo frente a la solución comercial elegida.
- **Sintetizar biotintas** cuyo biomaterial sea una mezcla de hidrogel gelatina-alginato y el componente celular sean esferoides de células madre mesenquimales del tejido adiposo.
- **Analizar la expresión génica de los esferoides formados**, mediante el aislamiento del ARN, la síntesis del ADNc y la realización de PCR cuantitativa.
- **Trabajar dentro de una sala blanca**. Puesto que la parte experimental del proyecto se realiza, en gran medida, dentro de una sala blanca, es necesario conocer el equipamiento con el que se debe entrar en esta.
- **Valorar económicamente la magnitud del proyecto**, cuantificando los recursos materiales y humanos que se utilizan.

- **Formarse en el instrumental de investigación biomédica**, como son las cabinas de flujo laminar, las centrifugas, las incubadoras y los diferentes microscopios, necesarios para la adquisición de imágenes ópticas y de fluorescencia, entre otros instrumentos.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

A continuación, se detallan aquellos materiales considerados más relevantes en el desarrollo del trabajo. El resto de materiales como reactivos químicos, material fungible de biología molecular y los equipos de caracterización biológica se mencionarán directamente en los párrafos correspondientes de la metodología, a fin de hacer más intuitivos esos apartados.

3.1. SOLIDWORKS

SOLIDWORKS es una herramienta de software muy completa formada por distintos módulos, como son el módulo de diseño asistido por ordenador (CAD), el módulo de simulación por el método de elementos finitos (FEM) y el módulo de fabricación asistida por ordenador (CAM), entre otros. Esta herramienta de software permite la materialización de una idea, pasando por las distintas etapas. Permite el diseño de las distintas piezas de las que se compone un proyecto, comenzando con la creación de los croquis bidimensionales de lo que será la pieza, con sus distintas cotas, para aplicar sucesivas operaciones hasta construir lo que será la pieza final.

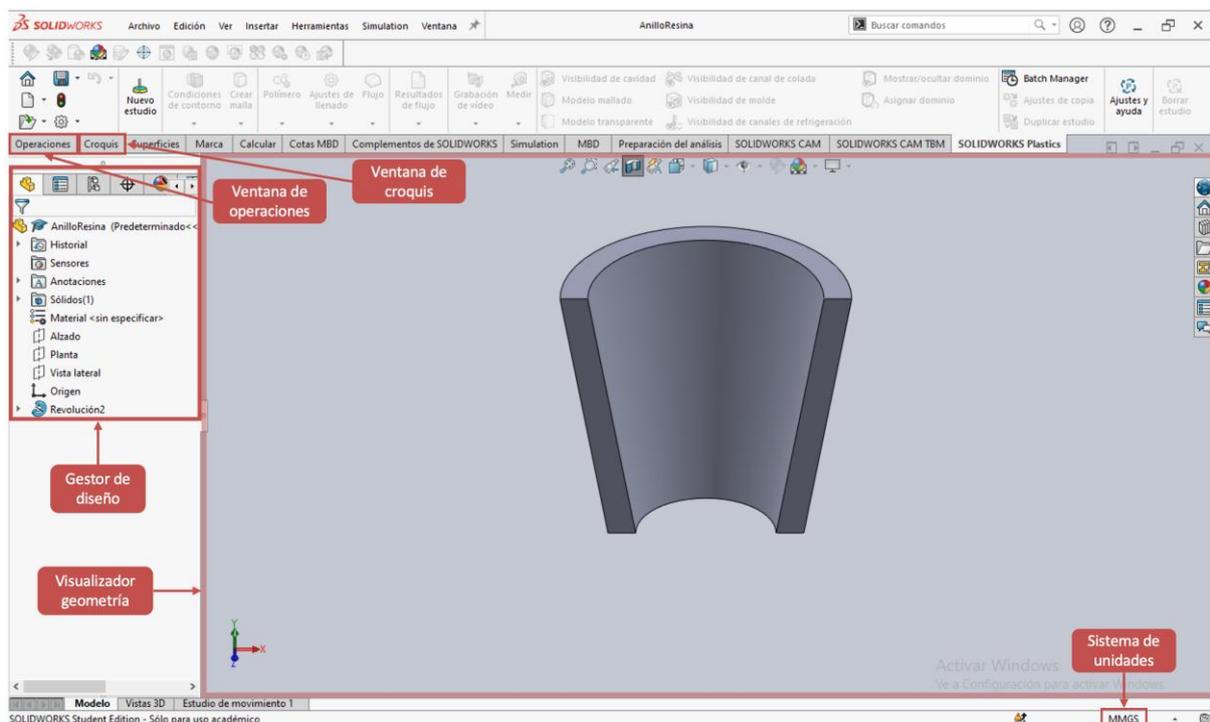


Figura 18. Interfaz de SOLIDWORKS

En la [Figura 18](#) se muestra el interfaz de SOLIDWORKS junto con los distintos módulos que proporciona la herramienta. Antes de comenzar a trabajar, es importante establecer las unidades de medida. En la esquina inferior derecha de la figura se puede apreciar el sistema de unidades con el que se trabaja: en este caso es MMGS (milímetro, gramo, segundo). En la parte izquierda se muestra el gestor del diseño destacando los tres planos del diseño (alzado, planta y vista lateral), los sólidos que se tienen y el historial de las operaciones que se han llevado a cabo. Este último es de gran utilidad ya que permite ocultar los pasos que se han realizado, desde los más nuevos a los más antiguos, para ver si esos pasos mejoran el diseño o no son realmente necesarios. En la parte central, se encuentra el visualizador de la geometría que se va formando, junto con el sistema de ejes XYZ para conocer la orientación de la figura en todo momento.

En la parte superior se observan las distintas ventanas de herramientas a utilizar durante el desarrollo de un modelo, destacando especialmente la ventana de croquis y operaciones. La ventana de croquis ([Figura 19A](#)), se utiliza para el dibujo en el plano de las geometrías deseadas. Se pueden utilizar geometrías tales como círculos, rectángulos, líneas, arcos y curvas de forma tanto independiente como combinada. Además, estas se pueden combinar para formar nuevas geometrías utilizando la operación de recortar entidades, herramienta que permite eliminar líneas internas siempre que la geometría siga siendo cerrada. Esta ventana de croquis también es muy importante ya que se pueden acotar las distintas distancias del diseño mediante el uso de la herramienta “cota inteligente”. Una vez se realiza el croquis, se utilizan los planos a diferentes alturas y perspectivas, junto con la barra de operaciones, para pasar del espacio bidimensional a figuras tridimensionales. En la ventana de operaciones ([Figura 19B](#)) se pueden observar operaciones muy utilizadas como son la extrusión de salientes y cortes, las revoluciones de salientes/bases y las matrices de simetría.

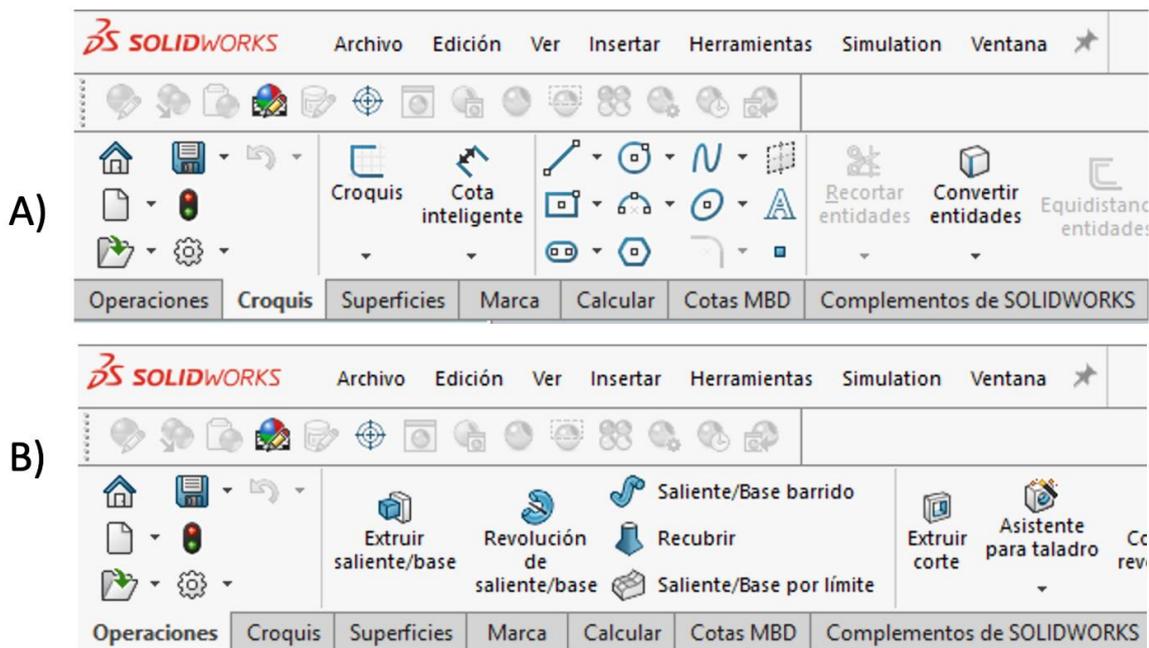


Figura 19. Ventana de croquis (A), y de operaciones (B) en SOLIDWORKS.

3.2. BIOIMPRESORA 3D

La bioimpresora utilizada para este proyecto es, en realidad, una impresora 3D convencional con una serie de modificaciones que la hacen adecuada para la bioimpresión. Esta impresora 3D se trata de una Fab@Home, una de las primeras impresoras 3D multimaterial de acceso libre. Originalmente, cuenta con un motor paso a paso en cada uno de los tres ejes de un sistema de coordenadas XYZ. Adicionalmente, cuenta con otro motor paso a paso con un tornillo coaxial a la jeringa del material. De esta forma, el material es empujado mediante un pistón durante la impresión. En la Figura 20, se muestra cómo es la Fab@Home en su origen en comparación con la modificada para bioimpresión. En el segundo caso, hay tres cambios principales respecto a la original. Primeramente, el sistema de extrusión no se hace mediante un sistema mecánico mediante tornillo si no que se hace mediante un sistema neumático. Cuando las válvulas de los conductos conectados a la bomba de aire se encuentran abiertas, este aire a presión empuja el pistón de la jeringa extruyendo el material. En segundo lugar, el soporte de la jeringa de material cuenta con un sistema de regulación de temperatura. Este está formado por un bloque de aluminio con un conducto para introducir la jeringa, junto con dos placas Peltier pegadas y dos ventiladores. Las placas Peltier consisten en un sistema que, mediante la aplicación de diferencias de potencial se consigue que un lado de la placa se caliente y el otro se enfríe. En tercer lugar, la base de lo que sería la cama caliente cuenta con un soporte para 4 platillos de cultivo de 35 mm. Alternativamente, se podría utilizar un soporte para un único platillo con un diámetro mucho mayor como se aprecia en el lado derecho de la base de la bioimpresora.

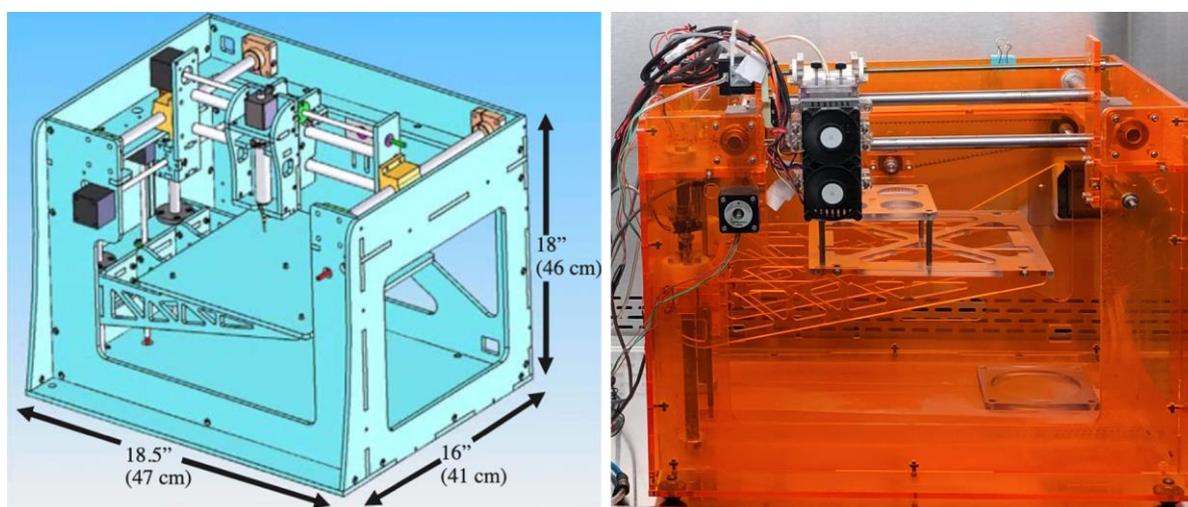


Figura 20. Esquema de Fab@Home original (izquierda) y Fab@Home modificada para bioimpresión (derecha).

La electrónica de la bioimpresora está compuesta por una placa de microcontrolador Arduino Mega 2560 Rev3 junto con un *shield* RepRap Arduino Mega Pololu Shield 1.4 (RAMPS 1.4). las conexiones

de los distintos componentes al *shield* se muestran en la [Figura 21](#). En el pin digital diez (D10) se encuentran conectadas dos placas peltier en serie. En función de si se invierte o no la polaridad en ese pin, junto con comentar o descomentar una línea del Marlin, las placas se encontrarán en modo calentamiento o en modo enfriamiento. Esto resulta de gran importancia cuando se trabaja en ambientes con mayor o menor temperatura que la temperatura a la que se debe imprimir. Tres motores paso a paso son los encargados de producir el movimiento lineal a lo largo de los tres ejes: X, Y y Z. También en el *shield* podemos ver conectados 3 finales de carrera, correspondientes a cada uno de los ejes del sistema de coordenadas XYZ. Estos finales de carrera se encuentran conectados a la patilla de normalmente cerrado. Esto quiere decir que los motores paso a paso se encuentran funcionando hasta que el cabezal llega a un final de carrera, activa el botón, abre el circuito y se detiene al no llegarle corriente. Existen 2 termistores conectados a la RAMPS, uno de ellos se encarga de medir la temperatura del ambiente mientras que el segundo se encuentra encastrado en un orificio de bloque de aluminio que contiene la jeringuilla con la biotinta. Este segundo termistor nos permite conocer la temperatura aproximada de la biotinta en cada momento, crucial para alcanzar la temperatura idónea de bioimpresión. Un par de ventiladores se encuentran ubicados colindantes con las dos placas Peltier para que estas funcionen de forma adecuada. El pin digital 9 (D9) es el encargado de conectarse con la válvula solenoide del sistema neumático que moverá el pistón de la jeringuilla. El funcionamiento consiste en el paso o cese de corriente a través de un solenoide produciendo o no un campo magnético. La presencia o ausencia de este campo magnético junto con un muelle, hará que se abra o cierre la válvula que permite el paso del flujo de aire desde el compresor de aire al pistón de la jeringa. Por último, los distintos componentes junto con el *shield* se alimentan de una fuente de alimentación conectada a este último.

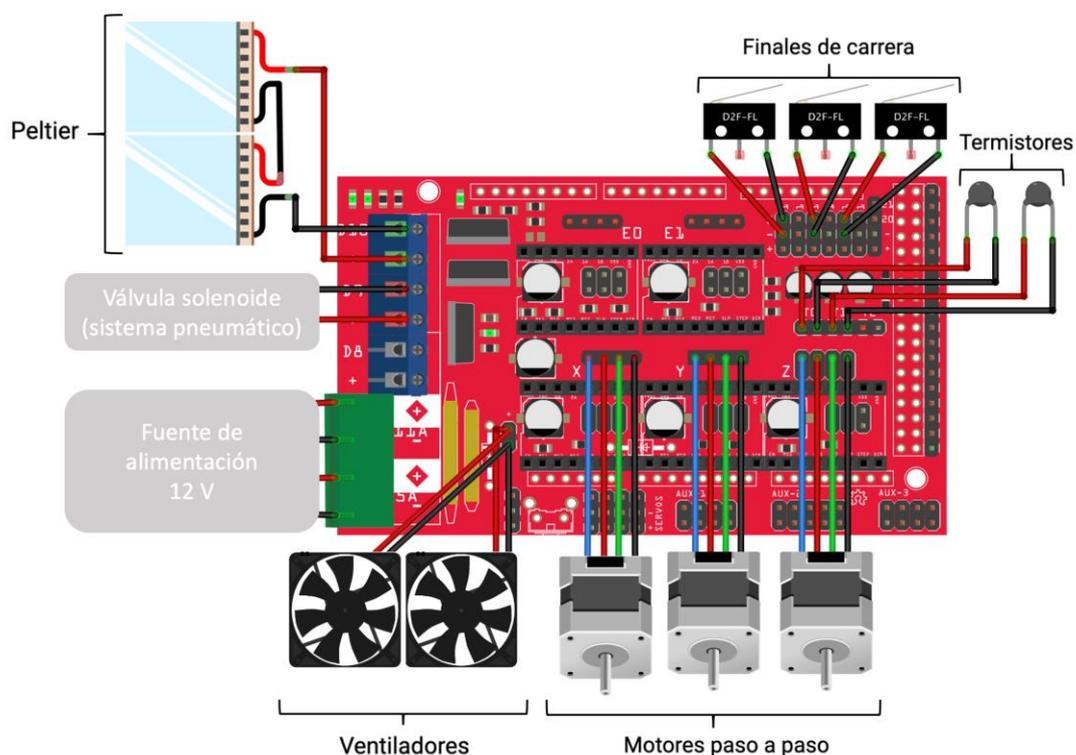


Figura 21. Conexiones de los componentes a la electrónica de la bioimpresora.

3.3. REPETIER-HOST

Repetier-Host (Repetier-Host V1.2.1, Willich, Alemania) es un programa de código abierto que permite controlar y monitorizar todo el proceso de impresión de un sólido. Esto incluye desde que se carga el modelo CAD hasta su laminado y generación del Gcode, instrucciones entendibles por la impresora para realizar la geometría.

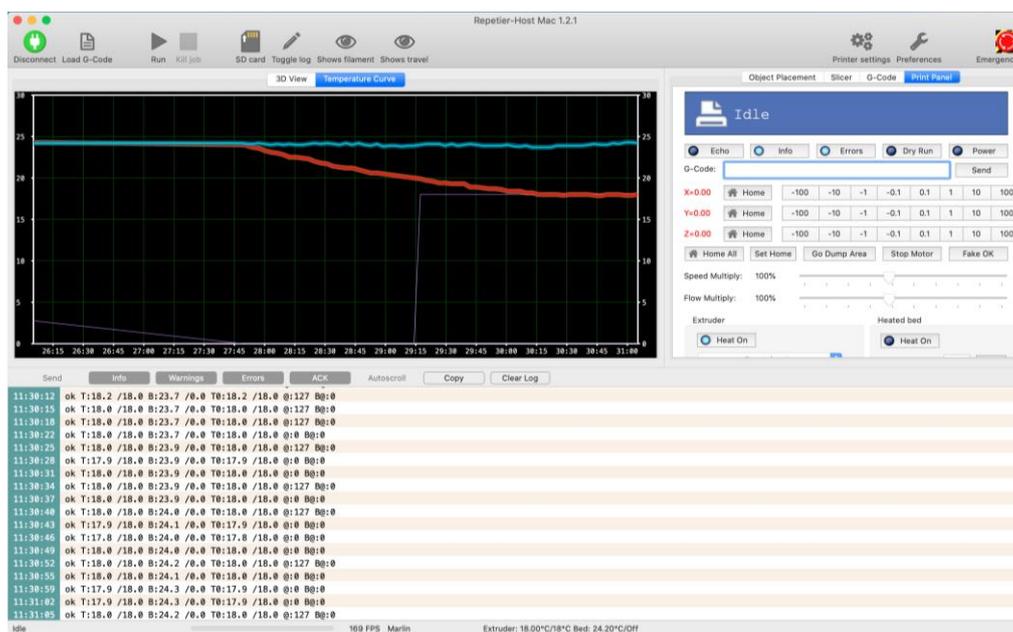


Figura 22. Interfaz de Repetier-Host.

En la Figura 22 se muestra el interfaz del programa Repetier-Host. En la parte izquierda se observan la pestaña 3D View y Temperature Curve. La pestaña de curva de temperatura permite caracterizar la temperatura en todo el proceso de bioimpresión mientras que la pestaña del 3D View permite visualizar geometrías importadas.

En la parte derecha se muestran otras cuatro pestañas: Object Placement, Slicer, G-Code y Print Panel. El uso combinado de las tres primeras pestañas permite pasar de un diseño, en archivo stl, a un archivo Gcode con las instrucciones necesarias para que la impresora realice el modelo completo. Es decir, la pestaña de Object Placement permite importar el archivo stl de la geometría y posicionarlo virtualmente en lo que será la superficie de impresión. La pestaña de Slicer lamina el sólido importado y genera el Gcode visualizado en la pestaña de Gcode. La pestaña de Print Panel permite, entre otras cosas, el control manual del desplazamiento del cabezal de la impresora y la introducción de comandos puntuales en lenguaje Gcode.

Por último, en la zona inferior del interfaz de Repetier aparece una ventana de mensajes. En ella se muestra, inicialmente, la conexión correcta del ordenador con la impresora. Acto seguido, aporta información de la temperatura del cabezal como la del ambiente. Mientras que la pestaña de Curva de Temperatura devuelve gráficamente el valor de los sensores de temperatura, esta ventana de mensajes nos dice de forma cuantitativa el valor de estos.

MÉTODOS

3.4. PREPARACIÓN MEDIO DE CULTIVO PARA HASC

El medio de cultivo se ha preparado de tal forma que fuera adecuado para las células madre mesenquimales que se han utilizado para realizar este trabajo, favoreciendo su mantenimiento y proliferación. Como se recoge en la [Tabla 1](#), para preparar 500 mL de este medio de cultivo, han sido necesarios 465 mL de medio esencial mínimo (DMEM (1X) GlutaMax), 5 mL de una mezcla de antibióticos (penicilina – estreptomicina), y 30 mL de suero fetal bovino.

Reactivos	Cantidad (mL)
DMEM (1X) GlutaMax	465
Penicilina - Estreptomicina	5
Suero Fetal Bovino (FBS)	30

Tabla 1. Preparación del medio de cultivo para hASC.

Como se muestra en la [Figura 23](#), los diferentes reactivos eran introducidos en un contenedor estéril. Acto seguido, se conectaba la bomba de vacío mediante un conducto a un tapón ubicado entre el contenedor inicial y el final. Este vacío producía el paso del medio de cultivo a través de un filtro de tal forma que, una vez pasaba al segundo contenedor, este medio ya se encontraba esterilizado. Tras su preparación, este podía ser utilizado en el momento o almacenarse en la nevera para su correcta conservación de 7 a 10 días. Si posteriormente se quería utilizar el medio de cultivo almacenado, este era atemperado en el incubador durante al menos una hora en condiciones fisiológicas (37°C y 5% de CO₂).

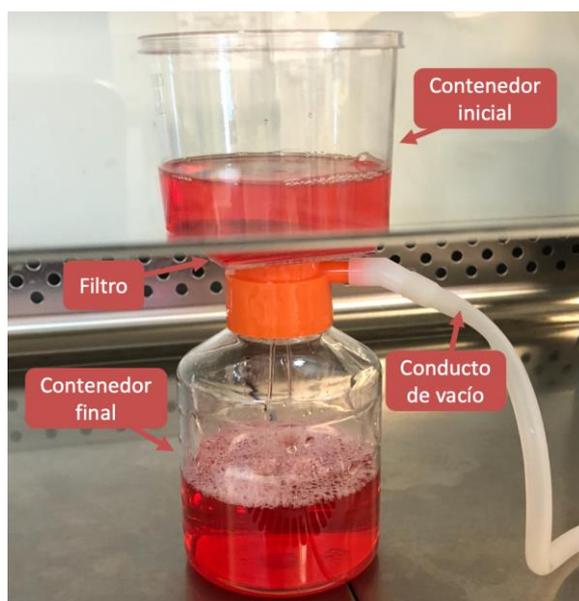


Figura 23. Sistema de esterilización del medio de cultivo.

3.5. DESCONGELACIÓN Y SIEMBRA CELULAR

Las muestras de células para descongelar eran transportadas desde el tanque de nitrógeno líquido (-196°C) a la cabina de cultivos en contenedores con hielo. Ya en la cabina, y antes de descongelar la muestra, se aplicaban 3 mL de medio de cultivo en un frasco de cultivo de 25 cm² (T25) y 6 mL de medio de cultivo en un tubo de centrifugar de 15 mL. La descongelación de los viales se realizaba manteniéndolos a 37 °C hasta observar los últimos cristales. En ese momento, se resuspendía la muestra con una micropipeta y se iba mezclando con el medio del tubo de 15 mL. Finalmente, la mezcla de los 6 mL de medio conteniendo la suspensión celular, se sembraba en el frasco de cultivo y se guardaba en el incubador a 37C y 5% de CO₂.

Es importante remarcar que, a las muestras preparadas para congelar, se les añadía dimetilsulfóxido (DMSO). Este compuesto químico es muy buen criopreservante, pero a temperatura ambiente, puede comprometer la viabilidad celular. Por ello, 24 horas después de la siembra, se reemplazaba el medio de cultivo por medio fresco.

3.6. CAMBIO DEL MEDIO DE CULTIVO CELULAR

Transcurridos dos días desde la siembra, se llevaba a cabo el cambio del medio de cultivo. Esto era necesario ya que en ese período de tiempo las células han consumido gran parte del medio preparado y han secretado desechos metabólicos que conviene eliminar. Para el cambio de medio, se aspiraba el medio residual con ayuda de una punta de pipeta conectada a una bomba de vacío. A continuación, se añadían 6 mL de medio de cultivo nuevo, previamente atemperado, y el matraz de cultivo se almacenaba en el incubador.

3.7. PASE CELULAR

Una vez las células alcanzaban el 80% de confluencia, estas se pasaban a nuevos platos de cultivo para continuar su expansión y crecimiento. El proceso consistía en aspirar el medio antiguo y aplicar tres lavados consecutivos con 3 mL de PBS. Tras la aspiración del último lavado, se aplicaban 3 mL de TrypLE™ Express, una enzima sintética utilizada para el despegue de las células de la superficie de cultivo. Después de haber incubado con esta enzima durante 5 minutos, se aplicaban unos ligeros toques al recipiente de cultivo para que el despegue de las células fuera más eficaz. La comprobación del correcto despegue de las células se hacía observando las células al microscopio. Para parar la reacción enzimática, del TrypLE™ Express, se añadían 6 mL de medio, homogeneizando para recuperar todo el contenido celular. Una vez recogida, la suspensión celular se traspasaba a un tubo de centrifugar de 15 mL. El contenido se centrifugaba a 1450 r.p.m. durante cinco minutos. Para que la centrifugación se hiciera de forma correcta, era necesario que hubiera el mismo número de tubos con los mismos volúmenes en la centrifugadora. Si el número de tubos a centrifugar era impar, se añadía un tubo adicional con el mismo volumen y se colocaba en la posición diametralmente opuesta para equilibrar. Tras la centrifugación, se aspiraba el sobrenadante y se añadían tantos mililitros de medio al sobrenadante como matraces se fueran a sembrar. Se resuspendía el medio para romper el pellet de células y conseguir una solución homogénea. En cada nuevo frasco de cultivo, con 6 mL

previamente suministrados, se disponía 1 mL de medio con células. Cuando se terminaba el pase celular, se rotulaban con el tipo celular, el pase, la fecha de siembra y el nombre del operador.

3.8. CONGELACIÓN CELULAR

La congelación celular no se hacía de manera tan frecuente como el resto de pasos anteriormente explicados. Esta se hacía cuando la cantidad de material biológico del que se disponía era suficiente y no hacía falta seguir expandiendo más cultivos. Otra razón por la que se podía congelar era al finalizar los experimentos si ya no se iba a seguir trabajando con esas células.

El procedimiento para la congelación celular era idéntico al del pase celular hasta el aspirado del sobrenadante. Llegados a este punto, el pellet se resuspendía con un medio especialmente preparado para congelación. Este medio de congelación estaba formado por medio de cultivo frío y DMSO 10% (v/v). Se resuspendía el medio de congelación con el pellet del tubo de centrifugar y se introducía 1 mL de la suspensión celular en cada criotubo. Acto seguido, se transportaban y almacenaban los criotubos en un contenedor de congelación Corning® CoolCell® en el congelador de -80°C. Transcurridos dos días, los criotubos se transferían al tanque de nitrógeno líquido de -196°C.

3.9. RECUENTO CELULAR

El recuento celular juega un papel muy importante a la hora de poder aplicar distintas densidades celulares en la formación de esferoides. El procedimiento del recuento celular es igual que los dos procedimientos anteriores hasta el aspirado del sobrenadante. Una vez se aspiraba todo el medio, se le añadía 1mL de medio y se resuspendían las células. Posteriormente, se añadían 10 µL de la suspensión celular junto a 10 µL de azul de tripano en un tubo de microcentrifuga. A continuación, se resuspendía la mezcla y se cargaban 10 µL en una cámara de Neubauer, dispositivo empleado para el recuento celular. Como se muestra en la [Figura 24](#), se ha cargado una de las dos posiciones de la cámara de Neubauer y se ha hecho el recuento celular. En la imagen de la derecha de esa misma figura se observa el patrón de cuadrados que presenta la cámara. Aquellos marcados en rojo son los que se han utilizado para llevar a cabo el recuento de las células y se ha hecho un promediado de los cuatro cuadrados en cada caso. En definitiva, al inyectar la muestra sobre la cámara, al observar esta en el microscopio invertido se veía cómo las células estaban sobre el patrón de la imagen. Para evitar recontar la misma célula por duplicado en caso de que las células cayeran sobre alguna de las cuatro aristas, para cada cuadradito que conforma cada cuadrado rojo, solo se contaban aquellas presentes en la arista izquierda y superior. Tras la obtención del promediado se aplicaba la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración celular} = \frac{\text{Número de células} \cdot 10.000}{\text{Número de cuadrados contados} \cdot \text{Dilución}}$$

Ecuación 1. Recuento celular con cámara de Neubauer.

donde el número de células se corresponde con la suma de todas las células contadas en todo el patrón, y el número de cuadrados se corresponde con el número de cuadrados rojos contados. En

definitiva, se trata de un promediado del total de células contadas en los cuadrados rojos. La dilución en todos los casos aplicados en este trabajo era de $\frac{1}{2}$ ya que siempre se diluían 10 μL de suspensión celular en 10 μL de azul de tripano. Por tanto, la fórmula se simplificaba de la siguiente manera:

$$\text{Concentración celular} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Número de cuadrados contados}} \cdot 20.000$$



Figura 24. Cámara de Neubauer cargada con una muestra (izquierda) y patrón de la cámara (derecha).

3.10. FORMACIÓN ESFEROIDES

Los esferoides son el tipo de agregado celular que se ha utilizado para introducir en la biotinta de gelatina-alginato. Para la producción de estos se han utilizado tres alternativas: el uso de *hanging drops*, la solución comercial Aggrewell™ 800 y un molde de elaboración propia.

3.10.1. HANGING DROPS

Los *hanging drops* son microgotas de suspensiones celulares en medio de cultivo depositadas en una placa Petri y puestas del revés para que queden colgando. De esta forma, con el paso del tiempo, y gracias al efecto de la gravedad, las células se van agregando, formando un esferoide. Para llevar a cabo este método primeramente se ha realizado un recuento celular con una cámara de Neubauer, estableciendo las concentraciones celulares deseadas por cada gota de 10 μL que se incorporaba a la placa Petri. En la [Figura 25](#) se muestra cómo quedaron las gotas sobre la tapa del plato Petri. Con el fin de que las gotas con las células no se resecaran, en la base del plato se añadía PBS. Para este método de formación de esferoides se utilizaron densidades celulares de 1.500 y 3.000 células por microgota.

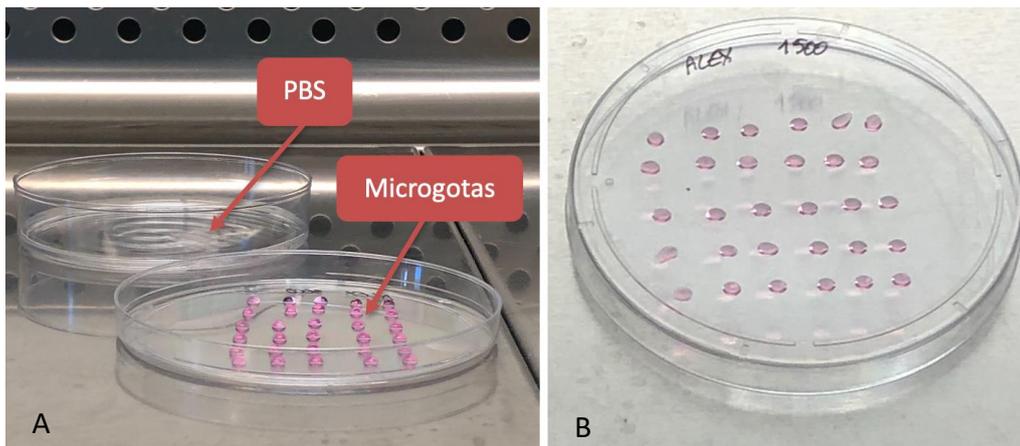


Figura 25. Sistema para la formación de esferoides mediante *hanging drops*.

3.10.2. AGGREWELL 800

Aggrewell™ 800 es un producto comercial de la marca STEMCELL™ Technologies que permite la formación de esferoides a partir de suspensiones celulares. Como los trabajos realizados por Tu et al. (2014) y Ungrin et al. (2008), este producto se basa en el uso de la repetición de microcavidades con diferentes geometrías. Este en concreto son microcavidades con forma de pirámides invertidas de tal forma que, al centrifugar la suspensión celular, las células se repartan de forma homogénea por estas para formar los esferoides. En la Figura 26 se puede observar una placa de Aggrewell™ 800 de 24 pocillos y la geometría de pirámides invertidas que conforman las microcavidades.

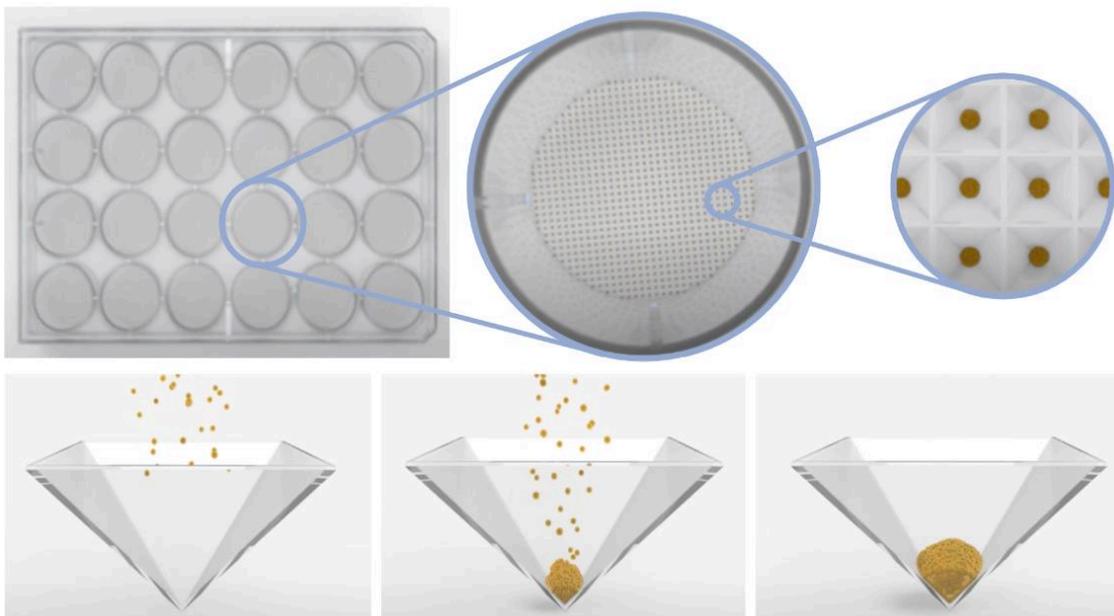


Figura 26. Estructura de la placa de Aggrewell para la formación de esferoides. Cada pocillo está formado por multitud de micropocillos de forma piramidal donde se forman los esferoides.

Preparación de las placas de formación de esferoides de Aggrewell

Antes de comenzar a preparar la placa, fue necesario atemperar medio de cultivo para que este se encontrara en las condiciones adecuadas. Lo primero que se hizo fue tratar con 500 μ L de solución de lavado de Aggrewell cada pocillo que se iba a utilizar. Se centrifugaba a 2000 r.c.f. durante cinco minutos en una centrifugadora con soportes para placas de 24, poniendo otra placa estándar con el mismo volumen en el mismo número de pocillos para compensar y que no se desequilibrara. Tras la centrifugación se observaba bajo el microscopio que no quedara ninguna burbuja y entonces se aspiraba la solución de lavado. El tratamiento previo de los pocillos con esta solución favorecía que las células no se adhirieran a la superficie, favoreciendo la formación de los esferoides. A continuación, se realizaba un lavado de cada pocillo a utilizar con 2 mL de medio atemperado, se aspiraba completamente y se añadía 1 mL del medio de cultivo completo.

Formación de los esferoides

Tras el recuento celular de las *hASCs*, se añadía la cantidad de células en suspensión deseada para cada pocillo. Para conocer el número de células a introducir por pocillo bastaba con conocer el número de células que se querían por microcavidad y aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células por pocillo} = \text{N}^{\circ} \text{ células deseadas por } \underline{\text{micropocillo}} \cdot 300$$

Ecuaación 2. Estimación celular por pocillo según densidad celular de esferoide.

donde 300 se corresponde con el número estimado de micropocillos presentes en cada pocillo de la placa. Se añadía la cantidad de células deseadas junto con medio de cultivo hasta llegar a un volumen final por pocillo de 2 mL y se resuspendía el contenido de cada pocillo. Acto seguido, se centrifugaba la placa de 24, junto con otra placa de 24 con el mismo volumen para compensar, a 100 r.c.f. durante 3 minutos. Esto favorecía que las células cayeran en los micropocillos de cada pocillo de forma más rápida. Se observaba la placa bajo el microscopio para verificar el reparto homogéneo de las células y se introducía en el incubador a 37°C y 5% de CO₂. Utilizando este tipo de placas se apreció que a partir de las 24 horas se empezaban a formar esferoides.

Cambio del medio de cultivo

Para que las células recibieran nuevos nutrientes y otros factores, así como la eliminación de los desechos generados, se cambiaba el medio a los pocillos cada 2-3 días. Se retiraba parcialmente el medio antiguo (de 1 a 1,5 mL del total) y se reponía con medio nuevo atemperado. Era importante que el cambio de medio, con pipeta de 1000 μ L o con pipetas serológicas de 2 o 5 mL, se hiciera de forma lenta para que no se levantasen las células de los micropocillos.

Recolección y recuento de los esferoides

Antes de la recolecta era importante haber atemperado medio de cultivo, necesario próximamente. La recolección consistía en la aspiración de la mitad del medio con una micropipeta de 1000 μ L para,

a continuación, devolver ese medio con fuerza al pocillo, levantando las células sin llegar a romperlas. Era importante que la punta de la pipeta fuera lo suficientemente grande para que los esferoides pudieran ser recogidos sin ser dañados. Se añadía 1 mL adicional a los pocillos para recolectar los esferoides que permanecían en los micropocillos. Aunque el número esperado de esferoides era de aproximadamente 300, se podía llevar a cabo un recuento de estos resuspendiendo el contenido de los pocillos 2-3 veces para que se distribuyera de forma homogénea y obteniendo un volumen de 50 μ L. El número total de esferoides se podía estimar atendiendo a la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ esferoides} = \frac{N^{\circ} \text{ esferoides (en } 50 \mu\text{L)} \cdot \text{volumen de suspensión total de esferoides } (\mu\text{L)}}{50 \mu\text{L}}$$

Ecuación 3. Estimación número total de esferoides por pocillo sembrado.

3.10.3. MOLDES PROPIOS

Diseño CAD

Además de las técnicas anteriormente mencionadas, se realizó una serie de diseños utilizando el programa de SOLIDWORKS con el objetivo de crear una serie de moldes para la formación de las microcavidades y poder así formar esferoides celulares. Esta técnica de formación de los esferoides comenzó con la elaboración de una serie de moldes en dicho programa de diseño. Los moldes finales se consiguieron tras un proceso de diseño y optimización cuando se encontraban ciertas limitaciones al modelo. En la [Figura 27](#) se muestra el diagrama de flujo seguido hasta la obtención del modelo final. La valoración funcional de cada modelo diseñado se hizo mediante reuniones con los tutores. Una vez se llegó a un modelo definitivo, este fue fabricado. En el siguiente capítulo, en el apartado [4.1. MODELOS SOLIDWORKS](#) se comentará más en detalle las limitaciones que presentaban los diseños descartados hasta llegar al definitivo.

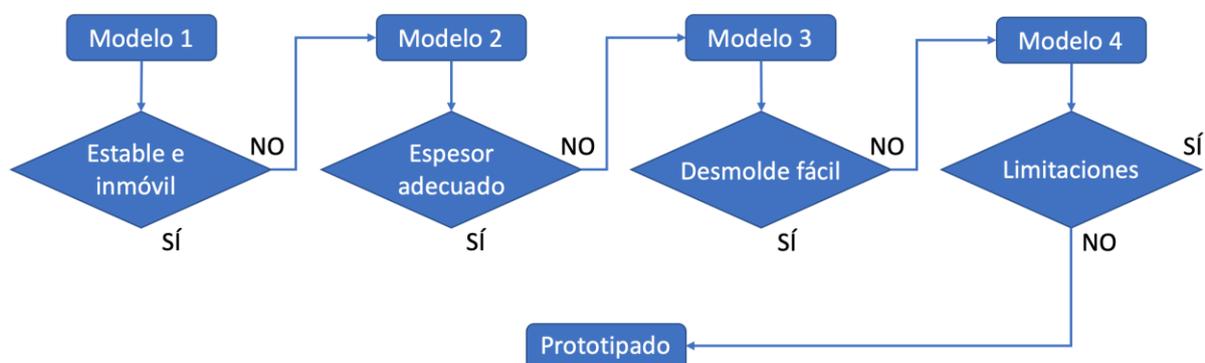


Figura 27. Diagrama de flujo para el diseño y optimización de los moldes CAD

Prototipado e impresión

Tras el proceso de rediseño y optimización se observó que el modelo 4 de SOLIDWORKS, era aquel que mejor cumplía con las expectativas de lo que se quería producir. Con el fin de conocer si el modelo seleccionado pudiera tener alguna limitación al ser fabricado, se hizo el prototipo utilizando la impresora 3D Prusa I3 MK3S y el laminador PrusaSlicer (Figura 28). Este prototipado era recomendable ya que permitía verificar que el modelo era adecuado antes de imprimirlo definitivamente con la impresora de estereolitografía. Esta impresora era necesaria ya que tenía mayor resolución, necesaria para la fabricación de las microcavidades donde se formarían los esferoides.

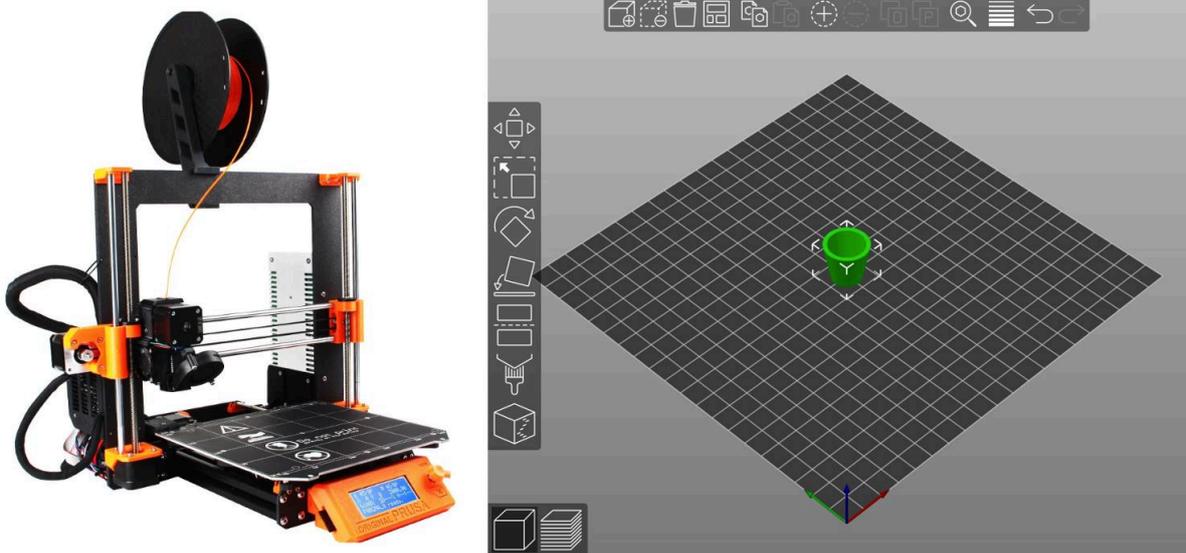


Figura 28. Impresora 3D Prusa I3 MK3S utilizada para el prototipado, junto con el visualizador del programa de laminado PrusaSlicer.

Moldes de PDMS

La producción de los moldes de PDMS se hizo mezclando una base con un agente curante en una proporción 10:1. La base era el elastómero de silicona 184 de SYLGARD™ y el agente curante era el propio para este elastómero de silicona, también de SYLGARD™. Tras pesar 20 gramos de la base, se añadían 2 gramos del agente curante y se mezclaba todo durante varios minutos. A continuación, como se muestra en la Figura 29B, se llenaban los moldes hechos por impresión con la mezcla del PDMS. Posteriormente, se llevaba a cabo el proceso de eliminación de las burbujas de aire para que el PDMS se introdujera perfectamente en los patrones de las microcavidades y que estas se formaran de forma precisa (Figura 29C). Finalmente, los moldes rellenos del PDMS se dejaban curando durante toda la noche en una estufa a 60 °C para que la mezcla se endureciera (Figura 29D).

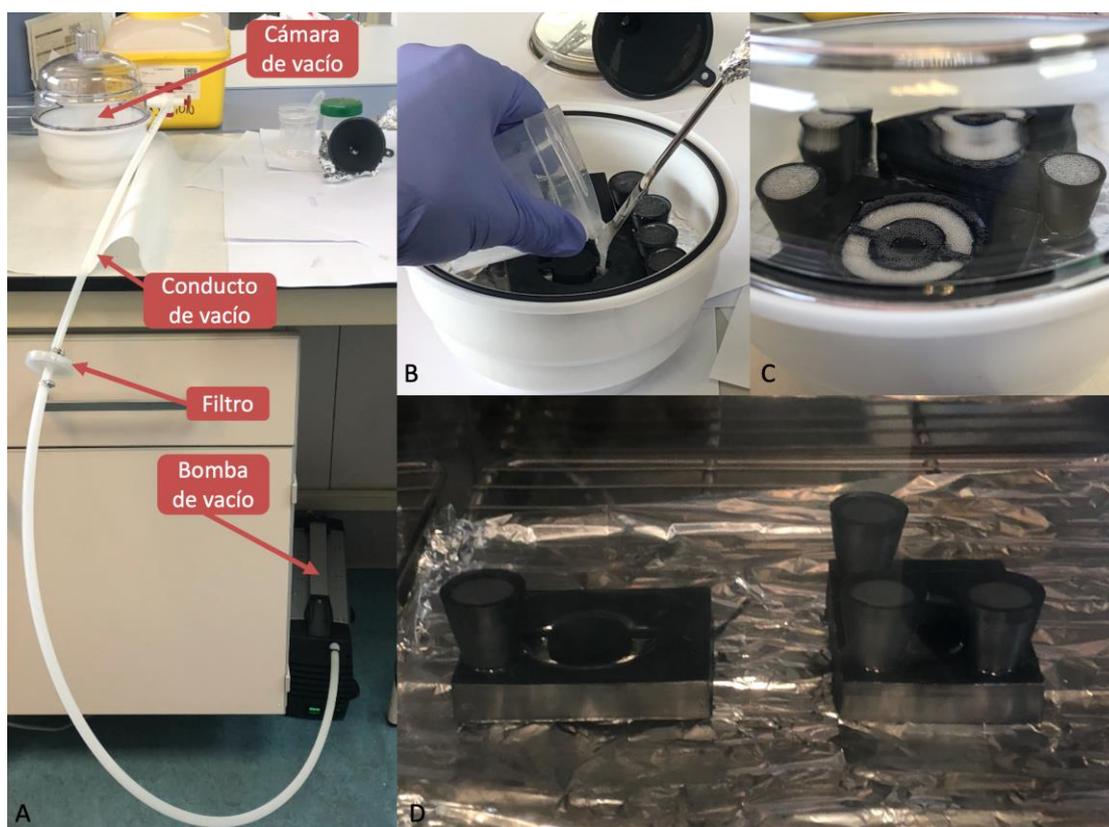


Figura 29. Sistema de vacío utilizado para la producción de los moldes de PDMS (A), junto con los pasos de llenado de los moldes (B), eliminación del aire (C) y curado por calor (D).

Preparación de la agarosa

Se preparó una solución de agarosa con cloruro sódico para rellenar los moldes de PDMS y así crear el dispositivo donde se formarían los esferoides. Se colocó una botella de vidrio de tapón roscado sobre un termoagitador magnético con 50 mL de agua MiliQ. Mientras que el agua era agitada, debido a la introducción de una barra magnética en la botella, se añadió progresivamente los 0,45 gramos de cloruro sódico y, posteriormente, el gramo de agarosa en polvo. En la [Tabla 2](#) se recogen, a modo de resumen, los reactivos junto con sus cantidades. Tras la preparación de la disolución, ésta fue esterilizada en un autoclave a 120°C durante 20 minutos. La razón por la cual se añadió el cloruro sódico a la disolución fue para que la estructura de agarosa que se creaba posteriormente fuera capaz de mantenerse en estado sólido dentro del incubador. Esta condición era fundamental para poder sembrar la suspensión celular en el molde y que los esferoides se pudieran formar con el paso del tiempo.

Reactivos	Cantidad
Agua MiliQ	50 mL
NaCl	0,45 g
Agarosa	1 g

Tabla 2. Reactivos necesarios para la preparación de la solución de agarosa.

Formación del molde de agarosa

Una vez se tenía preparada la disolución de agarosa, se colocaban los dos moldes de PDMS sobre una placa de vidrio para poder verter dicha disolución. Primeramente, se colocaba el patrón circular de las microcavidades sobre la placa de vidrio. Presionando el molde de PDMS del patrón contra la placa se conseguía eliminar el aire entre las dos superficies en contacto, haciendo que hubiera adherencia. Posteriormente, presionando nuevamente, se colocaba el anillo de PDMS de forma concéntrica al patrón circular para que el montaje quedara como se muestra en la [Figura 30](#).

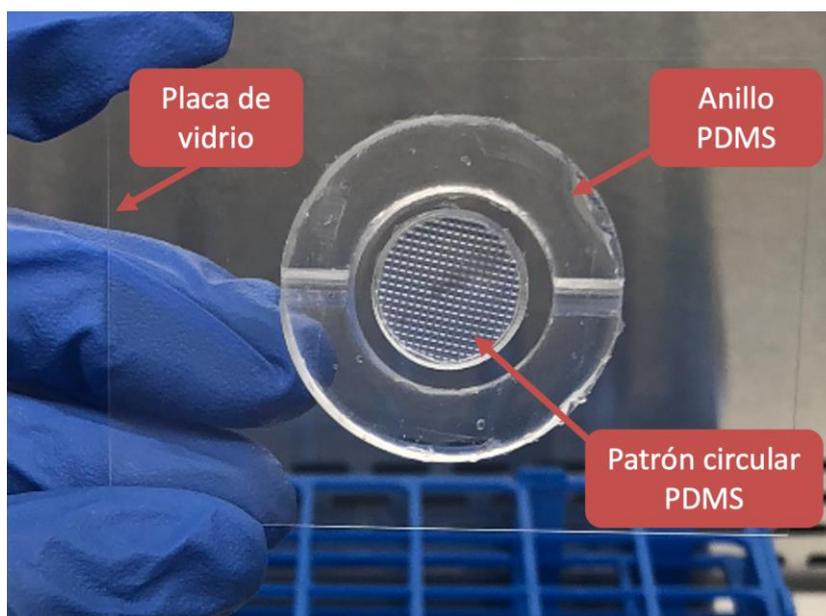


Figura 30. Montaje de los moldes de PDMS sobre la placa de vidrio.

3.11. PREPARACIÓN DE LA BIOTINTA GELATINA-ALGINATO

La biotinta utilizada para la bioimpresión 3D estaba compuesta de gelatina-alginato, mezcla bastante utilizada (Li et al., 2018). Para su fabricación se disolvieron 10 gramos de gelatina porcina tipo A en una botella de vidrio de tapón roscado con 50 mL de agua MiliQ, dando lugar a gelatina 20% (w/v). En otra botella, se disolvieron 2 gramos de alginato sódico con otros 50 mL de agua MiliQ, para generar alginato 4% (w/v). Para favorecer la correcta disolución de la gelatina y el alginato en el agua MiliQ, estos reactivos se añadían lentamente mientras el agua era agitada en un termoagitador magnético a unos 60°C. Ambas preparaciones eran esterilizadas posteriormente utilizando autoclave.

A la hora de preparar las jeringas para la bioimpresión, se mezclaban 750 μ L de alginato con 750 μ L de agarosa. Puesto que el volumen pasó a ser el doble, los reactivos entonces eran gelatina 10% (w/v) y alginato 2% (w/v). Esta mezcla se hacía en tubos de centrifugación de 15 mL que se mantenían en un baño de agua a 37°C dentro de la cabina de flujo laminar. Para incorporar la parte celular a la biotinta, los esferoides eran centrifugados y el sobrenadante era aspirado. A continuación, se incorporaban 50 μ L de medio a los esferoides centrifugados y se daban pequeños golpecitos contra

la mesa a la base del tubo centrifugado para que los esferoides se separaran. Una vez hecho esto, con el uso de una micropipeta del 1000 μ L se resuspendían los esferoides y se introducían en la jeringa de bioimpresión, cuya capacidad máxima era de 3 mL. A continuación, se incorporaba la mezcla de 1,5 mL de gelatina 10% (w/v) – alginato 2% (w/v) a la jeringa de bioimpresión con las células, se resuspendía y ya estaba lista la jeringa para montar en la bioimpresora (Figura 31).

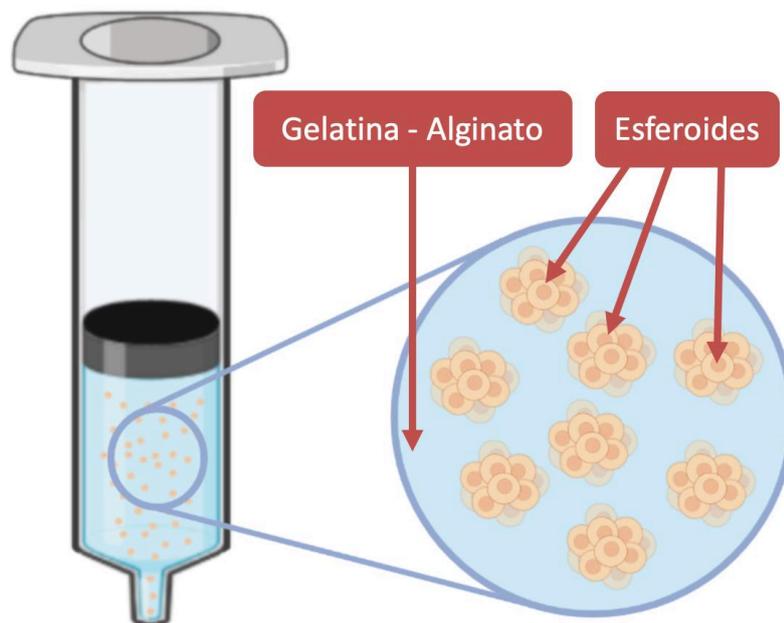


Figura 31. Biotinta de gelatina - alginato con esferoides celulares en suspensión. Creado con Biorender.

3.12. CONFIGURACIÓN DE BIOIMPRESIÓN

La configuración de la bioimpresora para realizar la plataforma de cultivo celular, se ha hecho utilizando el programa de Repetier-Host, descrito anteriormente. Las pestañas del programa relevantes en el desarrollo del proyecto fueron la de Gcode, Print Panel y Temperature Curve, además de la ventana de mensajes. El resto de las pestañas no tenían interés en el proyecto debido a que la geometría a bioimprimir se creaba directamente escribiendo el Gcode, por lo que no había que importar ni laminar la geometría. La ventana de Print Panel ha permitido hacer comprobaciones como desplazar manualmente el cabezal de bioimpresión o la introducción de comandos gcode puntuales, también para comprobaciones.

Una parte fundamental en el desarrollo de este proyecto ha sido la constante comprobación de la temperatura para que esta fuera la adecuada para bioimprimir. Por ello, es importante destacar los modos de temperatura configurables en la bioimpresora: el modo calentamiento y el modo enfriamiento.

Modo calentamiento y modo enfriamiento

Como se puede apreciar en la [Figura 32](#), se muestran dos líneas, una roja y una azul, apreciables en la ventana de curva de temperatura de Repetier. La curva azul, se corresponde con el sensor de temperatura ambiente, mientras que la curva roja se corresponde con el sensor de la temperatura de extrusión. Cuando se trabajaba en modo calentamiento, la mínima temperatura que podía alcanzar el extrusor era la de la temperatura ambiente. Por el contrario, cuando se trabajaba en modo enfriamiento, la máxima temperatura que podía alcanzar el extrusor era la de la temperatura ambiente.

Esto se ha tenido en cuenta por dos razones. Primeramente, porque en función de si se imprimía en la sala blanca (17 °C de temperatura ambiente) o en el laboratorio (27 °C de temperatura ambiente) hacía falta trabajar en un modo u otro para alcanzar una temperatura óptima de impresión de 26 °C. En segundo lugar, el cambiar de un modo de trabajo al otro implicaba invertir la polaridad del pin digital 10 de la RAMPS, comentar o descomentar una línea de código del Marlin y volver a cargarlo en la placa.

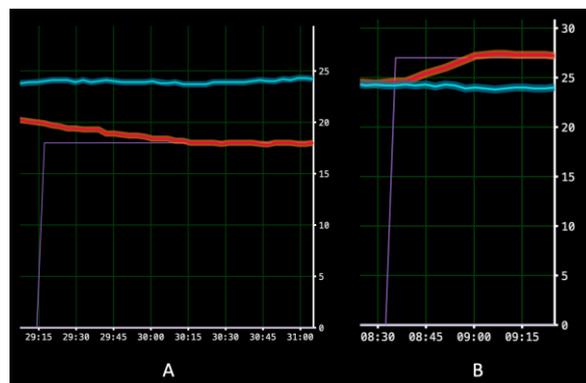


Figura 32. Bioimpresora en modo enfriamiento (A) y en modo calentamiento (B), visto desde la ventana de Curve Temperature de Repetier-Host. Nótese que la línea azul se corresponde con la temperatura ambiente y la línea roja con la temperatura en el cabezal de bioimpresión.

3.13. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

3.13.1. EXTRACCIÓN ARN

Para la extracción del ARN de las células madre humanas derivadas del tejido adiposo se ha utilizado el RNeasy® Plus Mini Kit de la marca Qiagen. A diferencia de otros kits, este puede almacenarse a temperatura ambiente, entre 15 y 25 grados centígrados, durante al menos 9 meses. Pevio a la realización de la purificación del ARN, se prepararon una serie de reactivos. Por un lado, se mezclaron 10 µL de β-mercaptoetanol con 1 mL del Buffer RLT antes de ser utilizado. Esta preparación podía utilizarse durante un mes antes de que perdiera sus propiedades. Otra preparación que se debía hacer era añadir 4 volúmenes (44 mL) de etanol (96-100%) al bote de Buffer RPE, el cual contenía 11 mL concentrados. Así el buffer final contenía 55 mL de la mezcla

etanol-buffer concentrado. También se preparó una alícuota de 10 mL de etanol al 70% mezclando 7 mL de alcohol absoluto (pureza $\geq 99\%$) con 3 mL de agua.

El procedimiento comenzó con la recolección de las células, centrifugando para ello la muestra y aspirando el sobrenadante para quedarse con el pellet. Puesto que la muestra de células contenía menos de $5 \cdot 10^6$ células, se añadió 350 mL de Buffer RLT Plus como se indicaba en una tabla del protocolo. Acto seguido se homogeneizaba usando un vórtex durante al menos 30 segundos hasta que el pellet desaparecía. Para asegurar, aún más, una correcta homogeneización, la suspensión celular se resuspendía 5 veces utilizando una jeringuilla de 1 mL con boquilla 29G (0,33 mm). El lisado celular ya homogeneizado se transfería a una columna de centrifugación eliminadora del ADN genómico (ADNg) que reposa sobre un tubo colector de 2mL. Tras centrifugar a 10000 r.p.m. durante 30 segundos, se descartaba la columna y se utilizaba la parte filtrada que reposa en el tubo colector. Se añadía 350 μ L de etanol al 70% y se resuspendía para homogeneizar. La muestra de 700 mL se transfería a un tubo de centrifugación RNeasy depositado sobre un tubo colector de 2 mL y, tras centrifugar a 10000 r.p.m. durante 15 segundos, se desechaba el tubo colector. A continuación, se añadían 700 μ L de Buffer RW1 a la columna de centrifugación RNeasy depositada sobre otro tubo colector de 2 mL y se centrifugaba a 10000 r.p.m. durante 15 segundos, descartando de nuevo el tubo colector. Se hacía un lavado añadiendo 500 μ L de Buffer RPE a la columna de centrifugado RNeasy, se centrifugaba a 10000 r.p.m. durante 15 segundos y se desechaba el tubo colector. Este último paso se repetía una segunda vez durante 2 minutos más. Adicionalmente, se centrifugaba a máxima velocidad durante un minuto para secar aún más la membrana. Tras el secado de la membrana, se colocaba la columna de centrifugación RNeasy sobre un tubo Eppendorf de 1,5 mL, se añadía 50 μ L de agua libre de ARNasa y se centrifugaba a 10000 r.p.m. para eluir el ARN. Para concluir con el procedimiento de extracción del ARN, se repetía este último paso. Es importante mencionar que tanto la campana donde se trabajó en el laboratorio de biología molecular como los guantes que se utilizaron, fueron desinfectados utilizando RNase Zap.

3.13.2. OBTENCIÓN ADN COMPLEMENTARIO

Una vez aislado el ARN, se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc). Para ello, se utilizó dicho ARN junto con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Para la síntesis de ADNc fue necesario la preparación de una mezcla maestra con diferentes reactivos que se recogen en la siguiente tabla (Tabla 3).

Reactivos	Cantidad (μ L)
10X RT Buffer	2,8
25X dNTP Mix (100 mM)	1,1
10X RT Random Primers	2,8
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,4
Nuclease free water	5,9

Tabla 3. Reactivos, junto con sus cantidades, para formación de la mezcla maestra.

Posteriormente, el total de la mezcla maestra era añadida a un volumen igual de muestra de ARN. Tras la homogeneización y centrifugado de la solución anterior, se llevaba a cabo la transcripción inversa para la síntesis del ADNc. Para ello, se programaba un termociclador en 4 pasos, con diferentes temperaturas y tiempos para cada paso, como se recoge en la [Tabla 4](#). Programa de temperatura para la síntesis de ADNc.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo (minutos)	10	120	5	Inf.

Tabla 4. Programa de temperatura para la síntesis de ADNc.

3.13.3. PCR CUANTITATIVA

Este tercer paso para el análisis de la expresión génica no ha sido posible realizarlo debido a la avería de uno de los equipos. No obstante, el procedimiento que se seguiría sería utilizar el kit FastStart PCR Master Mix. El volumen de reacción contendría 1µL de ADNc, 12.5 µL de Mastermix, 9 µL de H₂O y 0.6 µM del mix de cebadores correspondiente al tipo de detección.

El programa a utilizar para la amplificación sería un primer paso de 95°C durante 1 minuto. A continuación, le seguirían 38 ciclos repetitivos que consistirían en 30 segundos a 95°C, seguidos de 30 segundos de la temperatura de hibridación correspondiente a la pareja de cebadores utilizados y 45 segundos a 72°C. Finalmente, se realizaría un paso adicional de 72°C durante 7 minutos.

3.14. TINCIÓN CÉLULAS VIVAS/MUERTAS

Este tipo de ensayos, presentados en forma de kits como el utilizado, LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit for Mammalian Cells, resultan de gran utilidad ya que permiten evaluar las células que se encuentran vivas y las que se encuentran muertas una vez se hayan bioimpreso los patrones con la biotinta. Se basa en la tinción de las células en color verde si estas se encuentran vivas, y en color rojo si están muertas.

El principio de funcionamiento consiste en que las células vivas presentan actividad esterasa intracelularmente, y esta se puede determinar por la conversión de la calceína AM, que no es fluorescente, en calceína, que sí lo es. Es decir, la actividad de las enzimas esterasas de las células vivas, hidrolizan la calceína AM, que no es fluorescente, en calceína. Esta calceína se retiene en las células vivas produciendo un color verde intenso, excitándose con longitudes de onda de 495 nm y emitiendo fluorescencia con longitudes de onda de 515nm ([Figura 33](#)).

El homodímero-I de etidio se utiliza para evaluar las células que se encuentran muertas. Cuando este homodímero entra en células con la membrana dañada, este se une a ácidos nucleicos y mejora su fluorescencia emitiendo un color rojo intenso en estas células muertas (siendo excitado a longitudes de onda de aproximadamente 495 nm y emitiendo fluorescencia en 635 nm). Por el contrario, si la célula está viva el homodímero-I de etidio no penetra al interior celular al encontrarse la membrana intacta. En la [Figura 33](#), se muestra, de forma esquemática, el principio de funcionamiento del ensayo de viabilidad celular por tinción de células vivas-muertas.

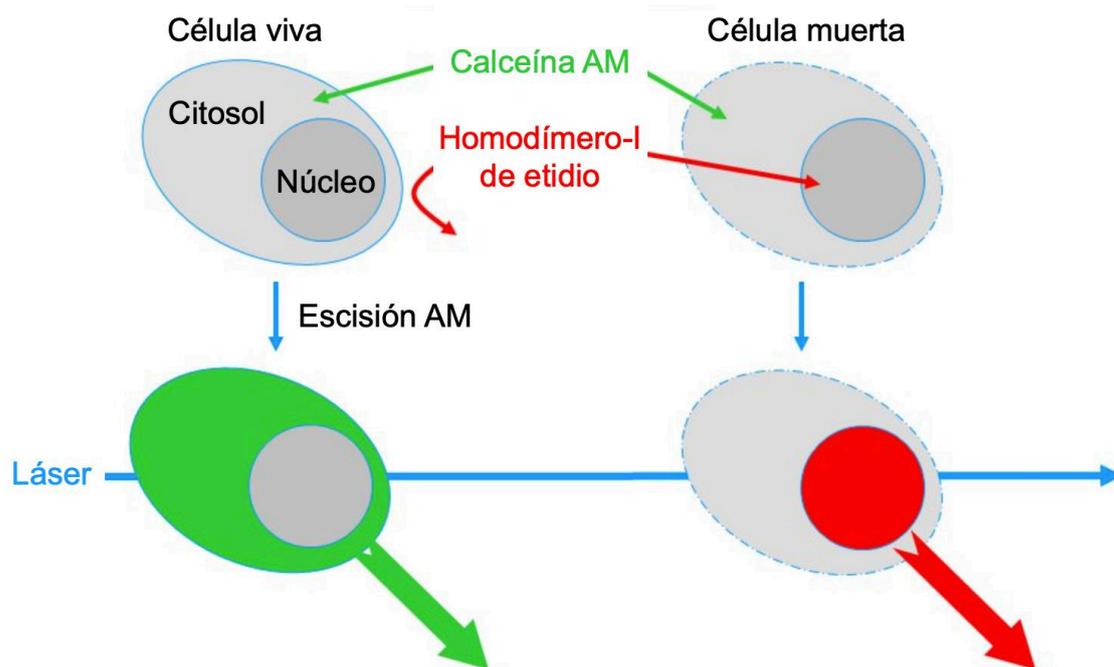


Figura 33. Mecanismo de funcionamiento del ensayo de células vivas/muertas.

3.15. CRIOCORTES DE ESFEROIDES

Transcurrido el período de cultivo establecido en la planificación de los experimentos, se procedió a aislar y fijar los esferoides. Esto fue necesario para realizar los criocortes y poder caracterizarlos, posteriormente, empleando inmunohistoquímica.

En primer lugar, los esferoides se recogieron en un tubo de centrifugar de 15 mL, y se procedió a su centrifugación a 1400 r.p.m. para eliminar el sobrenadante. Tras repetir esta operación lavando 3 veces con 5 mL de PBS, las muestras se fijaron por inmersión añadiendo 1 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% (w/v) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalizada la fijación, se lavaron las muestras 3 veces con PBS, a intervalos de 5 minutos. Por último, los esferoides fueron embebidos en agar al 0,2 % (w/v) y congelados por inmersión en nitrógeno durante 1 minuto. Para obtener cortes histológicos, las preparaciones fueron desmoldadas y colocadas en el criostato. Los cortes, con un

grosor de 7 micras, fueron pegados en portaobjetos superfrost y guardados a -20°C hasta la realización de las pruebas de inmunohistoquímica.

3.16. PREPARACIÓN DE INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica es un estudio histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno, aplicado a una muestra de tejido orgánico, correctamente fijada e incluida. El complejo antígeno-anticuerpo así formado, mediante la utilización de alguna de las técnicas específicas, como peroxidasa antiperoxidasa y fluoresceína, permite ser localizado e identificado dentro de las muestras tisulares o citológicas a estudiar, logrando la identificación de marcadores antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular, con lo que se determina el tipo de célula involucrado en la muestra.

Para realizar este ensayo, se procedió de la siguiente manera:

1. Se creó una cámara húmeda en una caja de portaobjetos, utilizando papel mojado con agua destilada.
2. Por otro lado, se colocaron los portaobjetos con las muestras sobre una superficie plana y se realizaron tres lavados, a intervalos de cinco minutos, en el agitador a velocidad suave para eliminar los restos de OCT.
3. Se preparó el tampón bloqueo:
 - a. 0,1% Tritón (detergente para eliminar membrana celular)
 - b. 10% NGS (suero que bloquea uniones específicas)
 - c. 90% PBS
4. Se añadió el anticuerpo primario diluido en el tampón bloqueo.
5. Se realizaron cinco lavados de PBS, a intervalos de cinco minutos, cubriendo con parafilm después de cada lavado.
6. Se añadió el anticuerpo secundario, también diluido en el tampón bloqueo.
7. Se repitieron los lavados como en el paso 5.
8. Se añadió el medio de montaje.
9. Se guardó la muestra en la nevera de 4°C hasta su uso.
10. El cubreobjetos de la muestra se fijó aplicando pintauñas en las esquinas.

3.17. ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

3.17.1. ANÁLISIS IMÁGENES

Las imágenes obtenidas de los esferoides han sido analizadas con el programa ImageJ (ImageJ V1.53a, NIH, USA), programa de código abierto y licencia de dominio público, para el análisis y procesamiento de imágenes. El análisis de las imágenes ha consistido en la obtención de los

diámetros de los esferoides de las distintas densidades sembradas. Gracias a esta herramienta, además de los diámetros de los esferoides, se ha podido realizar un recuento de estos.

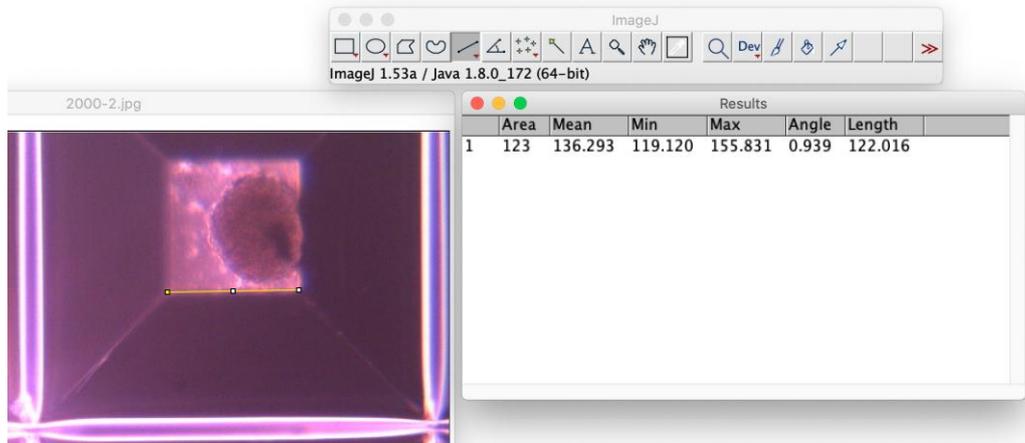


Figura 34. Interfaz de ImageJ. La barra de herramientas (arriba), imagen cargada en el programa (izquierda) junto con la herramienta de línea, en amarillo, siendo utilizada y el panel de resultados (derecha).

La Figura 34 muestra distintos momentos del análisis de distancias. Primeramente, se cargó la imagen con la cual se quería trabajar. Una vez abierta la imagen en el programa, se pulsaba el botón de la línea y se hacía del tamaño que se deseaba medir. A continuación, seleccionando Analyze >> Measure, emergía la ventana de resultados donde se muestran parámetros como el área, el ángulo y la longitud, en píxeles. Para poder trabajar en unidades del sistema métrico decimal, en vez de en píxeles, era necesario conocer una longitud de la imagen. De esta manera se establecía una conversión de píxeles a la unidad deseada (en este caso micrómetros) para poder trabajar en una unidad de medida que fuera de utilidad (Figura 35). Finalizado todo este proceso, se realizaban las medidas de los esferoides. Para que pudiera ser lo más fiable posible, cada diámetro de esferoide se medía 10 veces y el resultado de la media es el que se tomaba como verdadero (Analyze >> Summarize o Results >> Summarize). El programa ImageJ también permitía colocar una barra de escala en las imágenes para dar una idea de tamaño en micrómetros a las personas que observan la imagen. Para ello, una vez se establecía la conversión de píxeles a micrómetros bastaba con ir a Analyze >> Tools >> Scale Bar.

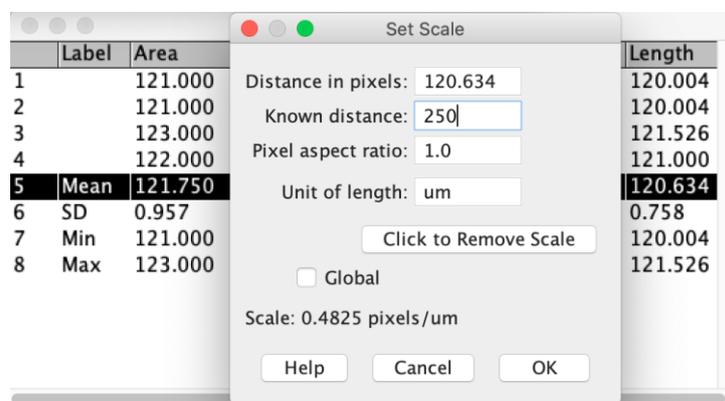


Figura 35. Conversión de píxeles a micrómetros en ImageJ.

3.17.2. PROCESAMIENTO IMÁGENES

El procesamiento de las imágenes fue útil para aquellas obtenidas con el microscopio de fluorescencia. Cuando se analizaron las muestras con los distintos filtros de fluorescencia, cada imagen filtrada se capturó como una imagen de escala de grises. Posteriormente, mediante ImageJ, se procesaron las imágenes para obtener la versión en color como se muestra en la [Figura 36](#).

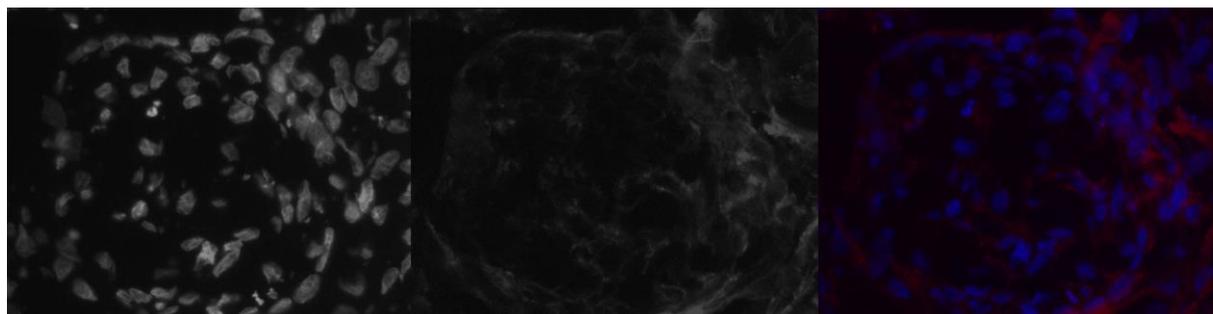


Figura 36. Montaje de las dos imágenes en escala de grises a superponer, junto con la imagen superpuesta a color.

Para pasar de las imágenes en escala de grises a lo que fue la imagen final, se pulsaba en Image >> Color >> Merge Channels. De esta forma aparecía una nueva ventana donde seleccionar el canal de color que le correspondía a cada imagen. Este mismo proceso se podía hacer a la inversa, pasando de la imagen de color a las imágenes de escala de grises correspondiente a cada canal mediante Image >> Color >> Split Channels.

3.18. MANTENIMIENTO DE LA ASEPSIA

La condición de asepsia fue fundamental cuando se trabajó con cultivos celulares. Es decir, los niveles de contaminación por la presencia de gérmenes eran mínimos. Para lograr estos bajos niveles de contaminación, fue necesario el uso de unas instalaciones específicas y la ejecución de una serie de protocolos. Esta asepsia se consiguió fundamentalmente con el uso de la sala blanca, la cabina de flujo laminar y el autoclave ([Figura 37](#)).

3.18.1. SALA BLANCA

En primer lugar, las instalaciones se trataban de salas blancas, esto es, salas especialmente diseñadas para obtener bajos niveles de contaminación. Atendiendo a la norma ISO 14644-1:2015, las salas blancas se clasifican como “clase N de ISO” siendo N un valor entre 1 y 9. Conforme menor sea el número de la sala blanca, mayor son las restricciones en cuanto al número máximo y el tamaño de las partículas presentes.

La entrada a las instalaciones de la sala blanca se realizó a través de un vestuario donde había que colocarse un gorro, una bata y unos cubrezapatos a fin de contaminar lo menos posible. El acceso a la

sala blanca donde se realizaban los cultivos celulares se hacía atravesando un sistema de esclusas donde no se podía abrir una puerta si la contigua estaba abierta. Mediante luces verdes y rojas encima de cada puerta se sabía en todo momento si se podía abrir o no la puerta. Para conseguir el correcto aislamiento de las salas de interés, la instalación contaba con un sistema de presiones positivas y negativas, creando presiones diferenciales.

3.18.2. CABINA FLUJO LAMINAR

Este tipo de cabinas permitían que el aire circulase con flujo laminar, de tal forma que todo el aire circulaba de forma lineal y uniforme, sin zonas inmóviles. La luz ultravioleta de la cabina se encendía entre 20 y 30 minutos antes de su uso para asegurar la mayor asepsia posible. Transcurrido ese tiempo, se apagaba la luz ultravioleta, se levantaba el cristal de la cabina hasta la marca y se encendía el flujo laminar. Tras aplicar luz ultravioleta, se hacía una segunda desinfección aplicando alcohol isopropílico (IPA) en la superficie de trabajo, paredes y cristal. Cabe destacar que todo el material a utilizar dentro de la cabina era desinfectado previamente con alcohol al 70% ya fueran tubos de centrifugar, *flasks* o puntas de pipeta. Para realizar el trabajo de forma más restrictiva, cada vez que las manos se sacaban de la cabina de flujo laminar, los guantes se desinfectaban nuevamente con alcohol al 70%.

3.18.3. AUTOCLAVADO

El autoclave fue usado para la esterilización de material diverso a introducir en la sala blanca. Se utilizó principalmente para la esterilización de recipientes de vidrio, los hidrogeles de gelatina, alginato y agarosa, las jeringuillas y las puntas de bioimpresión. Este autoclave aplicababa vapor caliente, a 120°C durante 20 minutos, eliminando así los gérmenes.



Figura 37. Sistemas de mantenimiento de la asepsia. Entrada a una sala blanca (A), autoclave (B) y cabina de flujo laminar (C).

3.19. GESTIÓN DE LOS RESIDUOS

La correcta clasificación y eliminación de los residuos fue importante ya que al trabajar con muestras biológicas se generaban, entre otros, desechos infecciosos. En el laboratorio se contaba con los siguientes cuatro contenedores de residuos:

- **Contenedor de residuos clínicos:** consistía en un contenedor de color negro utilizado para desechos clínicos. Es decir, aquellos residuos derivados de la investigación biomédica. Atendiendo a la clasificación ADR, acuerdo europeo para el transporte por carretera de sustancias peligrosas, estos residuos eran de la clase 6.2., categoría B, número ONU 3291. Esto implicaba que se trataba de materia infecciosa que, al estar en contacto con ella, no causa una incapacidad permanente o la muerte en personas o animales ([World Health Organization, 2021](#)).
- **Contenedor de residuos clínicos punzantes:** este contenedor era utilizado para desechos clínicos, como el anterior, con la peculiaridad de que pudieran ser punzantes. Es decir, agujas o placas de vidrio, principalmente. La fabricación de este tipo de recipientes, para residuos punzantes biológicos, tienen que cumplir una serie de requisitos que se consiguen, por ejemplo, cumpliendo la norma UNE-EN ISO 23907:2012.
- **Contenedor de plásticos:** en él se desechan principalmente envoltorios de plástico o recipientes de plástico que no han estado en contacto con muestras biológicas.
- **Contenedor de papel:** en él se tiraba principalmente papel utilizado para la desinfección de la cabina de flujo laminar, así como todo el material que se introducía a la cabina.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. MODELOS SOLIDWORKS

Los moldes CAD realizados con SOLIDWORKS han sufrido una serie de variaciones hasta llegar a una versión definitiva que recogiera todas las necesidades. El objetivo era encontrar aquel diseño final con el cual poder crear unos moldes de PDMS. Posteriormente, estos moldes de PDMS se combinaban de tal forma que permitieran la fabricación del molde de agarosa. Es decir, los modelos de SOLIDWORKS debían contar con los patrones de microcavidades a modo de negativo. Al hacer el molde de PDMS, este adquiría la forma de las microcavidades como positivo y finalmente, el molde de agarosa fabricado formaba el patrón de las microcavidades como negativo. De esta manera, porciones de la suspensión celular acababan depositadas sobre cada microcavidad de la agarosa y daban lugar a la formación del esferoide. Para llegar al diseño definitivo que mejor se ajustara a las necesidades ha sido necesario un proceso creativo de comprobaciones y rediseños.

En primer lugar, se diseñó un estampador con el patrón de las pirámides en uno de los extremos y una empuñadura en el otro ([Figura 38A](#)). El principal problema que presentaba este diseño era que no contaba con un soporte para que el estampador se mantuviera inmóvil mientras la agarosa gelificaba. El soportarlo manualmente durante el proceso de gelificación no era aconsejable ya que se necesitaba una resolución micrométrica en las pirámides que del propio pulso humano era inviable. Por ello se buscó un segundo diseño que contara con soportes.

El segundo diseño ([Figura 38B](#)), eliminaba la empuñadura por una serie de solapas que hacían de tope en el plato de 35 mm donde se encontraría la agarosa a estampar. Aunque a nivel de diseño se pensó que solucionaba el problema, no se tuvo en cuenta las propiedades del material con el que se iba a fabricar: PDMS. Este material flexible que ganaba rigidez conforme se aumentaba el espesor de este. Puesto que se trabajaba con dimensiones bastante pequeñas, no se contaba con la capacidad de hacer estas solapas de espesores y tamaños suficientes para conseguir la rigidez necesaria para que esta estructura realizara su función. Por lo que hubo que pensar un siguiente modelo que planteara el problema desde otro punto de vista.

El tercer diseño ([Figura 38C](#)), se basaba en la creación de un molde para crear una geometría en PDMS que permitiera actuar a modo de recipiente en vez de estampador. Es decir, en esta ocasión el abordaje se centraba en que el gel de agarosa se vertiera en el molde de PDMS en lugar de utilizar la estructura de PDMS para estampar la agarosa. Las principales limitaciones que se pensaron eran que el PDMS sería muy difícil de separar de su molde y que el patrón de las microcavidades debía realizarse por separado. Es decir, la geometría de las microcavidades debía realizarse por separado al ser la única que requería de una resolución elevada. El resto se debía realizar como componentes adicionales. La razón de esto fue que la impresión por estereolitografía requería de mucho tiempo

para obtener esa gran resolución, por lo que, para optimizar el proceso, se buscó diseñar un modelo compatible con que el patrón de las microcavidades pudiera hacerse independiente del resto de piezas. De esta forma se llegó al cuarto y último modelo.

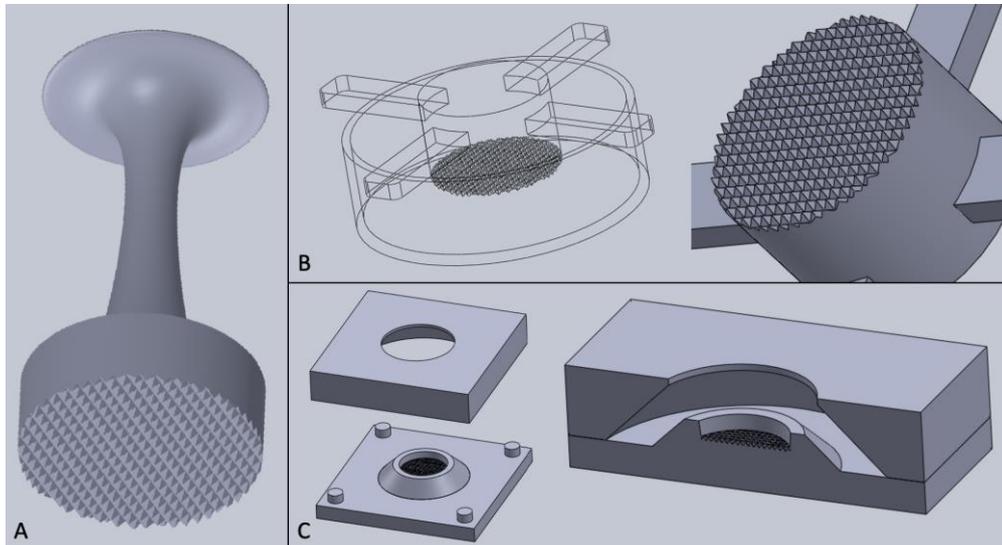


Figura 38. Modelos iniciales de SOLIDWORKS.

El cuarto modelo solucionó todas las limitaciones que se encontraron a lo largo del proceso creativo del diseño. Este último estaba formado por un ensamblaje de dos piezas para formar el patrón de la microcavidades, y de otro modelo adicional para la formación de la pared limitante de la estructura de agarosa resultante. El ensamblaje consistía en un anillo cilíndrico donde uno de los extremos circulares era de mayor diámetro que el otro, similar a un cono invertido al cual se le corta la punta a una determinada altura. Sobre este anillo se introduce un cilindro, también con forma de cono invertido acortado, que presentaba el patrón de las pirámides (Figura 39). Estas dos piezas, al presentar esta forma de caras opuestas concéntricas, pero de distinto diámetro, la pieza interna quedaba encajada sobre la externa a una altura específica. De esta manera, luego se podía verter el PDMS para formar el patrón positivo de las microcavidades. Cuando este se formaba, se aplicaba una serie de cortes en los rebordes y se aplicaba presión por la abertura opuesta del anillo para conseguir desmoldar así la nueva pieza que se formaba.

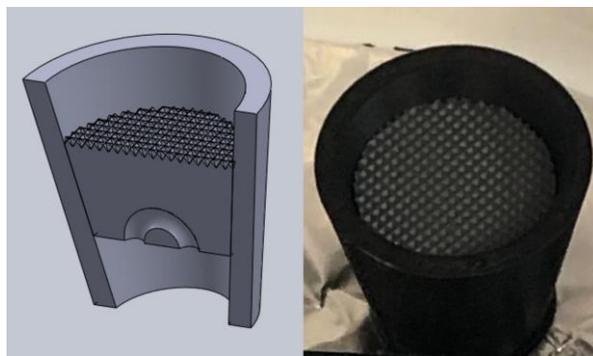


Figura 39. Modelo definitivo para la creación del molde del patrón circular de PDMS, en SOLIDWORKS (izquierda) y ya fabricado (derecha). El elemento central cuenta con las microcavidades

de forma piramidal en uno de sus extremos y en el otro, un conducto por donde introducir un hilo y así ajustar este elemento con el anillo cónico exterior.

Además del ensamblaje de las dos piezas para hacer el molde del patrón de los micropocillos, se contaba con el molde para realizar el anillo exterior que haría de pared en la estructura de agarosa. Como se puede observar en la [Figura 40](#), hubo ligeras variaciones entre el modelo de SOLIDWORKS que se pensaba que sería definitivo y el que finalmente se hizo. Esto se debió a que el modelo inicial presentaba una gran limitación a la hora de desmoldar el anillo de PDMS que se hubiera formado. Por el contrario, en el segundo caso, en vez de tener una base maciza impresa, se trataba de una placa de vidrio encajada que se podía deslizar. Así, cuando el molde de PDMS se formaba, se retiraba la placa de vidrio, se pasaba una cuchilla por todos los rebordes para que se despegara y, por último, se empujaba por uno de los dos lados para que saliera por el otro.

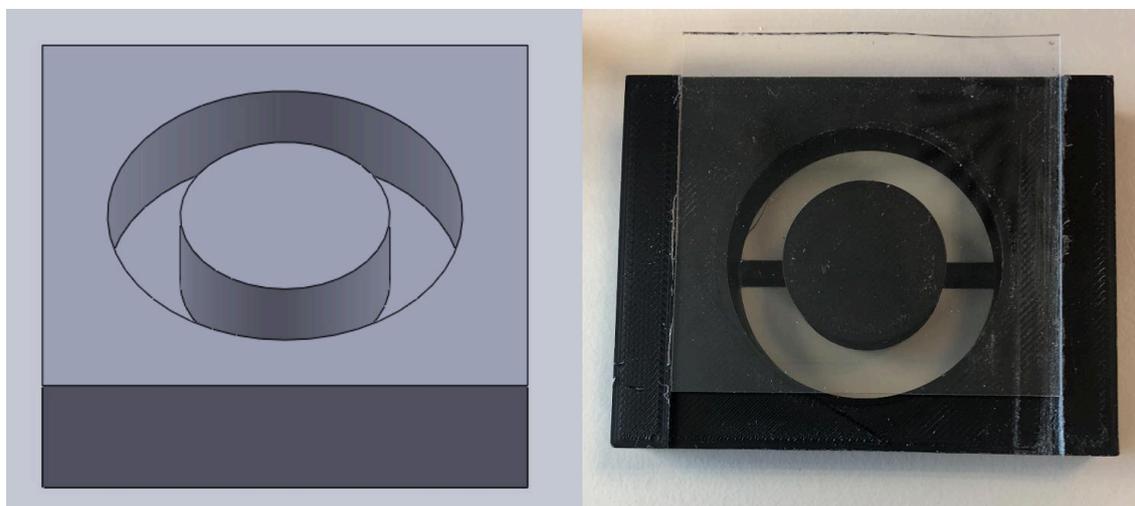


Figura 40. Molde del anillo externo de PDMS en SOLIDWORKS (izquierda) y molde definitivo ya fabricado (derecha).

4.2. FORMACIÓN ESFEROIDES

Como se mencionaba anteriormente en el [Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS](#), en este proyecto se ha llevado a cabo la formación de agregados celulares a modo de esferoides mediante 3 técnicas diferentes: *hanging drops*, molde comercial Aggrewell y molde de elaboración propia.

4.2.1. HANGING DROPS

La primera técnica utilizada para la formación de esferoides de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo fue la de las *hanging drops* o gotas colgantes. Se dispusieron 30 microgotas de suspensiones celulares en platos Petri y se dejó transcurrir el tiempo para que se fueran formando los esferoides. Estos experimentos se realizaron con densidades celulares de 1.500 y 3.000 células por microgota.

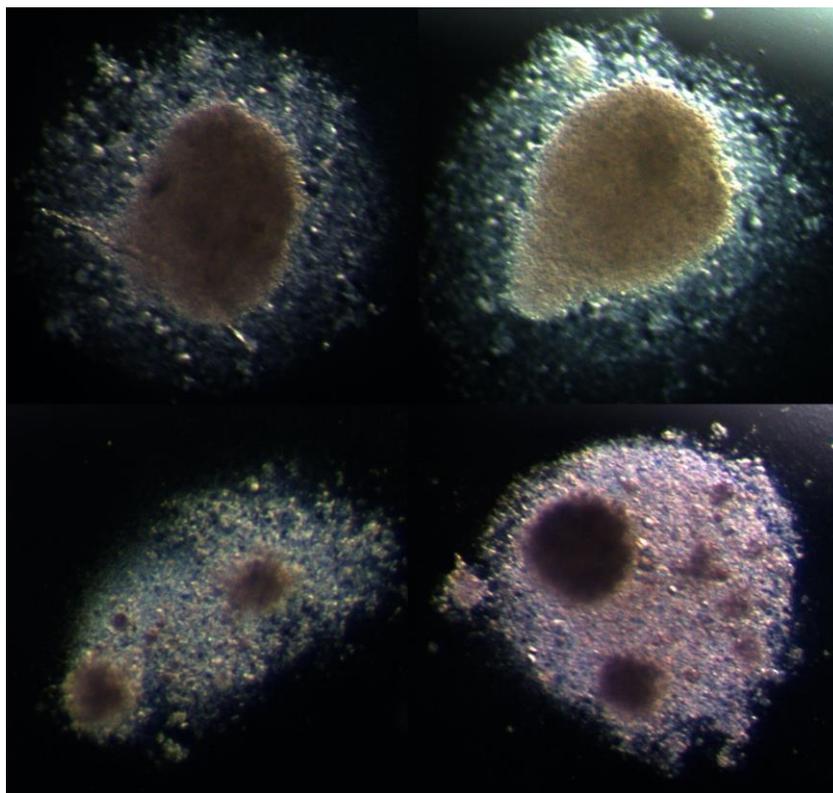


Figura 41. Muestra de algunos esferoides formados por el método de los *hanging drops*.

La Figura 41 muestra diferentes microgotas al quinto día de su siembra. Se decidió tomar las imágenes transcurrido este tiempo por dos motivos. En primer lugar, el protocolo de la solución comercial, para esa técnica, indicaba que la formación de esferoides, dependiendo de la línea celular, podía llegar a tardar hasta los 3 días. En segundo lugar, puesto que ese tiempo no fue suficiente para la técnica de los *hanging drops*, se decidió normalizar la toma de imágenes al quinto día, donde ya se apreciaban resultados para poder comparar. En la primera fila se pueden apreciar dos esferoides formados en dos microgotas distintas, presentando una forma bastante esférica. Por otro lado, en la segunda fila se pueden apreciar otras dos microgotas donde, en cada una de ellas, el número de esferoides que se ha formado es variable y mayor que uno.

Este método de gotas colgantes ha permitido la apreciación de la formación de esferoides de una forma bastante sencilla. No obstante, presenta dos principales limitaciones en el desarrollo de este proyecto. En primer lugar, no se puede controlar que el diámetro de los esferoides formados sea más o menos homogéneo. Es decir, la siembra de las microgotas con una determinada densidad celular no permite estimar el diámetro de los esferoides formados. Esto es debido a que en una misma microgota se van a poder formar varios esferoides con diámetros y densidades celulares que no se pueden controlar. En segundo lugar, el ritmo de producción de esferoides con esta técnica es bastante reducido. Cada plato Petri era sembrado con 30 microgotas y en el caso ideal de que todos los esferoides fueran homogéneos y se formara un único esferoide por microgota, solamente se dispondría de 30 esferoides por placa sembrada.

4.2.2. AGGREWELL™ 800

Los esferoides formados utilizando la solución comercial Aggrewell™ 800 presentan resultados prometedores por varias razones. En primer lugar, esta solución tiene un buen ritmo de producción de esferoides por pocillo sembrado (aproximadamente 300). En segundo lugar, los esferoides formados tienen un diámetro similar entre todos los producidos en la siembra y cada microcavidad, de forma piramidal, da lugar a un único esferoide. En la [Figura 42](#), se puede apreciar que el agregado celular formado es único y con gran esfericidad, y en la imagen derecha se puede observar que la forma de estos esferoides es homogénea.

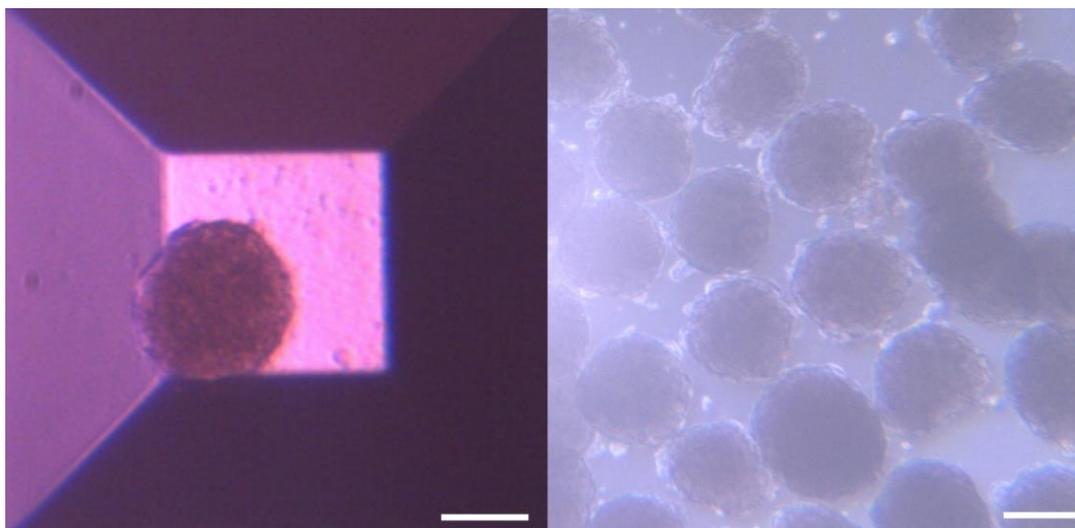


Figura 42. Esferoide dentro de una microcavidad de la placa de Aggrewell (izquierda) y conjunto de esferoides recolectados de un pocillo de la placa de Aggrewell (derecha). Barras de escala: ambas 100 μm .

4.2.3. MOLDES DE ELABORACIÓN PROPIA

La primera imagen de la [Figura 43](#), muestra el resultado del proceso de fabricación del molde de agarosa. Tras retirar el anillo exterior y el patrón circular de PDMS, se observa una zona central circular en el molde de agarosa con el patrón de las microcavidades. Alrededor de esta zona central se encuentra una pared concéntrica y circular de unos 5 mm. Esta se diseñó así para que, al introducir la suspensión celular, el volumen incorporado fuera suficiente para permitir una distribución homogénea de las células. La segunda imagen de esa misma figura muestra cómo los moldes de agarosa fabricados están diseñados de tal forma que permitan un ajuste bastante bueno a los pocillos de una placa de 12.



Figura 43. Molde de agarosa producido a partir de moldes de PDMS (izquierda) y moldes de agarosa encajados perfectamente en una placa de 12 pocillos (derecha).

Esta técnica se ha hecho como alternativa a la solución comercial, basándose en el mismo principio, para valorar el rendimiento de formas similares de fabricación que presentan un coste mucho más reducido. En la [Figura 44](#), se muestra el molde antes de ser sembrado y tras la siembra y formación de los esferoides. Haciendo un análisis de los diámetros de estos se ha obtenido que tenían un valor de $138,02 \pm 21,46 \mu\text{m}$ (n=16).

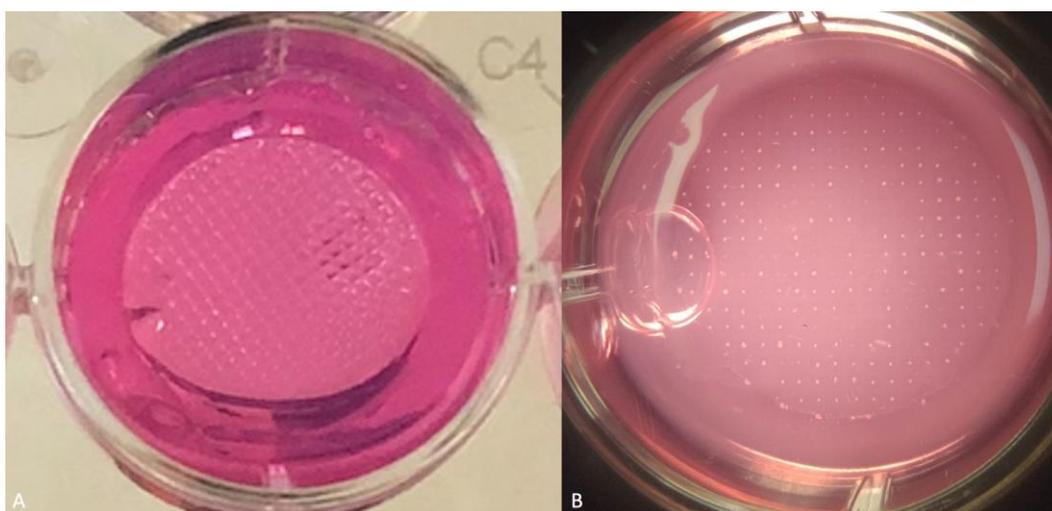


Figura 44. Molde de agarosa antes de la siembra (A) y tras la formación de esferoides (B).

4.2.4. COMPARATIVA DE LOS TRES MODELOS

Aggrewell y hanging drops

Como conclusión de lo expuesto anteriormente, los esferoides formados en la placa de Aggrewell son mejor alternativa que la técnica de *hanging drops*. Esto se debe principalmente al ritmo de producción por siembra (300 frente a 30) y a la homogeneidad de diámetros de los esferoides formados. En los *hanging drops* esta homogeneidad no se daba ya que había microgotas que daban lugar a más de un esferoide, de diámetros diversos. Adicionalmente, el tiempo necesario para la formación de esferoides con la solución comercial era mucho menor ([Figura 45](#)). A las 48 horas ya se

podían apreciar esferoides formados, mientras que algunas de las microgotas, observadas al quinto día, presentaban agregados muy pequeños todavía en algunos casos. También es importante mencionar que, en el caso de la solución comercial, los agregados celulares se correspondían con la práctica totalidad de las células del micropocillo mientras que en las *hanging drops* el aprovechamiento no era tan elevado.

Es importante destacar también que el cambio de medio en las placas de Aggrewell era bastante sencillo. Bastaba con aspirar alrededor del 50% del medio de los pocillos y renovarlo por medio fresco aplicado lentamente para no desplazar los esferoides que se estaban formando. Por el contrario, el cambio de medio en las microgotas suponía una dificultad muy elevada por lo que el tiempo de formación de los esferoides en estas es limitado. En definitiva, la técnica mediante gotas colgantes ha permitido un primer contacto en la formación de esferoides, pero no supone una opción adecuada para el desarrollo de la plataforma a bioimprimir.

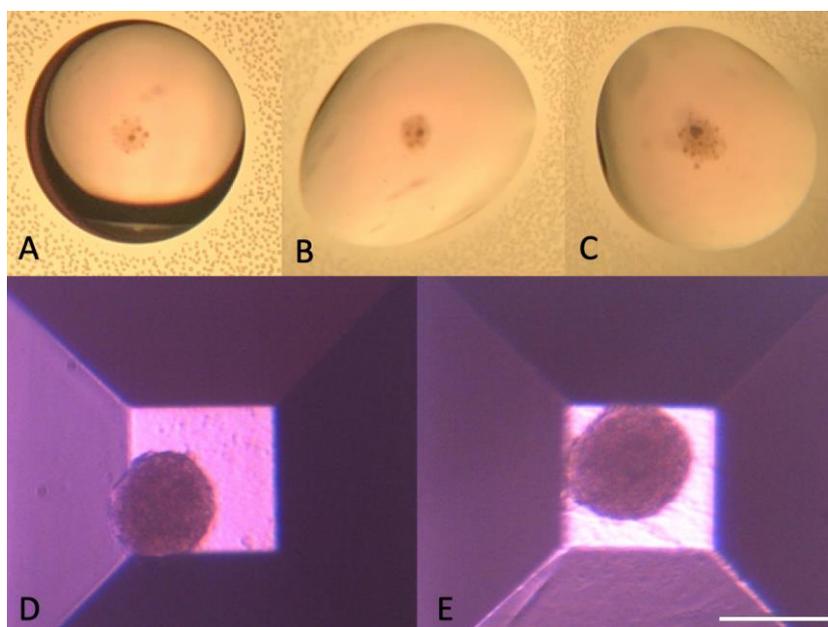


Figura 45. Formación de esferoides mediante el método de *hanging drops* al quinto día (A-C) y mediante la solución comercial a las 48 horas (D-E). La solución comercial se corresponde con densidades celulares de 1000 (D) y 2000 (E). Barra de escala (D-E): 200 μm .

Aggrewell y moldes de agarosa

En la Figura 46 se recogen los diámetros de esferoides obtenidos utilizando la solución comercial Aggrewell y el molde de agarosa de fabricación propia. El diámetro de esferoide utilizando la solución comercial es de $146,31 \pm 10,37 \mu\text{m}$, y de $138,02 \pm 21,46 \mu\text{m}$ para la del molde de agarosa. Tras aplicar el estadístico de la prueba t de Welch, para diferencia de varianzas significativa, se observa que no hay diferencia significativa en la media de los diámetros de los esferoides utilizando estas dos técnicas (p -valor = 0,2446). Aunque el ritmo de producción utilizando la técnica de elaboración propia es también próxima a 300 por siembra, cabe mencionar que la variación entre los esferoides es mayor que la de la solución comercial.

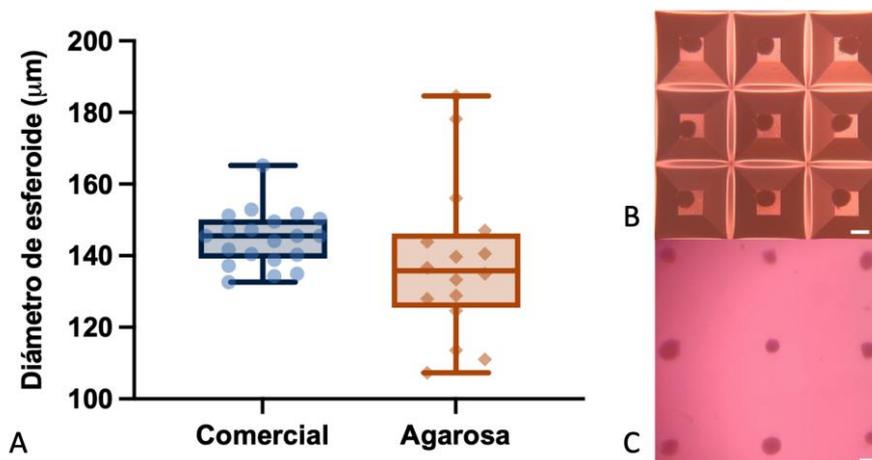


Figura 46. Comparativa de los diámetros de los esferoides formados por la solución comercial y con los moldes de agarosa (A), e imágenes de microscopía de esferoides formados con la solución comercial (B) y con los moldes de agarosa (C). El número de muestras tomadas es de $n=20$ y $n=16$, para la solución comercial y la solución de agarosa, respectivamente. Barra de escala (B-C): $200\ \mu\text{m}$.

4.3. SELECCIÓN TAMAÑO ÓPTIMO DE ESFEROIDE PARA BIOIMPRESIÓN

Para determinar la densidad celular y el diámetro de esferoide óptimos para el proceso de bioimpresión, se sembraron suspensiones celulares iniciales con 1000, 2000, 2500 y 3000 células por pocillo. Esto se ha hecho para determinar qué densidad celular sería aconsejable utilizar para la bioimpresión. En la Figura 47 se recogen los diámetros de esferoides obtenidos para las cuatro densidades celulares, 5 días después de su siembra. Los esferoides tenían un diámetro de $146,31 \pm 10,37\ \mu\text{m}$, $162,89 \pm 11,58\ \mu\text{m}$, $193,22 \pm 9,61\ \mu\text{m}$ y $198,44 \pm 8,82\ \mu\text{m}$, para las densidades celulares de 1.000, 2.000, 2.500 y 3.000, respectivamente. Se puede concluir que un aumento en la concentración celular da como resultado esferoides de mayor diámetro.

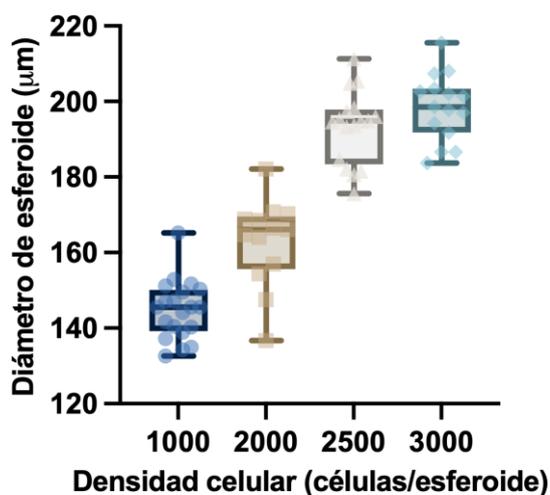


Figura 47. Diámetro de los esferoides en función de su densidad celular. En orden creciente de diámetros, el número de muestras tomadas fue $n=20$, $n=13$, $n=17$ y $n=15$.

4.3.1. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR EMPLEANDO ALAMAR BLUE

Lo que se pretendía mediante este ensayo era llevar a cabo un análisis cuantitativo de la viabilidad celular en los esferoides tras 5 días en cultivo. Para ello, se utilizó la reducción de resazurina como indicador de la actividad metabólica de las células presentes en el esferoide y, por tanto, de su viabilidad.

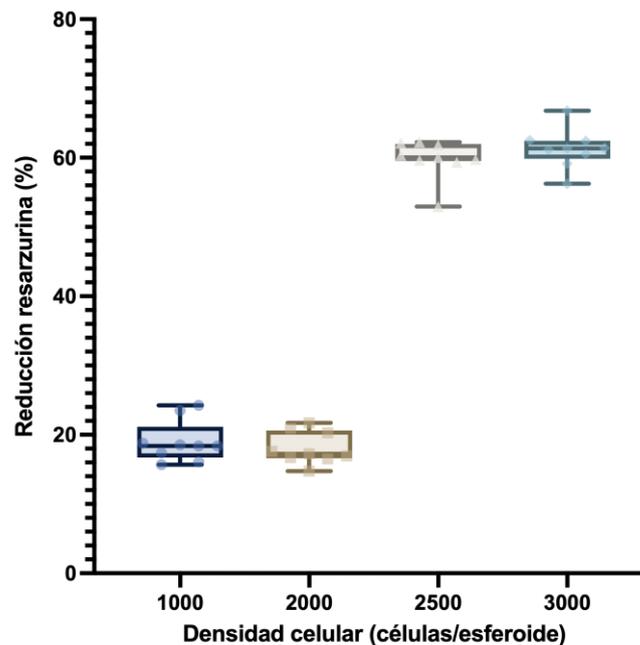


Figura 48. Reducción de resazurina en los esferoides celulares. El número de muestras para todas las condiciones es n=9.

Como se puede observar en la [Figura 48](#), los agregados con mayor contenido celular son capaces de metabolizar los mayores porcentajes de resazurina a los 5 días de cultivo. Esto puede deberse a que, al tener mayor contenido celular, hay más actividad metabólica. No obstante, cabe esperar que análisis de este tipo transcurrido un tiempo significativamente mayor, indique una mayor reducción en los esferoides de menor tamaño. Esto es debido a que el paso del tiempo hará que incrementen los fenómenos de hipoxia en los esferoides de mayor tamaño, al tener una menor difusión de nutrientes y oxígeno en su región más interna.

4.3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

Estudio de proliferación celular con marcador nuclear Ki-67

La realización del siguiente estudio de inmunohistoquímica ha permitido evaluar la proliferación celular de los esferoides de 1000, 2000, 2500 y 3000 células. La utilización de DAPI sirve para marcar núcleos de células muertas, permitiendo intuir la geometría de los esferoides. El marcador Ki-67, genera fluorescencia nuclear en aquellas células que están proliferando. Si bien es cierto que se pretende llevar a cabo un estudio más exhaustivo en el futuro, estas primeras aproximaciones apuntan a que hay una mayor proliferación celular en los esferoides de menor tamaño ([Figura 49](#)).

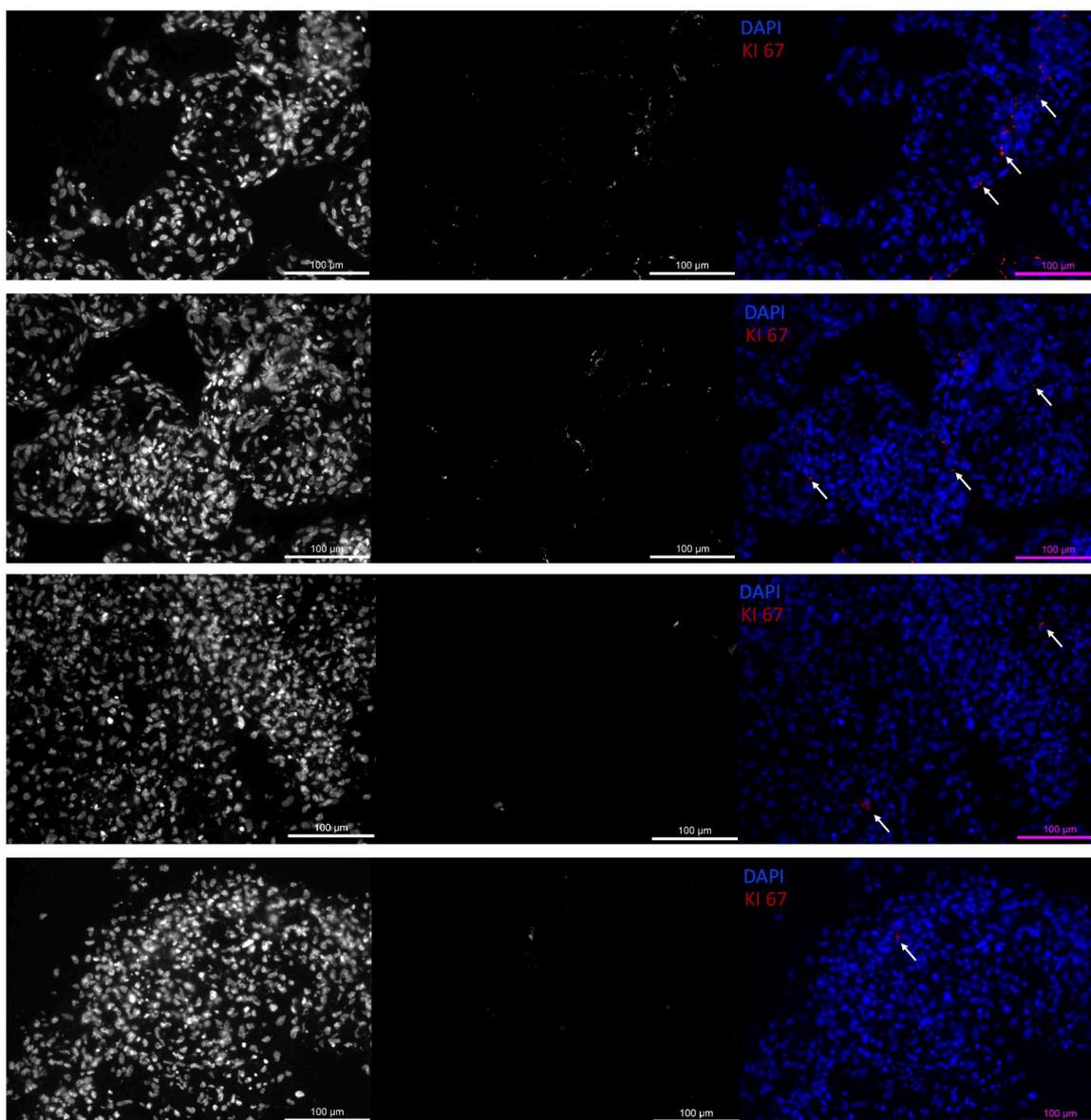


Figura 49. Proliferación celular en esferoides de 1000, 2000, 2500 y 3000 células. Las flechas muestran, en cada condición, células marcadas con Ki-67, es decir, células que están proliferando.

Producción de fibronectina y secreción de matriz extracelular

También se llevó a cabo un ensayo de inmunohistoquímica utilizando DAPI y fibronectina para conocer la secreción de matriz extracelular. El DAPI sirvió para marcar nuevamente núcleos de células muertas, permitiendo apreciar la morfología de los esferoides. Mientras que el anticuerpo se marcó tanto en la fibronectina producida intracelularmente como en aquella secretada formando matriz extracelular (Figura 50). Es decir, se puede apreciar que los cuatro tipos de esferoides eran capaces de producir matriz extracelular.

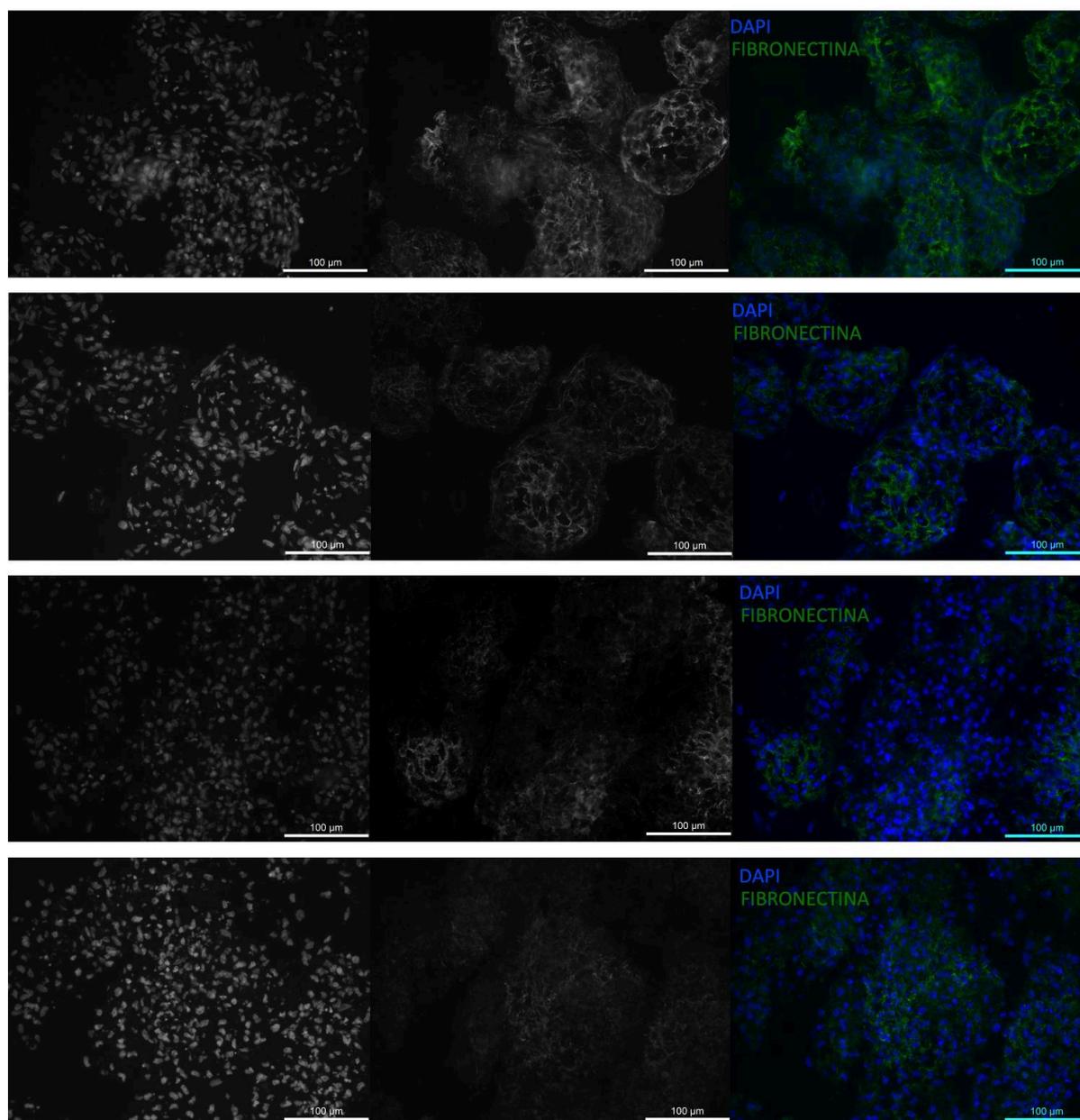


Figura 50. Formación de matriz extracelular en los esferoides.

Junto con las conclusiones obtenidas por los ensayos de actividad metabólica y de inmunohistoquímica, se decidió utilizar la densidad de 1000 células por pocillo por las siguientes razones:

- **Los tiempos de proliferación celular.** Inicialmente, se priorizaba el tener un mayor número de esferoides frente a que estos fueran de un mayor tamaño. Es importante tener en cuenta que con la cantidad celular con la que se siembra un pocillo de densidad de 3.000 células, se pueden sembrar 3 pocillos con densidad de 1.000. Análogamente, la cantidad necesaria para sembrar un pocillo de 2.000 permite sembrar dos pocillos de 1.000.

- **Tamaño de boquilla de bioimpresión.** La boquilla de impresión se trata de una boquilla cónica G25 de la marca Nordson EFD, cuyo diámetro interior es de 250 μm . De una manera bastante conservacionista, se optó por el menor diámetro posible de esferoide.
- **Capacidad de difusión de nutrientes y oxígeno.** Puesto que los nutrientes, los residuos metabólicos y el oxígeno son transportados mediante difusión, es importante tener en cuenta el tamaño de los esferoides. Cuanto mayor es el diámetro de los esferoides, mayor es la probabilidad de que haya hipoxia y que los nutrientes no lleguen a la masa interna celular del esferoide. Por tanto, los esferoides de mayor diámetro presentan limitaciones de difusión que condicionan la viabilidad celular. Es decir, la proliferación celular está inversamente relacionada con el tamaño de esferoide (Decarli et al., 2021).

4.4. VALIDACIÓN CALIDAD CELULAR PARA BIOIMPRESIÓN

A fin de conocer la calidad de los esferoides celulares, se caracterizó el ARN extraído y el ADNc sintetizado. Utilizando el espectrofotómetro Nanodrop One, se obtuvieron las concentraciones de ARN y ADNc en 3 muestras de densidad celular 1000, 1 muestra de 2500 y otra de 3000, así como el ratio A260/A280 y A260/A230. Estos ratios se corresponden con los valores de absorbancia obtenidos a longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm. En la [Figura 51](#) se puede observar el espectrofotómetro utilizado junto con los valores del ARN extraído. Para que la muestra del ARN sea pura, los ratios A260/A280 suelen ser de 2-2,3, mientras que el rango del ratio A260/A230 es de 1,8-2. Como se puede apreciar, las muestras presentan ratios de A260/A280 próximos al rango óptimo, mientras que el segundo de los rangos es bastante inferior al esperado. No obstante, el espectrofotómetro solamente consideró necesario hacer correcciones en las muestras 2 y 5. Esto dio como resultado una medida de concentración corregida. La impureza detectada en estas dos muestras se correspondía con tiocianato de guanidinio.



	Ácido nucleico (ng/ μL)	A260/A280	A260/A230	Corregida (ng/ μL)
1	14,117	2,004	0,154	-
2	21,237	1,702	0,274	20,44
3	20,342	1,861	0,481	-
4	31,325	1,788	0,758	-
5	40,634	1,669	0,144	29,48

Figura 51. Espectrofotómetro utilizado junto con los valores de extracción del ARN para esferoides de densidad celular 1000 (1-3), 2500 (4) y 3000 (5).

Respecto al ADNc sintetizado, los ratios de absorbancia eran correctos y la concentración obtenida para las 5 muestras fue de 2963,3 ng/ μL , 2743,9 ng/ μL , 2615,9 ng/ μL , 2551,6 ng/ μL y 2325,1 ng/ μL , respectivamente.

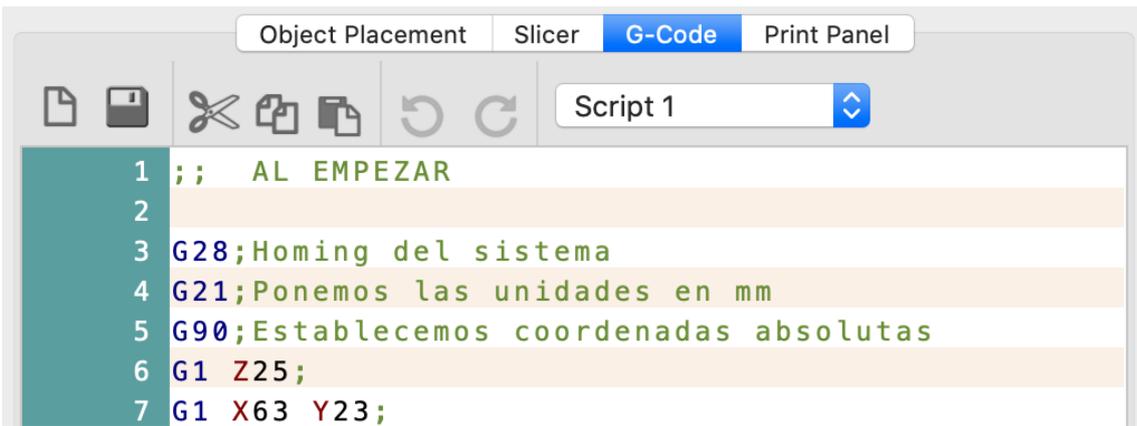
4.5. BIOIMPRESIÓN

4.5.1. SCRIPTS

Se han realizado tres *scripts* para llevar a cabo todas las funciones necesarias de la bioimpresora. Un script para el posicionamiento del cabezal, otro para la purga de material y otro para el patrón de bioimpresión como tal. A continuación, se detallan todas las acciones que realizaba cada programa para lograr el posicionamiento, la purga y la bioimpresión.

Posicionamiento del cabezal

Como se muestra en la [Figura 52](#), el *script* 1 se corresponde con el proceso de posicionamiento del cabezal en el centro del plato de impresión. Inicialmente, se escribe la instrucción G28 que permite que la bioimpresora vuelva a la posición (0,0,0) del sistema de coordenadas XYZ. Al escribir G28 sin ningún tipo de parámetro adicional, hace el *homing* de los tres ejes; primero el de X, después el de Y y, por último, el de Z. El comando siguiente es G21, el cual permite trabajar en milímetros, unidad bastante adecuada debido a los pequeños desplazamientos realizados. El comando G90 establece el sistema de coordenadas en coordenadas absolutas. Es decir, al haber hecho el *homing* previamente, es una forma de reiniciar el sistema y poder establecer como origen el origen de la máquina. A continuación, se aplican los movimientos lineales del cabezal mediante los comandos G1. Primero se hace el G1 Z25 para separar la base de impresión del cabezal. Esto es importante ya que, al poner los platillos de impresión sobre la base, un desplazamiento horizontal en X y Y, sin haber hecho esta separación, supondría que la punta de la jeringa chocara con las paredes del platillo. Una vez alejada la base de impresión una distancia prudencial de 25 mm, se ejecuta el comando G1 X63 Y23 que desplaza horizontalmente el cabezal al centro del platillo de impresión.

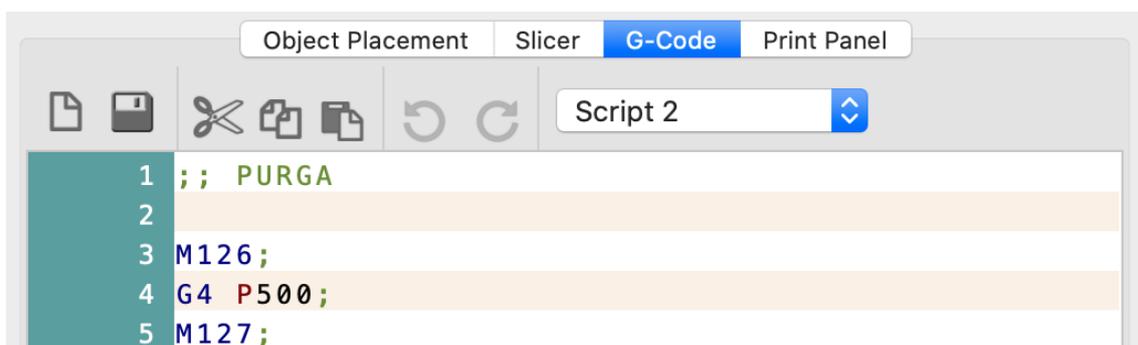


```
1 ;; AL EMPEZAR
2
3 G28;Homing del sistema
4 G21;Ponemos las unidades en mm
5 G90;Establecemos coordenadas absolutas
6 G1 Z25;
7 G1 X63 Y23;
```

Figura 52. Script de posicionamiento del cabezal.

Purga de la biotinta

Una vez se realiza el *script* 1 de posicionamiento del cabezal, se deja la jeringa cargada dentro del bloque de aluminio del cabezal por un período de 20 a 30 minutos. Esto es necesario para que la biotinta se estabilice y adquiera la temperatura que hace que sus propiedades reológicas sean las adecuadas para la bioimpresión. Transcurrido este periodo de tiempo, se lleva a cabo la purga de la biotinta. Es importante ya que inicialmente la biotinta se encuentra únicamente dentro de la jeringa y es necesario que esta fluya a través de la punta cónica hasta su orificio de salida. La purga consiste en la apertura y cierre de la válvula del sistema neumático durante un periodo de tiempo (Figura 53). En función de la temperatura de la biotinta y la presión aplicada mediante el sistema neumático, el tiempo de apertura y cierre varía. En este trabajo, la temperatura aplicada a la biotinta era de 26°C y una presión de 0,9 bares. Los comandos aplicados entonces en el *script* 2 son M126, para la apertura de la válvula, G4 P500 para que el programa espere 500 milisegundos para leer la siguiente línea de comandos, y M127 para el cierre de la válvula. Como se comentaba, en función de los parámetros de presión y temperatura aplicados a la biotinta, el tiempo de espera del comando G4 varía.



```
Object Placement Slicer G-Code Print Panel
Script 2
1 ;; PURGA
2
3 M126;
4 G4 P500;
5 M127;
```

Figura 53. Script de purga de la biotinta.

Patrón de bioimpresión

El tercer *script* que se ha utilizado (Figura 54), se trata del *script* para la realización del patrón de bioimpresión. En este proyecto se trata de una geometría en forma de rejilla cuadrada. Tras la purga del *script* anterior, se comienza este nuevo con el comando G90 para cerciorarse que la máquina se encuentra en coordenadas absolutas. Es importante mencionar que la distancia entre la punta del cabezal de impresión y la superficie del platillo varía de unos platillos a otros. Por ello, entre una impresión y la siguiente, se ajusta la z óptima haciendo uso del *print panel* y acercando manualmente la z hasta obtener la adecuada. Este valor de z obtenido es el que se modifica en la línea 6 del *script* para cada impresión. Tras el establecimiento de coordenadas absolutas, se desplaza la Z a 20 mm para confirmar que se encuentra fuera del platillo y que se puede hacer un desplazamiento horizontal. Acto seguido, se ejecuta el comando de desplazamiento lineal a la posición X63 Y24, correspondiente al centro del platillo. Se aproxima la Z a la Z de impresión y se aplica el comando G91 para poner las coordenadas en coordenadas relativas. Esto resulta de utilidad porque, a continuación, se realiza el patrón. Puede ser más cómodo de entender para el operario que el cabezal de la bioimpresora se desplace una cierta cantidad desde la posición donde se encuentra que

tener en cuenta el sumarle en cada momento el desplazamiento a las coordenadas absolutas. Con la siguiente línea de código, G1 X-3 Y3, la punta de la jeringuilla se desplaza a la esquina superior izquierda de lo que será el patrón bioimpreso. A continuación, se abre la válvula solenoide y la biotinta comienza a fluir realizando las líneas horizontales (líneas 16 a 22 del código). Cuando se termina de realizar las líneas horizontales, en la esquina inferior derecha, se realizan las líneas verticales (líneas 27 a 33 del código). Una vez concluido el recorrido, se cierra la válvula, deja de fluir la biotinta y se aleja la base de impresión 20 mm (G1 Z20). Es importante destacar que la válvula se mantiene abierta durante todo el periodo de impresión al ser líneas que se pueden hacer seguidas, sin producir ningún tipo de discontinuidad. Este modo de proceder favorece la formación de la geometría deseada, mejor que si se hicieran solamente las líneas horizontales y verticales abriendo y cerrando la válvula al comienzo y final de cada línea, respectivamente. Este mismo patrón en forma de rejilla cuadrada de 2x2 cuadrados se hizo como patrón de 3x3, pudiendo escalarse a tamaños mayores.

1	;CASO DE GRID DE 2X2	13	;Horizontales	25	;Verticales
2		14		26	
3	G90;	15	M126;	27	G1 Y6;
4	G1 Z20;	16	G1 X6;	28	G1 X-3;
5	G1 X63 Y24;	17	G1 Y-3;	29	
6	G1 Z6.6;	18		30	G1 Y-6;
7	G91;	19	G1 X-6;	31	G1 X-3;
8		20	G1 Y-3;	32	
9	G1 X-3 Y3;	21		33	G1 Y6;
10		22	G1 X6;	34	
11		23		35	M127;
12		24		36	G1 Z20;

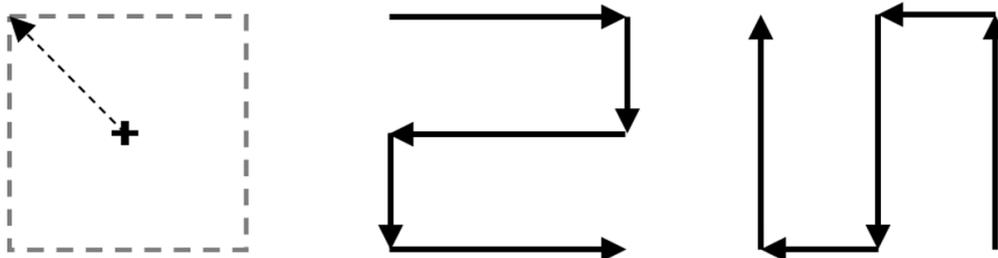


Figura 54. Script del patrón de bioimpresión junto con los principales desplazamientos: ir al punto de inicio de la bioimpresión, realizar las líneas horizontales y realizar las líneas verticales.

4.5.2. PLATAFORMA BIOIMPRESA

La bioimpresión se ha realizado tanto con células en suspensión como empleando los esferoides obtenidos. Es importante destacar que tras la carga de la biotinta fue necesario que la jeringa estuviera dentro del bloque de aluminio del cabezal de la bioimpresora unos 20-30 minutos, para

permitirle alcanzar la temperatura de bioimpresión de 26°C. Esto se debe a que esta es la temperatura idónea para mantener las mejores propiedades reológicas de la gelatina-alginato .

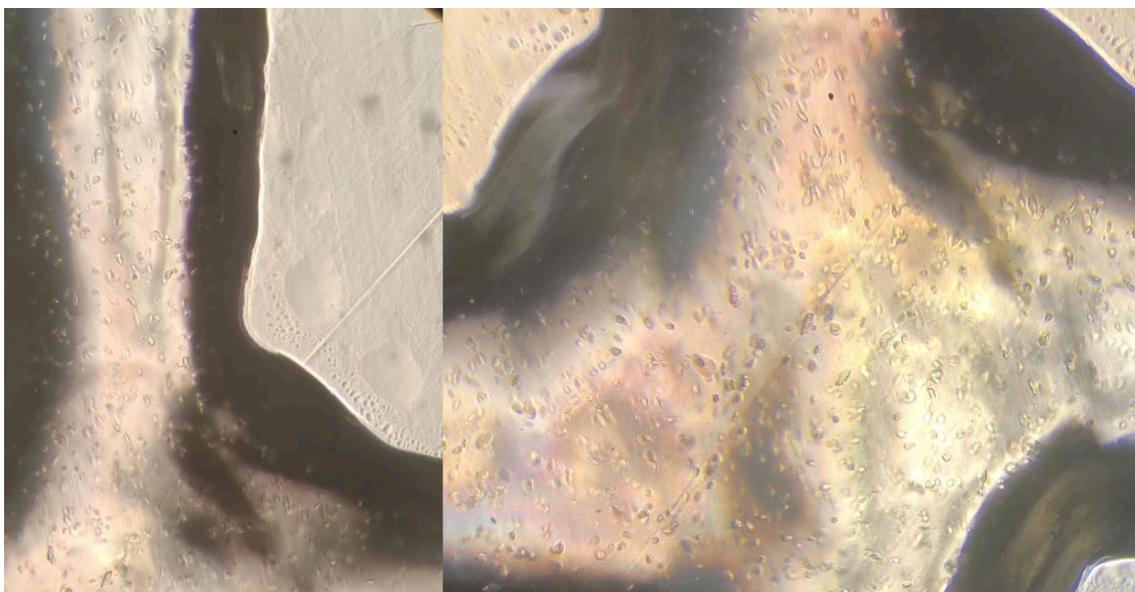


Figura 55. Estructura bioimpresa con la biotinta de células sin formar agregados celulares. Las zonas sombreadas se corresponden con la parte límite de la biotinta con la superficie del plato de bioimpresión. Desde esa zona sombreada hacia el interior, se aprecian gran cantidad de pequeñas formas correspondientes con las células presentes en el interior de la gelatina-alginato.

Como se muestra en la Figura 55, durante la realización de este trabajo se ha conseguido bioimprimir rejillas cuadradas con la biotinta. Las zonas sombreadas de la figura se corresponden con las líneas verticales y horizontales formadas con la biotinta, en cuyo interior se aprecian las células.

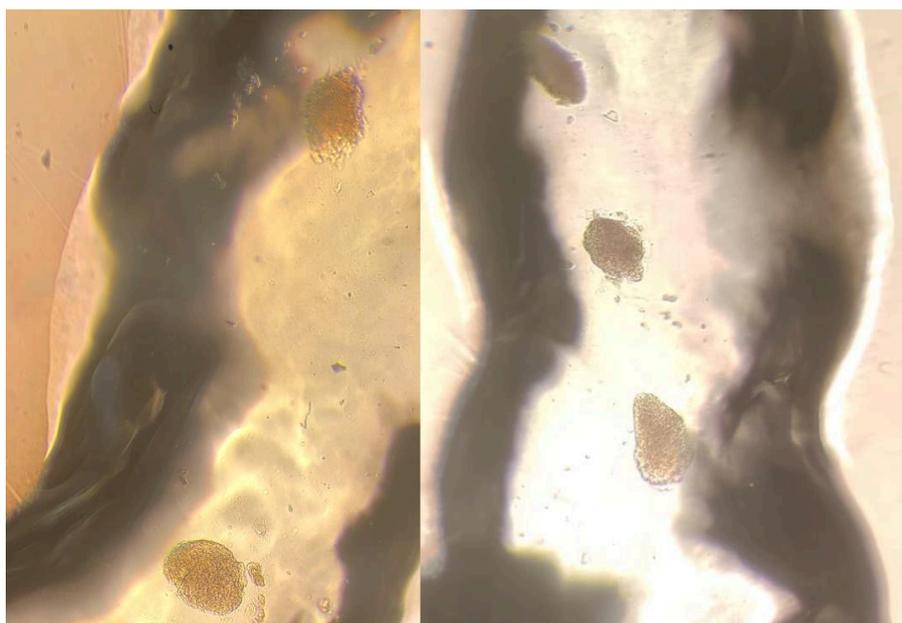


Figura 56. Estructura bioimpresa con agregados celulares en forma de esferoides.

Como se puede apreciar en la [Figura 56](#), tras haber puesto a punto los parámetros de bioimpresión con células individualizadas, se realizó la bioimpresión con los esferoides preparados durante la fase de cultivos celulares. Aunque se aprecia que el tamaño de los esferoides es mucho menor que el tamaño de las líneas que se han bioimpreso, eso no debe hacer pensar que el tamaño de esferoides pudiera haber sido mucho mayor. Esta matización es importante ya que el factor limitante no es únicamente el ancho que presente la línea impresa si no el diámetro interior de la boquilla por donde sale la biotinta extruida. Es decir, el diámetro de nuestra boquilla es mucho menor (250 micrómetros) en comparación con el ancho de las líneas bioimpresas.

Por último, en la [Figura 57](#) se muestra un ejemplo de patrón de rejilla cuadrada de 3x3 bioimpreso, junto con el detalle de una biotinta de células que se presentaron como suspensiones celulares y otra producida con los agregados celulares en forma de esferoides.

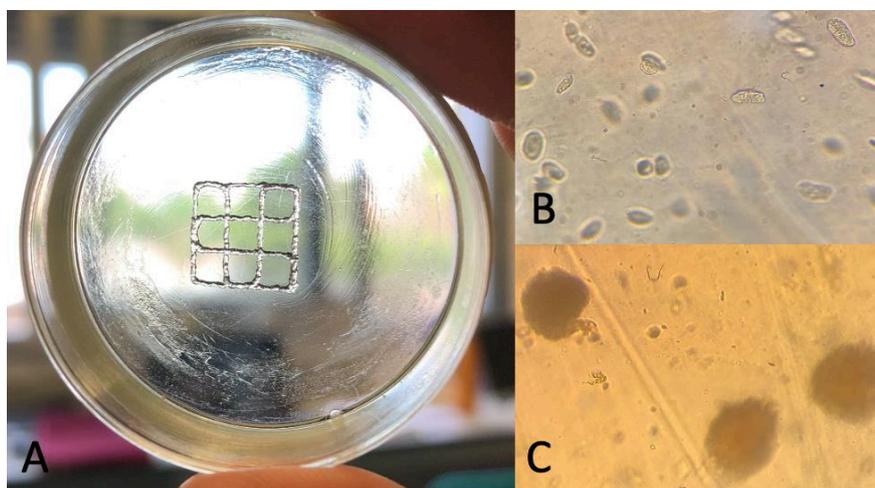


Figura 57. Rejilla cuadrada de 3x3 bioimpresa (A), detalle de bioimpresión con células sin formar agregados celulares (B) y con los esferoides obtenidos (C).

4.6. VIABILIDAD CELULAR TRAS LA BIOIMPRESIÓN

Una vez la plataforma de cultivo celular fue bioimpresa, se llevó a cabo un análisis de viabilidad celular utilizando el kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit for Mammalian Cells. Además de esta tinción, se hizo otra utilizando Hoechst 33342, colorante azul que se expresa en el núcleo de células vivas.

Como se puede observar en la [Figura 58\(A-B\)](#), los resultados obtenidos mediante la tinción live-dead no fueron de utilidad ya que las células teñidas de verde también se muestran teñidas de rojo. Esto implicaría que las células estuvieran vivas y muertas a la vez, lo cual no es posible. Por ello, es necesario un refinamiento futuro de esta tinción para obtener resultados representativos. Paralelamente, se realizaron tinciones de otras plataformas bioimpresas utilizando Hoechst 33342 ([Figura 58C](#)). Dicha imagen permite una mejor estimación de la viabilidad celular ya que las células que se encuentran vivas, en el plano de captura de la imagen, se han teñido de azul.

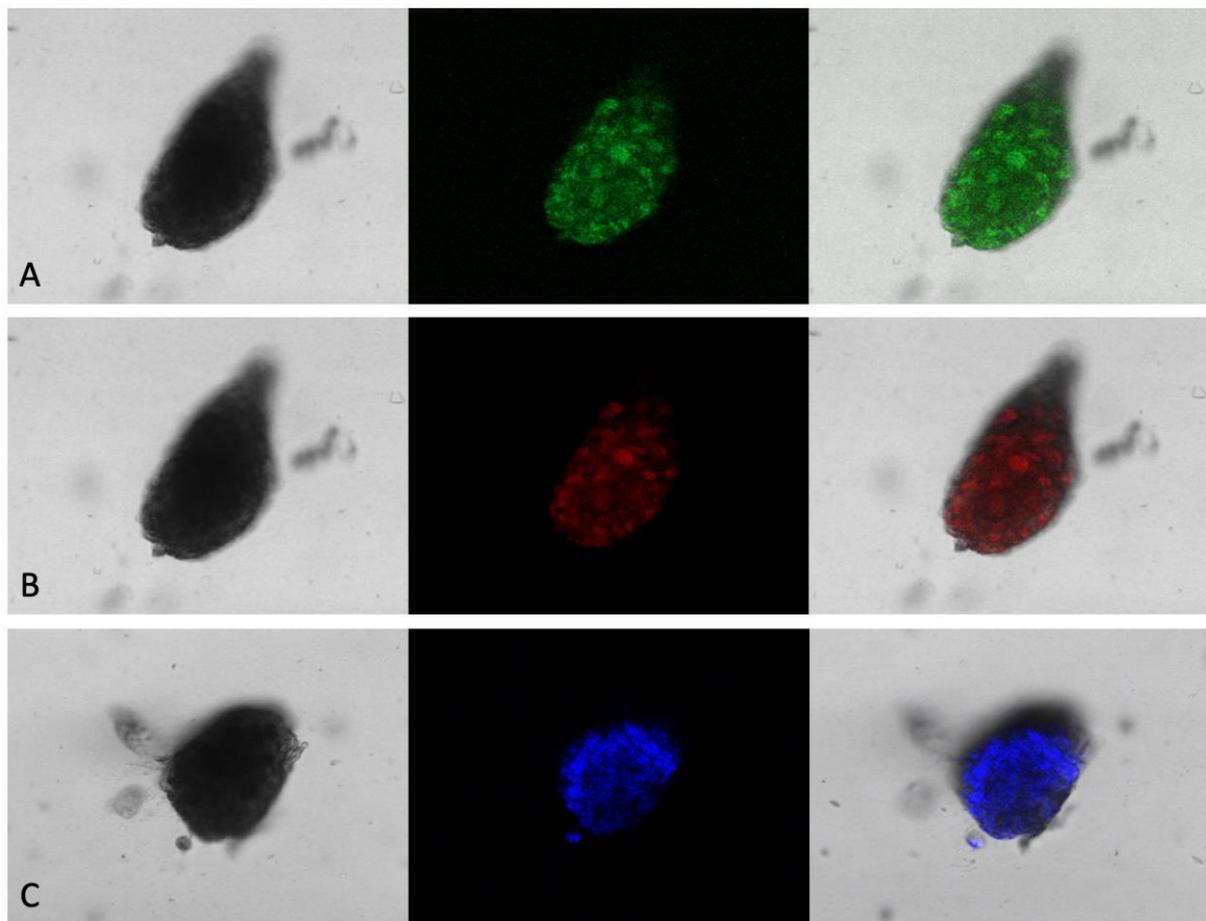


Figura 58. Ensayo de viabilidad celular utilizando tinción live (A) - dead (B), y tinción con Hoechst 33342 (C).

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

El objetivo del presente trabajo es la fabricación de una plataforma de cultivo celular 3D para realizar estudios de diferenciación con células madre mesenquimales del tejido adiposo. De las distintas plataformas presentes en la literatura, se optó por la bioimpresión 3D, utilizando una biotinta de agregados celulares embebidos en un hidrogel de gelatina-alginato.

Cuando se tuvieron suficientes células expandidas en los cultivos celulares, se utilizaron tres técnicas diferentes para la formación de los agregados celulares en forma de esferoides: *hanging drops*, una solución comercial y una solución de elaboración propia.

El método de los *hanging drops* ha sido útil como primera toma de contacto en la fabricación de esferoides. No obstante, esta solución fue posteriormente descartada por dos razones: la escalabilidad y la heterogeneidad entre esferoides. En cuanto a la escalabilidad, el número de esferoides que se podía recolectar, por cada siembra realizada, era bastante inferior al de las otras dos técnicas. Así mismo, el diámetro de los esferoides formados era bastante variable para una misma densidad celular, y el número de esferoides por microgota, en muchas ocasiones, era mayor de dos. Esto hizo que la estimación de los diámetros de los esferoides, en función de las densidades celulares, fuera poco viable.

La solución comercial, por su parte, ha permitido la generación de una gran cantidad de esferoides (alrededor de 300) por pocillo sembrado. Además, los diámetros de estos eran bastante homogéneos y proporcionales a la densidad celular sembrada.

La solución de elaboración propia ha tenido resultados prometedores en dos aspectos: en la fabricación del molde de formación de los esferoides como tal, y en el tamaño de los esferoides formados. En relación con el primer aspecto, se ha conseguido que los moldes iniciales, diseñados por ordenador, se imprimieran en 3D con buena resolución. Tras su impresión, han sido útiles para fabricar los moldes de PDMS con los que, posteriormente, se ha generado la estructura final de agarosa para la formación de los esferoides. En cuanto al segundo aspecto, se puede concluir que los esferoides formados por el método propio y por la solución comercial, no presentan diferencia significativa en cuanto al diámetro medio de esferoide, $146,31 \pm 10,37 \mu\text{m}$, y $138,02 \pm 21,46 \mu\text{m}$, respectivamente. Si bien es cierto, la variabilidad en el diámetro, utilizando el molde de agarosa, es significativamente mayor que utilizando el molde comercial.

Una vez formados los agregados celulares, estos han sido encapsulados en el hidrogel de gelatina-alginato para la formación de la plataforma de cultivo celular. La correcta bioimpresión de esta plataforma, en forma de rejilla cuadrada, permite concluir que el programa Gcode, encargado del proceso de bioimpresión, era adecuado. Dicho programa ha permitido controlar, de forma eficaz,

aspectos como el desplazamiento del cabezal, la temperatura de impresión o la apertura y el cierre de la válvula del sistema neumático de extrusión.

En conclusión, se ha conseguido generar una plataforma de cultivo celular 3D bioimpresa para la realización de estudios de diferenciación de células madre mesenquimales del tejido adiposo. No obstante, en el siguiente capítulo, se mencionan aquellas líneas futuras que se han detectado durante la realización del proyecto, así como aquellas que ya eran conocidas desde un inicio.

CAPÍTULO 6. LÍNEAS FUTURAS

Concluido este trabajo y, a raíz de los resultados prometedores que se han obtenido, surgen posibles líneas futuras. Estas permitirían resolver aquellas limitaciones observadas durante el desarrollo del proyecto, así como la continuación planificada de los experimentos. Las líneas futuras detectadas son:

- **Producir un modelo de obesidad temprana.** Como se ha comentado en varias ocasiones en este proyecto, una vez se desarrolle completamente la plataforma de cultivo celular y se hagan estudios de diferenciación, esta podría servir para realizar diferenciaciones a tejido adiposo que busquen modelizar la obesidad temprana. Así se podrían desarrollar estudios de la enfermedad como la evaluación de posibles fármacos.
- **Mecanizar una cubierta para la punta de impresión.** Experimentalmente se observó que la temperatura del ambiente afectaba significativamente a la bioimpresión cuando era inferior a los 22°C. Para solucionar dicho problema, se podría mecanizar una punta metálica, unida al bloque metálico en el que se soporta la jeringa, evitando así el descontrol de la temperatura en la boquilla de bioimpresión y los taponamientos.
- **Optimizar la tinción de células vivas-muertas.** Como se apreció, al realizar el estudio de células vivas-muertas, se veían las células marcadas tanto como vivas como muertas. Si bien es cierto que dicho problema se puede evitar haciendo otra tinción distinta con Hoechst 33342 con una finalidad similar, sería interesante optimizar la tinción anterior para que devolviera mejores resultados.
- **Realizar diferenciaciones celulares de distintos tipos.** Una vez se compruebe la diferenciación celular al tipo más favorable, resultaría interesante desarrollar distintos medios de cultivo que produzcan distintos tipos celulares.
- **Optimizar el molde de agarosa.** Se vio que, pasados 7 días, el molde de agarosa para la formación de esferoides comenzaba a degradarse. Esto no afectaba a la formación y utilidad de estos ya que al quinto día eran recolectados. No obstante, podría ser de utilidad optimizar dicho molde para que su degradación fuera más tardía.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

- A.E.M.P.S. (2021). *Investigación preclínica de medicamentos de uso humano*. <https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/investigacion-preclinica-de-medicamentos-de-uso-humano/#uso>
- Agarwal, S., Sudhini, Y. R., Reiser, J., & Altintas, M. M. (2021). From Infancy to Fancy: A Glimpse into the Evolutionary Journey of Podocytes in Culture. *Kidney360*, 2(2), 385–397. <https://doi.org/10.34067/KID.0006492020>
- Agarwala, S. (2016). A perspective on 3D bioprinting technology: Present and future. In *American Journal of Engineering and Applied Sciences* (Vol. 9, Issue 4, pp. 985–990). Science Publications. <https://doi.org/10.3844/ajeassp.2016.985.990>
- Akkouch, A., Yu, Y., & Ozbolat, I. T. (2015). Microfabrication of scaffold-free tissue strands for three-dimensional tissue engineering. *Biofabrication*, 7(3). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/3/031002>
- Axpe, E., & Oyen, M. L. (2016). Applications of alginate-based bioinks in 3D bioprinting. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 12, p. 1976). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17121976>
- Bártolo, P. J. (2011). Stereolithography - Materials, Processes and Applications. In *Springer*.
- Bedell, M. L., Melchiorri, A. J., Aleman, J., Skardal, A., & Mikos, A. G. (2020). A high-throughput approach to compare the biocompatibility of candidate bioink formulations. *Bioprinting*, 17, e00068. <https://doi.org/10.1016/J.BPRINT.2019.E00068>
- Billiet, T., Vandenhoute, M., Schelfhout, J., Van Vlierberghe, S., & Dubruel, P. (2012). A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. In *Biomaterials* (Vol. 33, Issue 26, pp. 6020–6041). Biomaterials. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.050>
- Boutin, M. E., Voss, T. C., Titus, S. A., Cruz-Gutierrez, K., Michael, S., & Ferrer, M. (2018). A high-throughput imaging and nuclear segmentation analysis protocol for cleared 3D culture models. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29169-0>
- Bu, N.-U., Lee, H.-S., Lee, B.-N., Hwang, Y.-C., Kim, S.-Y., Chang, S. W., Choi, K.-K., Kim, D.-S., & Jang, J.-H. (2020). In Vitro Characterization of Dental Pulp Stem Cells Cultured in Two Microsphere-Forming Culture Plates. *Journal of Clinical Medicine*, 9(1), 242. <https://doi.org/10.3390/jcm9010242>
- Cedikova, M., Kripnerová, M., Dvorakova, J., Pitule, P., Grundmanova, M., Babuska, V., Mullerova, D., & Kuncova, J. (2016). Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. In *Stem Cells International* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/6067349>
- Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P., & Noisa, P. (2019). Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. In *World Journal of Stem Cells* (Vol. 11, Issue 12, pp. 1065–1083). Baishideng Publishing Group Co.

<https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i12.1065>

- Cheng, M., Wahafu, T., Jiang, G., Liu, W., Qiao, Y., Peng, X., Cheng, T., Zhang, X., He, G., & Liu, X. (2016). A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep24134>
- Dababneh, A. B., & Ozbolat, I. T. (2014). Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review. *Journal of Manufacturing Science and Engineering, Transactions of the ASME*, 136(6). <https://doi.org/10.1115/1.4028512>
- Das, S., Kim, S. W., Choi, Y. J., Lee, S., Lee, S. H., Kong, J. S., Park, H. J., Cho, D. W., & Jang, J. (2019). Decellularized extracellular matrix bioinks and the external stimuli to enhance cardiac tissue development in vitro. *Acta Biomaterialia*, 95, 188–200. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.026>
- Decarli, M., do Amaral, R., Dos Santos, D., Tofani, L., Katayama, E., Rezende, R., Silva, J., Swiech, K., Suazo, C., Mota, C., Moroni, L., & Moraes, Â. (2021). Cell spheroids as a versatile research platform: formation mechanisms, high throughput production, characterization and applications. *Biofabrication*, 13(3). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ABE6F2>
- Del Agua, I., Marina, S., Pitsalidis, C., Mantione, D., Ferro, M., Iandolo, D., Sanchez-Sanchez, A., Malliaras, G. G., Owens, R. M., & Mecerreyes, D. (2018). *Conducting Polymer Scaffolds Based on Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and Xanthan Gum for Live-Cell Monitoring*. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00458>
- Doss, M. X., & Sachinidis, A. (2019). Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells*, 8(5), 403. <https://doi.org/10.3390/cells8050403>
- Esteve Ràfols, M. (2014). Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 61(2), 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.endoen.2014.02.001>
- European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Laboratory Handbook 4th Edition. (n.d.). *Cell Types & Culture Characteristics*. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-types-culture>
- Ferraro, G. A., Mizuno, H., & Pallua, N. (2016). Adipose stem cells: From bench to bedside. In *Stem Cells International* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/6484038>
- Ferreira, L. P., Gaspar, V. M., & Mano, J. F. (2018). Design of spherically structured 3D in vitro tumor models -Advances and prospects. *Acta Biomaterialia*, 75, 11–34. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2018.05.034>
- Freshney, R. I. (2015). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 7th Edition* | Wiley. <https://www.wiley.com/en-us/Culture+of+Animal+Cells%3A+A+Manual+of+Basic+Technique+and+Specialized+Applications%2C+7th+Edition-p-9781118873656>
- Gao, W., Wu, D., Wang, Y., Wang, Z., Zou, C., Dai, Y., Ng, C. F., Teoh, J. Y. C., & Chan, F. L. (2018). Development of a novel and economical agar-based non-adherent three-dimensional culture method for enrichment of cancer stem-like cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 243. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0987-x>
- Geserick, M., Vogel, M., Gausche, R., Lipek, T., Spielau, U., Keller, E., Pfäffle, R., Kiess, W., & Körner, A. (2018). Acceleration of BMI in Early Childhood and Risk of Sustained Obesity.

- <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1803527>, <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1803527> 379(14), 1303–1312.
- Gu, Z., Fu, J., Lin, H., & He, Y. (2020). Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. In *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 15, Issue 5, pp. 529–557). Shenyang Pharmaceutical University. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.11.003>
- Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D., & Ozbolat, I. T. (2017). The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances*, 35(2), 217–239. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2016.12.006>
- Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2014). Pregnancy. In *Human Reproductive Biology* (pp. 175–204). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382184-3.00010-6>
- Jun, I., Han, H. S., Edwards, J. R., & Jeon, H. (2018). Electrospun fibrous scaffolds for tissue engineering: Viewpoints on architecture and fabrication. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19030745>
- Koledova, Z. (2017). 3D cell culture: An introduction. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1612, pp. 1–11). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6_1
- Kuroda, K., Kabata, T., Hayashi, K., Maeda, T., Kajino, Y., Iwai, S., Fujita, K., Hasegawa, K., Inoue, D., Sugimoto, N., & Tsuchiya, H. (2015). The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12891-015-0701-4>
- Łabowska, M. B., Cierluk, K., Jankowska, A. M., Kulbacka, J., Detyna, J., Michalak, I., & Pi, A. M. J. (2021). A Review on the Adaption of Alginate-Gelatin Hydrogels for 3D Cultures and Bioprinting. <https://doi.org/10.3390/ma14040858>
- Levato, R., Visser, J., Planell, J. A., Engel, E., Malda, J., & Mateos-Timoneda, M. A. (2014). Biofabrication of tissue constructs by 3D bioprinting of cell-laden microcarriers. *Biofabrication*, 6(3), 035020. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035020>
- Li, Z., Huang, S., Liu, Y., Yao, B., Hu, T., Shi, H., Xie, J., & Fu, X. (2018). Tuning Alginate-Gelatin Bioink Properties by Varying Solvent and Their Impact on Stem Cell Behavior. *Scientific Reports 2018* 8:1, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26407-3>
- Liu, X., Wang, X., Wang, X., Ren, H., He, J., Qiao, L., & Cui, F. Z. (2013). Functionalized self-assembling peptide nanofiber hydrogels mimic stem cell niche to control human adipose stem cell behavior in vitro. *Acta Biomaterialia*, 9(6), 6798–6805. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2013.01.027>
- Lü, S., Gao, C., Xu, X., Bai, X., Duan, H., Gao, N., Feng, C., Xiong, Y., & Liu, M. (2015). Injectable and Self-Healing Carbohydrate-Based Hydrogel for Cell Encapsulation. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(23), 13029–13037. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b03143>
- Malda, J., Visser, J., Melchels, F., Jüngst, T., Hennink, W., Dhert, W., Groll, J., & Huttmacher, D. (2013). 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 25(36), 5011–5028. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201302042>
- Mirab, F., Kang, Y. J., & Majd, S. (2019). Preparation and characterization of size-controlled glioma spheroids using agarose hydrogel microwells. *PLOS ONE*, 14(1), e0211078. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0211078>
- Mizuno, H. (2009). Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and a literature review. In *Journal of Nippon Medical School* (Vol. 76, Issue 2, pp. 56–

- 66). <https://doi.org/10.1272/jnms.76.56>
- Mummery, C., Van de Stolpe, A., Roelen, B. A. J., & Clevers, H. (2014). What Are Stem Cells? In *Stem Cells* (pp. 53–68). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411551-4.00003-9>
- Murphy, S. V., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. In *Nature Biotechnology* (Vol. 32, Issue 8, pp. 773–785). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
- Ozbolat, I. T. (2017). Extrusion-Based Bioprinting. *3D Bioprinting*, 93–124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803010-3.00004-4>
- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., & Paul Solomon, F. D. (2015). 3D cell culture systems: Advantages and applications. *Journal of Cellular Physiology*, 230(1), 16–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>
- Schmidleithner, C., & Kalaskar, D. M. (2018). Stereolithography. In *3D Printing*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78147>
- Seol, Y. J., Kang, H. W., Lee, S. J., Atala, A., & Yoo, J. J. (2014). Bioprinting technology and its applications. In *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* (Vol. 46, Issue 3, pp. 342–348). European Association for Cardio-Thoracic Surgery. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezu148>
- Skloot, R. (2010). *The immortal life of Henrietta Lacks*. Crown Publishers.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tan, G. Z., & Zhou, Y. (2019). Electrospinning of biomimetic fibrous scaffolds for tissue engineering: a review. In *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* (pp. 1–14). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1636248>
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *Introduction to Cell Culture*. Recuperado de [//www.thermofisher.com/es/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html](http://www.thermofisher.com/es/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html)
- Tu, T.-Y., Wang, Z., Bai, J., Sun, W., Peng, W. K., Huang, R. Y.-J., Thiery, J.-P., & Kamm, R. D. (2014). Rapid prototyping of concave microwells for the formation of 3D multicellular cancer aggregates for drug screening. *Advanced Healthcare Materials*, 3(4), 609. <https://doi.org/10.1002/ADHM.201300151>
- Ungrin, M. D., Joshi, C., Nica, A., Bauwens, C., & Zandstra, P. W. (2008). Reproducible, Ultra High-Throughput Formation of Multicellular Organization from Single Cell Suspension-Derived Human Embryonic Stem Cell Aggregates. *PLOS ONE*, 3(2), e1565. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0001565>
- Verjans, E.-T., Doijen, J., Luyten, W., Landuyt, B., & Schoofs, L. (2017). *Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: worth the effort?* <https://doi.org/10.1002/jcp.26052>
- Wang, D. Z., Koo, K.-I., Kim, K., Wang, Z., & Samanipour, R. (2015). Organ-on-a-Chip Platforms for Drug Delivery and Cell Characterization: A Review. *Sensors and Materials*, 27(6), 487–506. <https://doi.org/10.18494/SAM.2015.1086>
- Wankhade, U. D., Shen, M., Kolhe, R., & Fulzele, S. (2016). Advances in Adipose-Derived Stem Cells Isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering. In *Stem Cells International* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/3206807>
- World Health Organization. (2021). *Guidance on regulations for the transport of infectious*

substances. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240019720>

Xie, Z., Gao, M., Lobo, A. O., & Webster, T. J. (2020). 3D Bioprinting in Tissue Engineering for Medical Applications: The Classic and the Hybrid. *Polymers*, 12(8), 1717. <https://doi.org/10.3390/polym12081717>

DOCUMENTO II. PRESUPUESTO

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1. Introducción	1
2. Mano de obra, materiales y maquinaria	1
3. Precios descompuestos.....	3
4. Presupuestos parciales	9
4. Presupuesto de ejecución material	9

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CÓDIGO DE LOS ELEMENTOS PRESUPUESTADOS	1
TABLA 2. CUADRO DE LA MANO DE OBRA	1
TABLA 3. CUADRO DE LOS MATERIALES	2
TABLA 4. CUADRO DE LA MAQUINARIA	3
TABLA 5. CUADRO DE LOS PRECIOS DESCOMPUESTOS.....	3
TABLA 6. CUADRO DE LOS PRESUPUESTOS PARCIALES.....	9
TABLA 7. CUADRO DEL PRESUPUESTO TOTAL DEL PROYECTO.....	9

PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN

El presente presupuesto tiene como objetivo poner en valor el trabajo final de máster realizado y su viabilidad económica. Para ello, se han estimado los costes de los procedimientos detallados en el *Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS* de la memoria anterior.

Los recursos empleados para el desarrollo de este proyecto se clasifican, como se recoge en la *Tabla 1*, en: mano de obra, materiales y maquinaria. Se han realizado los cuadros de costes para estas categorías, seguido de los cuadros descompuestos de los procedimientos del proyecto. Por último, se han obtenido los presupuestos parciales y el presupuesto de ejecución material.

Tabla 1. Código de los elementos presupuestados.

Código	Descripción
M.O.	Mano de Obra
MAT.	Materiales
MAQ.	Maquinaria

2. MANO DE OBRA, MATERIALES Y MAQUINARIA

Este apartado recoge los cuadros para la mano de obra (*Tabla 2*), los materiales (*Tabla 3*) y la maquinaria (*Tabla 4*). Además de los recursos económicos materiales, los recursos humanos necesarios para este proyecto han sido los siguientes:

- Alejandro López Cuquerella, autor del TFM.
- Dr. Guillermo Vilariño Feltrer, tutor encargado de la dirección y coordinación del TFM.
- Dra. Carmen Escobedo Lucea, tutora encargada de la dirección experimental y coordinación del TFM.
- Dr. Andrés Sanz García, tutor encargado de la dirección experimental del TFM.

Tabla 2. Cuadro de la mano de obra.

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
M.O. 1	Graduado en Ingeniería Biomédica	520,00	h	12,00	6240
M.O. 2	Tutor del proyecto	50,00	h	45,00	2250
M.O. 3	Tutora experimental del proyecto	100,00	h	45,00	4500
M.O.4	Tutor experimental del proyecto	50,00	h	45,00	2250
TOTAL (€)					15240

Tabla 3. Cuadro de los materiales

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 1	Gibco DMEM GlutaMax	4650,00	mL	0,05	232,50
MAT. 2	FBS	300,00	mL	1,22	366,00
MAT. 3	Penicilina-Estreptomicina	50,00	mL	0,16	8,00
MAT. 4	Tubo falcon de 50 mL	121,00	ud	0,47	56,87
MAT. 5	Sistema filtrador de medio	10,00	ud	11,86	118,60
MAT. 6	Tubo falcon de 15 mL	107,00	ud	0,44	47,08
MAT. 7	Frasco cultivo T25	195,00	ud	1,73	337,35
MAT. 8	Micropipeta P1000	147,00	ud	0,05	7,35
MAT. 9	Pipeta serológica 2 mL	272,00	ud	0,11	29,92
MAT. 10	Pipeta serológica 5 mL	298,00	ud	0,15	44,70
MAT. 11	Pipeta serológica 10 mL	173,00	ud	0,20	34,60
MAT. 12	DPBS	838,00	mL	0,06	50,28
MAT. 13	Tryple	240,00	mL	0,09	21,60
MAT. 14	Par de guantes	200,00	ud	0,12	24,00
MAT. 15	DMSO	1,00	mL	0,05	0,05
MAT. 16	Criotubo	10,00	ud	0,60	6,00
MAT. 17	Micropipeta P10	42,00	ud	0,05	2,10
MAT. 18	Cámara de Neubauer	1,00	ud	60,00	60,00
MAT. 19	Placa Petri	2,00	ud	1,70	3,40
MAT. 20	Aggrewell 800	2,00	ud	56,00	112,00
MAT. 21	Rinsing solution	24,00	mL	0,44	10,56
MAT. 22	Trypan blue solution	0,10	mL	0,40	0,04
MAT. 23	Microtubo eppendorf de 1,5 mL	20,00	mL	0,05	1,00
MAT. 24	Cubreobjetos	10,00	ud	0,10	1,00
MAT. 25	Bobina de PLA	19,50	g	0,02	0,39
MAT. 26	Resina impresión 3D	3,00	mL	0,19	0,57
MAT. 27	Kit PDMS	20,00	g	0,28	5,60
MAT. 28	Agarosa en polvo	4,10	g	1,89	7,75
MAT. 29	Gelatina en polvo	10,00	g	0,39	3,90
MAT. 30	Alginato en polvo	2,00	g	0,87	1,74
MAT. 31	Agua milli-Q	0,50	L	0,20	0,10
MAT. 32	Jeringuilla bioimpresión de 3 cc	10,00	ud	0,24	2,40
MAT. 33	Punta de bioimpresión	40,00	ud	0,06	2,40
MAT. 34	Kit Rneasy Plus Mini (50)	0,08	ud	327,12	26,17
MAT. 35	cDNA Reverse Transcription Kit (200)	0,02	ud	418,00	8,36
MAT. 36	Paraformaldehido en polvo	6,00	g	0,08	0,48
MAT. 37	Criostato servicio microscopía	20,00	ud	3,40	68,00
MAT. 38	Anticuerpo Ki-67 APC	1,00	ud	3,02	3,02
MAT. 39	Antifade Mountant with DAPI	0,20	mL	10,80	2,16
MAT. 40	BSA	2,00	mL	11,50	23,00
MAT. 41	Glicina	4,00	mL	0,16	0,64
MAT. 42	Tween 20	2,00	mL	2,76	5,52
MAT. 43	Tritón x-100	0,20	mL	0,75	0,15
MAT. 44	Monoclonal anti-fibronectin	1,00	µL	4,38	4,38
TOTAL (€)					1741,73

Para el cálculo del presupuesto en maquinaria (*Tabla 4*), se ha tenido en cuenta la tabla de coeficientes de amortización publicada en el Boletín Oficial del Estado (BOE-A-2004-14600). El punto 9 de la agrupación 92 – Sanidad y servicios veterinarios, de la división 9 – Otros servicios, establece que las instalaciones y equipos de laboratorio tienen un período máximo de amortización de 14 años. Para calcular el coste por hora de cada maquinaria utilizada, se ha atendido a la siguiente fórmula:

$$C = \frac{Cm \cdot Tu}{P.A.}$$

Donde *Cm* es el coste de la máquina, *Tu* es el tiempo de uso en horas y *P.A.* es el período de amortización.

Tabla 4. Cuadro de la maquinaria.

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAQ. 1	Bomba de vacío	171,00	h	0,02	3,42
MAQ. 2	Cabina de flujo laminar	257,00	h	0,12	30,84
MAQ. 3	Baño de agua caliente	5,00	h	0,01	0,05
MAQ. 4	Incubadora Forma Steri-Cycle i160	248,00	h	0,22	54,56
MAQ. 5	Centrífuga Eppendorf 5810r	9,00	h	0,17	1,53
MAQ. 6	Ordenador portátil	250,00	h	0,03	7,50
MAQ. 7	Impresora 3D Prusa I3 MK3S	1,50	h	0,02	0,03
MAQ. 8	Impresora 3D Form 3	10,00	h	0,10	1,00
MAQ. 9	Estufa de laboratorio	24,00	h	0,01	0,24
MAQ. 10	Termoagitador magnético	5,00	h	0,01	0,05
MAQ. 11	Espectrofotómetro NanoDrop One	2,00	h	0,08	0,16
MAQ. 12	Vórtex	2,00	h	0,01	0,02
MAQ. 13	Termociclador	1,00	h	0,07	0,07
MAQ. 14	Microscopio fluorescencia Leica	8,00	h	0,09	0,72
TOTAL (€)					100,19

3. PRECIOS DESCOMPUESTOS

En la *Tabla 5* se muestra el cuadro del presupuesto descompuesto. Este cuadro recoge el precio que supone la realización de los principales procedimientos desarrollados durante este TFM.

Tabla 5. Cuadro de los precios descompuestos.

EXP.1. Medio cultivo hASCs (500 mL)

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 1	Gibco DMEM GlutaMax	465,00	mL	0,05	23,25
MAT. 2	FBS	30,00	mL	1,22	36,60
MAT. 3	Penicilina-Estreptomina	5,00	mL	0,16	0,80
MAT. 4	Tubo falcon de 50 mL	10,00	ud	0,47	4,70
MAT. 5	Sistema filtrador de medio	1,00	ud	11,86	11,86
MAQ. 1	Bomba de vacío	0,50	h	0,02	0,01
MAQ. 2	Cabina de flujo laminar	0,50	h	0,12	0,06
MAQ. 3	Baño de agua caliente	0,50	h	0,01	0,01
TOTAL (€)					77,29

EXP.2. Descongelación y siembra hASCs (1 vial)

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
EXP. 1	Medio Cultivo Celular	9,00	mL	0,15	1,35
MAT. 4	Tubo falcon de 50 mL	0,18	ud	0,47	0,08
MAT. 6	Tubo falcon de 15 mL	1,00	ud	0,44	0,44
MAT. 7	Frasco cultivo T25	1,00	ud	1,73	1,73
MAT. 8	Micropipeta P1000	1,00	ud	0,05	0,05
MAT. 10	Pipeta serológica 5 mL	2,00	ud	0,15	0,30
MAQ. 2	Cabina de flujo lamninar	2,00	h	0,12	0,24
MAQ. 4	Incubadora Forma Steri-Cycle i160	2,00	h	0,22	0,44
TOTAL (€)					4,63

EXP.3. Cambio de medio frasco de cultivo T25

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 10	Pipeta serológica 5 mL	1,00	ud	0,15	0,15
MAT. 9	Pipeta serológica 2 mL	1,00	ud	0,11	0,11
EXP. 1	Medio Cultivo Celular	6,00	mL	0,15	0,90
MAT. 4	Tubo falcon de 50 mL	0,12	ud	0,47	0,06
MAQ. 1	Bomba de vacío	0,50	h	0,02	0,01
MAQ. 2	Cabina de flujo lamninar	0,50	h	0,12	0,06
MAQ. 4	Incubadora Forma Steri-Cycle i160	0,50	h	0,22	0,11
TOTAL (€)					1,40

EXP.4. Pase celular frasco de cultivo T25 (1:3)

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 12	DPBS	9,00	mL	0,06	0,54
MAT. 13	Tryple	3,00	mL	0,09	0,27
MAT. 9	Pipeta serológica 2 mL	2,00	ud	0,11	0,22
MAT. 10	Pipeta serológica 5 mL	2,00	ud	0,15	0,30
MAT. 11	Pipeta serológica 10 mL	2,00	ud	0,20	0,40
MAT. 8	Micropipeta P1000	1,00	ud	0,05	0,05
MAT. 7	Frasco cultivo T25	3,00	ud	1,73	5,19
EXP. 1	Medio Cultivo Celular	27,00	mL	0,15	4,05
MAT. 4	Tubo falcon de 50 mL	0,54	ud	0,47	0,25
MAT. 6	Tubo falcon de 15 mL	1,00	ud	0,44	0,44
MAQ. 1	Bomba de vacío	2,00	h	0,02	0,04
MAQ. 2	Cabina de flujo lamninar	2,00	h	0,12	0,24
MAQ. 4	Incubadora Forma Steri-Cycle i160	2,00	h	0,22	0,44
TOTAL (€)					12,43

EXP.5. Congelación frasco de cultivo T25

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 12	DPBS	9,00	mL	0,06	0,54
MAT. 13	Tryple	3,00	mL	0,09	0,27
MAT. 9	Pipeta serológica 2 mL	2,00	ud	0,11	0,22
MAT. 10	Pipeta serológica 5 mL	2,00	ud	0,15	0,30
MAT. 11	Pipeta serológica 10 mL	2,00	ud	0,20	0,40
MAT. 8	Micropipeta P1000	2,00	ud	0,05	0,10
EXP. 1	Medio Cultivo Celular	6,90	mL	0,15	1,04
MAT. 4	Tubo falcon de 50 mL	0,14	ud	0,47	0,07
MAT. 6	Tubo falcon de 15 mL	1,00	ud	0,44	0,44
MAT. 15	DMSO	0,10	mL	0,05	0,01
MAT. 16	Criotubo	1,00	ud	0,60	0,60
MAQ. 1	Bomba de vacío	2,00	h	0,02	0,04
MAQ. 2	Cabina de flujo lamninar	2,00	h	0,12	0,24
MAQ. 4	Incubadora Forma Steri-Cycle i160	2,00	h	0,22	0,44
TOTAL (€)					4,70

EXP.6. Recuento celular frasco de cultivo T25

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 12	DPBS	9,00	mL	0,06	0,54
MAT. 13	Tryple	3,00	mL	0,09	0,27
MAT. 9	Pipeta serológica 2 mL	2,00	ud	0,11	0,22
MAT. 10	Pipeta serológica 5 mL	2,00	ud	0,15	0,30
MAT. 11	Pipeta serológica 10 mL	2,00	ud	0,20	0,40
MAT. 8	Micropipeta P1000	2,00	ud	0,05	0,10
MAT. 17	Micropipeta P10	2,00	ud	0,05	0,10
MAT. 6	Tubo falcon de 15 mL	1,00	ud	0,44	0,44
MAT. 22	Trypan blue solution	0,01	mL	0,40	0,00
MAT. 23	Microtubo eppendorf de 1,5 mL	2,00	mL	0,05	0,10
MAT. 24	Cubreobjetos	1,00	ud	0,10	0,10
MAQ. 1	Bomba de vacío	2,00	h	0,02	0,04
MAQ. 2	Cabina de flujo lamninar	2,00	h	0,12	0,24
MAQ. 4	Incubadora Forma Steri-Cycle i160	2,00	h	0,22	0,44
TOTAL (€)					3,29

EXP.7. Hanging Drops

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 19	Placa Petri	2,00	ud	1,70	3,40
EXP. 1	Medio Cultivo Celular	1,00	mL	0,15	0,15
MAT. 4	Tubo falcon de 50 mL	0,02	ud	0,47	0,01
MAT. 12	DPBS	6,00	mL	0,06	0,36
MAT. 6	Tubo falcon de 15 mL	1,00	ud	0,44	0,44
MAQ. 2	Cabina de flujo lamninar	2,00	h	0,12	0,24
MAT. 17	Micropipeta P10	2,00	ud	0,05	0,10
TOTAL (€)					4,70

EXP.8. Aggrewell

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 20	Aggrewell 800	1,00	ud	56,00	56,00
MAT. 21	Rinsing solution	12,00	mL	0,44	5,28
MAT. 11	Pipeta serológica 10 mL	2,00	ud	0,20	0,40
MAT. 8	Micropipeta P1000	1,00	ud	0,05	0,05
EXP. 1	Medio Cultivo Celular	48,00	mL	0,15	7,20
MAT. 9	Pipeta serológica 2 mL	2,00	ud	0,11	0,22
MAQ. 1	Bomba de vacío	2,00	h	0,02	0,04
MAQ. 2	Cabina de flujo lamninar	2,00	h	0,12	0,24
MAQ. 4	Incubadora Forma Steri-Cycle i160	2,00	h	0,22	0,44
EXP. 6	Recuento celular	1,00	ud	3,29	3,29
TOTAL (€)					73,16

EXP.9. Molde de elaboración propia

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
EXP. 9.1.	Moldes de impresión 3D	1,00	ud	1,99	1,99
EXP. 9.2.	Moldes de PDMS	1,00	ud	5,88	5,88
EXP. 9.3.	Molde de agarosa	1,00	ud	2,58	2,58
TOTAL (€)					10,45

EXP.9.1. Moldes de impresión 3D

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAQ. 7	Impresora 3D Prusa I3 MK3S	1,50	h	0,02	0,03
MAQ. 8	Impresora 3D Form 3	10,00	h	0,10	1,00
MAT. 25	Bobina de PLA	19,50	g	0,02	0,39
MAT. 26	Resina impresión 3D	3,00	mL	0,19	0,57
TOTAL (€)					1,99

EXP.9.2. Moldes de PDMS

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 27	Kit PDMS	20,00	g	0,28	5,60
MAQ. 1	Bomba de vacío	2,00	h	0,02	0,04
MAQ. 9	Estufa de laboratorio	24,00	h	0,01	0,24
TOTAL (€)					5,88

EXP.9.3. Molde de agarosa

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 28	Agarosa en polvo	1,00	g	1,89	1,89
MAT. 31	Agua milli-Q	0,05	L	0,20	0,01
MAQ. 10	Termoagitador magnético	1,00	h	0,01	0,01
MAT. 4	Tubo falcon de 50 mL	1,00	ud	0,47	0,47
MAT. 11	Pipeta serológica 10 mL	1,00	ud	0,20	0,20
TOTAL (€)					2,58

EXP.10. Formación de la biotinta

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 29	Gelatina en polvo	10,00	g	0,39	3,90
MAT. 30	Alginato en polvo	2,00	g	0,87	1,74
MAT. 31	Agua milli-Q	0,10	L	0,20	0,02
MAT. 32	Jeringuilla bioimpresión de 3 cc	10,00	ud	0,24	2,40
MAT. 33	Punta de bioimpresión	40,00	ud	0,06	2,40
MAQ. 10	Termoagitador magnético	1,00	h	0,01	0,01
MAT. 6	Tubo falcon de 15 mL	10,00	ud	0,44	4,40
MAT. 11	Pipeta serológica 10 mL	5,00	ud	0,20	1,00
EXP. 8	Aggrewell 24 pocillos	1,00	ud	73,16	73,16
TOTAL (€)					89,03

EXP.11. Extracción de ARN

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 34	Kit Rneasy Plus Mini (50)	0,08	ud	327,12	26,17
MAQ. 5	Centrífuga Eppendorf 5810r	2,00	h	0,17	0,34
MAT. 8	Micropipeta P1000	10,00	ud	0,05	0,50
MAT. 17	Micropipeta P10	10,00	ud	0,05	0,50
MAQ. 11	Espectrofotómetro NanoDrop One	1	h	0,08	0,08
MAQ. 2	Cabina de flujo lamninar	1	h	0,12	0,12
MAQ. 12	Vórtex	1	h	0,01	0,01
TOTAL (€)					27,72

EXP.12. Síntesis de ADNc

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 35	cDNA Reverse Transcription Kit (200)	0,02	ud	418,00	8,36
MAQ. 5	Centrífuga Eppendorf 5810r	2,00	h	0,17	0,34
MAT. 8	Micropipeta P1000	10,00	ud	0,05	0,50
MAT. 17	Micropipeta P10	10,00	ud	0,05	0,50
MAQ. 11	Espectrofotómetro NanoDrop One	1	h	0,08	0,08
MAQ. 2	Cabina de flujo lamninar	1	h	0,12	0,12
MAQ. 12	Vórtex	1	h	0,01	0,01
MAQ. 13	Termociclador	1	h	0,07	0,07
TOTAL (€)					9,98

EXP.13. Criocortes

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 6	Tubo falcon de 15 mL	1,00	ud	0,44	0,44
MAQ. 5	Centrifuga Eppendorf 5810r	0,5	h	0,17	0,09
MAT. 8	Micropipeta P1000	10,00	ud	0,05	0,50
MAT. 12	DPBS	30,00	mL	0,06	1,80
MAT. 28	Agarosa en polvo	0,10	g	1,89	0,19
MAT. 36	Paraformaldehido en polvo	2,00	g	0,08	0,16
MAT. 31	Agua milli-Q	0,10	L	0,20	0,02
MAT. 37	Criostato servicio microscopía	20,00	ud	3,40	68,00
TOTAL (€)					71,19

EXP.14. Inmunohistoquímica

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
EXP. 14.1.	DAPI y KI67	1,00	ud	21,75	21,75
EXP.14.2.	DAPI y FIBRONECTINA	1,00	ud	23,11	23,11
TOTAL (€)					44,86

EXP.14.1. DAPI y KI67

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 38	Anticuerpo Ki-67 APC	1,00	ud	3,02	3,02
MAT. 36	Paraformaldehido en polvo	2,00	g	0,08	0,16
MAT. 31	Agua milli-Q	0,05	L	0,20	0,01
MAT. 12	DPBS	41,00	mL	0,06	2,46
MAT. 39	Antifade Mountant with DAPI	0,10	mL	10,80	1,08
MAT. 40	BSA	1,00	mL	11,50	11,50
MAT. 41	Glicina	2,00	mL	0,16	0,32
MAT. 42	Tween 20	1,00	mL	2,76	2,76
MAT. 43	Tritón x-100	0,10	mL	0,75	0,08
MAQ. 14	Microscopio fluorescencia Leica	4,00	h	0,09	0,36
TOTAL (€)					21,75

EXP.14.2. DAPI y FIBRONECTINA

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidad	Total
MAT. 44	Monoclonal anti-fibronectin	1,00	µL	4,38	4,38
MAT. 36	Paraformaldehido en polvo	2,00	g	0,08	0,16
MAT. 31	Agua milli-Q	0,05	L	0,20	0,01
MAT. 12	DPBS	41,00	mL	0,06	2,46
MAT. 39	Antifade Mountant with DAPI	0,10	mL	10,80	1,08
MAT. 40	BSA	1,00	mL	11,50	11,50
MAT. 41	Glicina	2,00	mL	0,16	0,32
MAT. 42	Tween 20	1,00	mL	2,76	2,76
MAT. 43	Tritón x-100	0,10	mL	0,75	0,08
MAQ. 14	Microscopio fluorescencia Leica	4,00	h	0,09	0,36
TOTAL (€)					23,11

4. PRESUPUESTOS PARCIALES

En la *Tabla 6* se recogen los experimentos anteriormente presupuestados, junto con el número de veces que se repitieron dichos procedimientos. Es decir, se pasa del coste unitario de los experimentos al coste total de cada experimento.

Tabla 6. Cuadro de los presupuestos parciales

Código	Descripción	Cantidad	Unidad	Precio unidac	Total
EXP.1	Medio cultivo celular (500 mL)	10,00	ud	77,29	772,85
EXP.2	Descongelación y siembra hASCs	15,00	ud	4,63	69,52
EXP.3	Cambio de medio frasco cultivo T25	108,00	ud	1,40	150,81
EXP.4	Pase celular frasco cultivo T25(1:3)	60,00	ud	12,43	746,03
EXP.5	Congelación frasco cultivo T25	10,00	ud	4,70	46,96
EXP.6	Recuento celular frasco de cultivo T25	10,00	ud	3,29	32,94
EXP.7	Hanging Drops	1,00	ud	4,70	4,70
EXP.8	Aggrewell	2,00	ud	73,16	146,32
EXP.9.1	Moldes de impresión 3D	1,00	ud	1,99	1,99
EXP.9.2	Moldes de PDMS	2,00	ud	5,88	11,76
EXP.9.3	Molde de agarosa	4,00	ud	2,58	10,32
EXP.10	Formación de la biotinta	1,00	ud	89,03	89,03
EXP.11	Extracción de ARN	1,00	ud	27,72	27,72
EXP.12	Síntesis de ADNc	1,00	ud	9,98	9,98
EXP.13	Criocortes	1,00	ud	71,19	71,19
EXP.14.1	DAPI y KI67	1,00	ud	21,75	21,75
EXP.14.2	DAPI y FIBRONECTINA	1,00	ud	23,11	23,11
TOTAL (€)					2236,97

5. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL

Finalmente, se ha obtenido el presupuesto de ejecución material. Cabe mencionar, que la mano de obra no se ha contabilizado en los precios descompuestos si no en el total del proyecto (*Tabla 7*). El presupuesto para la realización de este proyecto se ha obtenido tras aplicar un 13% de gastos generales junto con el correspondiente IVA (21%).

Tabla 7. Cuadro del presupuesto total del proyecto.

Código	Descripción	Total
EXP.	Experimentos	2236,97
M.O.	Mano de obra	15240,00
Presupuesto de ejecución material		17476,97
Gastos generales (13%)		2272,01
Presupuesto del proyecto		19748,98
IVA (21%)		4147,28
TOTAL (€)		23896,26

El presupuesto de ejecución del proyecto asciende a la cantidad de **VEINTITRÉS MIL OCHO CIENTOS NOVENTA Y SEIS EUROS CON VEINTISÉIS CÉNTIMOS**.

