



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

Diseño de hidrogeles de gelatina-PEG con fibronectina y factores de crecimiento como plataforma in vitro de hepatotoxicidad.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Biomédica

AUTOR/A: Panova , Ekaterina

Tutor/a: Gallego Ferrer, Gloria

Cotutor/a externo: SANCHEZ GONZALEZ, ESTELA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIERÍA
INDUSTRIAL VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

DISEÑO DE HIDROGELES DE GELATINA- PEG CON FIBRONECTINA Y FACTORES DE CRECIMIENTO COMO PLATAFORMA IN VITRO DE HEPATOTOXICIDAD

AUTORA: EKATERINA PANOVA

TUTORA: GLORIA GALLEGO FERRER

COTUTORA: ESTELA SÁNCHEZ GONZÁLEZ

Curso académico: 2021-2022

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, la realización del presente Trabajo Final de Grado no hubiera sido posible sin la oportunidad que me ofrecieron mi tutora y mi cotutora del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular. Les agradezco de todo corazón la confianza que tuvieron para darme la oportunidad de formar parte de este proyecto; y el esfuerzo, la dedicación y la paciencia tan admirable que han tenido conmigo desde mis primeros días en el laboratorio. Gracias a mi tutora por toda la atención, los ánimos, por las críticas y por toda la ayuda ofrecida para la elaboración del trabajo. Gracias a mi cotutora también por todo lo aprendido en el día a día del laboratorio, por explicar las mil y una dudas que me surgían para comprender todos los procesos; y, por supuesto, por el apoyo y la paciencia durante la redacción del documento.

Gracias también a mi familia, a mis amigxs, por sus ánimos en todo momento, por creer en mí, por las veces que me han ayudado a desconectar cuando no me podía dar cuenta de que necesitaba un descanso, por leer los borradores del documento. Vuestra presencia en mi vida no tiene precio.

No puedo olvidar a mis compañeros de laboratorio, sin quiénes el ambiente en el CBIT no hubiera sido el mismo. Gracias por la cálida acogida, por las risas, por los descansos y por ayudarme cuando fuera necesario.

Y gracias a Aquél quien me dio fuerzas para sobrellevarlo todo y llegar hasta el final.

Mil gracias de todo mi corazón.

RESUMEN

Los modelos *in vitro* que se emplean en la detección del efecto de los fármacos en las células hepáticas muestran limitaciones y bajo potencial de predicción. Por ello, actualmente existe una gran necesidad de diseñar nuevos modelos de hepatotoxicidad para ensayos preclínicos que mimeticen máximamente el entorno *in vivo* de los hepatocitos humanos, con el fin de que éstos mantengan su fenotipo y funcionalidad para conseguir resultados extrapolables a humanos. El desarrollo de la ingeniería tisular ha hecho posible afrontar este problema desde varios enfoques innovadores que permiten cada vez un mayor acercamiento a dichas condiciones fisiológicas. Los hidrogeles inyectables a base de componentes derivados de los presentes en la matriz extracelular (ECM) están en el auge de su uso para la fabricación de estas plataformas debido a sus características mecánicas y fisicoquímicas controlables, pudiendo ajustarse con mayor precisión a las de la ECM hepática. Además, muestran baja citotoxicidad y ofrecen la posibilidad de incorporar células y biomoléculas (por ejemplo, la fibronectina (FN)) en la solución precursora, dando como resultado una red entrecruzada con células encapsuladas y biomoléculas ancladas. La adición de moléculas como la FN hace posible la presentación de factores de crecimiento (GF) en fase sólida a las células encapsuladas en el hidrogel, aumentando la eficacia de la plataforma para el mantenimiento del fenotipo y de la funcionalidad de los hepatocitos.

En el presente Trabajo Final de Grado se realizó la optimización de la síntesis de hidrogeles inyectables híbridos basados en gelatina (Gel) y polietilenglicol (PEG) para su aplicación como plataformas de cultivo *in vitro* para pruebas de hepatotoxicidad. Se probaron distintos ratios de Gel-PEG y se determinaron sus propiedades mecánicas, así como su capacidad de retención de agua. Se evaluó la viabilidad celular de la línea celular HepG2 para comprobar la biocompatibilidad y como primera puesta a punto del cultivo. Con estos resultados, se seleccionó la composición 1:0.75 como óptima para continuar los últimos ensayos. En concreto, se evaluó la retención de FN dimérica y monomérica en los hidrogeles, así como la retención del GF de hepatocitos en hidrogeles con y sin FN. De esta manera, se pudo evaluar el efecto de la funcionalización de los hidrogeles con fibronectina. Este trabajo ha permitido la puesta a punto de la plataforma y deja abiertas diversas posibilidades de trabajo para el futuro.

Palabras clave: DILI, hepatotoxicidad, hidrogeles inyectables, gelatina, polietilenglicol, fibronectina, factor de crecimiento de hepatocitos

RESUM

Els models *in vitro* que s'empren en la detecció de l'efecte dels fàrmacs en les cèl·lules hepàtiques mostren limitacions i baix potencial de predicció. Per això, actualment existeix una gran necessitat de dissenyar nous models de hepatotoxicitat per a assajos preclínic que mimetitzen màximament l'entorn *in vivo* dels hepatòcits humans, amb la finalitat que aquests mantinguen el seu fenotip i funcionalitat per a aconseguir resultats extrapolables a humans. El desenvolupament de l'enginyeria tissular ha fet possible afrontar aquest problema des de diversos enfocaments innovadors que permeten cada vegada un major acostament a aquestes condicions fisiològiques. Els hidrogels injectables a base de components derivats dels presents en la matriu extracel·lular (ECM) estan en l'auge del seu ús per a la fabricació d'aquestes plataformes a causa de les seues característiques mecàniques i fisicoquímiques controlables, podent ajustar-les amb major precisió a les de la ECM hepàtica. A més, mostren baixa citotoxicitat i ofereixen la possibilitat d'incorporar cèl·lules i biomolècules (per exemple, la fibronectina (FN)) en la solució precursora, donant com a resultat una xarxa entrecreuada amb cèl·lules encapsulades i biomolècules ancorades. L'addició de molècules com la FN fa possible la presentació del factors de creixement (GF) en fase sòlida a les cèl·lules encapsulades en l'hidrogel, augmentant l'eficàcia de la plataforma per al manteniment del fenotip i de la funcionalitat dels hepatòcits.

En el present Treball Final de Grau es va realitzar l'optimització de la síntesi d'hidrogels injectables híbrids basats en gelatina (Gel) i polietilenglicol (PEG) per a la seua aplicació com a plataformes de cultiu *in vitro* per a proves de hepatotoxicitat. Es van provar diferents ràtios de Gel-PEG i es van determinar les seues propietats mecàniques, així com la seua capacitat de retenció d'aigua. Es va avaluar la viabilitat cel·lular de la línia cel·lular HepG2 per a comprovar la biocompatibilitat i com primera posada a punt del cultiu. Amb aquests resultats, es va seleccionar la composició 1:0.75 com a òptima pala continuar els últims assajos. En concret, es va avaluar la retenció de FN dimèrica i monomèrica en els hidrogels, així com la retenció del GF d'hepatòcits en hidrogels amb i sense FN. D'aquesta manera, es va poder avaluar l'efecte de la funcionalització dels hidrogels amb FN. Aquest treball ha permés la posada a punt de la plataforma i deixa obertes diverses possibilitats de treball per al futur.

Paraules clau: DILI, hepatotoxicitat, hidrogels injectables, gelatina, polietilenglicol, fibronectina, factor de creixement d'hepatòcits

ABSTRACT

In vitro models used to detect the effect of drugs on liver cells show limitations and low predictive potential. Therefore, there is currently a great need to design new hepatotoxicity models for preclinical assays that mimic as closely as possible the *in vivo* environment of human hepatocytes, so that they maintain their phenotype and functionality to achieve results that can be extrapolated to humans. The development of tissue engineering has made it possible to tackle this problem from several innovative approaches that allow an ever-closer approach to these physiological conditions. Injectable hydrogels based on components derived from those present in the ECM are at the forefront of their use for the fabrication of these platforms due to their controllable mechanical and physicochemical characteristics, which can be more closely matched to those of the liver ECM. In addition, they show low cytotoxicity and offer the possibility to incorporate cells and biomolecules (e.g., fibronectin (FN)) into the precursor solution, resulting in a cross-linked network with encapsulated cells and anchored biomolecules. The addition of molecules such as fibronectin enables the presentation of solid-phase growth factors (GF) to the cells encapsulated in the hydrogel, increasing the efficacy of the platform in maintaining the phenotype and functionality of the hepatocytes.

In the present Final Degree Project, the optimisation of the synthesis of hybrid injectable hydrogels based on gelatin (Gel) and poly(ethylene) glycol (PEG) for their application as *in vitro* culture platforms for hepatotoxicity testing was performed. Different Gel-PEG ratios were tested and their mechanical properties as well as their water retention capacity were determined. The cell viability of the HepG2 cell line was evaluated for biocompatibility and as a first culture set-up. Based on these results, the 1:0.75 composition was selected as the optimum for further testing. In particular, the retention of dimeric and monomeric FN in the hydrogels was evaluated, as well as the retention of hepatocyte GF in hydrogels with and without FN. In this way, the effect of functionalisation of the hydrogels with FN could be evaluated. This work has allowed the platform to be fine-tuned and leaves open several possibilities for future work.

Keywords: DILI, hepatotoxicity, injectable hydrogels, gelatin, poly(ethylene) glycol, fibronectin, hepatocyte growth factor.

GLOSARIO

APS – persulfato amónico

ATP – adenosín trifosfato

BSA – albúmina de suero bovino

DILI - daño hepático inducido por fármacos

DMF - N,N-dimetilformamida

DMEM - medio esencial mínimo de Dulbecco

DPBS - tampón fosfato salino de Dulbecco sin calcio y magnesio

ECM – matriz extracelular

FGF - factor de crecimiento de fibroblastos

FN – fibronectina

Gel – gelatina

GF – factor de crecimiento

HGF – factor de crecimiento de hepatocitos

PEG – polietilenglicol

PEG-SG – polietilenglicol succinimidil-glutarato

RGD – arginina-glicina-ácido aspártico

SBF – suero bovino fetal

SDS - dodecil sulfato sódico

SG – succinimidil-glutarato

TCEP - tris(2-carboxietil)fosfina

TEMED - N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamina

TGF – factor de crecimiento transformante

Tris-HCl - tris(hidroximetil) aminometano

VEGF - factor de crecimiento de endotelio vascular

w/v – peso-volumen

DOCUMENTO I: MEMORIA

Índice

1. Motivación	19
2. Normativa	20
3. Introducción	21
3.1. El hígado: macro y microestructura	21
3.2. Daño hepático inducido por fármacos.....	24
3.2.1. Células hepáticas.....	25
3.2.2. Plataformas 3D y cultivos monocapa.....	25
3.2.3. Plataformas actuales de ensayos de toxicidad <i>in vitro</i> y sus limitaciones.....	26
3.3. Uso de hidrogeles como plataformas <i>in vitro</i> para ingeniería tisular.....	26
3.3.1. Hidrogeles	26
3.3.2. Hidrogeles inyectables	27
3.4. Factores de crecimiento. Presentación en fase sólida.....	28
3.5. Modelo propuesto	31
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	33
5. Materiales y métodos	34
5.1. Materiales	34
5.1.1. Hidrogeles	34
5.1.2. Cultivo celular	34
5.2. Métodos.....	35
5.2.1. Preparación de los hidrogeles Gel-PEG.....	35
5.2.2. Tiempo de gelificación y propiedades mecánicas.....	36
5.2.3. Medida del contenido de agua en equilibrio.....	37
5.2.4. Desnaturalización de la fibronectina	38
5.2.5. Incorporación de fibronectina monomérica en hidrogeles Gel-PEG de ratio 1:0.75	40
5.2.6. Incorporación del factor de crecimiento de hepatocitos en hidrogeles Gel-PEG de ratio 1:0.75	41
5.2.7. Cultivo celular	42
5.2.8. Análisis estadístico	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
6.1. PROPIEDADES MECÁNICAS DE HIDROGELES GEL-PEG SIN FN.....	44
6.1.1. Tiempo de gelificación	44
6.1.2. Barrido de amplitud	45

6.1.3.	Barridos de frecuencia	45
6.1.4.	Propiedades mecánicas de los hidrogeles con células encapsuladas	46
6.1.5.	Hidrogeles gelificados frente a hinchados	49
6.2.	VIABILIDAD CELULAR	51
6.3.	CONTENIDO DE AGUA EN EQUILIBRIO DE HIDROGELES GEL-PEG SIN FN	52
6.4.	DESNATURALIZACIÓN DE FN _d	53
6.5.	LIBERACIÓN DE FN _d Y FN _m	54
6.6.	HIDROGELES GELIFICADOS E HINCHADOS CON FN FRENTE A HIDROGELES GEL-PEG SIN FN	55
6.7.	CONTENIDO DE AGUA EN EQUILIBRIO EN HIDROGELES GEL-PEG CON FN FRENTE A HIDROGELES GEL-PEG SIN FN	55
6.8.	LIBERACIÓN DE FACTOR DE CRECIMIENTO.....	56
7.	CONCLUSIONES.....	58
	BIBLIOGRAFÍA.....	59
	ANEXO	65

Índice de figuras

Figura 1. Vista frontal del hígado. Se muestra la separación en dos lóbulos, derecho (izq.) e izquierdo (dcha.), así como la división en segmentos propuesta por Couinaud en base a la anatomía funcional del órgano [2].....	21
Figura 2. Vascularización del hígado (izq.). Microestructura del lóbulo hepático (dcha.) [4].	22
Figura 3. Esquema-resumen de los tipos más comunes de entrecruzamiento físico (dcha.) y químico (izq.) [26]. En el caso del entrecruzamiento químico, son comunes el entrecruzador como mediador (A), los polímeros híbridos (B), reacciones por agentes fotosensibles (C) o el entrecruzamiento por catálisis enzimática (D). En cuanto al entrecruzamiento físico, se tiene como ejemplo las reacciones hidrofóbicas (E), iónicas (F), por puentes de hidrógeno (G) o formación de cristales (H).....	27
Figura 4. Presentación de GF en fase sólida y en fase líquida [36]. Se observa que en el caso de la presentación en fase sólida se tiene una alta concentración local de GF, el GF tiene restringida la difusión y es posible la formación de clústeres con integrinas que permiten la sinergia entre ambas moléculas y aumentan el efecto del GF aún con unas dosis mínimas de éste [36].	29
Figura 5. Estructura de la FN que muestra los puntos de unión a integrinas y a colágeno/gelatina. Los sitios de unión a la heparina (FNIII ₁₂₋₁₄) son también los sitios de unión de los GF [40].	30
Figura 6. Esquema del anclaje de GF a un material sin FN (izq.) y a un material con FN y heparina (dcha.). En el segundo caso el GF (violeta y verde) se encuentra unido en su totalidad a la fibronectina (naranja) y heparina (rojo) [44].	30
Figura 7. Estructura química de la Gel [49]. Los grupos terminales son grupos amino (NH ₂).	31
Figura 8. Estructura química del PEG-SG de cuatro brazos [50].	32
Figura 9. Esquema de la reacción de entrecruzamiento por poliadición entre Gel y PEG-SG [33].	35
Figura 10. Hidrogel pregelificado sobre molde de 300 µL.....	36
Figura 11. Hidrogel pregelificado en plato de reómetro, rodeado por gotas periféricas de agua destilada.	37
Figura 12. Curvas de reología de hidrogeles de Gel-PEG de todos los ratios: A) Módulo de almacenamiento (G') frente a tiempo (s); B) Módulo complejo (G*) frente a deformación (%); C) Módulo de pérdida (G'') frente a frecuencia (Hz); D) G' frente a frecuencia. Las curvas se prepararon empleando 5 réplicas para el ratio 1:0.5 y 4 réplicas para los dos ratios restantes.	44
Figura 13. Gráfica de los resultados del análisis estadístico de los tiempos de gelificación de los ratios Gel-PEG 1:0.75 y 1:0.5. Se emplearon 5 réplicas para el ratio 1:0.5 y 4 réplicas para el ratio 1:0.75. Significancia estadística: ***p<0.001. T-test no emparejado.	45

Figura 14. Curvas de reología obtenidas para el ratio 1:0.5 sin células y con células HepG2 encapsuladas. Se presentan las mismas curvas que en la serie de curvas de reómetro de las muestras sin HepG2 (Figura 12). Las curvas se prepararon empleando 4 réplicas sin células y 2 réplicas con células HepG2 encapsuladas.....	47
Figura 15. Curvas de reología obtenidas para el ratio 1:0.75 sin células y con células HepG2 encapsuladas. Se presentan las mismas curvas que en la serie de curvas de reómetro de las muestras sin HepG2 (Figura 12). Las curvas se prepararon empleando 5 réplicas sin células y 3 réplicas con células HepG2 encapsuladas.....	47
Figura 16. Curvas de reología obtenidas para el ratio 1:1 sin células y con células HepG2 encapsuladas. Se presentan las mismas curvas que en la serie de curvas de reómetro de las muestras sin HepG2 (Figura 12). Las curvas se prepararon empleando 5 réplicas sin células y 3 réplicas con células HepG2 encapsuladas.....	48
Figura 17. Estadística de los valores obtenidos para el G' frente a frecuencia (Hz). Se muestra el promedio de 5, 4 y 3 réplicas de los ratios sin HepG2 y de 3, 3 y 2 réplicas para los ratios con HepG2 encapsuladas. Significancia estadística: * $p < 0.05$. ANOVA de 2 factores y test de Sidak.	48
Figura 18. Curvas de reología de hidrogeles gelificados. A) Curva de G^* frente a deformación; B) Curva de G'' frente a frecuencia; C) Curva de G' frente a frecuencia. Se emplearon 5 réplicas para el ratio Gel-PEG 1:1, 3 réplicas para el ratio 1:0.75 y 4 réplicas para el ratio 1:0.5.....	49
Figura 19. Curvas de reología de los hidrogeles hinchados. A) Curva de G^* frente a deformación; B) Curva de G'' frente a frecuencia; C) Curva de G' frente a frecuencia. Se emplearon 5 réplicas para el ratio Gel-PEG 1:1, 3 réplicas para el ratio 1:0.75 y 4 réplicas para el ratio 1:0.5.	50
Figura 20. Gráfica del análisis estadístico del G' frente a frecuencia de los hidrogeles gelificados e hinchados de los tres ratios. Se emplearon 5 réplicas de ratio 1:1 y 3 réplicas para los ratios 1:0.75 y 1:0.5. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Pruebas intragrupo: test no paramétrico de Mann-Whitney (ratio 1:1) y T-test no emparejado. Pruebas intergrupos: prueba de Kruskal-Wallis y test de Dunn y T-test no emparejado (ratio 1:0.75 frente a 1:0.5).	50
Figura 21. Imágenes de microscopía de los ensayos LIVE-DEAD de hidrogeles Gel-PEG con células HepG2 encapsuladas tras dos días de cultivo. Se emplearon 200.00 células en todas las condiciones. Se marcaron: células vivas con calceína AM (verde), células muertas con homodímero de etidio (rojo) y núcleos celulares con Hoechst (azul). La escala fueron 100 μm	51
Figura 22. Gráfica del análisis estadístico de los resultados de viabilidad celular tras 2 días de cultivo. Se emplearon 2 réplicas para el ratio 1:1, 3 réplicas para el ratio 1:0.75, 5 réplicas para el ratio 1:0.5 y 4 réplicas para el cultivo en monocapa. No se encontraron diferencias significativas. Prueba de Kruskal-Wallis y test de Dunn.	52
Figura 23. Gráfica del análisis estadístico obtenido para los resultados del EWC de los ratios Gel-PEG sin FN. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Los resultados se obtuvieron empleando 6 réplicas para	

los ratios Gel-PEG 1:1 y 1:0.75 y 5 réplicas para el ratio 1:0.5. Prueba de Kruskal-Wallis y test de Dunn, T-test no emparejado (para la comparación de los ratios 1:0.75 y 1:0.5).	53
Figura 24. Imagen de la electroforesis SDS-PAGE realizada para la FN _d (FNcontrol en la imagen) y la FN _m , con un marcador de pesos moleculares en las bandas de las esquinas.	53
Figura 25. Curvas patrón del kit ELISA (izq.), de la FN _d (centro) y de la FN _m (dcha.). Valores de R ² : 0.5972, 0.7135, 0.7421, respectivamente.	54
Figura 26. Resultados de la estadística de la liberación de la FN _d frente a la FN _m . Se emplearon 4 réplicas para la FN _d y 3 réplicas para la FN _m . Significancia estadística: *p<0.05. T-test no emparejado.....	54
Figura 27. Resultados de la estadística de los hidrogeles gelificados e hinchados de ratio Gel-PEG 1:0.75 con FN _m frente a los mismos sin FN. Se emplearon 3 réplicas de cada composición. Significancia estadística: ***p<0.001. ANOVA de 2 factores y test de Sidak.	55
Figura 28. Gráfica de la estadística obtenida de los resultados del EWC de hidrogeles Gel-PEG 1:0.75 con y sin FN. Se obtuvo empleando 6 réplicas para el ratio sin FN y 3 réplicas para el ratio con FN _m . No se encontraron diferencias significativas. T-test no emparejado.	56
Figura 29. Curva patrón del HGF marcado con DyLight-488. Valor de R ² = 0.9997.....	56
Figura 30. Resultados del ensayo de liberación de HGF. Curva de liberación acumulada (izq.) y gráfica del análisis estadístico del porcentaje de HGF retenido tras 48 horas en DPBS (dcha.). Se emplearon 3 réplicas para los hidrogeles sin FN y con FN _m y 2 réplicas para aquellos con FN _d . No se encontraron diferencias significativas. ANOVA de un factor y test de Holm-Sidak.....	57

Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplos del rol de las proteínas de la ECM en la retención de los factores de crecimiento. Siglas: TGF (transforming growth factor, factor de crecimiento transformante), HGF (hepatocyte growth factor, factor de crecimiento hepático), VEGF (vascular endotelial growth factor, factor de crecimiento de endotelio vascular), FGF (fibroblast growth factor, factor de crecimiento de fibroblastos) [13].	24
Tabla 2. Concentraciones de Gel y PEG establecidas para cada ratio.	35
Tabla 3. Función de cada componente en los procesos de la formación del hidrogel y de la electroforesis en sí [54], [55]. Volúmenes de los componentes necesarios para la preparación de las dos partes del gel de electroforesis.	39
Tabla 4. Volúmenes de los componentes de las muestras a introducir en el gel de electroforesis.....	40
Tabla 5. Resultados del análisis estadístico del tiempo de gelificación.....	77
Tabla 6. Estadística módulo almacenamiento vs Tgel (ratios sin HepG2).	77
Tabla 7. Resultados del análisis estadístico de G' frente a frecuencia (hidrogeles con HepG2 frente a sin HepG2).	77
Tabla 8. Resultados del análisis estadístico de los hidrogeles gelificados e hinchados.....	78
Tabla 9. Resultados del análisis estadístico del EWC.....	78
Tabla 10. Resultados de la estadística de la liberación de FN.	79
Tabla 11. Resultados del análisis estadístico de la liberación de HGF.....	79
Tabla 12. Estadística viabilidad celular. Kruskall-Wallis y test de Dunn.	79

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Cálculo del contenido de agua en equilibrio (EWC) en tanto por uno..... 38

Ecuación 2. Cálculo del volumen de la disolución de DyLight-488 requerido para el tinte del HGF. m_{HGF} es la masa del HGF, PM_{HGF} es el peso molecular del HGF, $PM_{DyLight - 488}$ el peso molecular del tinte DyLight-488 y $[DyLight - 488]$ es la concentración del tinte señalada por el fabricante..... 41

Ecuación 3. Cálculo de la viabilidad celular media..... 43

1. Motivación

La motivación por la realización del presente Trabajo Final de Grado (TFG) en un centro de investigación en el ámbito de la ingeniería tisular viene de la fascinación por esta rama de la ingeniería biomédica, los avances que actualmente se tienen y lo que dicha disciplina puede aportar para la mejora de la salud y del nivel de vida de las personas. Además de la ilusión por la posibilidad que ofreció el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) de la UPV de un contacto real con este ámbito en el laboratorio y de aportar un grano de arena en un proyecto de investigación e innovación que está dedicado a la búsqueda de la solución a uno de los mayores problemas en el campo de la medicina y farmacología como son las pruebas de hepatotoxicidad de fármacos *in vitro*.

Desde que en la asignatura de Biomateriales se introdujeron los primeros conceptos de la ingeniería tisular, mi interés por dicha rama de nuestra carrera fue a más con cada artículo o noticia que leía, pues no solamente se trata de una disciplina innovadora con avances de gran importancia que ya se han hecho a lo largo de la historia, sino que también es un ámbito que tiene grandes perspectivas de investigación futura. Ciertamente, además, el perfil del trabajo encajó a la perfección para la puesta en práctica de conocimientos adquiridos en las materias cursadas a lo largo de la carrera, como la anatomía, fisiología, bioquímica, biofísica, biomateriales, ingeniería tisular, biomecánica, matemáticas y estadística.

Por otro lado, fue una gran oportunidad, así como un gran reto, el hecho de realizar el TFG de forma experimental en un laboratorio de un centro de investigación como el CBIT. Además de adquirir conocimientos sobre los métodos de trabajo en laboratorio, sobre el uso de las instalaciones y sobre el proceso de la realización de experimentos, se aprenden valiosas competencias de trabajo en equipo, comunicación, de gestión e interpretación de resultados (tanto de ensayos exitosos como los que no dan resultados esperados) y de redacción de un documento científico de calidad, que no se pueden adquirir hasta que no se ponen en práctica fuera del ámbito de cursar las asignaturas del grado.

En definitiva, la elección del enfoque del presente TFG y del centro de investigación para la realización del mismo, aunque no se trate de una decisión hecha nada más comenzar la carrera, no fue casual y se tomó desde la mayor ilusión y con gran motivación por su desarrollo. Es más, durante la realización y tras terminar el trabajo me reafirmé en la decisión de seguir profundizando mis conocimientos profesionales en este campo de la ingeniería biomédica y aportar más a los futuros desarrollos de la ingeniería tisular.

2. Normativa

La parte experimental del presente TFG sigue la normativa dada por el Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST). Todos los experimentos realizados se rigen por todos aquellos Reales Decretos y leyes relacionadas con la manipulación y almacenamiento de sustancias químicas y biológicas, así como de los correspondientes residuos.

Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales.

Real Decreto 833/1988, de 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, básica de residuos tóxicos y peligrosos.

Real Decreto 485/1997, de 14 de abril, sobre disposiciones mínimas en materia de señalización de seguridad y salud en el trabajo (Anexo I.2; II.1; III.3).

Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (BOE 124, 24 de mayo de 1997, págs. 16100-16115).

Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo (Artículo 5.3).

Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.

Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo (Artículos 5.2.c, 7.4.c).

Real Decreto 614/2001, de 8 de junio, sobre disposiciones mínimas para la protección de la salud y seguridad de los trabajadores frente al riesgo eléctrico.

Orden ESS/1451/2013, de 29 de julio, por la que se establecen disposiciones para la prevención de lesiones causadas por instrumentos cortantes y punzantes en el sector sanitario y hospitalario.

3. Introducción

3.1. El hígado: macro y microestructura

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano que se encarga de la detoxificación de la sangre. Anatómicamente se encuentra en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal, protegido por las costillas y sujeto mediante ligamentos (Abdel-Misih y Bloomston, 2010). A nivel macroscópico su estructura se divide en dos lóbulos, izquierdo y derecho, tal y como se puede ver en la Figura 1.

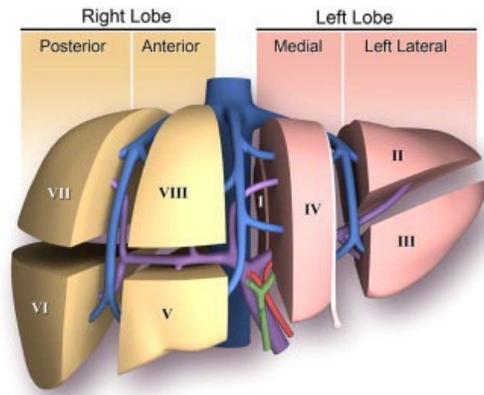


Figura 1. Vista frontal del hígado. Se muestra la separación en dos lóbulos, derecho (izq.) e izquierdo (dcha.), así como la división en segmentos propuesta por Couinaud en base a la anatomía funcional del órgano (Sibulesky, 2013).

El hígado es el órgano con mayor riego sanguíneo recibido: alrededor del 25% del volumen sanguíneo total bombeado por el corazón. El 25%-30% de este volumen le llega por la arteria hepática, mientras que el 75-70% restante proviene de la vena porta y provee el hígado de nutrientes. Antes de pasar a la circulación sistémica a través del sistema venoso intrahepático, ambos torrentes de sangre se mezclan en los sinusoides hepáticos (capilares que forman parte de los lóbulos hepáticos, descritos más adelante en este apartado). En cuanto al transporte de la bilis producida por las células del hígado, los conductos biliares siguen la disposición de la vena porta. En el 80% de los casos el transporte se realiza tanto por los conductos del lóbulo izquierdo como por los del derecho, aunque también existen casos en los que se da solamente por parte de los conductos de solamente uno de los lóbulos (Abdel-Misih y Bloomston, 2010), (Carotti y otros, 2020). En la Figura 2 se puede apreciar la organización vascular del hígado detalladamente.

A nivel microestructural, en el hígado se diferencian los siguientes tipos celulares: hepatocitos, células sinusoides, células de Kupffer (de la familia de los macrófagos) y células estrelladas (almacenaje de vitamina A). Además, los conductos biliares están recubiertos por colangiocitos - células sensibles a hormonas, factores de crecimiento y daño hepático (Carotti y otros, 2020), (Nagy y otros, 2020).

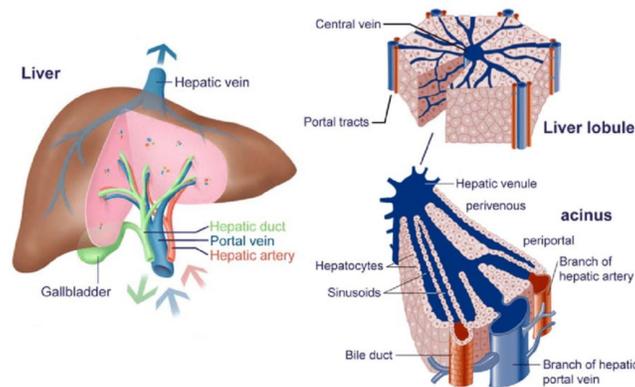


Figura 2. Vascularización del hígado (izq.). Microestructura del lóbulo hepático (dcha.) (Chen y Palmer, 2010).

La unidad funcional del hígado es el *acinus* o lóbulo hepático. Se trata de una estructura de 1-2 mm de largo, de forma hexagonal, que en su centro tiene la vena central y en los extremos, la tríada vena porta-arteria hepática-canalículo biliar. Los hepatocitos se organizan en platillos hepáticos dispuestos en forma radial y entre estos se encuentran los sinusoides, canales por los que circula la sangre desde los extremos hacia la vena central. Estos están en contacto con la membrana basal de los hepatocitos, permitiendo así el intercambio de sustancias entre éstos y la sangre (Lee y otros, 2013), (Lu y otros, 2021). Esta distribución del lóbulo hepático se puede observar detalladamente en la Figura 2.

Como ya se ha visto, de entre todas las células presentes en el hígado, las más abundantes (cerca del 60% del total de células (Tabernilla y otros, 2021)) y las que se encargan de las principales funciones del órgano son los hepatocitos. Estas células tienen como una de las funciones principales el transporte de metabolitos de desecho desde la sangre hasta el conducto biliar (Lee y otros, 2013). Para realizar dicha función, están polarizadas: poseen una membrana basolateral que está en contacto con la sangre a través de los sinusoides y una membrana apical que se conecta con los canalículos biliares. Ambas membranas expresan proteínas de transporte diferentes según su función (captar metabolitos desde la sangre o liberarlos a los canalículos para que lleguen al conducto biliar, respectivamente) (Lee y otros, 2013), (Feher, 2017). Entre la membrana basolateral de los hepatocitos y las células endoteliales de los sinusoides (carentes de membrana basal) se encuentra el espacio de Disse, donde ocurre la liberación a la sangre de proteínas y lipoproteínas producto de los hepatocitos (Lee y otros, 2013), (Feher, 2017). Los hepatocitos también se unen entre sí mediante uniones Gap (para comunicación intercelular) y mediante uniones adherentes (para la formación de una estructura 3D) (Lee y otros, 2013).

Por otro lado, cabe destacar la variación de funciones de los hepatocitos según su ubicación en el platillo; esta funcionalidad distinta viene determinada por el flujo unidireccional de sangre a través del hígado y en concreto, como se ha dicho previamente, por los sinusoides (Krebs y otros, 2007). Así, aquellos próximos a las vénulas y arteriolas reciben mayores concentraciones de oxígeno, pues son los primeros a los que les llega la sangre. En cambio, aquellos situados en la cercanía de la vena central reciben menor concentración de oxígeno al llegarles menor volumen sanguíneo; estas células llevan a cabo el procesamiento de toxinas mediante el sistema citocromo-oxidasa P450 (Krebs y otros, 2007). Otra función importante de los hepatocitos es la producción continua de fibrinógeno, un factor clave en los procesos de coagulación sanguínea que se produce casi de manera exclusiva por este tipo celular (Zhou y otros, 2015).

Finalmente, los hepatocitos juegan un papel clave en preservar la salud del organismo también debido a su rol en la producción de proteínas y en el metabolismo de fármacos (Lee y otros, 2013), (Zhou y otros, 2015). Poseen numerosas enzimas específicas de metabolismo de fármacos de Fase I (encargadas de los procesos de oxidación, reducción e hidrólisis) y Fase II (conjugación). Estas enzimas se responsabilizan de desactivar y detoxificar los fármacos provenientes de la sangre y que llegan a los hepatocitos a través de los sinusoides (Lee y otros, 2013). En cuanto a su papel en el sistema inmune, los hepatocitos producen numerosas proteínas de la inmunidad innata de vital importancia sobre todo por sus efectos bactericidas directos e indirectos (proteínas bactericidas, opsoninas, moléculas de señalización de las rutas de activación de lipopolisacáridos, proteínas clave para el metabolismo de hierro...) (Zhou y otros, 2015). Todas estas, de hecho, son las proteínas que los hepatocitos exportan a la sangre mediante el intercambio en el espacio de Disse (Feher, 2017).

La matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*) es un conjunto de moléculas insolubles que es sintetizado por las células en sus bordes laterales (entre células del mismo tipo) y basales (entre células distintas). Concretamente la ECM del hígado está compuesta por moléculas de adhesión celular y proteoglicanos en los bordes laterales de las células y fibronectina (FN), laminina, colágenos, tinactina y tenascina, así como moléculas de adhesión celular y proteoglicanos, en los bordes basales (Krebs y otros, 2007). Alrededor de los hepatocitos la matriz tiene una organización única debido a la existencia del espacio de Disse. En esta zona la ECM es escasa y está compuesta por FN, colágeno tipo I y una cantidad menor de colágenos tipo III, IV, V y VI (Martinez-Hernandez y Amenta, 1993).

Funcionalmente, la ECM es responsable de mantener la estructura 3D para el crecimiento celular, por una parte, y por otra sirve para estabilizar, retener y liberar biomoléculas de señalización, como son los factores de crecimiento (GF, del inglés *growth factor*). En la Tabla 1 se puede observar la importancia de los colágenos presentes en la ECM no solamente para la función estructural, sino también para la retención de moléculas de señalización. Además, la composición descrita en el párrafo anterior facilita un rápido intercambio de macromoléculas entre el plasma (espacio de Disse) y la superficie basal de los hepatocitos (Martinez-Hernandez y Amenta, 1993). Este intercambio de sustancias resulta clave para el mantenimiento de la homeóstasis y el correcto funcionamiento del hígado, y su alteración puede causar la pérdida de funciones del órgano (Krebs y otros, 2007), (Martinez-Hernandez y Amenta, 1993). Por otro lado, la interacción entre los hepatocitos y la ECM es vital para el mantenimiento del fenotipo y la funcionalidad. Así, la unión física de las integrinas (moléculas transmembrana de las células que actúan como receptores de adhesión celular) a la matriz garantiza la supervivencia de las células, ya que es clave para que éstas entren en la fase S del ciclo celular (Sawicka y otros, 2015). Y la presencia en la ECM de proteínas de la membrana basal induce la polarización, también clave para la función de los hepatocitos (Martinez-Hernandez y Amenta, 1993).

En el diseño de modelos *in vitro*, también se debe prestar atención a las propiedades mecánicas del entorno celular, pues han de ser similares a las del órgano. Además, se debe garantizar una correcta respuesta de las células a las fuerzas que se establecen y a la mecanotransducción, de modo que mantengan su fenotipo y funcionalidad. La bibliografía indica que los niveles normales de rigidez de la ECM del hígado se encuentran en un rango de entre 400 Pa y 600 Pa de módulo elástico a cizalla, y los más bajos se dan en la periferia de los hepatocitos (Agarwal y otros, 2019), (Li y otros, 2021).

Factor de crecimiento	Molécula de unión a la ECM
TGF	Colágeno tipo IV, FN, fibrinógeno, fibrina
HGF	Colágeno tipo I, III, IV, V y VI, FN, fibrinógeno, fibrina
VEGF	Colágenos, FN, fibrinógeno, fibrina
FGF	FN, fibrinógeno, fibrina

Tabla 1. Ejemplos del rol de las proteínas de la ECM en la retención de los factores de crecimiento. Siglas: TGF (transforming growth factor, factor de crecimiento transformante), HGF (hepatocyte growth factor, factor de crecimiento hepático), VEGF (vascular endothelial growth factor, factor de crecimiento de endotelio vascular), FGF (fibroblast growth factor, factor de crecimiento de fibroblastos) (Sawicka y otros, 2015).

En este trabajo es de particular importancia el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). El papel e interacciones de los factores de crecimiento con la ECM se describirá con mayor detalle más adelante en el documento.

3.2. Daño hepático inducido por fármacos

Los posibles efectos tóxicos de la exposición del organismo a fármacos, hierbas medicinales y otros xenobióticos son ampliamente estudiados hoy en día. El hígado es el órgano encargado de metabolizar gran parte de este tipo de sustancias, lo que lo convierte en un órgano susceptible de sufrir daños. Durante la detoxificación se forman moléculas bioactivas que pueden resultar dañinos y causar lo que se conoce como daño hepático inducido por fármacos (DILI, por sus siglas en inglés *Drug-Induced Liver Injury*). Dicha patología es la principal causa de la retirada de fármacos del mercado (Serras y otros, 2021), (Sainz-Arnal y otros, 2019). Uno de los principales problemas del DILI es la ausencia de biomarcadores específicos que permitan diagnosticarlo, por lo que sigue siendo una enfermedad detectada por diagnóstico por exclusión. Esto lleva a que a menudo se den situaciones clínicas en las que, en el momento del diagnóstico de DILI, la vida del paciente ya se encuentre en riesgo grave (Serras y otros, 2021).

Se distinguen dos tipos de DILI: intrínseco, que depende de la dosis y se manifiesta a los pocos días; e idiosincrásico, el cual no tiene una dependencia de la dosis, por lo que es prácticamente impredecible y además tiene un estadio latente, con lo cual se manifiesta al cabo de un tiempo (Serras y otros, 2021), (Norman, 2020). El segundo tipo de DILI es un problema particularmente complejo y está relacionado con factores genéticos y, por tanto, con la reacción individual de cada paciente a un determinado fármaco (Norman, 2020).

Los mecanismos moleculares que derivan en la muerte de los hepatocitos se desarrollan de la siguiente manera: la lesión inicial puede ocurrir bien porque se destruye la bicapa lipídica de la membrana, o bien porque los fármacos alteran la organización intracelular influyendo en la compartimentalización de la célula y alterando así la función de los orgánulos. A continuación, tiene lugar la pérdida de funcionalidad de las mitocondrias (encargadas de la respiración celular, fuentes de energía para la célula), provocada por el efecto de los fármacos en el potencial de la membrana mitocondrial; esto lleva a la interrupción del

ciclo respiratorio de la mitocondria, generando un estado de estrés oxidativo e impidiendo la síntesis de adenosín trifosfato (ATP). También puede afectar a las mitocondrias influyendo en los poros de las membranas, llevando a la liberación del citocromo C al interior de la célula o a la entrada de protones y agua a la mitocondria. Si estos daños afectan a una gran cantidad de mitocondrias, tiene lugar una drástica disminución de niveles de ATP que provoca el desequilibrio iónico y causa muerte por necrosis; si en cambio, son pocas las mitocondrias afectadas, el resto de éstas sigue produciendo ATP. Sin embargo, el hecho de la liberación de citocromo C de las mitocondrias afectadas induce muerte por apoptosis (Tabernilla y otros, 2021), (Serras y otros, 2021).

La detección de fármacos hepatotóxicos en fases de postcomercialización tiene graves efectos económicos para las empresas farmacéuticas y pone en riesgo la salud del paciente, lo que lo ha convertido en un problema de salud importante. Esto se debe a la ausencia de modelos *in vitro* robustos y potentes en los ensayos preclínicos, así como las limitaciones que presentan los modelos animales empleados. En los estudios tradicionales se emplean típicamente modelos animales de ratas, perros o monos. No obstante, se ha demostrado que dichos ensayos no predicen con exactitud la reacción que se tendría en un humano al fármaco, puesto que el metabolismo animal de los fármacos es distinto al de los humanos (Lee y otros, 2013). Es por ello que surge la necesidad del desarrollo de modelos hepáticos humanos *in vitro* para una mejor y más fiable predicción del comportamiento del hígado ante los xenobióticos. Para ello, los hepatocitos deben disponerse en un entorno tridimensional similar al tejido *in vivo*, donde puedan llevar a cabo el metabolismo de fármacos durante un período de tiempo prolongado sin desdiferenciarse, así como de unos entornos que mimeticen al máximo la ECM que rodea a estas células.

3.2.1. Células hepáticas

En el entorno biológico, como bien se ha dicho antes, los hepatocitos realizan múltiples funciones, entre las cuales una de las más importantes es el metabolismo de fármacos. El uso de hepatocitos primarios presenta una clara ventaja, puesto que dichas células conservan las enzimas necesarias para la detoxificación de fármacos (Nanjappan y otros, 2018). Desafortunadamente, son una fuente limitada puesto que provienen de pacientes, presentan pérdida rápida de funcionalidad y tienen poco potencial de crecimiento *in vitro*, lo que limita su uso en investigación (Nanjappan y otros, 2018). Es por ello que se han empleado otras fuentes, como ahora las líneas celulares inmortalizadas (la HepG2, HepaRG, Upcytes, etc.) (Krebs y otros, 2007). Estos hepatocitos son alterados genéticamente para mantener una capacidad de proliferación *in vitro* prácticamente ilimitada, y a la misma vez mantienen la función de los hepatocitos sin llegar a inducir oncogénesis. No obstante, dicha conservación de funcionalidad no siempre es exitosa y puede darse solo parcialmente. Además, muchas líneas no tienen enzimas para el metabolismo de fármacos, lo que limita su uso en ensayos de hepatotoxicidad. Sin embargo, son reproducibles, ilimitadas y fáciles de manejar, por lo que se emplean en la puesta a punto de sistemas, como el uso de la línea HepG2 en este trabajo (Krebs y otros, 2007). Por último, destacar que en los estudios más recientes se apuesta por el uso de células madre inducidas (iPSC) diferenciadas a hepatocitos, aunque todavía no se ha conseguido una diferenciación completa (Krebs y otros, 2007), (Nanjappan y otros, 2018).

3.2.2. Plataformas 3D y cultivos monocapa

En condiciones fisiológicas las células se encuentran en un espacio 3D en la ECM, dispuestas en forma de platillos hepáticos a lo largo de los sinusoides. Esta disposición fomenta su expansión, migración, proliferación, diferenciación e interacción con el entorno (matriz y células adyacentes). Los cultivos en 2D,

aunque son simples y fáciles de realizar, no pueden recrear dicha complejidad biológica, por lo que las células no disponen de toda su funcionalidad y los resultados obtenidos con estos estudios pueden no ser realistas. Además, en estos entornos 2D las células rápidamente pierden su fenotipo al no encontrarse en sus condiciones biológicas (Zhao y otros, 2020). Se ha visto que en cultivos 2D los hepatocitos adquieren una morfología plana y extendida, unos índices de proliferación y de expresión de proteínas de citoesqueleto elevados, pero disminuyen significativamente la expresión de genes específicos de las células hepáticas, así como su funcionalidad (Agarwal y otros, 2019). En cambio, los modelos 3D sí son capaces de mimetizar la estructura y la funcionalidad de la ECM biológica, de modo que las células son capaces de llevar a cabo su función y mantienen su fenotipo gracias a la posibilidad de interactuar con el entorno y recibir los estímulos necesarios (Zhao y otros, 2020), (Agarwal y otros, 2019). De este modo, los cultivos en 3D proporcionan un entorno físico y mecánico similar a la ECM biológica y posibilitan la comprensión de los procesos biológicos de células, tejidos y órganos *in vitro*, siendo de especial interés como futura alternativa no solamente a los cultivos 2D, sino también a la experimentación animal, que hoy en día aún sigue siendo insustituible (Zhao y otros, 2020).

3.2.3. Plataformas actuales de ensayos de toxicidad *in vitro* y sus limitaciones

Actualmente existen numerosas plataformas 3D desarrolladas para los ensayos de hepatotoxicidad inducida por fármacos *in vitro*. Las estructuras más relevantes son los esferoides (simples o complejos), sistemas de *scaffolds* 3D, modelos microfluídicos, hidrogeles 3D e incluso organoides (Zhao y otros, 2020), (Sainz-Arnal y otros, 2019). Algunos ejemplos comercializados son el cocultivo 3D HepatoPac (Chan y otros, 2013), los modelos microfluídicos como HepaChip o HuREL (Schütte y otros, 2010), (Baxter, 2009) o los organoides desarrollados para la simulación de fibrosis hepática inducida por fármacos (Leite y otros, 2016). No obstante, aún existen ciertas limitaciones como el mantenimiento de la completa funcionalidad de los hepatocitos a largo plazo, la mimetización perfecta de la ECM hepática o el problema de la falta de conexión con otros órganos, que no es posible simular *in vitro*. Por tanto, hacen falta nuevos estudios que propongan solución a alguno de estos problemas (Lu y otros, 2021).

3.3. Uso de hidrogeles como plataformas *in vitro* para ingeniería tisular

3.3.1. Hidrogeles

Como se ha dicho, una de las formas de imitar el entorno 3D biológico de los hepatocitos es el uso de hidrogeles 3D. Los hidrogeles son polímeros hidrofílicos de redes viscoelásticas tridimensionales capaces de retener una cantidad de agua múltiplo del valor de su peso seco e hincharse en ambientes fisiológicos, gracias a la presencia de grupos funcionales hidrofílicos como -OH, -SO₃H, -COOH, -NH₂ o -CONH₂ (Almawash y otros, 2022). Esta característica, junto con otras ventajas como la capacidad de encapsulación de moléculas y macromoléculas, la posibilidad de adaptación de sus propiedades mecánicas a las necesidades del modelo, la flexibilidad y la degradación controlable, convierte a los hidrogeles en un biomaterial muy versátil e idóneo para la mimetización de medios tan complejos como la ECM. De hecho, si se mira desde el punto de vista de biomateriales, la ECM se puede considerar un hidrogel muy complejo en el cual estructuras fibrosas de colágeno y otras proteínas se encuentran embebidas en matrices blandas de polisacáridos y glicoproteínas con biomoléculas ancladas, que permiten presentar otras biomoléculas, como los GF (Zhao y otros, 2020). En el campo de las pruebas farmacológicas *in vitro*, resulta de especial interés su capacidad de retención o liberación controlada de los fármacos, así como el alto grado de adherencia celular (Jacob y otros, 2021).

Los materiales empleados en la fabricación de hidrogeles son variados y pueden ser sintéticos, biológicos o una combinación de ambos (hidrogeles híbridos). Al interactuar directamente con células, han de ser capaces de imitar al máximo posible la ECM, donde las células puedan adherirse, proliferar, migrar y llevar a cabo su función sin desdiferenciarse. Esto implica que deben presentar una adecuada química, un determinado tamaño de poros e interconectividad, así como ser no citotóxicos. Si bien los materiales sintéticos pueden ser fácilmente controlables en cuanto a propiedades mecánicas y velocidad de degradación, carecen de bioactividad; en cambio, los biopolímeros naturales tienen la ventaja de ser biológicamente activos de forma natural, pero no exhiben buenas propiedades mecánicas, que además son difícilmente controlables en este tipo de materiales (Dubey y Mequanint, 2011), (Almawash y otros, 2022). Por esta razón, cada vez se desarrollan más hidrogeles de materiales híbridos, de modo que las ventajas de ambos tipos de polímeros se fusionan, dando lugar a unos constructos más similares a la ECM biológica y, además, cuyas propiedades son controlables (Krebs y otros, 2007).

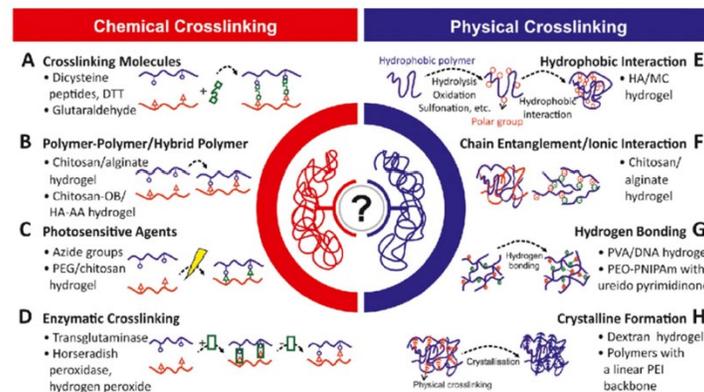


Figura 3. Esquema-resumen de los tipos más comunes de entrecruzamiento físico (dcha.) y químico (izq.) (Almawash y otros, 2022). En el caso del entrecruzamiento químico, son comunes el entrecruzador como mediador (A), los polímeros híbridos (B), reacciones por agentes fotosensibles (C) o el entrecruzamiento por catálisis enzimática (D). En cuanto al entrecruzamiento físico, se tiene como ejemplo las reacciones hidrofóbicas (E), iónicas (F), por puentes de hidrógeno (G) o formación de cristales (H).

En los últimos años los hidrogeles 3D se han utilizado para múltiples aplicaciones, como sistemas 3D para cultivo de células madre mesenquimales para terapia celular (Hu y otros, 2022), bioimpresión 3D como en el caso de tejido cardiovascular *in vitro* e *in vivo* (Vettori y otros, 2020), modelos de enfermedades *in vitro*, encapsulación para liberación de fármacos, entre otras (Cao y otros, 2021). La principal limitación de estos sistemas, una vez más, es mantener la funcionalidad y el fenotipo de las células a largo plazo debido a la dificultad de mimetizar la ECM (Cao y otros, 2021).

3.3.2. Hidrogeles inyectables

Dentro de todos los tipos de hidrogeles, destacan particularmente los hidrogeles inyectables. Este tipo de hidrogeles poseen unas capacidades de biocompatibilidad y de hidrofiliidad únicas y tienen una particular habilidad en cuanto a cambio de fases líquido a sólido para formar estructuras de gel que fomentan la encapsulación de biomoléculas en la red, porque sucede de manera no citotóxica (Almawash y otros, 2022). Se forman por la polimerización *in situ* del material primario que se utiliza: se parte de una solución acuosa del material principal, al cual se le añade el polímero entrecruzador, provocando la rápida gelificación del compuesto. La gran ventaja que aporta este tipo de hidrogeles es la posibilidad de añadir células y sustancias bioactivas, como la FN, mezclándolas justo antes de la inyección del entrecruzador, reduciendo considerablemente el tiempo de fabricación del sistema. La rapidez del entrecruzamiento

evita la sedimentación de las células antes de la formación del hidrogel (Dubey y Mequanint, 2011), (Yu y Ding, 2008).

Los hidrogeles inyectables se pueden formar bien por entrecruzamiento físico o bien por entrecruzamiento químico (Hu y otros, 2022). Los hidrogeles formados por entrecruzamiento físico pasan al estado de gel por medio de fuerzas moleculares (enlace iónico, puente de hidrógeno, reacciones hidrofóbicas...) que ocurren bien por la interacción entre los polímeros o bien por estímulos externos como el calor, el pH, presión o luz. Los hidrogeles físicos tienen un tiempo de gelificación, mecánica de degradación y características mecánicas específicos, pero sus enlaces tienden a ser fácilmente destruibles, especialmente si cambian las condiciones físicas en las que se ha formado (Almawash y otros, 2022). Los hidrogeles por entrecruzamiento químico, en cambio, gelifican por la formación de enlaces covalentes en su red polimérica por medio de reacciones químicas. Esto ocurre en una fase de transición líquido-gel (la llamada transición sol-gel), con lo cual requiere mayor tiempo de gelificación (por tanto, presentan una ventaja para aplicaciones con encapsulación de células o de biomoléculas que los hidrogeles físicos) y una vez formado el hidrogel la reacción es irreversible, por lo que son más estables que los hidrogeles físicos. Asimismo, su tiempo de gelificación y propiedades mecánicas se han de determinar experimentalmente (Almawash y otros, 2022). En la Figura 3 se pueden observar los esquemas de los distintos mecanismos más comunes de entrecruzamiento tanto físico como químico.

Como se ha dicho en el apartado anterior, en los últimos años se están usando materiales híbridos para la fabricación de hidrogeles debido a su capacidad de conservar las ventajas tanto de los materiales sintéticos como de los biológicos. Entre los hidrogeles inyectables, los materiales más utilizados en la ingeniería tisular del hígado se ha visto que son el colágeno, la gelatina o los alginatos, junto con polímeros sintéticos como los poliésteres o el polietilenglicol (Krebs y otros, 2007). Sin embargo, estos hidrogeles tienen ciertas limitaciones como ahora las ya mencionadas en el apartado de plataformas 3D para pruebas de hepatotoxicidad *in vitro* (sobre todo en cuanto a la supervivencia de las células a largo plazo), lo que se refleja en la estabilidad y en las propiedades mecánicas del material (Krebs y otros, 2007), (Sarrigiannidis y otros, 2021).

3.4. Factores de crecimiento. Presentación en fase sólida.

Los GF son moléculas de señalización con un papel crucial en organogénesis y el desarrollo de los tejidos, al ser los que definen la diferenciación, migración y proliferación celular. Es por ello por lo que tienen una elevada significancia en aplicaciones clínicas. La ECM, a su vez, es un reservorio de GF: se unen a la matriz gracias a las proteínas y glicoproteínas de la misma, permitiendo que coordine su interacción con las células (Trujillo y otros, 2020). Dicha interacción varía en función de cómo está presente el GF en la ECM. Si se unen a los receptores transmembrana de la célula, activa moléculas señalizadoras en el medio intracelular, o bien puede ser internalizado por la célula por endocitosis. Esto último ocurre si el GF se encuentra en la ECM en fase líquida (A y otros, 2018). Sin embargo, esto se ha visto que ocurre muy raramente, generalmente en los nichos de células madre, siendo la norma biológica la presentación de los GF en la ECM en fase sólida, como también lo es el caso del HGF (Salmerón-Sánchez y otros, 2016). En la Figura 4 se puede observar la diferencia entre la presentación de GF en fase sólida y su presencia en fase líquida en la ECM.

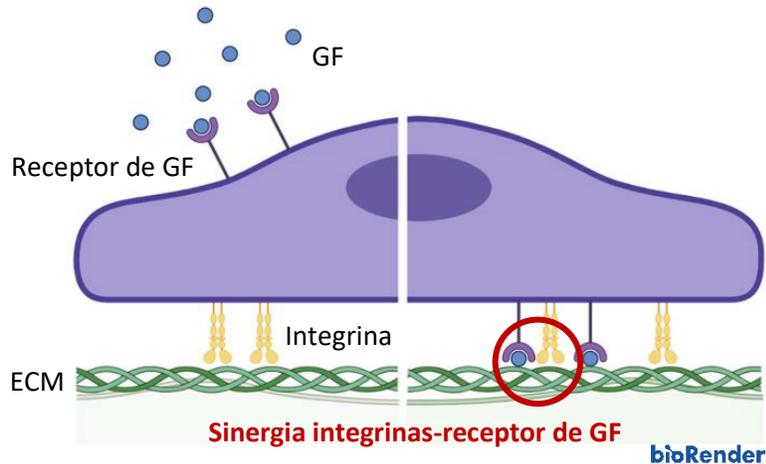


Figura 4. Presentación de GF en fase sólida y en fase líquida (imagen hecha en bioRender). Se observa que en el caso de la presentación en fase sólida se tiene una alta concentración local de GF, el GF tiene restringida la difusión y es posible la formación de clústeres con integrinas que permiten la sinergia entre ambas moléculas y aumentan el efecto del GF aún con unas dosis mínimas de éste (Salmerón-Sánchez y otros, 2016).

Distintos métodos tradicionales han defendido el uso de los GF en fase líquida para las aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, esto presenta una serie de problemas. Por una parte, no representa el funcionamiento natural *in vivo*, donde los GF no se encuentran libremente en el medio extracelular (que es lo que ocurre si se añade una solución de GF al medio de cultivo), sino anclados de una forma u otra a la ECM, la cual se encarga de la regulación de su actividad. Además, en estado soluble los GF son susceptibles a ser fagocitados, hidrolizados o a la degradación enzimática, por lo que su vida media es muy corta; esto lleva a la necesidad de usar dosis elevadas de GF en el cultivo, que al estar por encima incluso de las dosis fisiológicas resultan tóxicas para las células (A y otros, 2018), (Teixeira y otros, 2020). Es por ello que hoy en día se desarrollan sistemas que permiten la presentación de GF en fase sólida, de modo que hacen posible la regulación de su actividad y, además, requieren unas dosis mínimas de GF para un correcto funcionamiento al tener éstos una vida media más larga (A y otros, 2018), (Teixeira y otros, 2020), (Trujillo y otros, 2019).

Otro factor a tener en cuenta cuando se habla de la actividad de los GF en fase sólida es el importante papel de la sinergia entre las integrinas de las células y los GF, mediada por la FN. Las integrinas son receptores transmembrana que se unen a secuencias de adhesión de las proteínas de la ECM, siendo una de las más conocidas la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) presente en la FN (Damiati y otros, 2022). La FN es una glicoproteína dimérica de 500kDa que se une a las integrinas y proteínas de la ECM, como el colágeno (Dubey y Mequanint, 2011). Consta de dos subunidades unidas por un puente disulfuro, cada uno de los cuales poseen tres módulos que se repiten (I, II y III) mediante los cuales interactúan con otras moléculas. Esto posibilita la formación de estructuras formadas por FN_{I-5} y FN_{III-1-2}, integrinas unidas al dominio RGD (en FN_{III9-10}) y GF (en FN_{III12-14}), tal y como se puede ver detalladamente en la Figura 5 (Damiati y otros, 2022). Dicha conformación, en la cual tiene lugar la unión simultánea y en dominios próximos de ambas moléculas a la FN, se ha demostrado que fomenta la cooperación entre integrinas y los GF, creando una sinergia entre ambas moléculas que aumenta el efecto del GF en el comportamiento celular (Sarrigiannidis y otros, 2021), (Trujillo y otros, 2020), (Damiati y otros, 2022). Esta interacción se ha reproducido *in vitro* y efectivamente se ha visto que la sinergia solamente tiene lugar cuando las células se unen a la FN, resultando en la unión próxima de las integrinas y de los GF

(Trujillo y otros, 2020). Los detalles moleculares más precisos de la interacción, no obstante, aún quedan por explorar (Trujillo y otros, 2020).

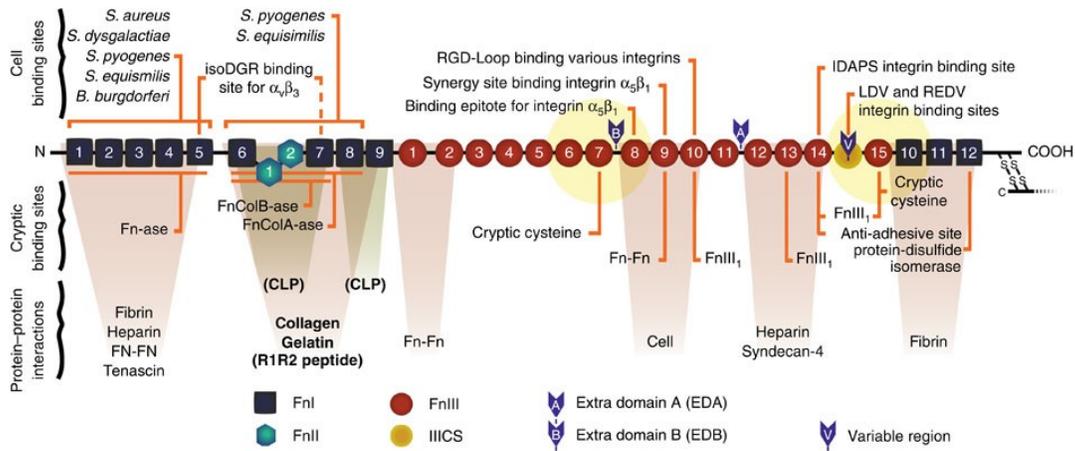


Figura 5. Estructura de la FN que muestra los puntos de unión a integrinas y a colágeno/gelatina. Los sitios de unión a la heparina (FnIII₁₂₋₁₄) son también los sitios de unión de los GF (Kubow y otros, 2015).

Entre los materiales actuales que contienen FN con su secuencia RGD y de unión de GF existen ejemplos tanto de estrategias 2D como 3D. En el caso de 2D se han añadido polímeros como polietilacrilato (PEA), que causa el despliegue de la FN en nanoredes, exponiendo los dominios de unión de interés (Trujillo y otros, 2019). En cuanto a los sistemas 3D, que son los más relevantes para la ingeniería tisular del hígado por razones ya mencionadas, la variedad de materiales es más grande. Así se tienen hidrogeles de fibrina funcionalizados con fragmentos específicos de FN (Trujillo y otros, 2019), se utilizan moléculas mediadoras como el polietilenglicol para anclar la FN a los polímeros base del scaffold (Krebs y otros, 2007) o incluso se fabrican plataformas en las cuales el material principal es la propia FN (Trujillo y otros, 2020). También se ha visto en estudios (Benoit y Anseth, 2005), (Hersel y otros, 2003) que el uso de tan solo la cadena corta RGD añadida a los biomateriales no produce el mismo efecto que la fibronectina completa, con lo cual actualmente los materiales son desarrollados conteniendo, a ser posible, la proteína entera - para una mejor funcionalización y mimetización de la ECM biológica. En la Figura 6 se puede observar un ejemplo de cómo varía la disposición de los GF en una matriz polimérica con la inclusión de FN en la misma.

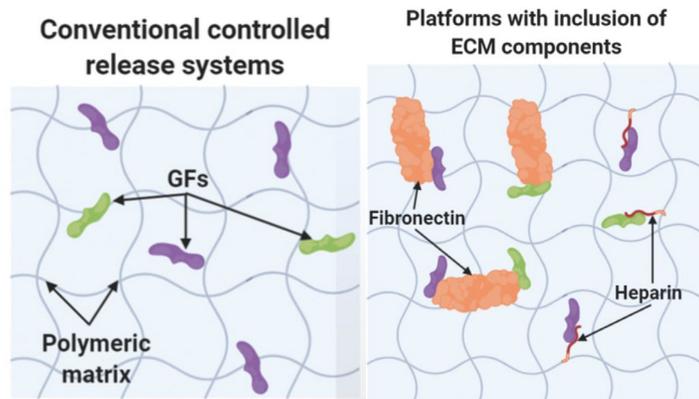


Figura 6. Esquema del anclaje de GF a un material sin FN (izq.) y a un material con FN y heparina (dcha.). En el segundo caso el GF (violeta y verde) se encuentra unido en su totalidad a la fibronectina (naranja) y heparina (rojo) (Ker y otros, 2011).

3.5. Modelo propuesto

En el presente Trabajo Final de Grado (TFG), se propone como modelo *in vitro* para pruebas de hepatotoxicidad de fármacos un hidrogel inyectable (los cuales se ha visto en apartados anteriores que presentan numerosas ventajas para aplicaciones de estudios *in vitro*), cuyo material principal es un polímero natural, la gelatina (Gel), entrecruzada mediante la adición del polímero sintético polietilenglicol (PEG). Como bien establecen estudios previos (Liang y otros, 2019), (Su y otros, 2019), se trata de una combinación óptima de material sintético y biológico que proporcionan buenas propiedades mecánicas y de adhesión y proliferación celular, respectivamente. Además, se ha visto que combinaciones basadas en Gel y PEG pueden formar estructuras con poros de mayor tamaño y poca matriz (Cao y otros, 2021), lo cual es otra ventaja pues se acerca más a la estructura que tiene la ECM que rodea a los hepatocitos. A continuación, se detallan las propiedades de cada material y sus ventajas en cuanto al uso en la ingeniería tisular.

La Gel es una proteína obtenida por la desnaturalización e hidrólisis ácida del colágeno, generalmente del de Tipo I (de particular interés para los constructos que imitan las condiciones fisiológicas del hígado pues, como se ha descrito anteriormente, este tipo de colágeno prevalece en su ECM), cuya estructura química se puede observar en la Figura 7. Tras el proceso de obtención, la proteína por una parte mantiene la funcionalidad del colágeno en cuanto a, por ejemplo, la presencia de secuencias específicas para la adhesión celular por medio de integrinas (como la secuencia RGD) o sitios sensibles a las metaloproteinasas (MMP), que permiten la degradación enzimática de la ECM por parte de las células y, por consiguiente, su remodelación por las mismas (Klotz y otros, 2016), (Carthew y otros, 2018). Y por otra, la desnaturalización por medio de calor resuelve el problema de la respuesta antigénica que sí existe al usar el colágeno, con lo cual la Gel es, además, no antigénica y no citotóxica (Klotz y otros, 2016). Cabe destacar también que la Gel es una sustancia de bajo coste y fácilmente manipulable (Klotz y otros, 2016), (Carthew y otros, 2018).

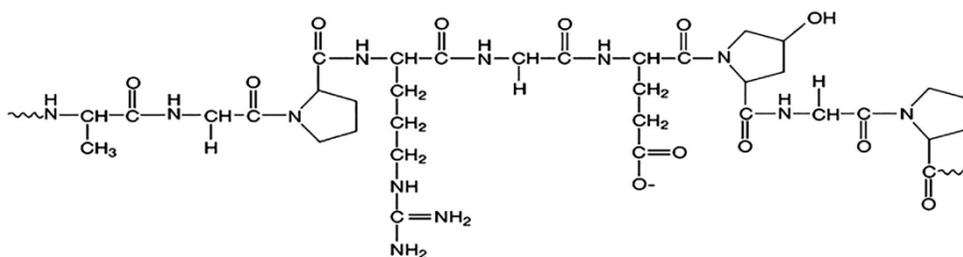


Figura 7. Estructura química de la Gel (Biswal, 2021). Los grupos terminales son grupos amino (NH_2).

Disuelta en agua o en medio fisiológico, la Gel gelifica físicamente a una temperatura de 24°C (Klotz y otros, 2016). No obstante, la proteína es inestable a la temperatura del cuerpo humano, de 37°C , y el gel pasa a ser otra vez líquido (Carthew y otros, 2018). Por tanto, la gelificación se lleva a cabo por entrecruzamiento químico covalente de la proteína. Esto puede realizarse mediante la adición de un polímero sintético, como en este caso es el PEG, mejorando las propiedades mecánicas del hidrogel obtenido, pues las que presentan los geles de Gel pura no son suficientes para su uso como ECM de hepatocitos (Liang y otros, 2019), (Carthew y otros, 2018).

En este proyecto se utiliza el PEG succinimidil-glutarato (PEG-SG), cuya estructura química puede observarse en la Figura 8.

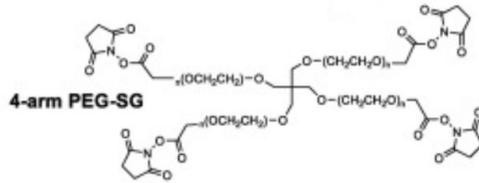


Figura 8. Estructura química del PEG-SG de cuatro brazos [50].

El PEG, como bien indica su nombre, es un componente químico compuesto por unidades repetidas de etilenglicol (*Thermo Fisher Scientific – ES*, n.d.). Es un polímero sintético, bioinerte y no inmunogénico muy ampliamente utilizado como entrecruzador en la ingeniería tisular debido a su alta biocompatibilidad (puesto que no interfiere en la función celular y tampoco provoca respuesta inmunológica) y su versatilidad para la modificación de sus grupos terminales con el fin de adaptarse a las reacciones de entrecruzamiento con distintos materiales (Pandala y otros, 2022), (*Thermo Fisher Scientific – ES*, n.d.). Esta última característica es importante en el caso de ser el entrecruzamiento químico, como bien ocurre en el sistema planteado en este TFG. Así, como bien se observa en la Figura 8, en este caso se sustituyen los grupos amino terminales por el SG, que fomenta su interacción con los grupos amino terminales de la Gel (Figura 7) (Sarrigiannidis y otros, 2021). Dicha interacción será explicada más en detalle en el apartado de Materiales y métodos del presente TFG. Por otra parte, el entrecruzamiento con PEG aporta propiedades mecánicas buenas, que pueden ser reguladas mediante el control de la proporción en la que se añade con respecto a la Gel (*Thermo Fisher Scientific – ES*, n.d.), (Klotz y otros, 2016).

El PEG ha demostrado ser el polímero sintético idóneo para la fabricación de hidrogeles híbridos, al ser no citotóxico y tener grupos terminales modificables para una mejor interacción con un polímero concreto, además de aportar unas propiedades mecánicas que se echan en falta en constructos fabricados de puros biomateriales biológicos (Klotz y otros, 2016), (Dura y otros, 2018). El uso de este polímero como biomaterial está aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, administración de alimentos y medicamentos de EE. UU.) (*Thermo Fisher Scientific – ES*, n.d.).

Por último, se ha visto que los hidrogeles de Gel-PEG presentan una excelente viabilidad celular sin perder las propiedades mecánicas y sin que se presente pérdida de funcionalidad o desdiferenciación por parte de las células (Hoang Thi y otros, 2016), lo cual también supone una ventaja que podría solucionar una de las limitaciones de los sistemas actuales como es el mantenimiento del fenotipo funcional de los hepatocitos.

En los apartados siguientes se describen en detalle: la química de entrecruzamiento Gel-PEG; los experimentos llevados a cabo para la selección de las proporciones idóneas de Gel-PEG a utilizar, así como la funcionalización de los hidrogeles fabricados a la proporción elegida con la FN y el efecto de su adición en la retención del HGF; y finalmente, el cultivo celular realizado para evaluar la viabilidad celular del sistema.

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha visto en el apartado de Introducción, en la actualidad existe una gran necesidad de modelos de pruebas de hepatotoxicidad *in vitro* para ensayos preclínicos de fármacos. El desarrollo de la ingeniería tisular ha hecho posible afrontar este problema desde varios enfoques innovadores que permiten cada vez un mayor acercamiento a dichas condiciones fisiológicas. Los hidrogeles inyectables de materiales híbridos (sintético + biológico) a base de componentes derivados de los presentes en la ECM están en auge debido a sus características mecánicas y fisicoquímicas controlables, pudiendo ajustarlas con mayor precisión a las de la ECM hepática. También por su baja citotoxicidad y la posibilidad que presentan de inyectar células y biomoléculas, como la FN o los GF, justo antes de la formación del hidrogel. La adición de moléculas como la FN, a su vez, hace posible la presentación del GF en fase sólida a las células encapsuladas en el hidrogel, aumentando la eficacia de la plataforma para el mantenimiento del fenotipo y de la funcionalidad de los hepatocitos.

Es por todo ello que el objetivo principal del presente TFG fue el diseño de un modelo para pruebas de hepatotoxicidad *in vitro* basado en un hidrogel inyectable de Gel y PEG con encapsulación de FN y HGF, para alcanzar el cual se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Síntesis de hidrogeles de Gel-PEG a distintos ratios de los componentes (ratios de Gel-PEG 1:1, 1:0.75 y 1:0.5).
- Determinación de las propiedades mecánicas y de hinchado de cada composición de Gel-PEG.
- Evaluación del efecto de la encapsulación de células HepG2 en las propiedades mecánicas de los hidrogeles a distintos ratios.
- Evaluación de la viabilidad celular en los hidrogeles de los tres ratios y comparación de los resultados con el cultivo en monocapa para asegurar que el material permite el cultivo celular.
- Selección de la composición óptima de hidrogel a utilizar para los experimentos siguientes en función de los resultados obtenidos en la caracterización mecánica, de hinchado y en la encapsulación y viabilidad celular.
- Evaluación de la retención de FN_d y FN_m en el hidrogel a dicha composición para la selección de la proteína con mayor grado de retención, con el fin de garantizar más puntos de anclaje para el HGF en fase sólida.
- Evaluación de la retención de HGF en fase sólida en el hidrogel en presencia de FN_d, FN_m y en hidrogel sin FN para evaluar el efecto de la FN_d y FN_m en el proceso.

En los apartados siguientes se detallan los Materiales y métodos seguidos para llevar a cabo los procesos necesarios para la consecución de dichos objetivos, así como se presentan los Resultados y la discusión de los mismos. Finalmente, en el apartado de Conclusiones se reporta si se consiguieron los objetivos establecidos y se presentan las perspectivas de futuras investigaciones.

5. Materiales y métodos

5.1. Materiales

5.1.1. Hidrogeles

Para el proceso de síntesis de los hidrogeles de gelatina (Gel) y polietilenglicol (PEG) se utilizaron los siguientes reactivos: PEG-SG (polvo, 10K, polietilenglicol succinimidil-glutarato de 4 brazos, SIGMA-ALDRICH, Alemania), gelatina de piel de cerdo (polvo, tipo A, SIGMA-ALDRICH, Alemania), *buffer* DPBS (-/-) (tampón fosfato salino de Dulbecco sin calcio y magnesio, líquido, SIGMA-ALDRICH, Alemania) y DMEM (medio esencial mínimo de Dulbecco, bajo en glucosa, con piruvato de sodio, sin glutamina, sin rojo fenol, Gibco, EEUU). La proteína utilizada fue la fibronectina (FN) humana (polvo, CORNING).

Todos los materiales se conservaron según lo establecido en las recomendaciones de la empresa fabricante: el *buffer* DPBS (-/-) y la Gel en polvo se guardaron a temperatura ambiente y el PEG-SG en polvo y la FN disuelta en DPBS (-/-) se conservaron a -20°C.

En el proceso de desnaturalización de la FN se utilizaron: TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina, pH 7, SIGMA-ALDRICH, Alemania), urea (Plus One Urea, Amershan Biosciences), NaOH (hidróxido de sodio, 1M), yodoacetamida (84mM), etanol absoluto, etanol al 90% y las membranas de diálisis Slide-A-Lyzer™ MINI (0.5mL, 10kDa MWCO, por sus siglas en inglés *Molecular Weight Cut-Off*, ThermoFisher).

Para la electroforesis se empleó acrilamida-bisacrilamida (30%:0.8% w/v (peso/volumen, del inglés *weight/volume*), ThermoFisher), dodecil sulfato sódico (10% w/v, ThermoFisher), SDS, del inglés *sodium dodecyl sulfate*, ThermoFisher), persulfato amónico (10% w/v, APS, del inglés *amonic persulfate*, ThermoFisher), N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamina (TEMED, ThermoFisher), *buffer* Tris-HCl (tris(hidroximetil) aminometano, pH 8.8, 16.6mM, ThermoFisher), *buffer* de carga (Laemmli *buffer* 4X, ThermoFisher), *buffer* de electroforesis (TrisGlicina SDS 1X, ThermoFisher), isopropanol puro, glicerol y tinte para la proteína (azul brillante R-250 de Coomassie, ThermoFisher).

Para el experimento de liberación de la FN, se utilizó el kit DuoSet ELISA Development System (fibronectina humana, RnDSystems, Reino Unido).

Finalmente, para los ensayos de liberación del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, del inglés *hepatocyte growth factor*, Peprotech) se empleó el marcador fluorescente DyLight 488 NHS Ester (1011 g/mol, reactivo a aminas, ThermoFisher), N,N-dimetilformamida (DMF, ThermoFisher), el medio tampón bórax (*buffer* de borato, 0.05M, pH 8.5) y las membranas de diálisis Slide-A-Lyzer™ MINI (2mL, 10kDa MWCO, ThermoFisher).

5.1.2. Cultivo celular

Las células empleadas en los experimentos de encapsulación y cultivo celular fueron de la línea celular inmortalizada HepG2. Se cultivaron con medio completo Ham's F12/Leibovitz L15 suplementado con L-glutamina (2 mM), 7% de suero bovino fetal (SBF), glucosa (0.01 M), BSA (1 mg/mL), bicarbonato (0.01 M) y penicilina/estreptomicina. En el experimento de viabilidad celular se utilizó el kit LIVE/DEAD Cell Viability Assay (Invitrogen™).

5.2. Métodos

5.2.1. Preparación de los hidrogeles Gel-PEG

La estructura química de la FN, como se vio en el apartado de introducción, contiene grupos amino y carboxilo. Esto favorece su interacción con entrecruzadores como el PEG-SG. Este presenta grupos succinimidil-glutarato (SG) sustituyendo a los grupos carboxilo terminales asegurando su unión covalente a la Gel. Los grupos succinimidil reaccionan con los grupos amino de la Gel por poliadición de forma espontánea, estableciéndose así un enlace covalente (Figura 9) [33].

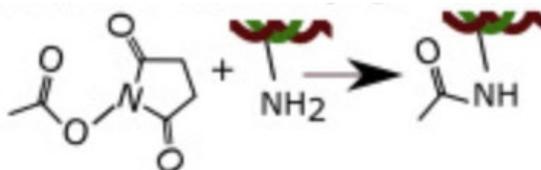


Figura 9. Esquema de la reacción de entrecruzamiento por poliadición entre Gel y PEG-SG [33].

Los hidrogeles se sintetizaron a partir de las siguientes disoluciones stock: 50 mg/mL de Gel y 100 mg/mL de PEG. Las concentraciones de trabajo de Gel y de PEG correspondientes a cada ratio están recogidas en la Tabla 2. Los hidrogeles de distintos ratios se sintetizaron trabajando con diferentes volúmenes de la disolución de PEG y manteniendo constante la concentración de la Gel.

Ratio	%	mg/mL
1:1	3.0% Gel	30
	3.0 % PEG	30
1:0.75	3.0% Gel	30
	2.25% PEG	22.5
1:0.5	3.0% Gel	30
	1.5% PEG	15

Tabla 2. Concentraciones de Gel y PEG establecidas para cada ratio.

Primeramente, se preparó la disolución de Gel en polvo con medio DMEM (Gel-DMEM) en tubos Eppendorf y disolvió a 37°C durante 30 minutos. Durante este tiempo, se pesaron las cantidades correspondientes previamente calculadas de PEG, dejándolas preparadas en alícuotas a -20°C. Una vez disuelta la Gel, se mezclaron los volúmenes de trabajo de Gel y de DMEM y se resuspendieron las alícuotas de PEG en DPBS durante 2-3 minutos. La síntesis de hidrogeles *in situ* en el reómetro para los experimentos de reología, así como de los hidrogeles gelificados en moldes, se llevaron a cabo con el mismo procedimiento. Primero se añadió el volumen necesario de Gel disuelta en DMEM y a continuación se le incorporó la disolución de PEG mezclando hasta obtener una mezcla homogénea en la que comienza el entrecruzamiento de las cadenas de Gel. Por último, para simular las condiciones fisiológicas, los hidrogeles en moldes se dejaron 30 minutos a 37°C y en el reómetro el plato inferior se configuró a 37°C. Consultar ANEXO I.

En cuanto a los hidrogeles con FN y/o con HGF incorporados, se prepararon a las concentraciones de trabajo correspondientes al ratio Gel-PEG 1:0.75. Las disoluciones stock para estos hidrogeles fueron: 70 mg/mL de Gel, 150 mg/mL de PEG, 2.5 mg/mL de FN dimérica o control (FN_d) o 1.5 mg/mL de FN

monomérica (FN_m) y 100 µg/mL de HGF. El proceso de elaboración de los hidrogeles fue el mismo que en el caso de los hidrogeles Gel-PEG sin aditivos, siendo los únicos cambios la incubación durante 30 minutos a 37°C de Gel+FN, Gel+FN+HGF o Gel+HGF, que se realizó una vez disuelta la Gel y antes de añadir el entrecruzador a la mezcla; y la incubación a 37°C de los hidrogeles recién formados durante un tiempo de 15 minutos en lugar de 30 minutos. Consultar ANEXO IV, ANEXO VI y ANEXO IX.

Nota: los hidrogeles con FN y/o HGF se prepararon gelificados en moldes (como los observados en la Figura 10), cuyo tamaño fue variable y se indica en el procedimiento de cada experimento en concreto.

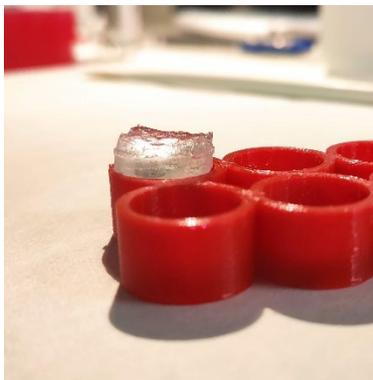


Figura 10. Hidrogel pregelificado sobre molde de 300 µL.

5.2.2. Tiempo de gelificación y propiedades mecánicas

Para evaluar las variaciones de las propiedades mecánicas en función de la composición del hidrogel entre las propuestas para este estudio (ratios de Gel-PEG 1:0.5, 1:0.75 y 1:1), se llevaron a cabo ensayos de reología, obteniéndose curvas de los módulos de almacenamiento, pérdida y complejo frente a tiempo, amplitud y frecuencia.

Los experimentos se realizaron en el reómetro por control de deformación “Discovery HR-2 Hybrid” (TA Instruments, EE. UU.). El vástago superior utilizado fue un plato de acero inoxidable, de 20 mm de diámetro para la medida de gelificación *in situ* y de 12 mm de diámetro para las medidas con los hidrogeles gelificados e hinchados, sintetizados en moldes de 300 µL. El espaciado entre los platos superior e inferior se estableció en un valor de 1000 µm para la gelificación *in situ* y fue variando para mantener la fuerza axial en 0.01 N para el caso de las medidas de los hidrogeles gelificados e hinchados. Gracias al sistema de *solvent trap* se pudo minimizar la evaporación del solvente durante el experimento. Además, se añadió agua destilada en el plato superior y gotas periféricas de la misma en el plato inferior, generando una atmósfera del 100% de humedad relativa.

Para iniciar el ensayo de gelificación *in situ*, se depositó sobre el plato inferior del reómetro la disolución de Gel con DMEM (las concentraciones de la misma varían según el ratio a evaluar). En el caso de los hidrogeles con células encapsuladas, éstas también fueron añadidas antes del entrecruzador, como se describe más adelante en el apartado de Encapsulación de HepG2. Se inició el experimento desde el ordenador y, en el tiempo que tardó el vástago superior hasta entrar en contacto con el hidrogel, se añadió rápidamente la cantidad de PEG correspondiente a la mezcla. Se le dio un pequeño impulso al vástago (inmediatamente antes de poner el sistema *solvent trap*) para asegurar el inicio de la rotación de éste y favorecer la mezcla de componentes. En el caso de los hidrogeles gelificados e hinchados, fueron depositados en el plato inferior del reómetro. Se añadieron las gotas periféricas de agua mQ y se inició el

ensayo desde el ordenador, también colocando inmediatamente el sistema *solvent trap*. En la Figura 11 se puede observar el plato inferior del reómetro antes de iniciar el ensayo con el hidrogel gelificado.

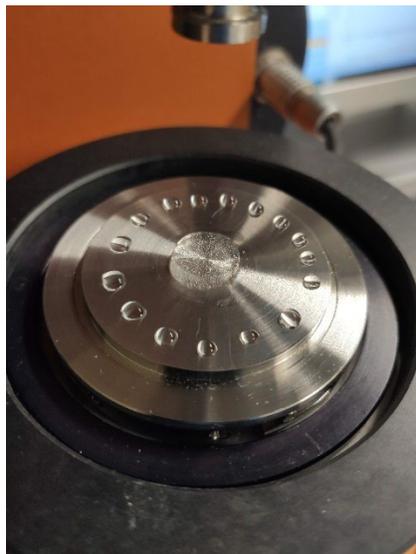


Figura 11. Hidrogel gelificado en plato de reómetro, rodeado por gotas periféricas de agua destilada.

En el protocolo experimental de este ensayo se definieron tres pruebas a realizar. El barrido de tiempo, que tuvo lugar durante la gelificación, se realizó a una frecuencia de 1 Hz y una deformación de 1% y con una duración de 45 minutos. Las dos pruebas cortas, de una duración aproximada de 10 minutos cada una, fueron: el barrido de amplitud, para determinar la región viscoelástica lineal del hidrogel, que se realizó en un rango de deformación de 0.01 a 20% y a una frecuencia constante de 1 Hz; y el barrido de frecuencia, realizado después del barrido de amplitud a deformación constante del 1% (dentro de la región viscoelástica lineal del hidrogel) y en un rango de frecuencia de 0.1 a 10 Hz. El barrido de tiempo se realizó solamente para el protocolo de la gelificación *in situ*, que solamente se llevó a cabo para los hidrogeles de Gel-PEG y de Gel-PEG con las células HepG2 encapsuladas. Los barridos de amplitud y frecuencia, en cambio, se tomaron tanto para el caso de la gelificación *in situ*, como para los hidrogeles previamente gelificados e hinchados.

5.2.3. Medida del contenido de agua en equilibrio

El contenido de agua en equilibrio (del inglés *equilibrium water content, EWC*) es el aumento fraccional del peso de un hidrogel por absorción de agua. Para realizar esta medida, para cada composición (1:1, 1:0.75 y 1:0.5 de Gel-PEG, y posteriormente 1:0.75 de Gel-PEG con FN_m) se prepararon hidrogeles de 250 μ L en moldes cilíndricos (consultar ANEXO II y ANEXO VII). El protocolo que se siguió fue el siguiente, con una duración del experimento total de 4 días. El primer día se sintetizaron los hidrogeles de la misma forma que se explicó en el apartado de síntesis, se pesaron recién gelificados y se trasladaron a viales individuales. Se cubrieron con medio de cultivo HepG2, se taparon y se dejaron en estufa a 37°C durante 24 horas para su hinchado.

Al segundo día, se quitó el medio de cultivo, se realizaron lavados con DPBS y se pesaron los hidrogeles hinchados para obtener los datos de peso húmedo ($m_{húmedo}$). A continuación, se cubrieron con tapas perforadas, se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron durante 24 horas en la liofilizadora (Telstar LyoQue, Alemania).

El tercer día se pesaron los hidrogeles liofilizados y se dejaron en la estufa a 60°C durante toda la noche sin tapa para asegurar la evaporación de toda el agua. El cuarto día se pesaron para obtener el peso seco (m_{seco}).

Por último, una vez obtenidos todos los datos necesarios (consultar ANEXO II y ANEXO VII), se calculó el contenido de agua en equilibrio en tanto por uno referido al peso seco de cada muestra empleando la Ecuación 1.

$$EWC = \frac{m_{agua}}{m_{seco}} = \frac{m_{húmedo} - m_{seco}}{m_{seco}}$$

Ecuación 1. Cálculo del contenido de agua en equilibrio (EWC) en tanto por uno.

5.2.4. Desnaturalización de la fibronectina

Tal y como se ha dicho en el apartado de Introducción, la FN es una proteína presente en la ECM cuya forma natural es dimérica y que consta de dos subunidades idénticas unidas por dos puentes disulfuro. No obstante, el caso concreto de este TFG, se decidió utilizarla en forma monomérica, ya que se vio en la bibliografía [36] que de esta forma los dominios de unión a gelatina, célula o factor de crecimiento pueden estar más disponibles. Por tanto, se desnaturalizó la FN siguiendo el siguiente protocolo.

Desnaturalización

El primer paso de la desnaturalización consiste en la ruptura de los puentes disulfuro. Para ello, se utilizó el agente reductor TCEP ayudado por la urea, que actuó de agente caotrópico. Por otro lado, para mantener la proteína en forma monomérica y evitar su renaturalización, se bloquearon las cisteínas por medio de la alquilación con yodoacetamida impidiendo la formación de nuevos puentes disulfuro.

El protocolo a seguir para llevar a cabo la desnaturalización de la FN_d fue el siguiente (para la obtención de 200 µL de FN_m):

Primero, se mezclaron 167 µL de FN (3 mg/mL) con 10 µL de TCEP (0.5 M), se le añadieron 450 µL de urea (18 M), 373 µL de PBS 1X y se dejó desnaturalizar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se detuvo la reacción con 5 µL de NaOH (1 M). A continuación, se llevó a cabo la alquilación de la FN: se añadieron 150 µL de yodoacetamida (84 mM) y la disolución se mantuvo en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente y cubierta con papel de aluminio para protección contra la luz. 1 hora antes de proceder con el paso siguiente, se hidrataron las membranas de diálisis especificadas en el apartado de Materiales con agua MilliQ (mQ). Transcurrido el tiempo de reacción en agitación, la mezcla se dializó con DPBS(-/-) durante 1 hora a temperatura ambiente en las membranas previamente hidratadas, para conseguir eliminar los agentes de desnaturalización (el TCEP y la urea). Por último, se procedió con la etapa de precipitación. En un falcon de ultracentrífuga, se añadieron la disolución de FN y 9 volúmenes (10 mL) de etanol absoluto frío y se mezcló bien la disolución con un vórtex. La mezcla se mantuvo en el congelador a -20°C durante la noche y al día siguiente se centrifugó a 15000g y a 4°C durante 15 minutos en ultracentrífuga. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol frío al 90%, tras lo cual se centrifugó de nuevo la mezcla a 15000g y a 4°C durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el etanol. Se resuspendió el pellet utilizando 200 µL de urea (8 M) obteniendo una disolución de FN_m a 2.5 mg/mL que, por último, se dializó durante 1 hora a temperatura ambiente frente a DPBS en las membranas de diálisis idénticas a las utilizadas en los primeros pasos.

Debido a que el protocolo no tiene un rendimiento del 100%, para conocer la concentración final de FN_m se midió la concentración tras la desnaturalización utilizando el espectrofotómetro “NanoDrop One” (Thermo Scientific™). Para ello, se colocó una muestra de 2 µL de la disolución de FN_m en el plato inferior del aparato y se bajó el plato superior, con lo cual, durante el contacto de ambos platos con la muestra y la leve elevación automática del plato superior, ésta fue atravesada por un haz de luz y el programa determinó la concentración de proteína a partir del nivel de fluorescencia de la misma. Los niveles de fluorescencia de la FN eran conocidos (valores de excitación y emisión, Ex/Em, de 450/570 nm) y se establecieron en la pantalla del aparato manualmente, aunque también es posible hacerlo seleccionando desde una lista de valores predeterminados disponibles en el desplegable. Por último, la FN desnaturalizada se guardó en frío a -20°C hasta su incorporación a los hidrogeles.

Electroforesis SDS-PAGE

Además, para comprobar que la desnaturalización se realizó correctamente, se llevó a cabo un experimento de electroforesis desnaturalizante en gel de acrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), que permite separar las proteínas por su peso molecular por medio de estimulación eléctrica, durante la cual las proteínas se desplazan en el gel con una velocidad inversamente proporcional a su peso (SDS-PAGE: Electroforesis, n.d.), (Lisón Párraga y Aparicio Herrero, n.d.). El contenido de acrilamida en el gel fue del 30%. El experimento se realizó utilizando el equipo de electroforesis MINIPROTEAN (BioRad).

Para ello, primeramente, se tuvo que preparar el gel de electroforesis, con dos zonas diferentes: gel concentrador o *stacking* (pH 6.6, donde se acumulan las proteínas antes de entrar en el gel de *resolving*, asegurando su entrada simultánea en éste) y el gel separador o *resolving* (pH 8.8, donde se separan las proteínas según su tamaño), que se superpusieron en un molde vertical, formado por dos placas de cristal selladas con unas pinzas de plástico y que forma parte del sistema MINIPROTEAN. Los volúmenes de todos los componentes necesarios para la preparación de ambas partes del gel, así como la función de cada uno de estos componentes, se listan en la Tabla 3. Previamente se prepararon los *buffers* de Tris-HCl, 100mL de cada uno, para el mantenimiento del pH de los geles: pH 6.6 para el gel de *stacking* (buffer de 0.5 M, 6.05 g de Tris y 80 mL de agua mQ) y pH 8.8 para el gel de *resolving* (buffer de 1.5 M, 18.17 g de Tris y 80 mL de agua mQ). Los cálculos detallados se recogen en el ANEXO III.

Componente	Función	<i>Stacking</i>	<i>Resolving</i>
Agua destilada	Medio de disolución	2.8 mL	5.7 mL
Acrilamida-bisacrilamida	Monómero y entrecruzador	0.85 mL	1.7 mL
Buffer Tris-HCl	Fomentar el movimiento de la proteína por el gel	1,25mL	2.5 mL
SDS 10%	Cargar negativamente a las proteínas para que su desplazamiento solamente sea influido por su peso molecular	100 µL	100 µL
APS 10%	Catalizar el entrecruzamiento	50 µL	50 µL
N, N, N', N'-tetrametilenetilendiamina (TEMED)	Inducir la formación de radicales libres en el APS, iniciando la polimerización de la acrilamida	10 µL	5 µL

Tabla 3. Función de cada componente en los procesos de la formación del hidrogel y de la electroforesis en sí (SDS-PAGE: Electroforesis, n.d.), (Lisón Párraga y Aparicio Herrero, n.d.). Volúmenes de los componentes necesarios para la preparación de las dos partes del gel de electroforesis.

Todo el proceso de fabricación del hidrogel de electroforesis *in situ* se llevó a cabo en campana debido a la capacidad oncogénica de la acrilamida no tratada (SDS-PAGE: Electroforesis, n.d.). Se mezclaron primero en un vaso de precipitados los componentes del gel de *resolving* en el orden siguiente: el agua destilada, el buffer Tris-HCl correspondiente, la acrilamida-bisacrilamida y el SDS se mezclaron primero y se dejaron reposar 10 minutos (para hacer desaparecer las posibles burbujas), tras lo cual se añadieron el APS y el TEMED. Inmediatamente después de la adición de los últimos, se depositó en el molde MINIPROTEAN la capa de *resolving* con precaución de no formar burbujas y se añadió isopropanol cubriendo la superficie del gel para dejar que gelifique sin contactar con oxígeno (éste de estar presente en la reacción capta los radicales libres, que son la base de esta reacción de polimerización, por lo que impide la formación del gel (Lisón Párraga y Aparicio Herrero, n.d.)). Se dejó gelificar el gel de *resolving* durante 30 minutos. Una vez gelificado el *resolving*, se eliminó el alcohol con un papel de filtro y se repitió el proceso de preparación y deposición para el gel de *stacking*, introduciendo en el mismo la peinetas de plástico, proporcionada por el fabricante del sistema, que permitió la formación de pocillos para la inyección de las proteínas. Se dejó solidificar el gel de *stacking* durante 30 minutos. Una vez preparado el hidrogel completo en el molde, se guardó en DPBS en nevera a 4°C hasta su uso.

Para la realización del experimento, se prepararon los siguientes reactivos: marcador de pesos moleculares, control de FN_d y dos muestras de FN_m. A las muestras de FN se les añadió agua mQ y el *buffer* de carga especificado en el apartado de Materiales. Los volúmenes exactos de cada componente se recogen en la Tabla 4. De cada muestra se cargaron 20 µL por pocillo.

	Disolución stock	Agua mQ	Buffer de carga
FN _d (control)	10.2 µL	4.8 µL	45 µL
FN _m muestra 1	13.8 µL	1.2 µL	45 µL
FN _m muestra 2	13.4 µL	1.6 µL	45 µL

Tabla 4. Volúmenes de los componentes de las muestras a introducir en el gel de electroforesis.

Una vez montado el sistema MINIPROTEAN y cargadas las muestras en los pocillos (el marcador en los pocillos de los extremos y las muestras de FN, en el resto), se llenó el recipiente con el *buffer* de electroforesis especificado en el apartado de Materiales. Se tapó el recipiente y se procedió a suministrar el voltaje: 50V en una fase inicial de 10-15 minutos y luego 150V en la fase final de una duración de aproximadamente 1 hora. Finalmente, se extrajo el gel de *resolving* y se procedió a la tinción con Coomassie y posterior toma de imágenes en el transiluminador (Gel Doc XR+ System, BioRad).

5.2.5. Incorporación de fibronectina monomérica en hidrogeles Gel-PEG de ratio 1:0.75

Para determinar la cantidad de FN que no se unió covalentemente al hidrogel, así como para evaluar la diferencia de la cantidad liberada al utilizar FN_d o FN_m, se realizó el experimento de liberación de FN mediante la técnica ELISA siguiendo las instrucciones disponibles del kit DuoSet ELISA.

Para el experimento, se prepararon hidrogeles de 50 µL con FN_d y FN_m a una concentración de 0.5 mg/mL (consultar ANEXO IV). Se sintetizaron y se dejaron en pocillos en placa de 48 pocillos no tratada cubiertos con 350 µL de DPBS. A las 24 horas se recogió el sobrenadante y se guardó a -20°C para analizarlo posteriormente. Para la obtención de las curvas patrón se empleó el lector de placas VICTOR (espectrofotómetro VICTOR 3 1420, PerkinElmer, EE. UU.), estableciendo una longitud de onda Ex/Em de 450/570 nm, indicada por las instrucciones del kit. Los resultados fueron guardados en forma de tabla Excel para su posterior análisis.

Por otro lado, además de la curva patrón del kit, se realizaron curvas patrón para la FN_d y la FN_m (para comprobar que el kit cuantificaba correctamente las proteínas empleadas) por medio de disoluciones seriadas, siendo la serie de concentraciones (ng/mL, cálculos detallados en ANEXO V): 180, 90, 45, 22.5, 11.25, 5.625 y el blanco (a 0 ng/mL). Dichas disoluciones se prepararon en tubos Eppendorf usando DPBS como medio. Primero, se prepararon 7 tubos Eppendorf y se echó 250 µL de DPBS en cada uno. A continuación, se añadieron 250 µL de la disolución con la FN al primer tubo, se mezcló bien la disolución, se tomó 250 µL de ésta y se añadieron al Eppendorf siguiente. El procedimiento se repitió hasta llegar al sexto Eppendorf, donde la concentración de FN fue la más baja, dejando uno solo con DPBS. Los Eppendorf se guardaron tapados con papel de aluminio a -20°C hasta su uso.

Nota: Para su uso en el kit, las muestras de sobrenadante se diluyeron a 1:500 en DPBS.

Nota 2: en la placa P-48, además de rellenar con DPBS los pocillos de los hidrogeles, también se rellenaron los pocillos periféricos vacíos con el fin de mantener la humedad relativa al 100% y se selló la placa con Parafilm antes de proceder con la incubación a 37°C, para evitar que el líquido se evapore.

5.2.6. Incorporación del factor de crecimiento de hepatocitos en hidrogeles Gel-PEG de ratio 1:0.75

Para determinar la cantidad de HGF retenida por el hidrogel y la influencia en el resultado de la presencia de la FN_m, se llevó a cabo el experimento de liberación de HGF. Se preparó un grupo control sin FN_m y el grupo a comparar, con la FN_m incluida en el hidrogel.

Para cuantificar la cantidad de HGF liberada, se realizó previamente un marcaje de éste con el marcador fluorescente DyLight-488 NHS Ester (DyLight-488) para la posterior medición en el espectrofotómetro VICTOR (VICTOR), el mismo que el utilizado en el experimento de la liberación de la FN.

El DyLight-488 es un tinte que reacciona con grupos amino y que la casa comercial proporciona en viales de 50 µg de tinte en polvo. Como indica el fabricante, para su uso se debe resuspender la cantidad correspondiente a un vial en 50 µL de N,N-dimetilformamida (DMF), obteniendo el DyLight-488 diluido a 1 mg/mL. Se mezclaron ambos componentes en un tubo Eppendorf, la disolución se sometió a un vórtex, se dejó reaccionar 5 minutos y se le volvió a aplicar el vórtex, tras lo cual se guardó a -20°C tapada de la luz con papel de aluminio hasta su uso.

Primeramente, se marcaron 100 µL de HGF a una concentración de HGF de 100 µg/mL. La cantidad de marcador necesaria para dicho volumen de HGF se calculó con la Ecuación 2, proporcionada también por el fabricante:

$$V_{DyLight-488} = \frac{m_{HGF} (mg)}{PM_{HGF} (g/mol)} \cdot 10 \cdot PM_{DyLight-488} (g/mol) \cdot \frac{1}{\square_{DyLight-488} (mg/mL)}$$

Ecuación 2. Cálculo del volumen de la disolución de DyLight-488 requerido para el tinte del HGF. m_{HGF} es la masa del HGF, PM_{HGF} es el peso molecular del HGF, $PM_{DyLight-488}$ el peso molecular del tinte DyLight-488 y $\square_{DyLight-488}$ es la concentración del tinte señalada por el fabricante.

Los pasos del marcaje fueron los siguientes: en primer lugar, se realizó la diálisis del HGF frente al *buffer* bórax (especificado en el apartado de Materiales y en el que se lleva a cabo el marcaje con DyLight-488) en membranas de diálisis previamente hidratadas con agua mQ, durante 2 horas. A continuación, se mezclaron el HGF con el volumen de DyLight-488 y se dejó reaccionar la mezcla durante 1 hora a

temperatura ambiente, protegido de la luz. Posteriormente se realizó otra diálisis ya del HGF marcado, frente a DPBS, durante 4 horas con 3 cambios de medio. Finalmente, las alícuotas de HGF marcado se guardan a -20°C hasta su uso. Consultar ANEXO VIII.

En segundo lugar, se procedió a la preparación de hidrogeles con el HGF marcado encapsulado: se preparó por un lado un control, con HGF y sin FN, y por otro los hidrogeles con FN_d y HGF y FN_m y HGF. De cada tanda (control, con FN_d y con FN_m) se prepararon 3 hidrogeles de 50 µL de volumen cada uno. En los hidrogeles con HGF, se añadió 5µL del stock (100 µg/mL) en cada hidrogel, siendo por tanto su concentración de 10µg/mL en el hidrogel. El procedimiento de elaboración de los hidrogeles fue el descrito en el apartado de síntesis de hidrogeles. Los hidrogeles se prepararon en placas de 48 pocillos P-48 no tratadas. Tras gelificar, se cubrieron con 350 µL de DPBS y se dejaron 4 horas a 37°C antes de recoger el sobrenadante, tapando las placas con papel de aluminio para proteger las muestras de la luz. Se volvieron a cubrir con 350 µL de DPBS y se repitió el proceso tras 24 horas y tras 48 horas a 37°C. Los sobrenadantes recogidos se dejaron a -80°C. Consultar ANEXO IX.

Nota: en las placas P-48, además de rellenar con PBS los pocillos de los hidrogeles, también se rellenaron los pocillos periféricos vacíos con el fin de mantener la humedad relativa al 100%. Antes de tapar la placa con papel de aluminio y dejarla a 37°C, se selló con Parafilm para evitar que el líquido se evapore.

Nota 2: con el mismo procedimiento, se fabricaron dos hidrogeles de cada composición (controles, Gel-PEG sin HGF y Gel-PEG con HGF marcado) para tener un blanco para los cálculos de cantidad de HGF liberada a partir de los datos de fluorescencia.

Tras los tres días de recogida de sobrenadantes, se procedió a la determinación de la cantidad de HGF liberada. Se preparó previamente la curva patrón del HGF marcado con 7 disoluciones seriadas con las siguientes concentraciones (en µg/mL, cálculos detallados en ANEXO X): 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03 y el blanco a 0 µg/mL. Una vez preparadas las alícuotas de la curva patrón y descongelados los sobrenadantes, se procedió al relleno de los pocillos de la placa negra protegida de la luz P-96 no tratada para su lectura en el VICTOR. Se prepararon medidas dobles en el siguiente orden: curva patrón (de mayor a menor concentración), sobrenadante a las 4 horas, sobrenadante a las 24 horas y sobrenadante a las 48 horas. Se prepararon por separado la placa con el control y la placa con el grupo con FN incorporada. Se introdujeron las placas por separado en el VICTOR, se estableció una frecuencia Ex/Em de 493/518 nm (dato proporcionado por el fabricante del DyLight-488), y, una vez realizadas las medidas, se extrajo el documento Excel de los resultados para su posterior análisis.

5.2.7. Cultivo celular

Suspensión celular

El cultivo celular en monocapa se lavó con DPBS y se levantó con tripsina, dejando que actuara durante 3 minutos. A continuación, se inactivó el medio de cultivo, la suspensión celular fue recogida y centrifugada a 1500 rpm durante 3 minutos y se decantó el medio restante. Las células se resuspendieron en medio nuevo y se realizó el recuento celular utilizando la cámara Neubauer.

Encapsulación de HepG2

Las células fueron encapsuladas en hidrogeles de 100 µL con una densidad celular de 200.000 células por cada hidrogel. Se prepararon en primer lugar las disoluciones de Gel con DMEM (Gel-DMEM) y las alícuotas de PEG, con las cantidades de componente correspondientes a cada ratio. Las tres variantes de polímeros a comparar (hidrogeles de ratios Gel-PEG 1:0.5, 1:0.75 y 1:1) se prepararon a 3% w/v en medio

DMEM y fueron esterilizados con filtros de 0.22 µm de poro. Una vez obtenida la suspensión celular, se separaron 200 000 células/hidrogel y se centrifugaron a 1500 rpm durante un tiempo de 3 minutos. Se obtuvo un pellet que se resuspendió en el volumen de las disoluciones Gel-DMEM y, una vez dispuesta la gota de dicha disolución, se añadió el PEG, 2-3 minutos antes resuspendido en DPBS, para el entrecruzamiento y la formación del hidrogel. Una vez gelificados, se añadió medio de cultivo para HepG2.

Viabilidad celular

Una vez encapsuladas las HepG2, los hidrogeles se mantuvieron en cultivo durante 2 días antes de ser transferidos a una placa nueva, en la que se sometieron a un ensayo de viabilidad (LIVE/DEAD) utilizando el kit especificado en el apartado de Materiales. Durante el ensayo, los hidrogeles se incubaron a 37°C durante un tiempo de 30 minutos en una disolución de calceína AM (2 µM), homodímero de etidio (8 µM) y Hoechst 33342 (2 µM) proporcionada por el kit, para posteriormente adquirir imágenes de fluorescencia en el microscopio Leica HMR (Leica Microsystems). La imagen del mismo campo se tomó en los tres canales. Esto fue posible gracias a que las células vivas poseen la capacidad de transporte de calceína AM a través de la membrana plasmática, de modo que ésta se transforma en fluorescente y marca el citoplasma y el núcleo, de modo que en el microscopio se visualizó de color verde. A su vez, el etidio penetra en las células muertas marcando el núcleo de color rojo. De este modo, se pudo diferenciar en las imágenes las células vivas de las células muertas.

Las imágenes obtenidas se analizaron en ImageJ mediante una cuantificación manual. Para la cuantificación de las células vivas se utilizaron imágenes de calceína AM (de células vivas). De igual forma, para la cuantificación de células muertas se emplearon las imágenes de homodímero de etidio. Finalmente, se calculó la viabilidad media de todas las composiciones partiendo de las distintas réplicas biológicas empleando la Ecuación 3.

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{células\ vivas}{células\ vivas + células\ muertas} \cdot 100$$

Ecuación 3. Cálculo de la viabilidad celular media.

Nota: los experimentos y resultados de los mismos del apartado de Cultivo celular se llevaron a cabo y fueron cedidos para completar este TFG por Estela Sánchez González.

5.2.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPAD Prism 8.0.2. Todos los datos relevantes se sometieron primeramente a una prueba de normalidad (test de Shapiro-Wilk, para variables con un pequeño tamaño de muestra, o test de d'Agostino-Pearson, si el tamaño de muestra era más grande y lo permitía) y de homocedasticidad de los residuos; a continuación, en función de si resultó que seguían una distribución normal o no se realizó un análisis estadístico u otro. En el primer caso, se procedió con la prueba de T-test no emparejado para los casos de comparación de dos variables y con el ANOVA de 1 factor y test de Holm-Sidak o el ANOVA de 2 factores y test de Sidak para cuando se trataba de una comparación entre más de dos variables. En el segundo caso, se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney para los análisis de dos variables y la prueba de Kruskal-Wallis y test de Dunn para las comparaciones entre más de dos variables. En todos los casos de análisis las diferencias entre las variables se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0.05$. Todas las gráficas presentes en este TFG también se elaboraron con dicho programa.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizados los experimentos descritos en el apartado anterior, se procedió al tratamiento y análisis de los resultados de propiedades de los materiales, con el objetivo de determinar la proporción óptima de Gel-PEG en los hidrogeles. Una vez seleccionado el ratio de Gel-PEG óptimo, se procedió a evaluar la retención de FN y HGF en los hidrogeles a dicha proporción.

6.1. PROPIEDADES MECÁNICAS DE HIDROGELES GEL-PEG SIN FN

Los hidrogeles se sometieron a tres barridos (tiempo, deformación y frecuencia) en el reómetro para determinar el tiempo de gelificación y sus propiedades mecánicas. Tras tratar los datos del reómetro, se obtuvieron las siguientes curvas (Figura 12).

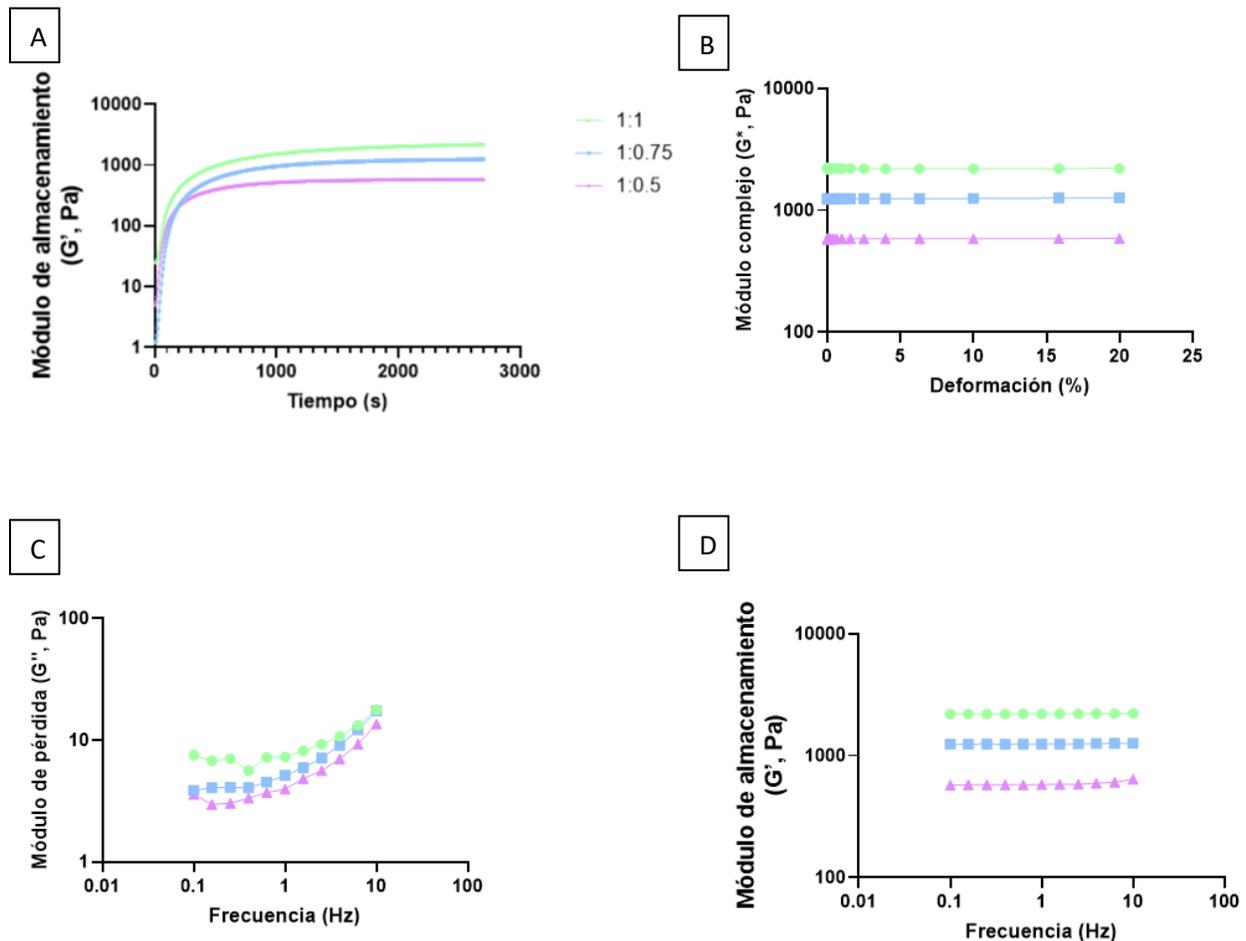


Figura 12. Curvas de reología de hidrogeles de Gel-PEG de todos los ratios: A) Módulo de almacenamiento (G') frente a tiempo (s); B) Módulo complejo (G^*) frente a deformación (%); C) Módulo de pérdida (G'') frente a frecuencia (Hz); D) G' frente a frecuencia. Las curvas se prepararon empleando 5 réplicas para el ratio 1:0.5 y 4 réplicas para los dos ratios restantes.

6.1.1. Tiempo de gelificación

Con las curvas resultantes del barrido del tiempo se calculó el tiempo de gelificación de cada uno de los ratios (Figura 12A). En primer lugar, tras la obtención de las gráficas y del análisis estadístico de las curvas de los tiempos de gelificación de los hidrogeles de los tres ratios (Gel-PEG 1:0.5, 1:0.75 y 1:1), se observó que este parámetro disminuía conforme aumentaba la proporción de PEG en el hidrogel. El ratio 1:1 es el

que presenta los valores más bajos de tiempo de gelificación, siendo inviable el cálculo del tiempo pues la gelificación es instantánea. Por ello, al establecer los ajustes lineales, el valor resultante es 0.00 min. Concretamente, el ajuste devuelve un tiempo de 0.0003 s, por lo que se asumió que cuando el equipo comienza la medición, ya han empezado a entrecruzarse las cadenas, es decir, el hidrogel gelifica antes de empezar la medición. El ratio 1:0.75 muestra 3.0 ± 0.3 min y el ratio 1:0.5, 4.7 ± 0.2 min. Los datos se obtuvieron mediante dos ajustes lineales, uno en el tramo ascendente de la curva de gelificación y otro en el tramo donde se estabiliza. La intersección de ambas rectas fue el tiempo de gelificación resultante. El análisis estadístico (Figura 13) (resultados detallados recogidos en ANEXO XIIa – Tabla 5) establece diferencias significativas entre los tres valores. Este resultado tiene sentido, pues la mayor cantidad de PEG significa más puntos de unión disponibles y, por tanto, mayor velocidad de entrecruzamiento de la Gel (Contessi Negrini y otros, 2021). Los tres valores de los tiempos medios de gelificación se encontraron por debajo de aquellos a los que comienzan a depositarse las células, como bien se demostró posteriormente en los resultados de encapsulación celular (Apartado 6.1.4.) y del ensayo de viabilidad celular (Apartado 6.2.).

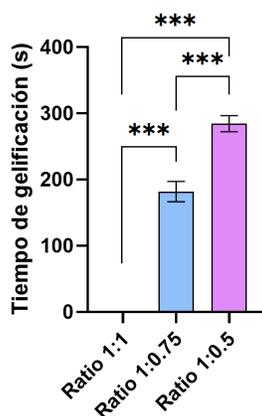


Figura 13. Gráfica de los resultados del análisis estadístico de los tiempos de gelificación de los ratios Gel-PEG 1:1, 1:0.75 y 1:0.5. Se emplearon 3 réplicas para el ratio 1:1, 4 réplicas para el ratio 1:0.75 y 5 réplicas para el ratio 1:0.5. Significancia estadística: *** $p < 0.001$. ANOVA de 1 factor y test de Holm-Sidak.

6.1.2. Barrido de amplitud

El segundo barrido, G^* frente a deformación (%) (Figura 12B), se realizó con el fin de comprobar que los materiales se encontraban en su zona viscoelástica lineal en todo el rango de trabajo (de 0.1 a 20% de deformación). Se observó, en los tres ratios, que el módulo complejo se mantuvo constante en todo este rango de deformación, con lo cual el hidrogel se encuentra en el rango viscoelástico lineal para un rango de deformación de entre 0.1-20% (Figura 1). Esto se requirió para determinar el valor de deformación adecuado en los siguientes barridos, que debe estar en el intervalo lineal (NETZSCH Analyzing & Testing, n.d.).

6.1.3. Barridos de frecuencia

Los últimos dos barridos, G' y G'' frente a frecuencia a 1% de deformación (en la zona viscoelástica lineal del hidrogel) (Figuras 12D y 12C, respectivamente), se realizaron para determinar las propiedades mecánicas de los hidrogeles. G' es el módulo de almacenamiento a cizalla del material y está relacionado con la respuesta elástica del hidrogel, mientras que el G'' es el módulo de pérdidas a cizalla del material, relacionado con la respuesta viscosa del material. Esto es, si el material posee un G'' mucho más elevado o similar a G' , se trata de un material viscoelástico, mientras que si G'' es mucho menor que G' indica que

se tiene un material elástico (TA Instruments Germany, n.d.). Como se puede observar en la Figura 1, el G' resultó mucho más elevado que el G'' , con lo cual en los tres ratios se trató de un material elástico. Esto es coherente con resultados obtenidos en trabajos similares (Bhattacharya y otros, 2012), (Fu y otros, 2012), (Almawash y otros, 2022). Por tanto, para el análisis de los valores numéricos nos fijaremos en G' , por ser la magnitud más importante en estos hidrogeles. Las medias con su desviación típica obtenidas para G' en cada ratio fueron: 2114 ± 249 Pa para el ratio 1:1, 1247 ± 601 Pa para el ratio 1:0.75 y 507 ± 144 Pa para el ratio 1:0.5. En (Fu y otros, 2012) reportaron resultados similares, se observaba como al aumentar la cantidad de PEG en el hidrogel, se producía a la vez un aumento de G' . El análisis estadístico de los valores medios de G' (obtenidos a 1% de deformación y frecuencia de 1 Hz) indica que existen diferencias significativas entre los tres ratios, con un valor $***p < 0.001$ (resultados detallados recogidos en ANEXO XIIa – Tabla 6). Por otro lado, se vio que solamente el ratio 1:0.5 tenía valores de G' similares a los del tejido natural (Agarwal y otros, 2019), (Li y otros, 2021). No obstante, cabe recordar que una simulación de condiciones fisiológicas más precisa se da en los hidrogeles hinchados, donde tiende a disminuir el módulo elástico, por lo que para la selección del ratio óptimo nos fijaremos en los resultados obtenidos en el apartado 6.1.5.

6.1.4. Propiedades mecánicas de los hidrogeles con células encapsuladas

A continuación, se midieron hidrogeles con células de la línea HepG2 en el reómetro, con el fin de evaluar el efecto de dicha encapsulación en las propiedades mecánicas del material. El análisis de los datos se llevó a cabo de la misma manera que el apartado anterior. En las Figuras 14, 15 y 16 se puede observar que los resultados de las curvas de reología se asemejaron en gran medida a los obtenidos anteriormente sin células, y tan solo se apreciaron diferencias significativas en el caso del ratio 1:1, como se puede ver en la Figura 17 (resultados detallados recogidos en ANEXO XIIa – Tabla 7).

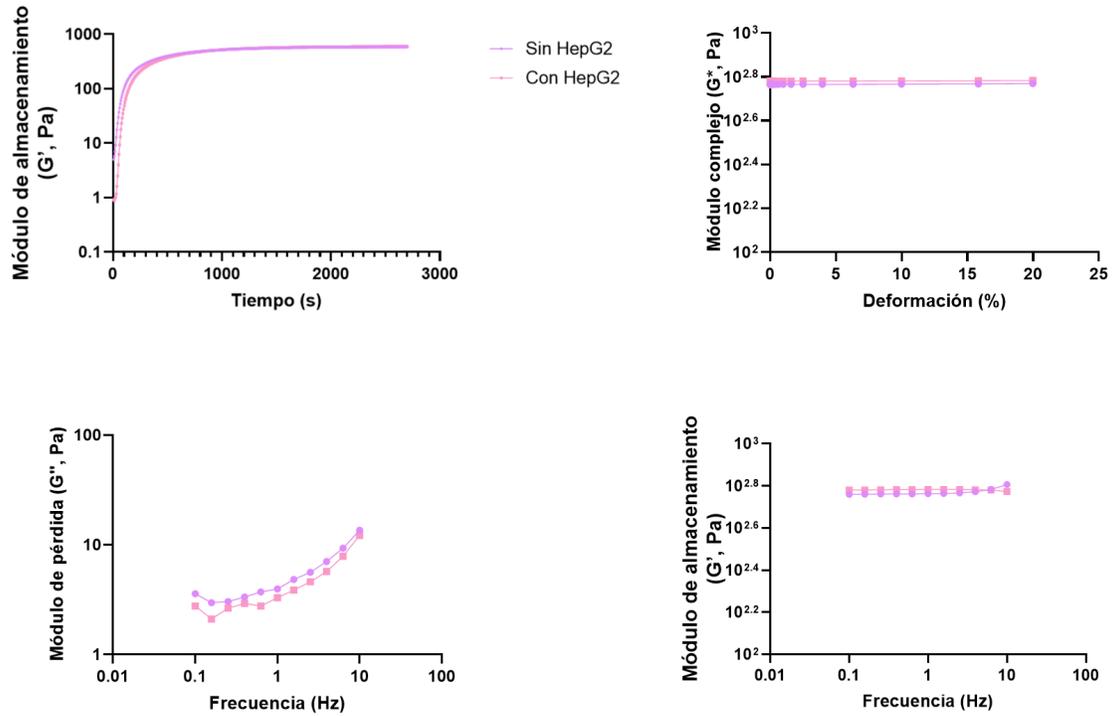


Figura 14. Curvas de reología obtenidas para el ratio 1:0.5 sin células y con células HepG2 encapsuladas. Se presentan las mismas curvas que en la serie de curvas de reómetro de las muestras sin HepG2 (Figura 12). Las curvas se prepararon empleando 4 réplicas sin células y 2 réplicas con células HepG2 encapsuladas.

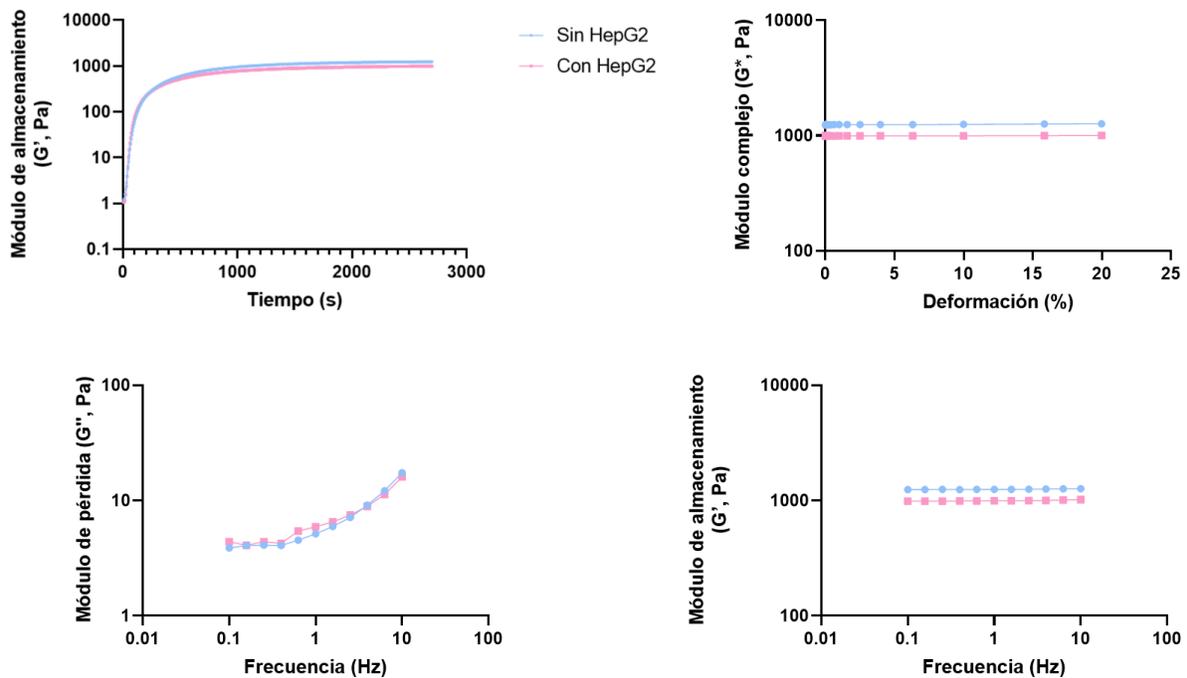


Figura 15. Curvas de reología obtenidas para el ratio 1:0.75 sin células y con células HepG2 encapsuladas. Se presentan las mismas curvas que en la serie de curvas de reómetro de las muestras sin HepG2 (Figura 12). Las curvas se prepararon empleando 5 réplicas sin células y 3 réplicas con células HepG2 encapsuladas.

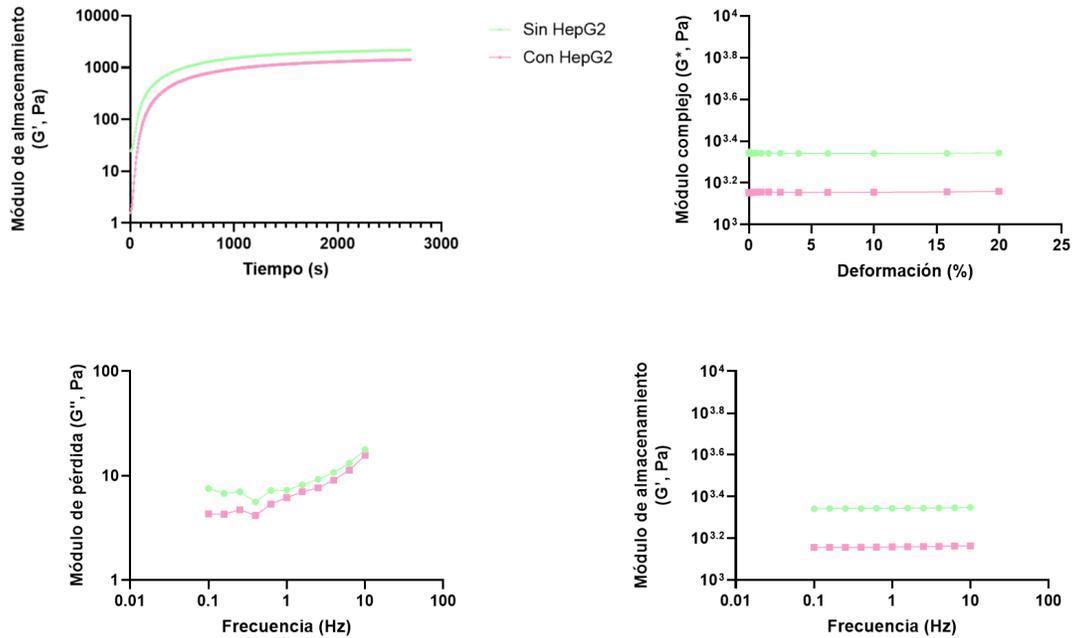


Figura 16. Curvas de reología obtenidas para el ratio 1:1 sin células y con células HepG2 encapsuladas. Se presentan las mismas curvas que en la serie de curvas de reómetro de las muestras sin HepG2 (Figura 12). Las curvas se prepararon empleando 5 réplicas sin células y 3 réplicas con células HepG2 encapsuladas.

Sin embargo, se observó aun así una ligera disminución de los valores de G' , G'' y G^* en los ratios 1:1 y 1:0.75 con HepG2 encapsuladas, pasando la característica de interés, el G' , a ser 1442 ± 362 Pa en el ratio 1:1, 1031 ± 289 Pa en el ratio 1:0.75. Esto se debió probablemente a que la presencia de las células en el momento de la formación del hidrogel dificultó el entrecruzamiento del mismo, lo cual resultó en una menor densidad de entrecruzamiento y, por tanto, en una disminución de las propiedades mecánicas, resultado ya observado en estudios previos (Krishnamoorthy y otros, 2019). Sin embargo, hubo un ligero aumento de G' para el ratio 1:0.5, que pasó a ser 606 ± 197 Pa frente a los 507 ± 144 Pa sin células, pero esta diferencia no resultó significativa según el análisis estadístico realizado y probablemente se debiera a variaciones entre réplicas de hidrogel.

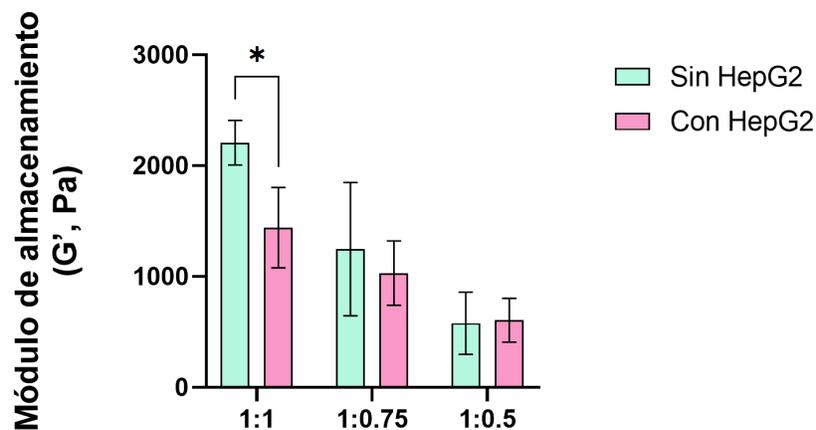


Figura 17. Estadística de los valores obtenidos para el G' frente a frecuencia (Hz). Se muestra el promedio de 5, 4 y 3 réplicas de los ratios sin HepG2 y de 3, 3 y 2 réplicas para los ratios con HepG2 encapsuladas. Significancia estadística: * $p < 0.05$. ANOVA de 2 factores y test de Sidak.

6.1.5. Hidrogeles gelificados frente a hinchados

Por último, se realizaron medidas de reómetro para evaluar las propiedades mecánicas de los hidrogeles gelificados e hinchados de los tres ratios (Figuras 18 y 19). Se observó que G' aumentó, tanto en los hidrogeles gelificados como en los hinchados, conforme aumentó el ratio de PEG. Los resultados del análisis estadístico (Figura 20) (resultados detallados recogidos en ANEXO XIIb – Tabla 8) mostraron diferencias significativas tanto intragrupo como intergrupo, exceptuando el caso del ratio 1:1 y la comparación entre los hidrogeles gelificados de ratio 1:1 y 1:0.75, donde no hubo diferencias significativas en los valores de G' . Este resultado se pudo explicar, de manera similar a la que se comentó en el caso de la gelificación *in situ*, por el aumento del ratio de Gel-PEG, puesto que aumentó el grado de entrecruzamiento del material, adjudicándole mayor propiedad mecánica. Por otro lado, dentro de cada ratio, el valor del G' fue menor para los hidrogeles hinchados que para los gelificados. Esto se debe al hinchado del hidrogel, que suele mostrar valores de G' menores bajo la misma deformación.

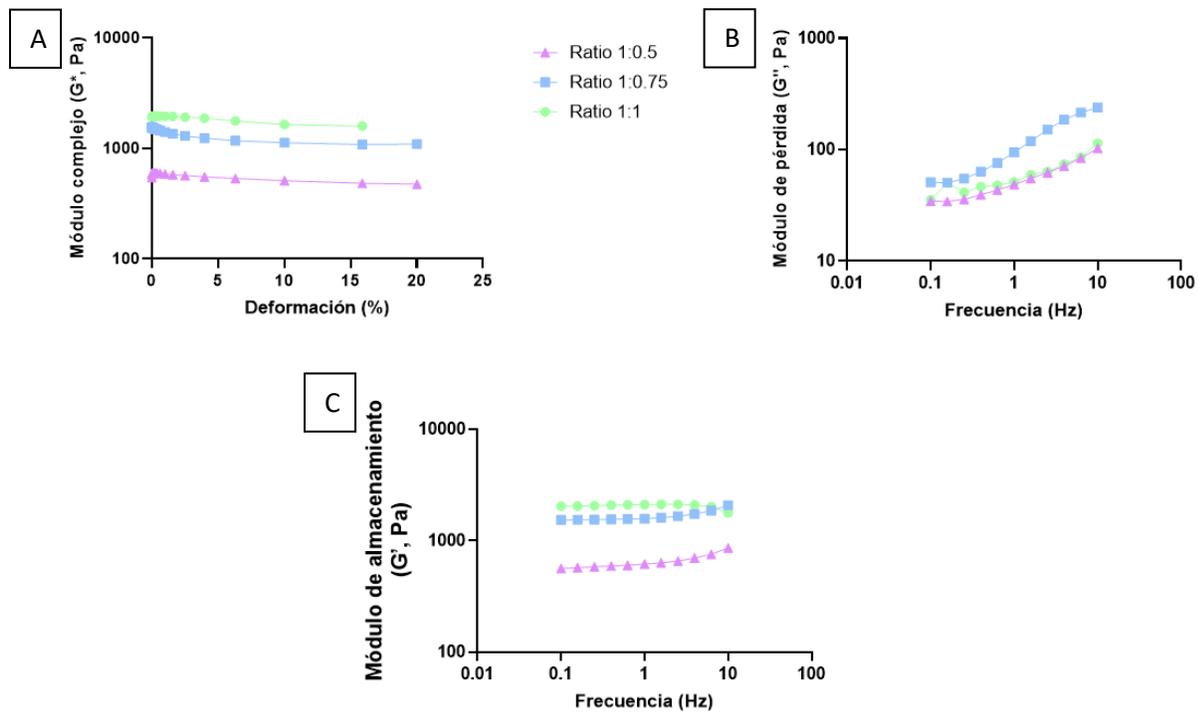


Figura 18. Curvas de reología de hidrogeles gelificados. A) Curva de G^* frente a deformación; B) Curva de G'' frente a frecuencia; C) Curva de G' frente a frecuencia. Se emplearon 5 réplicas para el ratio Gel-PEG 1:1, 3 réplicas para el ratio 1:0.75 y 4 réplicas para el ratio 1:0.5.

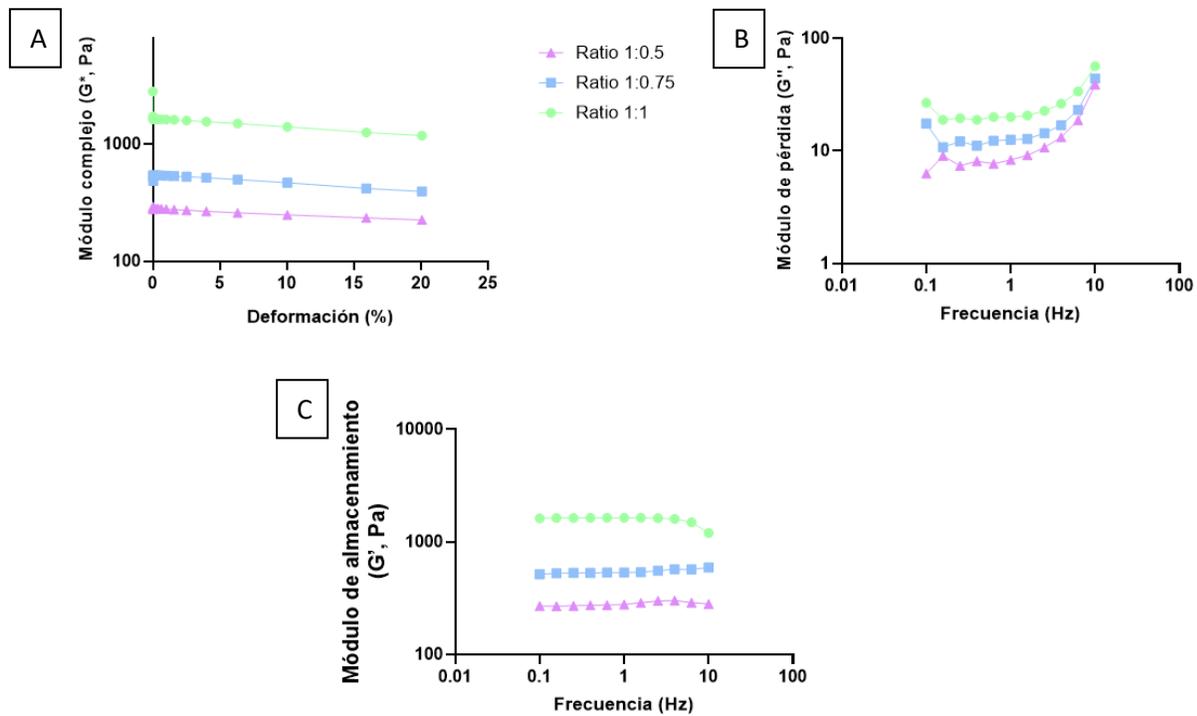


Figura 19. Curvas de reología de los hidrogeles hinchados. A) Curva de G^* frente a deformación; B) Curva de G'' frente a frecuencia; C) Curva de G' frente a frecuencia. Se emplearon 5 réplicas para el ratio Gel-PEG 1:1, 3 réplicas para el ratio 1:0.75 y 4 réplicas para el ratio 1:0.5.

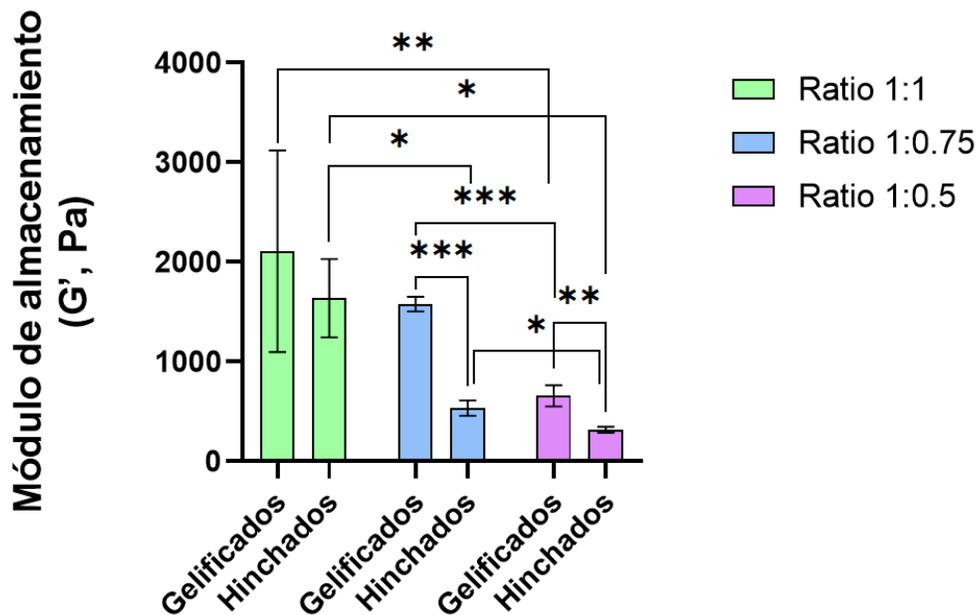


Figura 20. Gráfica del análisis estadístico del G' frente a frecuencia de los hidrogeles gelificados e hinchados de los tres ratios. Se emplearon 5 réplicas de ratio 1:1 y 3 réplicas para los ratios 1:0.75 y 1:0.5. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Pruebas intragrupo: test no paramétrico de Mann-Whitney (ratio 1:1) y T-test no emparejado. Pruebas intergrupos: prueba de Kruskal-Wallis y test de Dunn y T-test no emparejado (ratio 1:0.75 frente a 1:0.5).

6.2. VIABILIDAD CELULAR

A continuación, para completar los estudios con células se analizaron los resultados de los ensayos de viabilidad celular. Se presentan las imágenes de LIVE-DEAD (Figura 21) y la estadística que se obtuvo con los resultados numéricos del ensayo (Figura 22).

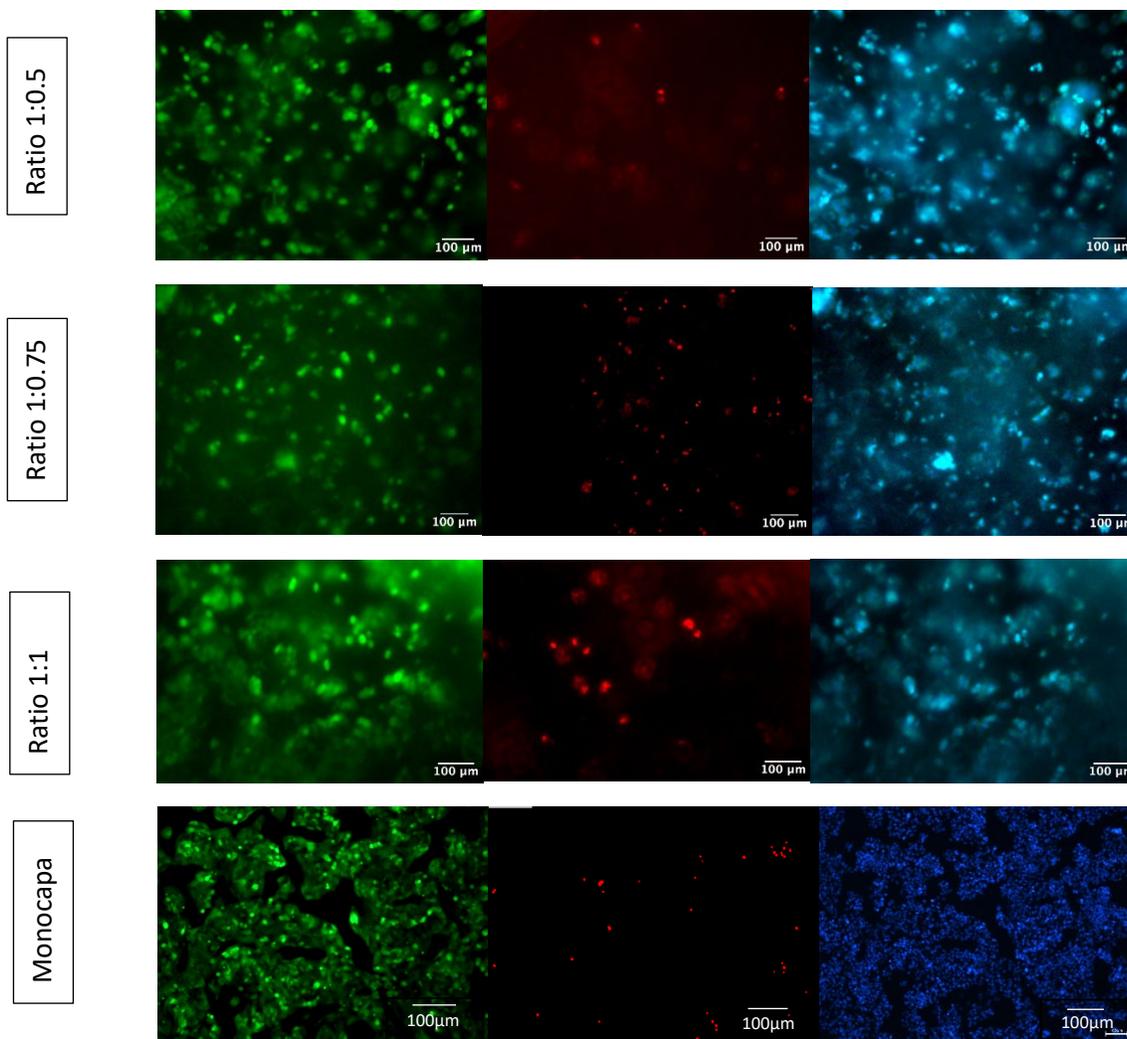


Figura 21. Imágenes de microscopía de los ensayos LIVE-DEAD de hidrogeles Gel-PEG con células HepG2 encapsuladas tras dos días de cultivo. Se emplearon 200.00 células en todas las condiciones. Se marcaron: células vivas con calceína AM (verde), células muertas con homodímero de etidio (rojo) y núcleos celulares con Hoechst (azul). La escala fueron 100 µm.

Se comprobó, por un lado, que el porcentaje de supervivencia de las células fue superior al 85% en todas las estructuras analizadas ($87 \pm 2\%$ para el ratio 1:1, $86 \pm 4\%$ para el ratio 1:0.75, $89 \pm 1\%$ para el ratio 1:0.5 y $97 \pm 1\%$ para el cultivo en monocapa), que es el umbral de viabilidad celular óptima establecido en la bibliografía (ResearchGate, n.d.), (ISO, n.d.). Los resultados observados en la Figura 21 para los hidrogeles fueron similares a los observados en el grupo control (monocapa). Por otro lado, el análisis estadístico (resultados detallados recogidos en ANEXO XIIf – Tabla 12) tampoco mostró diferencias significativas de la viabilidad en cultivos 3D con el cultivo empleado como control. Resultados similares se encontraron también en los estudios (Fu y otros, 2012), (Mazzocchi y otros, 2018). Por tanto, se puede asumir que la viabilidad celular de las tres composiciones es óptima.

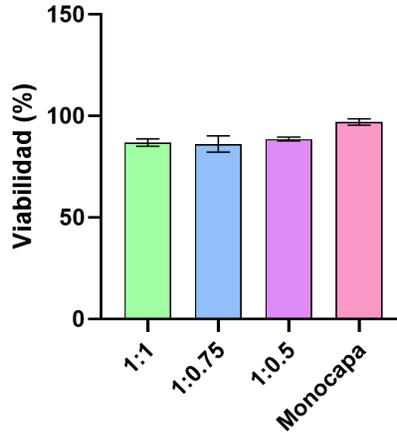


Figura 22. Gráfica del análisis estadístico de los resultados de viabilidad celular tras 2 días de cultivo. Se emplearon 2 réplicas para el ratio 1:1, 3 réplicas para el ratio 1:0.75, 5 réplicas para el ratio 1:0.5 y 4 réplicas para el cultivo en monocapa. No se encontraron diferencias significativas. Prueba de Kruskal-Wallis y test de Dunn.

Nota: el cálculo de la viabilidad celular, así como las imágenes de microscopía, fueron realizados y cedidos para completar este TFG por Estela Sánchez González.

6.3. CONTENIDO DE AGUA EN EQUILIBRIO DE HIDROGELES GEL-PEG SIN FN

Tras el análisis de las propiedades mecánicas, se procedió a la evaluación de los resultados del EWC en hidrogeles de los tres ratios sin FN en un *buffer* fisiológico, con el objetivo de determinar el agua retenida por los hidrogeles tras gelificar y el grado de absorción de agua en la red hasta llegar al equilibrio y por tanto, determinar el nivel de hidrofiliicidad de los hidrogeles. Estos resultados influyeron, como se verá en el apartado 6.8, en los niveles de liberación del HGF.

Los valores de las medias con sus desviaciones típicas obtenidos de cantidad de agua por unidad de masa de polímero seco en hidrogeles gelificados fueron: 13.8 ± 0.7 para el ratio Gel-PEG 1:1, 20 ± 2 para el ratio 1:0.75 y 21 ± 2 para el ratio 1:0.5. Por otro lado, las mismas medidas de cantidad de agua en equilibrio fueron de 19.3 ± 0.6 para el ratio Gel-PEG 1:1, 30 ± 4 para el ratio 1:0.75 y 37 ± 3 para el ratio 1:0.5. Por tanto, se observó que al aumentar el ratio de Gel-PEG, disminuía ligeramente la capacidad del hidrogel de absorber agua del estado gelificado al de hinchado; y a su vez, el EWC demostró una mayor hidrofiliicidad en los hidrogeles de menor ratio. Esto puede ser debido a que, al aumentar el grado de entrecruzamiento conforme aumentó el ratio de Gel-PEG en los hidrogeles, se obtuvo una red de polímero entrecruzado cada vez más densa y de un tamaño de red más pequeño, y por tanto era más complicado que el agua penetrara en el interior del hidrogel (Echalier y otros, n.d.), (Gong y otros, 2014). Unos resultados similares a los valores del EWC de los hidrogeles de ratios 1:0.75 y 1:0.5 se encontraron en el estudio (Mattei y otros, 2018), donde se obtuvo un EWC de 17.8 ± 0.98 ; la ligera disminución de valores se pudo deber a que el material a base de matriz extracelular descelularizada empleado en el caso del estudio tuviera un grado de entrecruzamiento de la red superior a los hidrogeles utilizados en el presente TFG. El análisis estadístico (gráfica en la Figura 23) (cálculos detallados recogidos en ANEXO) mostró que las diferencias de valores eran significativas entre los ratios 1:1-1:0.5 y 1:0.75-1:0.5, siendo la diferencia entre los ratios 1:0.75 y 1:1 con el ratio 1:0.5 mayor que entre 1:1 y 1:0.75, lo cual fue coherente con los resultados numéricos obtenidos como promedio de las réplicas.

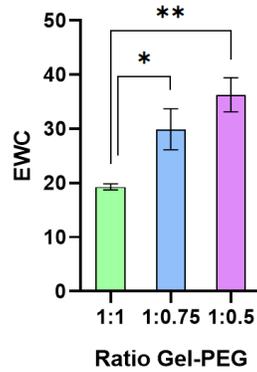


Figura 23. Gráfica del análisis estadístico obtenido para los resultados del EWC de los ratios Gel-PEG sin FN. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Los resultados se obtuvieron empleando 6 réplicas para los ratios Gel-PEG 1:1 y 1:0.75 y 5 réplicas para el ratio 1:0.5. Prueba de Kruskal-Wallis y test de Dunn, T-test no emparejado (para la comparación de los ratios 1:0.75 y 1:0.5).

Finalmente, se procedió a la selección del ratio de trabajo para los experimentos de liberación de la FN y del HGF. En vista de los resultados obtenidos, se eligió el ratio de Gel-PEG 1:0.75 con una media de $G' de 535 \pm 77 Pa$ en el estado de hinchado (ya que el estado hinchado simula mejor el entorno *in vivo*). Esta decisión se apoyó en el valor de módulo elástico de entre 400-600 Pa que se conoce de la ECM biológica alrededor de los hepatocitos (Agarwal y otros, 2019), (Li y otros, 2021) tal y como se vio en el apartado de Introducción. Además, el tiempo de gelificación de los hidrogeles de este ratio también resultó ser el óptimo en comparación con los obtenidos para los otros ratios.

6.4. DESNATURALIZACIÓN DE FN

Antes de proceder con el análisis de los resultados de la liberación de la FN, se comprobó mediante electroforesis de proteínas que la desnaturalización se había realizado con éxito. Como se observa en la Figura 24, los pesos moleculares de las muestras fueron los esperados y coincidieron con los valores ya mencionados en la Introducción. En concreto, la FN control se queda por encima de los 250 kDa ya que pesa 440kDa, mientras que las muestras de la FN_m se encuentran cerca de 250 kDa, confirmando que la FN se ha desnaturalizado y su peso es aproximadamente la mitad (Dubey y Mequanint, 2011).

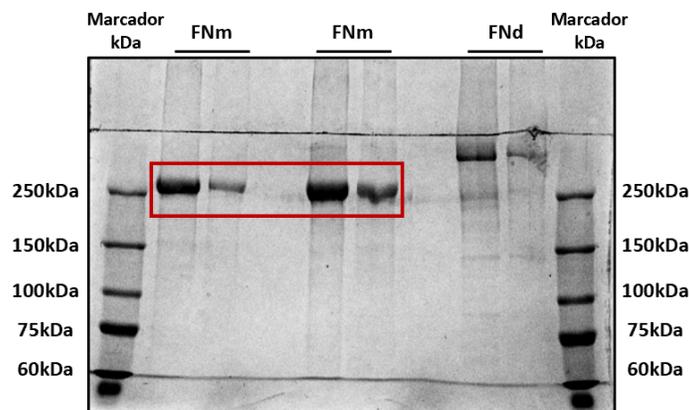


Figura 24. Imagen de la electroforesis SDS-PAGE realizada para la FN_d (FNcontrol en la imagen) y la FN_m, con un marcador de pesos moleculares en los pocillos de los extremos.

6.5. LIBERACIÓN DE FN_d Y FN_m

A continuación, se analizaron los resultados obtenidos de la liberación de FN en hidrogeles de ratio Gel-PEG 1:0.75 para determinar si, tal y como establecieron Salmerón-Sánchez y otros (2016), era más efectivo el uso de la FN_m para la fabricación de *scaffolds*. En primer lugar, se prepararon las curvas patrón para las dos proteínas marcadas, así como la curva del kit ELISA, asegurando que los valores máximos de concentración de proteína liberada se encontraban por debajo del máximo de concentración de su respectiva curva patrón. La representación gráfica del resultado se puede ver en la Figura 25. Para detalles de cálculo consultar ANEXO V.

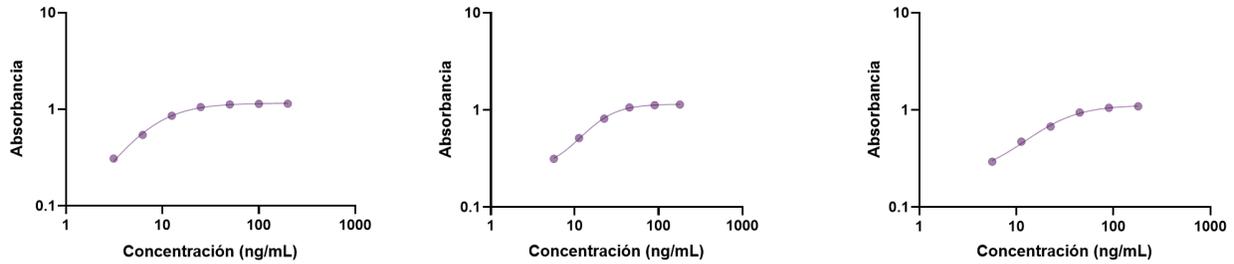


Figura 25. Curvas patrón del kit ELISA (izq.), de la FN_d (centro) y de la FN_m (dcha.). Ajuste sigmoideal de 4 parámetros.

A partir de los datos de las curvas patrón se pudo calcular el porcentaje de FN_d y FN_m retenida en el hidrogel. Como se observa en la Figura 26, aunque ambas proteínas mostraron unos porcentajes elevados de ser retenidas en el hidrogel, en el caso de la FN_m este valor es significativamente mayor que el de la FN_d (resultados detallados en ANEXO XIIId). Esto coincide con lo afirmado por Salmerón-Sánchez y otros (2016), que supone que la FN_m al ser desnaturizada expone más sus dominios de unión a la Gel, por lo que el resultado fue el esperado y los experimentos posteriores se llevaron a cabo con la FN_m.

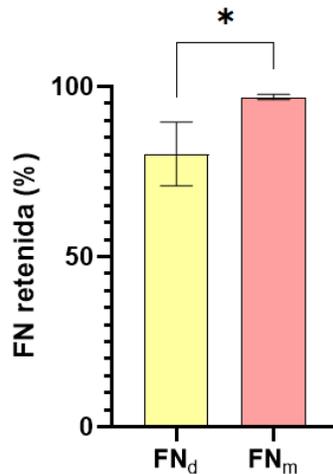


Figura 26. Resultados de la estadística de la liberación de la FN_d frente a la FN_m. Se emplearon 4 réplicas para la FN_d y 3 réplicas para la FN_m. Significancia estadística: * $p < 0.05$. T-test no emparejado.

6.6. HIDROGELES GELIFICADOS E HINCHADOS CON FN FRENTE A HIDROGELES GEL-PEG SIN FN

Una vez seleccionada la proteína a utilizar, se procedió a comparar las propiedades mecánicas de los hidrogeles gelificados e hinchados sin FN frente a los hidrogeles con FN, siempre con el ratio Gel-PEG 1:0.75. Se comparó el G' frente a frecuencia de 1Hz y a 1% de deformación y se obtuvieron los resultados que se pueden observar en la gráfica de la Figura 27 (resultados detallados recogidos en ANEXO XIIb – Tabla 8). Se vio que, en el caso de los hidrogeles gelificados, la diferencia es altamente significativa, siendo el valor del G' menor. Sin embargo, en el estado hinchado apenas se presentan diferencias entre los valores de G' , y no son estadísticamente significativos. Esto pudo deberse a que en el caso de la gelificación con FN se diese una situación similar a la que se vio en los hidrogeles con las células encapsuladas, pues la proteína dificultó el entrecruzamiento del hidrogel; mientras que en el caso de los hinchados el G' es incluso ligeramente superior en hidrogeles con FN, lo cual probablemente sea debido al menor grado de hinchado que se demuestra en el siguiente apartado.

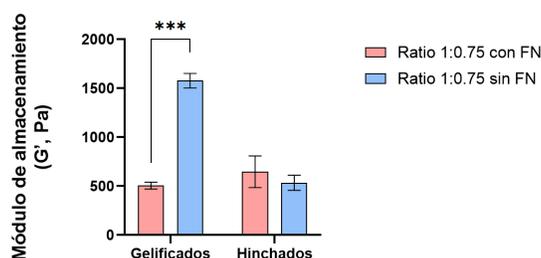


Figura 27. Resultados de la estadística de los hidrogeles gelificados e hinchados de ratio Gel-PEG 1:0.75 con FN frente a los mismos sin FN. Se emplearon 3 réplicas de cada composición. Significancia estadística: *** $p < 0.001$. ANOVA de 2 factores y test de Sidak.

Finalmente, observando los resultados numéricos se vio que los hidrogeles con FN_m mantienen el módulo elástico cercano al de la ECM biológica alrededor de los hepatocitos (entre 400-600 Pa, (Agarwal y otros, 2019), (Li y otros, 2021)), por lo que es adecuado el uso del material con FN_m para los experimentos posteriores.

6.7. CONTENIDO DE AGUA EN EQUILIBRIO EN HIDROGELES GEL-PEG CON FN FRENTE A HIDROGELES GEL-PEG SIN FN

Una vez obtenidos los resultados del EWC para los hidrogeles con FN_m incorporada, se procedió a su análisis y a la comparación de los mismos con los obtenidos para los hidrogeles sin FN. Se obtuvieron los siguientes valores de cantidad de agua por unidad de masa de polímero seco en los hidrogeles gelificados: 16.6 ± 0.5 para los hidrogeles con FN_m y 20 ± 2 para los hidrogeles sin FN. Los valores de EWC obtenidos fueron 24.9 ± 0.3 para los hidrogeles con FN_m y 30 ± 4 para aquellos sin FN. Se observó, por tanto, que el aumento del contenido en agua de gelificados a hinchados en ambas composiciones es similar en cuanto a proporción, lo cual era de esperar puesto que en ambos hidrogeles se mantuvo el mismo ratio Gel-PEG. Por otro lado, la ligera disminución en los valores de los hidrogeles con FN_m en ambos estados se pudo deber, al igual que ocurrió en el análisis de los hidrogeles gelificados e hinchados, a la presencia de la FN_m en la red: en los hidrogeles recién gelificados, en el mismo volumen que para los hidrogeles sin FN se tuvo la Gel con la FN_m, la cual mayor grado de entrecruzamiento en la red (pues la FN también puede

entrecruzar con el PEG) y menor grado de hinchado, disminuyendo los valores de EWC. El análisis estadístico (Figura 28) (resultados detallados recogidos en ANEXO XIc – Tabla 9), no obstante, estableció que las diferencias observadas no eran significativas, por lo que la disminución de hidrofiliidad en el hidrogel con FN_m no se consideró crítica. Además, estos resultados también son similares a los ya mencionados obtenidos en (Mattei y otros, 2018). No obstante, esta disminución sí influyo, aunque no significativamente, en los niveles de liberación del HGF (Apartado 6.8).

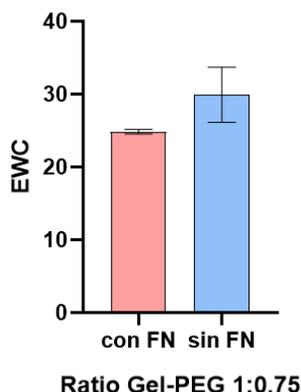


Figura 28. Gráfica de la estadística obtenida de los resultados del EWC de hidrogeles Gel-PEG 1:0.75 con y sin FN. Se obtuvo empleando 6 réplicas para el ratio sin FN y 3 réplicas para el ratio con FN_m. No se encontraron diferencias significativas. T-test no emparejado.

6.8. LIBERACIÓN DE FACTOR DE CRECIMIENTO

Tras establecer que el hidrogel con FN_m incorporada muestra propiedades similares a hidrogeles sin FN, se procedió a la incorporación del HGF. Primeramente, se calculó la curva patrón del HGF marcado con DyLight-488 en el medio de sobrenadante utilizado, DPBS, asegurando que la concentración máxima posible de HGF liberado estuviera por debajo del valor máximo de concentración en la curva patrón. La representación gráfica del resultado se puede observar en la Figura 29. Los cálculos detallados se recogen en el ANEXO X.

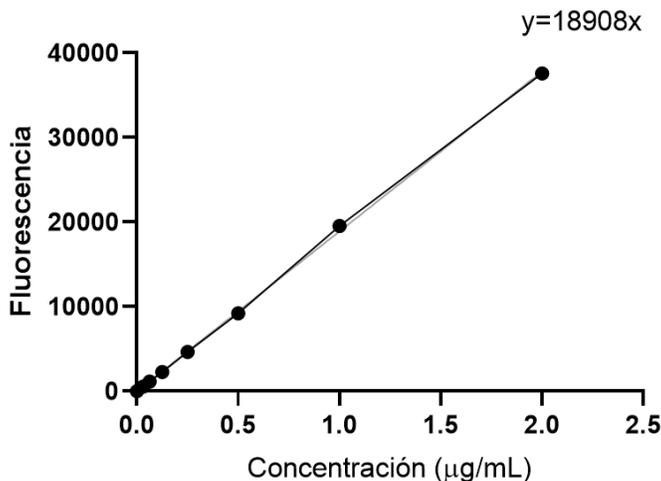


Figura 29. Curva patrón del HGF marcado con DyLight-488. Valor de $R^2 = 0.9997$.

En los ensayos de liberación se incluyeron réplicas de hidrogeles sin FN, con FN_m y también con FN_d para comprobar si la desnaturalización tiene efecto en la retención del factor. Se empleó la misma curva patrón y los resultados obtenidos a partir de ésta se recogen en la Figura 30. Dichos resultados de los experimentos de liberación mostraron un porcentaje de retención de HGF muy similar para las tres composiciones de hidrogel (con FN_d, con FN_m y sin FN), como se puede observar en la Figura 16 (dcha.). El análisis estadístico (resultados detallados recogidos en ANEXO XIIe – Tabla 11) no señaló diferencias significativas entre los valores, aunque se pudo observar que se retiene una cantidad ligeramente mayor de HGF en el caso de los hidrogeles con FN_m. Esta pequeña diferencia fue coherente con lo afirmado por (Salmerón-Sánchez y otros, 2016) y su recomendación del uso de la FN_m para la fabricación de *scaffolds*, aunque no fue significativa estadísticamente. Además, atendiendo a los resultados obtenidos de EWC, los hidrogeles con FN_m al tener una cantidad menor de agua retenida en equilibrio y por tanto, una menor difusión de líquido a través de la red, también tuvieron un grado menor de difusión de HGF desde el hidrogel hacia el sobrenadante, por lo que mostraron unos porcentajes de retención de HGF ligeramente mayores que en el caso de los hidrogeles sin FN.

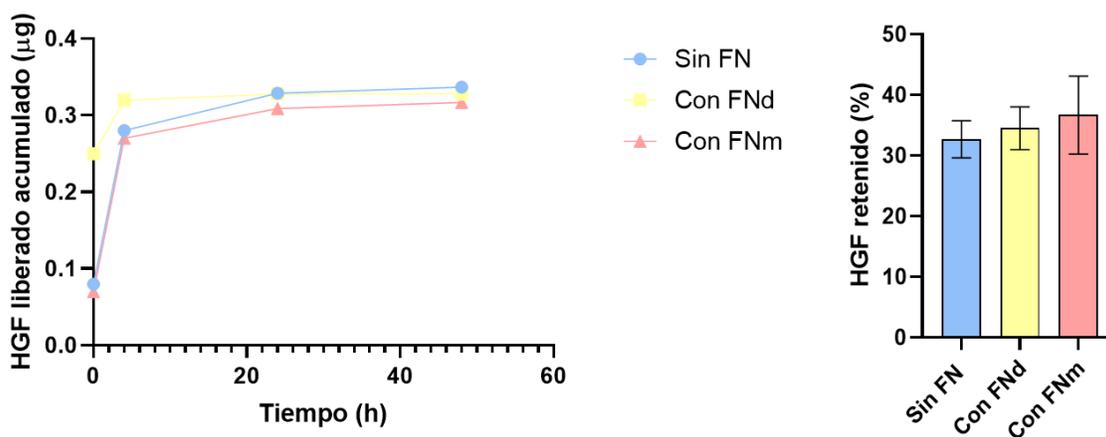


Figura 30. Resultados del ensayo de liberación de HGF. Curva de liberación acumulada (izq.) y gráfica del análisis estadístico del porcentaje de HGF retenido tras 48 horas en DPBS (dcha.). Se emplearon 3 réplicas para los hidrogeles sin FN y con FN_m y 2 réplicas para aquellos con FN_d. No se encontraron diferencias significativas. ANOVA de un factor y test de Holm-Sidak.

Por otro lado, lo esperado y lo que se encontró en resultados de estudios similares (Trujillo y otros, 2020) era que la diferencia entre hidrogeles con y sin FN fuera mayor (habiendo un porcentaje de HGF significativamente mayor retenido en los hidrogeles con FN). En el estudio mencionado la diferencia fue prácticamente del doble, de un 30% a aproximadamente un 60% de retención. No obstante, cabe la posibilidad de que, en el caso de este TFG, se obtuvieran resultados distintos debido a la retención física del HGF en la red polimérica de Gel-PEG aún sin presencia de FN, aunque no se pudo encontrar estudios con resultados similares.

En la Figura 30(izq.) se presenta la curva de liberación acumulada. En ésta, se comprobó que en los hidrogeles con FN_d se producía la mayor liberación inmediatamente tras la gelificación. Esto se pudo deber a que, en dicha composición de hidrogeles, la FN_d ocupó físicamente gran parte del espacio en la red de Gel-PEG, de modo que el 50% del HGF se expulsó de la misma a tiempo 0, inmediatamente al formarse el hidrogel. Además, como bien se indica en (Salmerón-Sánchez y otros, 2016) los dominios de la FN_d se encontraban menos expuestos que en el caso de la FN_m, dificultando más todavía su interacción con el HGF.

Finalmente, se observó que el porcentaje de HGF medio retenido en los hidrogeles con FN_m fue del 36.6%. Este valor pareció significativamente menor en comparación con el resultado obtenido en (Trujillo y otros, 2020), donde se retuvo hasta aproximadamente un 45% de VEGF en el hidrogel con FN. Sin embargo, si se tuviera en cuenta el hecho de que en varios estudios (Choi y otros, 2020), (Ammar y otros, 2018) se utilizó una dosis ultrabaja de HGF, del orden de nanogramos, el resultado obtenido en este TFG no carece de lógica, puesto que, al trabajar con una cantidad de HGF mayor, del orden de microgramos (Figura 16(izq.)), se deduce que se retuvo la cantidad de HGF suficiente.

Nota: en todo el análisis debe tenerse en cuenta el posible error de pipeteo por el calibrado volumétrico de las pipetas y por la cantidad de material que permaneció adherida a la punta de la misma.

7. CONCLUSIONES

En primer lugar, se consiguió determinar la composición de hidrogel de Gel-PEG óptima que mimetice lo mejor posible las características mecánicas de la ECM hepática. Se seleccionó el ratio 1:0.75 debido a que su módulo elástico a cizalla no varió significativamente al tener células encapsuladas, se vio buena viabilidad celular y, en estado de hinchado, mostró las propiedades mecánicas cercanas a las de la ECM natural. Además, dichas propiedades son estables, pues no variaron con la adición de la FN a la composición del hidrogel.

Por otra parte, los ensayos de liberación de la FN_d y FN_m confirmaron lo expuesto en la teoría (Salmerón-Sánchez y otros, 2016), en la que se recomienda el uso de la FN_m para la fabricación de *scaffolds in vitro* en vista de su mayor exposición de dominios de unión a la matriz del hidrogel, lo cual supone un mayor grado de retención de la proteína en el mismo.

Finalmente, los resultados de liberación del HGF no fueron los esperados según lo expuesto en experimentos previos en la teoría (Trujillo y otros, 2020), (Choi y otros, 2020), puesto que no se detectaron diferencias significativas entre el porcentaje de liberación de HGF en hidrogeles sin FN, con FN_d y con FN_m. A pesar de no haber encontrado constancia de resultados similares en estudios previos, se supuso que se debía a la retención física del HGF en la red de Gel-PEG. Además, se vio que, en los hidrogeles con FN, se retenía un menor porcentaje de HGF que el obtenido en la teoría (Trujillo y otros, 2020), (Choi y otros, 2020). No obstante, se consideró que la cantidad retenida era suficiente para mantener la funcionalidad del scaffold al ser la concentración usada en el presente TFG del orden de microgramos, mientras que en los estudios vistos se trata de concentraciones del orden de nanogramos las que permanecen retenidas en el hidrogel.

En conclusión, los resultados obtenidos han contribuido al desarrollo de hidrogeles de Gel-PEG como plataformas para ingeniería tisular del hígado y pueden ser de utilidad para estudios futuros. Por una parte, se consiguió determinar la proporción óptima de Gel-PEG (ratio 1:0.75) a utilizar para hidrogeles compuestos por estos materiales. Por otra parte, se confirmó la recomendación de uso de la FN_m, ya que el hidrogel presenta un grado de retención significativamente mayor de la misma. Por último, a pesar de no haber obtenido los resultados esperados en cuanto a liberación de HGF, se espera que en futuros estudios se realice el experimento con el mismo protocolo, pero disminuyendo la cantidad de HGF usado al orden de nanogramos, para ver si se obtienen unos porcentajes de retención mayores en hidrogeles con FN y para evaluar si se confirma el fenómeno de retención física del HGF en la red de Gel-PEG. Además, de cara al futuro también se pueden realizar estudios de funcionalidad celular y expresión génica con células hepáticas encapsuladas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Abdel-Misih, S. R. Z., Bloomston, M., & Bismuth, H. (2010). *Liver Anatomy*. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>
- [2] Sibulesky, L. (n.d.). *Normal liver anatomy*. <https://doi.org/10.1002/cld.124>
- [3] Carotti, S., Morini, S., Carpino, G., & Gaudio, E. (2020). *Liver Histology*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24432-3_2
- [4] Nagy, P., Thorgeirsson, S. S., & Grisham, J. W. (2020). Organizational Principles of the Liver. *The Liver*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/9781119436812.CH1>
- [5] Guo Chen, & Andre F. Palmer. (2010). *O₂ Carrier Facilitated O₂ Transport in a Hepatic Hollow Fiber Bioreactor* [The Ohio State University]. https://www.researchgate.net/publication/267837256_O_2_Carrier_Facilitated_O_2_Transport_in_a_Hepatic_Hollow_Fiber_Bioreactor
- [6] Lee, P., Allen, M., & Hung, P. (2013). Microfluidic Hepatotoxicity Platform. *Microfluidic Cell Culture Systems*, 341–355. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3459-1.00014-4>
- [7] Lu, S., Zhang, J., Lin, S., Zheng, D., Shen, Y., Qin, J., Li, Y., & Wang, S. (2021). Recent advances in the development of in vitro liver models for hepatotoxicity testing. *Bio-Design and Manufacturing 2021 4:4*, 4(4), 717–734. <https://doi.org/10.1007/S42242-021-00142-7>
- [8] Tabernilla, A., Rodrigues, B. D. S., Pieters, A., Caufriez, A., Leroy, K., Campenhout, R. Van, Cooreman, A., Gomes, A. R., Arnesdotter, E., Gijbels, E., & Vinken, M. (2021). In vitro liver toxicity testing of chemicals: A pragmatic approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22095038>
- [9] Feher, J. (2017). Pancreatic and Biliary Secretion. *Quantitative Human Physiology*, 810–820. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800883-6.00080-X>
- [10] Krebs, N. J., Neville, C., & Vacanti, J. P. (2007). Cellular Transplants for Liver Diseases. *Cellular Transplantation*, 215–240. <https://doi.org/10.1016/B978-012369415-7/50013-2>
- [11] Zhou, Z., Xu, M. J., & Gao, B. (2015). Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular & Molecular Immunology 2016 13(3)*, 301–315. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.97>
- [12] Martinez-Hernandez, A., & Amenta, P. S. (1993). The hepatic extracellular matrix. *Virchows Archiv A 1993 423(2)*, 77–84. <https://doi.org/10.1007/BF01606580>
- [13] Sawicka, K. M., Seeliger, M., Musaev, T., Macri, L. K., & Clark, R. A. (2015). Fibronectin Interaction and Enhancement of Growth Factors: Importance for Wound Healing. *Advances in wound care*, 4(8), 469–478. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0616>
- [14] Agarwal, Tarun & Subramanian, Bhuvaneshwaran & Maiti, Tapas. (2019). Liver Tissue Engineering: Challenges and Opportunities. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 10.1021/acsbomaterials.9b00745.

- [15] Li, W., Li, P., Li, N., Du, Y., Lü, S., Elad, D., & Long, M. (2021). Matrix stiffness and shear stresses modulate hepatocyte functions in a fibrotic liver sinusoidal model. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 320(3), G272–G282. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00379.2019/ASSET/IMAGES/LARGE/AJ-AGIP200058F005.JPEG>
- [16] Serras, A. S., Rodrigues, J. S., Cipriano, M., Rodrigues, A. V., Oliveira, N. G., & Miranda, J. P. (2021). A Critical Perspective on 3D Liver Models for Drug Metabolism and Toxicology Studies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 203. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.626805/BIBTEX>
- [17] Sainz-Arnal, P., Pla-Palacín, I., Sánchez-Romero, N., Almeida, M., Morini, S., Solanas, E., Lue, A., Serrano-Aulló, T., & Baptista, P. M. (2019). Bioengineering of Liver Tissue. *Principles of Regenerative Medicine*, 1101–1113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00062-X>
- [18] Norman, B. H. (2020). Drug Induced Liver Injury (DILI). Mechanisms and Medicinal Chemistry Avoidance/Mitigation Strategies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(20), 11397–11419. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.0C00524/SUPPL_FILE/JMOC00524_SI_001.PDF
- [19] Nanjappan, S., Paul, D., & Bolla, L. (2018). Assessing Herb–Drug Interactions of Herbal Products With Therapeutic Agents for Metabolic Diseases: Analytical and Regulatory Perspectives. *Studies in Natural Products Chemistry*, 59, 283–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00009-8>
- [20] Zhao, Z., Vizetto-Duarte, C., Moay, Z. K., Setyawati, M. I., Rakshit, M., Kathawala, M. H., & Ng, K. W. (2020). Composite Hydrogels in Three-Dimensional in vitro Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 611. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00611/BIBTEX>
- [21] Agarwal, T., Subramanian, B., & Maiti, T. K. (2019). Liver Tissue Engineering: Challenges and Opportunities. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 5(9), 4167–4182. <https://doi.org/10.1021/ACSBIMATERIALS.9B00745>
- [22] Chan, T. S., Yu, H., Moore, A., Khetani, S. R., & Tweedie, D. (2013). Meeting the Challenge of Predicting Hepatic Clearance of Compounds Slowly Metabolized by Cytochrome P450 Using a Novel Hepatocyte Model, HepatoPac. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(12), 2024–2032. <https://doi.org/10.1124/DMD.113.053397>
- [23] Schütte, J., Freudigmann, C., Benz, K., Böttger, J., Gebhardt, R., & Stelzle, M. (2010). A method for patterned in situ biofunctionalization in injection-molded microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 10(19), 2551–2558. <https://doi.org/10.1039/C005307D>
- [24] Baxter, G. T. (2009). Hurel™ - An in vivo-surrogate assay platform for cell-based studies. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 37(SUPPL. 1), 11–18. <https://doi.org/10.1177/026119290903701s01>
- [25] Leite, S. B., Roosens, T., El Taghdouini, A., Mannaerts, I., Smout, A. J., Najimi, M., Sokal, E., Noor, F., Chesne, C., & van Grunsven, L. A. (2016). Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis in vitro. *Biomaterials*, 78, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.11.026>

- [26] Almawash, S., Osman, S. K., Mustafa, G., & El Hamd, M. A. (2022). Current and Future Prospective of Injectable Hydrogels—Design Challenges and Limitations. *Pharmaceuticals*, *15*(3). <https://doi.org/10.3390/ph15030371>
- [27] Jacob, S., Nair, A. B., Shah, J., Sreeharsha, N., Gupta, S., & Shinu, P. (2021). Emerging Role of Hydrogels in Drug Delivery Systems, Tissue Engineering and Wound Management. *Pharmaceutics* *2021*, Page 357, *13*(3), 357. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13030357>
- [28] Dubey, G., & Mequanint, K. (2011). Conjugation of fibronectin onto three-dimensional porous scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, *7*(3), 1114–1125. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.010>
- [29] Hu, X., Xia, Z., & Cai, K. (2022). Recent advances in 3D hydrogel culture systems for mesenchymal stem cell-based therapy and cell behavior regulation. *Journal of Materials Chemistry B*, *10*(10), 1486–1507. <https://doi.org/10.1039/D1TB02537F>
- [30] Vettori, L., Sharma, P., Rnjak-Kovacina, J., & Gentile, C. (2020). 3D Bioprinting of Cardiovascular Tissues for In Vivo and In Vitro Applications Using Hybrid Hydrogels Containing Silk Fibroin: State of the Art and Challenges. *Current Tissue Microenvironment Reports* *2020*, *1*(4), 261–276. <https://doi.org/10.1007/S43152-020-00026-5>
- [31] Cao, H., Duan, L., Zhang, Y., Cao, J., & Zhang, K. (2021). Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity. *Signal Transduction and Targeted Therapy* *2021*, *6*(1), 1–31. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00830-x>
- [32] Yu, L., & Ding, J. (2008). Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society Reviews*, *37*(8), 1473–1481. <https://doi.org/10.1039/B713009K>
- [33] Sarrigiannidis, S. O., Rey, J. M., Dobre, O., González-García, C., Dalby, M. J., & Salmeron-Sanchez, M. (2021). A tough act to follow: collagen hydrogel modifications to improve mechanical and growth factor loading capabilities. *Materials Today Bio*, *10*, 100098. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100098>
- [34] Trujillo, S., Gonzalez-Garcia, C., Rico, P., Reid, A., Windmill, J., Dalby, M. J., & Salmeron-Sanchez, M. (2020). Engineered 3D hydrogels with full-length fibronectin that sequester and present growth factors. *Biomaterials*, *252*, 120104. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120104>
- [35] A., I. M., Kollmetz, T., & Malmström, J. (2018). Engineered systems to study the synergistic signaling between integrin-mediated mechanotransduction and growth factors (Review). *Biointerphases*, *13*(6), 06D302. <https://doi.org/10.1116/1.5045231>
- [36] Salmerón-Sánchez, M., & Dalby, M. J. (2016). Synergistic growth factor microenvironments. *Chemical Communications*, *52*(91), 13327–13336. <https://doi.org/10.1039/C6CC06888J>
- [37] Teixeira, S. P. B., Domingues, R. M. A., Shevchuk, M., Gomes, M. E., Peppas, N. A., & Reis, R. L. (2020). Biomaterials for Sequestration of Growth Factors and Modulation of Cell Behavior. *Advanced Functional Materials*, *30*(44), 1909011. <https://doi.org/10.1002/ADFM.201909011>

- [38] Trujillo, S., Gonzalez-Garcia, C., Rico, P., Reid, A., Windmill, J., Dalby, M. J., & Salmeron-Sanchez, M. (2019). *Engineered full-length Fibronectin-based hydrogels sequester and present growth factors to promote regenerative responses in vitro and in vivo*. <https://doi.org/10.1101/687244>
- [39] Damiati, L. A., Tsimbouri, M. P., Hernandez, V. L., Jayawarna, V., Ginty, M., Childs, P., Xiao, Y., Burgess, K., Wells, J., Sprott, M. R., Meek, R. M. D., Li, P., Oreffo, R. O. C., Nobbs, A., Ramage, G., Su, B., Salmeron-Sanchez, M., & Dalby, M. J. (2022). Materials-driven fibronectin assembly on nanoscale topography enhances mesenchymal stem cell adhesion, protecting cells from bacterial virulence factors and preventing biofilm formation. *Biomaterials*, *280*, 121263. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2021.121263>
- [40] Kubow, K. E., Vukmirovic, R., Zhe, L., Klotzsch, E., Smith, M. L., Gourdon, D., Luna, S., & Vogel, V. (2015). Mechanical forces regulate the interactions of fibronectin and collagen I in extracellular matrix. *Nature Communications* *2015*, *6*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms9026>
- [41] Trujillo, S., Gonzalez-Garcia, C., Rico, P., Reid, A., Windmill, J., Dalby, M. J., & Salmeron-Sanchez, M. (2020). Engineered 3D hydrogels with full-length fibronectin that sequester and present growth factors. *Biomaterials*, *252* (November 2019), 120104. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120104>
- [42] Benoit, D. S. W., & Anseth, K. S. (2005). The effect on osteoblast function of colocalized RGD and PHSRN epitopes on PEG surfaces. *Biomaterials*, *26*(25), 5209–5220. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.01.045>
- [43] Hersel, U., Dahmen, C., & Kessler, H. (2003). RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, *24*(24), 4385–4415. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00343-0)
- [44] Ker, E. D. F., Chu, B., Phillippi, J. A., Gharaibeh, B., Huard, J., Weiss, L. E., & Campbell, P. G. (2011). Engineering spatial control of multiple differentiation fates within a stem cell population. *Biomaterials*, *32*(13), 3413–3422. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.01.036>
- [45] Liang, J., Guo, Z., Timmerman, A., Grijpma, D., & Poot, A. (2019). Enhanced mechanical and cell adhesive properties of photo-crosslinked PEG hydrogels by incorporation of gelatin in the networks. *Biomedical Materials*, *14*(2), 024102. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/AAF31B>
- [46] Su, J., Satchell, S. C., Wertheim, J. A., & Shah, R. N. (2019). Poly(ethylene glycol)-crosslinked gelatin hydrogel substrates with conjugated bioactive peptides influence endothelial cell behavior. *Biomaterials*, *201*, 99–112. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.02.001>
- [47] Klotz, B. J., Gawlitta, D., Rosenberg, A. J. W. P., Malda, J., & Melchels, F. P. W. (2016). Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends in Biotechnology*, *34*(5), 394–407. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2016.01.002>
- [48] Carthew, J., Frith, J. E., Forsythe, J. S., & Truong, V. X. (2018). Polyethylene glycol–gelatin hydrogels with tuneable stiffness prepared by horseradish peroxidase-activated tetrazine–norbornene ligation. *Journal of Materials Chemistry B*, *6*(9), 1394–1401. <https://doi.org/10.1039/C7TB02764H>

- [49] Biswal, T. (2021). Biopolymers for tissue engineering applications: A review. *Materials Today: Proceedings*, 41, 397–402. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2020.09.628>
- [50] Dura, G., Waller, H., Gentile, P., Lakey, J. H., & Fulton, D. A. (2018). Tuneable hydrogels of Caf1 protein fibers. *Materials Science and Engineering: C*, 93, 88–95. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.07.063>
- [51] *Polyethylene Glycol (PEG) and Pegylation of Proteins | Thermo Fisher Scientific - ES*. (n.d.). Retrieved June 13, 2022, from <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/polyethylene-glycol-peg-pegylation-proteins.html>
- [52] Pandala, N., LaScola, M. A., Hinton, Z., Korley, L. S. T. J., & Lavik, E. (2022). Finding the sweet spot: a library of hydrogels with tunable degradation for tissue model development. *Journal of Materials Chemistry B*, 10(13), 2194–2203. <https://doi.org/10.1039/D1TB02436A>
- [53] Hoang Thi, T. T., Lee, J. S., Lee, Y., Park, K. M., & Park, K. D. (2016). Enhanced Cellular Activity in Gelatin-Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels without Compromising Gel Stiffness. *Macromolecular Bioscience*, 16(3), 334–340. <https://doi.org/10.1002/MABI.201500327>
- [54] *SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida – ChemEvol*. (n.d.). Extraído de <https://chemevol.web.uah.es/wp/sds-page-electroforesis-en-gel-de-poliacrilamida/>
- [55] Lisón Párraga, M. P., & Aparicio Herrero, F. (n.d.). *PRÁCTICA LABORATORIO 3 : ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS*.
- [56] Contessi Negrini, N., Angelova Volponi, A., Sharpe, P. T., & Celiz, A. D. (2021). Tunable Cross-Linking and Adhesion of Gelatin Hydrogels via Bioorthogonal Click Chemistry. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 7(9), 4330–4346. https://doi.org/10.1021/ACSBIMATERIALS.1C00136/ASSET/IMAGES/LARGE/AB1C00136_0007.JPEG
- [57] *Linear Viscoelastic Region (LVER) - Glossary - Training & Know-how - NETZSCH Analyzing & Testing*. (n.d.). Retrieved June 26, 2022, from <https://analyzing-testing.netzsch.com/en/training-know-how/glossary/linear-viscoelastic-region-lver>
- [58] *Viscoelasticity and dynamic mechanical testing A. Franck, TA Instruments Germany*. (n.d.).
- [59] Bhattacharya, M., Malinen, M. M., Lauren, P., Lou, Y. R., Kuisma, S. W., Kanninen, L., Lille, M., Corlu, A., Guguen-Guillouzo, C., Ikkala, O., Laukkanen, A., Urtti, A., & Yliperttula, M. (2012). Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. *Journal of Controlled Release*, 164(3), 291–298. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2012.06.039>
- [60] Fu, Y., Xu, K., Zheng, X., Giacomini, A. J., Mix, A. W., & Kao, W. J. (2012). 3D cell entrapment in crosslinked thiolated gelatin-poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels. *Biomaterials*, 33(1), 48–58. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.09.031>

- [61] Krishnamoorthy, S., Noorani, B., & Xu, C. (2019). Effects of Encapsulated Cells on the Physical–Mechanical Properties and Microstructure of Gelatin Methacrylate Hydrogels. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20). <https://doi.org/10.3390/IJMS20205061>
- [62] *What is the standard percentage of viability in the cell subculture?* (n.d.). Extraído de <https://www.researchgate.net/post/What-is-the-standard-percentage-of-viability-in-the-cell-subculture>
- [63] *ISO - ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.* (n.d.). Extraído de <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- [64] Mazzocchi, A., Devarasetty, M., Huntwork, R., Soker, S., & Skardal, A. (2018). Optimization of collagen type I-hyaluronan hybrid bioink for 3D bioprinted liver microenvironments. *Biofabrication*, 11(1), 015003. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/AAE543>
- [65] Echalié, C., Valot, L., Martinez, J., Mehdi, A., & Subra, G. (n.d.). *Chemical cross-linking methods for cell encapsulation in hydrogels.* <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.05.012>
- [66] Gong, H., Agustin, J., Wootton, D., & Zhou, J. G. (2014). Biomimetic design and fabrication of porous chitosan-gelatin liver scaffolds with hierarchical channel network. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(1), 113–120. <https://doi.org/10.1007/S10856-013-5061-8/FIGURES/10>
- [67] Mattei, G., Magliaro, C., Pirone, A., & Ahluwalia, A. (2018). Bioinspired liver scaffold design criteria. *Organogenesis*, 14(3), 129. <https://doi.org/10.1080/15476278.2018.1505137>
- [68] Choi, J. S., Heang Oh, S., Kim, Y. M., & Lim, J. Y. (2020). Hyaluronic Acid/Alginate Hydrogel Containing Hepatocyte Growth Factor and Promotion of Vocal Fold Wound Healing. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 17(5), 651–658. <https://doi.org/10.1007/S13770-020-00280-6/TABLES/1>
- [69] Ammar, M. M., Waly, G. H., Saniour, S. H., & Moussa, T. A. (2018). Growth factor release and enhanced encapsulated periodontal stem cells viability by freeze-dried platelet concentrate loaded thermo-sensitive hydrogel for periodontal regeneration. *The Saudi Dental Journal*, 30(4), 355. <https://doi.org/10.1016/J.SDENTJ.2018.06.002>

ANEXO

El presente ANEXO contiene los cálculos matemáticos de los siguientes puntos:

- I. Síntesis de hidrogeles de Gel-PEG para medidas de reología
- II. EWC sin FN
- III. Preparación buffer Tris-HCl
- IV. Síntesis de hidrogeles de Gel-PEG con FN
- V. EWC con FN_m
- VI. Curva patrón de la FN_d y FN_m
- VII. Síntesis de hidrogeles con FN_m para medidas de reología
- VIII. Etiquetado fluorescente del HGF
- IX. Síntesis de hidrogeles con FN y HGF
- X. Curva patrón del HGF marcado
- XI. Liberación acumulada de HGF-488

Por otro lado, se recogen los resultados de las pruebas estadísticas realizadas.

- XII. Estadística
 - a. Reómetro in situ
 - b. Reómetro hidrogeles gelificados-hinchados
 - c. EWC
 - d. Liberación de FN
 - e. Liberación de HGF
 - f. Viabilidad celular

I. Síntesis de hidrogeles de Gel-PEG para medidas de reología

Para la síntesis de 3 réplicas, se calculan las cantidades necesarias para 4 réplicas para tener un exceso de material en el caso de haber error de pipeteo. De la misma manera se realizaron los cálculos necesarios para la síntesis de otros hidrogeles que se presentan en este ANEXO. Además, para la fabricación de los hidrogeles primero se mezclaron los volúmenes de Gel y DMEM (y, si procede, FN y HGF) señalados en la columna de μL totales, y posteriormente se fue cogiendo de esa disolución la cantidad necesaria para cada hidrogel (columna $\mu\text{L}/\text{hidrogel}$).

Para la medida de propiedades mecánicas *in situ*:

Volumen hidrogel	350	μL
Nº hidrogeles	4	
Vtotal	1400	μL

a. Ratio 1:1

DISOLUCIONES STOCK					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	50	mg/mL	890	44.5	DMEM
PEG-SG	100	mg/mL	430	43	DPBS -

A añadir en cada hidrogel:

	mg/mL	$\mu\text{L}/\text{hidrogel}$	μL totales
Gelatina	30	210	840
PEG-SG	30	105	420
DMEM		35	140

b. Ratio 1:0.75

DISOLUCIONES STOCK					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	50	mg/mL	890	44.5	DMEM
PEG-SG	100	mg/mL	325	32.5	DPBS -

A añadir en cada hidrogel:

	mg/mL	$\mu\text{L}/\text{hidrogel}$	μL totales
Gelatina	30	210	840
PEG-SG	22.5	78.75	315
DMEM		61.25	245

c. Ratio 1:0.5

DISOLUCIONES STOCK					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	50	mg/mL	890	44.5	DMEM
PEG-SG	100	mg/mL	220	22	DPBS -

A añadir en cada hidrogel:

	mg/mL	μL/hidrogel	μL totales
Gelatina	30	210	840
PEG-SG	15	52.5	210
DMEM		87.5	350

Para los hidrogeles gelificados en moldes:

Volumen hidrogel	300	μL
Nº hidrogeles	4	
Vt	1200	μL

d. Ratio 1:1

DISOLUCIONES STOCK					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	50	mg/mL	770	38.5	DMEM
PEG-SG	100	mg/mL	370	37	DPBS -

A añadir en cada hidrogel:

	mg/mL	μL/hidrogel	μL totales
Gelatina	30	180	720
PEG-SG	30	90	360
DMEM		30	120

e. Ratio 1:0.75

DISOLUCIONES STOCK					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	50	mg/mL	770	38.5	DMEM
PEG-SG	100	mg/mL	280	28	DPBS -

A añadir en cada hidrogel:

	mg/mL	μL/hidrogel	μL totales
Gelatina	30	180	720
PEG-SG	22.5	67.5	270
DMEM		52.5	210

f. Ratio 1:0.5

DISOLUCIONES STOCK					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	50	mg/mL	770	38.5	DMEM
PEG-SG	100	mg/mL	190	19	DPBS -

A añadir en cada hidrogel:

	mg/mL	μL/hidrogel	μL totales
Gelatina	30	180	720
PEG-SG	15	45	180
DMEM		75	300

- II. EWC
 a. Síntesis de hidrogeles

Volumen hidrogel	200	μL
Nº hidrogeles	7	
Vt	1400	μL

- i. Ratio 1:1

DISOLUCIONES STOCK					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	50	mg/mL	890	44.5	DMEM
PEG-SG	100	mg/mL	430	43	DPBS -

A añadir a cada hidrogel:

	mg/mL	μL/hidrogel	μL totales
Gelatin	30	120	840
PEG-SG	30	60	420
DMEM		20	140

- ii. Ratio 1:0.75

DISOLUCIONES STOCK					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	50	mg/mL	890	44.5	DMEM
PEG-SG	100	mg/mL	325	32.5	DPBS -

A añadir a cada hidrogel:

	mg/mL	μL/hidrogel	μL totales
Gelatina	30	120	840
PEG-SG	22.5	45	315
DMEM		35	245

iii. Ratio 1:0.5

DISOLUCIONES STOCK					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	50	mg/mL	890	44.5	DMEM
PEG-SG	100	mg/mL	220	22	DPBS -

A añadir en cada hidrogel:

	mg/mL	μL/hidrogel	μL totales
Gelatina	30	120	840
PEG-SG	15	30	210
DMEM		50	350

b. EWC

Masas calculadas para cada ratio de Gel-PEG durante el experimento:

	Réplicas	Peso recién gelificados (mg)	Peso tras 24h en DPBS (mg)	Peso tras liofilizar (mg)
RATIO 1:1	1	172.00	229.92	11.53
	2	172.88	230.71	11.44
	3	149.77	201.22	9.47
	4	152.60	220.16	10.91
	5	148.34	210.23	10.58
RATIO 1:0.75	1	159.72	230.62	7.52
	2	157.77	239.35	7.51
	3	165.9	253.13	8.04
	4	148.74	216.85	5.81
	5	179.55	227.86	8.49
	6	166.96	251.66	9.18
RATIO 1:0.5	1	149.92	267.15	8.05
	2	157.77	259.27	6.55
	3	153.08	250.38	6.14
	4	160.74	270.89	7.71
	5	160.9	260.14	6.88
	6			

III. Preparación buffer Tris-HCl

Para la preparación del buffer TrisHCl 1M a pH 8.0, se emplearon:

Reactivo	Cantidad
Tris	12.11 g
Agua destilada	100 mL
HCl 37.5%	

En una botella Duran de 100 mL se mezclaron 12.11 g de Tris y 80 mL de agua destilada. Se mezcló la solución en un plato magnético y tras medir el pH se añadió lentamente el HCl con pipeta Pasteur, para reducir el pH a 8.0. Por último, se completó con agua destilada el volumen hasta llegar a 100 mL.

IV. Síntesis de hidrogeles de Gel-PEG con FN

Para el ensayo de liberación de la FN, se reajustó la disolución de stock de Gel a un 70% w/v con el fin de igualar las alícuotas a las condiciones habituales.

Volumen hidrogel	50	μL
Nº hidrogeles	4	
Vtotal	200	μL

DISOLUCIONES STOCK					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	70	mg/mL	135.71	6.79	DMEM
PEG-SG	100	mg/mL	55	5.5	DPBS -

A añadir en cada hidrogel:

	mg/mL	μL/hidrogel	μL totales
Gelatina	30	21.43	85.71
PEG-SG	22.5	11.25	45.00
FN	0.5	16.67	66.67
DMEM		0.65	2.62

V. Curva patrón de la FN_d y FN_m

Se decide tomar una concentración inicial de FN de 180 ng/mL para el cálculo de la curva, asegurando que todos los valores obtenidos del experimento queden por debajo del máximo de ésta. A partir de este dato y sabiendo que el volumen de DPBS a poner en cada disolución era de 250 μL y se trataba de disoluciones seriadas a la mitad, para el primer punto el volumen

de DPBS+FN a usar era de 500 μL . El correspondiente volumen de FN (a concentración stock, de 2.5 mg/mL para la FNd y de 1.5 mg/mL) a añadir fue:

$$V_{i_{FNd}} = \frac{180 \text{ ng/mL} \cdot 500 \mu\text{L}}{2500 \mu\text{g/mL}} = 36 \mu\text{L} \text{ y se añadieron } 464 \mu\text{L de DPBS}$$

$$V_{i_{FNd}} = \frac{180 \text{ ng/mL} \cdot 500 \mu\text{L}}{1500 \mu\text{g/mL}} = 60 \mu\text{L} \text{ y se añadieron } 440 \mu\text{L de DPBS}$$

A continuación, se detallan los cálculos y las concentraciones obtenidas para el resto de puntos de las curvas, idénticos para ambos tipos de FN:

$$[FN]_2 = \frac{180 \text{ ng/mL} \cdot 250 \mu\text{L}}{500 \mu\text{L}} = 90 \text{ ng/mL}$$

$$[FN]_3 = \frac{90 \text{ ng/mL} \cdot 250 \mu\text{L}}{500 \mu\text{L}} = 45 \text{ ng/mL}$$

$$[FN]_4 = \frac{45 \text{ ng/mL} \cdot 250 \mu\text{L}}{500 \mu\text{L}} = 22.5 \text{ ng/mL}$$

$$[FN]_5 = \frac{22.5 \text{ ng/mL} \cdot 250 \mu\text{L}}{500 \mu\text{L}} = 11.25 \text{ ng/mL}$$

$$[FN]_6 = \frac{11.25 \text{ ng/mL} \cdot 250 \mu\text{L}}{500 \mu\text{L}} = 5.625 \text{ ng/mL}$$

Resultados obtenidos para la curva patrón de la FN_d:

Concentración (ng/mL)	Fluorescencia (promedio)
180	1.106
90	1.089
45	1.030
22.5	0.784
11.25	0.482
5.625	0.284

Resultados obtenidos para la curva patrón de la FN_m:

Concentración (ng/mL)	Fluorescencia (promedio)
180	1.092
90	1.052
45	0.941
22.5	0.674
11.25	0.472
5.625	0.294

VI. Síntesis de hidrogeles con FN_m para medidas de reología

Volumen hidrogel	200	μL
Nº hidrogeles	4	
Vt	800	μL

PREPARAR STOCK DILUTIONS					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	70	mg/mL	392.86	19.64	DMEM
PEG-SG	100	mg/mL	190	19	DPBS -

A añadir en cada hidrogel:

	mg/mL	μL/hidrogel	μL totales
Gelatina	30	85.71	342.86
PEG-SG	22.5	45.00	180.00
FN	0.5	66.67	266.67
DMEM		2.62	10.48

- VII. EWC con FN_m
 a. Síntesis de hidrogeles con FN_m

Volumen hidrogel	200	μL
Nº hidrogeles	4	
Vtotal	800	μL

PREPARAR STOCK DILUTIONS					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	70	mg/mL	392.86	19.64	DMEM
PEG-SG	100	mg/mL	190	19	DPBS -

A añadir en cada hidrogel:

	mg/mL	μL/hidrogel	μL totales
Gelatina	30	85.71	342.86
PEG-SG	22.5	45.00	180.00
FN	0.5	66.67	266.67
DMEM		2.62	10.48

- b. Cálculo del EWC

Masas calculadas de las tres réplicas durante el experimento:

	Réplicas	peso (mg)	peso (mg)	peso (mg)
RATIO 1:0.75 con FN	1	214.40	314.69	12.34
	2	260.92	371.64	14.26
	3	210.57	318.01	12.21

- VIII. Etiquetado fluorescente del HGF

PM (HGF) = 80 000 g/mol

PM (DyLight-488) = 1011 g/mol

Cantidad de tinte requerida para la tinción de 10 μg/mL de HGF:

$$V_{DyLight-488} = \frac{10 \cdot 10^{-3} \text{ mg}}{PM_{HGF}} \cdot 10 \cdot PM_{DyLight-488} \cdot \frac{1}{1 \text{ mg/mL}} = 1.26 \mu\text{L} \approx 1.3 \mu\text{L}$$

- IX. Síntesis de hidrogeles con FN y HGF

Volumen hidrogel	50	μL
Nº hidrogeles	3.5	
Vt	175	μL

a. Hidrogeles sin FN con HGF

DISOLUCIONES STOCK					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	70	mg/mL	125.00	6.25	DMEM
PEG-SG	150	mg/mL	36.25	3.625	DPBS -

A añadir en cada hidrogel:

	mg/mL	μL/hidrogel	μL totales
Gelatina	30	21.43	75.00
PEG-SG	22.5	7.50	26.25
DMEM		16.07	56.25
HGF	10 μg/mL	5.00	17.50

b. Hidrogeles con FN y HGF

DISOLUCIONES STOCK					
	Concentración final		Vtotal (μL)	mg	
Gelatina	70	mg/mL	125.00	6.25	DMEM
PEG-SG	150	mg/mL	36.25	3.625	DPBS -

A añadir en cada hidrogel:

	mg/mL	μL/hidrogel	μL totales
Gelatina	30	21.43	75.00
PEG-SG	22.5	7.50	26.25
FN	0.5	16.67	58.33
HGF	10 μg/mL	5.00	17.50

X. Curva patrón del HGF marcado

Se calculó primero la concentración máxima liberada de HGF en 350 μL de sobrenadante, sabiendo que la concentración en cada hidrogel de 50 μL fue de 10 μg/mL, por lo que la masa de HGF en cada réplica era de 0.5 μg:

$$[HGF - 488]_{\text{máx}} = \frac{0.5 \mu\text{g}}{0.350 \text{ mL}} = 1.42 \mu\text{g/mL}$$

Para que todos los valores obtenidos de la liberación se encuentren por debajo del máximo valor de la curva patrón, se decidió coger 2 µg/mL como concentración de partida para el cálculo de la misma. Como el volumen de DPBS a poner en cada disolución era de 250 µL y se trataba de disoluciones seriadas a la mitad, para el primer punto el volumen de DPBS+HGF-488 a usar era de 500 µL. El correspondiente volumen de HGF-488 (a concentración stock, de 100 µg/mL) a añadir fue:

$$V_{i_{HGF-488}} = \frac{2 \mu g/mL \cdot 500 \mu L}{100 \mu g/mL} = 10 \mu L \text{ y se añadieron } 490 \mu L \text{ de DPBS}$$

A continuación, se detallan los cálculos y las concentraciones obtenidas para el resto de los puntos de la curva:

$$[HGF - 488]_2 = \frac{2 \mu g/mL \cdot 500 \mu L}{0.250 mL} = 1 \mu g/mL$$

$$[HGF - 488]_3 = \frac{1 \mu g/mL \cdot 500 \mu L}{0.250 mL} = 0.5 \mu g/mL$$

$$[HGF - 488]_4 = \frac{0.5 \mu g/mL \cdot 500 \mu L}{0.250 mL} = 0.25 \mu g/mL$$

$$[HGF - 488]_5 = \frac{0.25 \mu g/mL \cdot 500 \mu L}{0.250 mL} = 0.125 \mu g/mL$$

$$[HGF - 488]_6 = \frac{0.125 \mu g/mL \cdot 500 \mu L}{0.250 mL} = 0.06 \mu g/mL$$

$$[HGF - 488]_7 = \frac{0.06 \mu g/mL \cdot 500 \mu L}{0.250 mL} = 0.03 \mu g/mL$$

Resultados obtenidos para la curva patrón:

CURVA PATRÓN	
Concentración de HGF-488 (ug/mL)	Fluorescencia (promedio)
2	37569
1	19547
0.5	9228
0.25	4657
0.125	2269
0.06	1150
0.03	563
0	0

XI. Liberación acumulativa de HGF-488

Datos de la liberación acumulada del HGF de 0 a 48 horas de incubación (se presentan las medias de las réplicas de cada composición y a cada tiempo):

Tiempos	GelPEG con HGF	GelPEG Fndi	GelPEG FN _m 0.5
0h	0.08	0.25	0.07
4h	0.28	0.32	0.27
24h	0.329	0.328	0.309
48h	0.337	0.328	0.317

XII. Estadística

a. Reómetro in situ

VARIABLES A COMPARAR	Significancia estadística	P-valor	Resumen
1:1 vs 1:0.75	Sí	<0.001	***
1:1 vs 1:0.5	Sí	<0.001	***
1:0.75 vs 1:0.5	Sí	<0.001	***

Tabla 5. Resultados del análisis estadístico del tiempo de gelificación.

VARIABLES A COMPARAR	Significancia estadística	P-valor	Resumen
1:1 vs 1:0.75	Sí	<0.001	***
1:1 vs 1:0.5	Sí	<0.001	***
1:0.75 vs 1:0.5	Sí	<0.001	***

Tabla 6. Estadística módulo almacenamiento vs Tgel (ratios sin HepG2).

VARIABLES A COMPARAR	Significancia estadística	P-valor	Resumen
1:1 vs 1:1 con HepG2	Sí	0.234	*
1:0.75 vs 1:0.75 con HepG2	No	0.7826	ns
1:0.5 vs 1:0.5 con HepG2	No	0.9992	ns

Tabla 7. Resultados del análisis estadístico de G' frente a frecuencia (hidrogeles con HepG2 frente a sin HepG2).

b. Reómetro hidrogeles pregelificados-hinchados

Variables a comparar	Significancia estadística	P-valor	Resumen
1:1 gelificado - hinchado	No	0.419	ns
1:0.75 gelificado - hinchado	Sí	<0.001	***
1:0.5 gelificado - hinchado	Sí	<0.01	**
1:0.75 con FN gelificado - hinchado	No	0.222	ns
1:1 gelificado - 1:0.75 gelificado	No	0.488	ns
1:1 gelificado - 1:0.5 gelificado	Sí	0.006	**
1:0.75 gelificado - 1:0.5 gelificado	Sí	<0.001	***
1:0.75 sin FN gelificado - 1:0.75 con FN gelificado	No	0.222	ns
1:1 hinchado - 1:0.75 hinchado	No	0.040	*
1:1 hinchado - 1:0.5 hinchado	Sí	0.013	*
1:0.75 hinchado - 1:0.5 hinchado	Sí	0.01	*
1:0.75 sin FN hinchado - 1:0.75 con FN hinchado	No	0.222	ns

Tabla 8. Resultados del análisis estadístico de los hidrogeles gelificados e hinchados.

c. EWC

Variables a comparar	Significancia estadística	P-valor	Resumen
1:1 vs 1:0.75	No	0.129	ns
1:1 vs 1:0.5	Sí	0.001	**
1:0.75 vs 1:0.5	Sí	0.015	*
1:0.75 con FN vs 1:0.75 sin FN	No	0.060	ns

Tabla 9. Resultados del análisis estadístico del EWC.

d. Liberación de FN

Variables a comparar	Significancia estadística	P-valor	Resumen
FNd vs FNm	Sí	0.029	*

Tabla 10. Resultados de la estadística de la liberación de FN.

e. Liberación de HGF

Variables a comparar	Significancia estadística	P-valor	Resumen
Sin FN vs con FNd	No	0.870	ns
Sin FN vs con FNm	No	0.727	ns
con FNd vs con FNm	No	0.870	ns

Tabla 11. Resultados del análisis estadístico de la liberación de HGF.

f. Viabilidad celular

Variables a comparar	Significancia estadística	P-valor	Resumen
1:1 vs 1:0.75	No	>0.999	ns
1:1 vs 1:0.5	No	>0.999	ns
1:0.75 vs 1:0.5	No	0.094	ns
1:1 vs Monocapa	No	>0.999	ns
1:0.75 vs Monocapa	No	0.085	ns
1:0.5 vs Monocapa	No	0.231	ns

Tabla 12. Resultados del análisis estadístico de la viabilidad celular.

DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

Índice

1. INTRODUCCIÓN DEL PRESUPUESTO	87
2. CUADRO DE MANO DE OBRA.....	87
3. CUADRO DE MATERIALES.....	87
4. CUADRO DE MAQUINARIA.....	89
5. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS	90
6. CUADRO DE PRESUPUESTOS PARCIALES	100
7. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL Y POR CONTRATA	102

Índice de tablas

Tabla 1. Abreviaturas	87
Tabla 2. Cuadro de mano de obra.....	87
Tabla 3. Cuadro de materiales.	89
Tabla 4. Cuadro de maquinaria.....	90
Tabla 5. Cuadro de precios descompuestos.	99
Tabla 6. Cuadro de presupuestos parciales.	101
Tabla 7. Presupuesto de ejecución material.....	102
Tabla 8. Presupuesto de ejecución por contrata.	102

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Cálculo de la amortización.....	88
---	----

1. INTRODUCCIÓN DEL PRESUPUESTO

En el presente documento se recogen los cálculos llevados a cabo para la obtención del presupuesto total del proyecto para el estudio de su viabilidad económica. Las abreviaturas de los conceptos que se utilizaron fueron las recogidas en la Tabla 1.

Abreviatura	Significado
MO	Mano de obra
EPI	Equipo de protección individual
MAT	Material
MAQ	Maquinaria

Tabla 13. Abreviaturas.

Se calcularon primero los precios descompuestos y a continuación, el presupuesto parcial correspondiente a cada capítulo. Posteriormente, se obtuvieron los cuadros de mano de obra, materiales y maquinaria. Por último, se obtuvo el presupuesto general.

2. CUADRO DE MANO DE OBRA

Primero, en la Tabla 2 se recoge el cuadro de mano de obra. Se consideró a la autora del TFG como graduada de ingeniería biomédica, pero no recibió ningún tipo de retribución al respecto.

Cuadro de mano de obra				
Nº	Designación	Importe		
		Precio (€)	Cantidad (Horas)	Total (€)
1	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	304.50	3,654.00
2	Tutor/a responsable del proyecto	45.00	45.00	2,025.00
3	Cotutor/a responsable del proyecto	45.00	45.00	2,756.25
Importe total:				8,435.25

Tabla 14. Cuadro de mano de obra.

3. CUADRO DE MATERIALES

En segundo lugar, se presenta en la Tabla 3 el cuadro de materiales, que recoge la parte del presupuesto asociada a todo el material utilizado durante la realización del presente TFG que previamente se describió en detalle en el apartado de Materiales y Métodos del documento de la Memoria.

Cuadro de materiales					
Nº	Designación	Importe			
		Precio (€)	Cantidad empleada	Total (€)	
1	Bata de laboratorio	22.50	1	u	22.50

2	Guantes de látex (caja)	5.95	4	u	23.80
3	Máscara de gases	30.50	1	u	30.50
4	Pinzas de laboratorio	8.73	1	u	8.73
5	Espátula metálica	3.66	3	u	10.98
6	Micropipeta 1000 µL	215.00	1	u	215.00
7	Micropipeta 200 µL	215.00	1	u	215.00
8	Micropipeta 100 µL	215.00	1	u	215.00
9	Micropipeta 100 µL	215.00	1	u	215.00
10	Micropipeta 10 µL	215.00	1	u	215.00
11	Caja puntas micropipeta 1000 µL	65.25	3	u	195.75
12	Caja puntas micropipeta 200 µL	39.16	3	u	117.48
13	Caja puntas micropipeta 100 µL	65.25	3	u	195.75
14	Caja puntas micropipeta 20 µL	60.20	3	u	180.60
15	Caja puntas micropipeta 10 µL	52.60	3	u	157.80
16	Tubo Eppendorf 2 mL	0.08	50	u	4.00
17	Tubo Eppendorf 1.5 mL	0.07	200	u	14.00
18	Tubo Eppendorf 0.5 mL	0.05	300	u	15.00
19	Placa Petri 80 mm	1.13	1	u	1.13
20	Viales de cristal 10 mL	0.17	21	u	3.57
21	Tapas viales de cristal 10 mL	0.01	21	u	0.21
22	Placas de pocillo profundo P-48	2.81	5	u	14.05
23	Placas de pocillo negras P-96	5.52	2	u	11.04
24	Vaso de precipitados 25 mL	3.56	1	u	3.56
25	Mini membrana de diálisis (10K MWCO)	4.24	2	u	8.48
26	Falcon de ultracentrífuga 50 mL	0.10	3	u	0.30
27	Filtro 0.22	18.00	9	u	162.00
28	Agua destilada	0.20	0.1685	L	0.03
29	Agua milliQ	0.20	0.500008	L	0.10
30	Etanol absoluto	3.93	0.01	L	0.04
31	Etanol 90%	119.80	0.01	L	1.20
32	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.45011	g	0.20
33	PEG-SG	426.00	0.354875	g	151.15
34	Medio DMEM	35.58	0.012082	L	0.40
35	DPBS	175.00	0.043804	L	7.69
36	Fibronectina (FN)	34,491.00	0.000717	L	24.73
37	TCEP	123,000.00	0.00001	L	1.23
38	Urea	175.77	0.00065	L	0.11
39	Peróxido de sodio	294.00	0.000005	L	0.00
40	Yodoacetamida	42.21	0.00015	L	0.01
41	Acrilamida-bisacrilamida	189.28	0.00255	L	0.48
42	SDS	4.26	0.0002	L	0.00
43	Persulfato amónico	130.56	0.0001	L	0.01
44	TEMED	2,790.00	0.000015	L	0.04

45	Buffer Laemmli	22.70	0.000135	L	0.00
46	TrisGlicina SDS 1X	9.20	1	L	9.20
47	Azul de Coomassie	3.32	0.5	L	1.66
48	Kit DuoSet ELISA	640.00	1	u	640.00
49	Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)	41,450.00	0.000154	L	6.40
50	Marcador fluorescente (kit DyLight-488 NH Ester)	249.00	0.07	u	17.43
51	N,N-dimetilformamida	5.21	0.00005	L	0.00
52	Paquetes de tampones borato	4.63	1	u	4.63
53	Kit LIVE/DEAD Cell Viability Assay	834.00	1	u	834.00
54	Tripsina	409.50	0.01	L	4.10
55	Tris	0.14	24.2	g	3.39
56	Ácido clorhídrico (HCl)	92.10	0.01016	L	0.94
57	Pipeta Pasteur	0.02	10	u	0.20
Importe total:					3,965.60

Tabla 15. Cuadro de materiales.

4. CUADRO DE MAQUINARIA

A continuación, se presenta en la Tabla 4 el cuadro de maquinaria, que incluye a todas las máquinas usadas y descritas en el apartado de Materiales y Métodos del documento de la Memoria. Los costes de la maquinaria se estimaron mediante la amortización de los equipos con la ecuación 1, tomándose 10 años como el período de amortizado:

$$\text{Amortización} = \frac{\text{Coste del equipo} \cdot \text{Tiempo de uso}}{\text{Período de amortizado}}$$

Ecuación 1. Cálculo de la amortización.

Cuadro de maquinaria				
Nº	Descripción	Importe		
		Precio (€)	Cantidad (Horas)	Total (€)
1	Estufa 37°C	0.01	16.25	0.20
2	Balanza de precisión	0.15	7.18	1.17
3	Agitador magnético	0.01	0.50	0.01
4	Reómetro	10.00	18.75	187.50
5	Desecadora	0.03	48.00	1.44
6	Liofilizadora	1.35	48.00	64.80
7	Ultracentrifuga	0.13	0.35	0.05
8	Lector de fluorescencia (NanoDrop)	0.04	0.25	0.01

9	Lector de fluorescencia de placas (VICTOR)	0.01	0.50	0.00
10	Equipo de electroforesis (MICROPROTEAN)	0.02	2.25	0.05
11	Transiluminador (BioRad)	0.01	0.25	0.00
12	Cámara Neubauer	0.01	0.25	0.00
13	Microscopio Leica HMR	0.01	0.25	0.00
Importe total:				255.23

Tabla 16. Cuadro de maquinaria.

5. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS

En la Tabla 5 se presenta el cuadro de precios descompuestos, donde se recogen los procedimientos llevados a cabo para la realización del TFG desglosados por capítulos.

Cuadro de precios descompuestos							
Nº	Código	Ud	Descripción				Total (€)
			1. Síntesis de hidrogeles				
			1.1 Síntesis de hidrogeles sin FN para reología				
1.1.1	02.01.01	u	Gelificación hidrogeles 350 µL sin FN				
	MAT.29		0.0445	g	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.02
	MAT.30		0.0430	g	PEG-SG	426.00	18.32
	MAT.31		0.00103	L	Medio DMEM	35.58	0.04
	MAT.32		0.00043	L	DPBS	175.00	0.08
	MAQ.01		0.5	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MAQ.02		0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.01		2	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	24.00
	%0400		4	%	Costes indirectos	42.50	1.70
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	44.20	1.77
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 350 µL sin FN":							45.97
1.1.2	02.01.02	u	Gelificación hidrogeles 350 µL sin FN Ratio 1:0.75				
	MAT.29		0.0445	g	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.02
	MAT.30		0.0325	g	PEG-SG	426.00	13.85
	MAT.31		0.001135	L	Medio DMEM	35.58	0.04
	MAT.32		0.001135	L	DPBS	175.00	0.20
	MAQ.01		0.5	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MAQ.02		0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.01		2	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	24.00
	%0400		4	%	Costes indirectos	38.15	1.53
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	39.68	1.59
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 350 µL sin FN Ratio 1:0.75":							41.27

1.1.3	02.01.03	u	Gelificación hidrogeles 350 µL sin FN Ratio 1:0.5			
	MAT.29	0.0445	g	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.02
	MAT.30	0.022	g	PEG-SG	426.00	9.37
	MAT.31	0.00124	L	Medio DMEM	35.58	0.04
	MAT.32	0.00022	L	DPBS	175.00	0.04
	MAQ.01	0.5	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MAQ.02	0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.01	2	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	24.00
	%0400	4	%	Costes indirectos	33.51	1.34
	%0404	4	%	Recursos auxiliares	34.85	1.39
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 350 µL sin FN Ratio 1:0.5":						36.24
1.1.4	02.01.04	u	Gelificación hidrogeles 300 µL sin FN Ratio 1:1			
	MAT.30	0.037	g	PEG-SG	426.00	15.76
	MAT.31	0.00089	L	Medio DMEM	35.58	0.03
	MAT.32	0.00037	L	DPBS	175.00	0.06
	MAQ.01	1	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MAQ.02	0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.01	2	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	24.00
	%0400	4	%	Costes indirectos	39.89	1.60
	%0404	4	%	Recursos auxiliares	41.49	1.66
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 300 µL sin FN Ratio 1:1":						43.15
1.1.5	02.01.05	u	Gelificación hidrogeles 300 µL sin FN Ratio 1:0.75			
	MAT.29	0.0385	g	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.02
	MAT.30	0.028	g	PEG-SG	426.00	11.93
	MAT.31	0.00098	L	Medio DMEM	35.58	0.03
	MAT.32	0.00028	L	DPBS	175.00	0.05
	MAQ.01	1	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MAQ.02	0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.01	2	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	24.00
	%0400	4	%	Costes indirectos	36.07	1.44
	%0404	4	%	Recursos auxiliares	37.51	1.50
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 300 µL sin FN Ratio 1:0.75":						39.01
1.1.6	02.01.06	u	Gelificación hidrogeles 300 µL sin FN Ratio 1:0.5			
	MAT.29	0.0385	g	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.02
	MAT.30	0.019	g	PEG-SG	426.00	8.09
	MAT.31	0.00107	L	Medio DMEM	35.58	0.04
	MAT.32	0.00019	L	DPBS	175.00	0.03
	MAQ.01	1	h	Estufa 37°C	0.01	0.01

	MAQ.02		0.17	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.01		2	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	24.00
	%0400		4	%	Costes indirectos	32.22	1.29
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	33.51	1.34
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 300 µL sin FN Ratio 1:0.5":							34.85
1.1.7	02.01.07	u	Gelificación hidrogeles 100 µL para encapsulación celular Ratio 1:1				
	MAT.29		0.0145	g	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.01
	MAT.30		0.013	g	PEG-SG	426.00	5.54
	MAT.31		0.00033	L	Medio DMEM	35.58	0.01
	MAT.32		0.00013	L	DPBS	175.00	0.02
	MAQ.01		0.5	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MAQ.02		0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.03		0.75	h	Cotutor/a responsable del proyecto	45.00	33.75
	%0400		4	%	Costes indirectos	39.37	1.57
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	40.94	1.64
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 100 µL para encapsulación celular Ratio 1:1":							42.58
1.1.8	02.01.08	u	Gelificación hidrogeles 100 µL para encapsulación celular Ratio 1:0.75				
	MAT.29		0.0145	g	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.01
	MAT.30		0.01	g	PEG-SG	426.00	4.26
	MAT.31		0.00036	L	Medio DMEM	35.58	0.01
	MAT.32		0.0001	L	DPBS	175.00	0.02
	MAQ.01		0.5	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MAQ.02		0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.03		0.75	h	Cotutor/a responsable del proyecto	45.00	33.75
	%0400		4	%	Costes indirectos	38.09	1.52
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	39.61	1.58
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 100 µL para encapsulación celular Ratio 1:0.75":							41.19
1.1.9	02.01.09	u	Gelificación hidrogeles 100 µL para encapsulación celular Ratio 1:0.5				
	MAT.29		0.0145	g	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.01
	MAT.30		0.007	g	PEG-SG	426.00	2.98
	MAT.31		0.00039	L	Medio DMEM	35.58	0.01
	MAT.32		0.00007	L	DPBS	175.00	0.01
	MAQ.01		0.5	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MAQ.02		0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.03		0.75	h	Cotutor/a responsable del proyecto	45.00	33.75
	%0400		4	%	Costes indirectos	36.80	1.47
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	38.27	1.53
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 100 µL para encapsulación celular Ratio 1:0.5":							39.80

1.2 Síntesis hidrogeles 200 µL						
1.2.1	02.02.01	u	Gelificación hidrogeles 200 µL sin FN Ratio 1:1			
	MAT.29	0.0445	g	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.02
	MAT.30	0.043	g	PEG-SG	426.00	18.32
	MAT.31	0.00103	L	Medio DMEM	35.58	0.04
	MAT.32	0.00043	L	DPBS	175.00	0.08
	MAQ.01	1	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MAQ.02	0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.01	1.5	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	18.00
	%0400	4	%	Costes indirectos	36.50	1.46
	%0404	4	%	Recursos auxiliares	37.96	1.52
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 200 µL sin FN Ratio 1:1":						39.48
1.2.2	02.02.02	u	Gelificación hidrogeles 200 µL sin FN Ratio 1:0.75			
	MAT.29	0.0445	g	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.02
	MAT.30	0.032	g	PEG-SG	426.00	13.63
	MAT.31	0.001135	L	Medio DMEM	35.58	0.04
	MAT.32	0.000325	L	DPBS	175.00	0.06
	MAQ.01	1	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MAQ.02	0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.01	1.5	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	18.00
	%0400	4	%	Costes indirectos	31.79	1.27
	%0404	4	%	Recursos auxiliares	33.06	1.32
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 200 µL sin FN Ratio 1:0.75":						34.38
1.2.3	02.02.03	u	Gelificación hidrogeles 200 µL sin FN Ratio 1:0.5			
	MAT.29	0.0445	g	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.02
	MAT.30	0.022	g	PEG-SG	426.00	9.37
	MAT.31	0.00124	L	Medio DMEM	35.58	0.04
	MAT.32	0.00022	L	DPBS	175.00	0.04
	MAQ.01	1	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MAQ.02	0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.01	1.5	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	18.00
	%0400	4	%	Costes indirectos	27.51	1.10
	%0404	4	%	Recursos auxiliares	28.61	1.14
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 200 µL sin FN Ratio 1:0.5":						29.75
1.2.4	02.02.04	u	Gelificación hidrogeles 250 µL con FN			
	MAT.29	0.01964	g	Gelatina de cerdo (Gel)	0.43	0.01
	MAT.30	0.019	g	PEG-SG	426.00	8.09
	MAT.31	0.000403	L	Medio DMEM	35.58	0.01
	MAT.32	0.00019	L	DPBS	175.00	0.03

MAT.34	0.000267	L	Fibronectina (FN)	34,491.00	9.21
MAQ.01	0.75	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
MAQ.02	0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
MO.01	2	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	24.00
%0400	4	%	Costes indirectos	41.39	1.66
%0404	4	%	Recursos auxiliares	43.05	1.72
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 250 µL con FN":					44.77
1.3 Síntesis hidrogeles 50 µL					
1.3.1	02.03.01	u	Gelificación hidrogeles 50 µL sin FN ni HGF		
MAT.30	0.0055	g	PEG-SG	426.00	2.34
MAT.31	0.000142	L	Medio DMEM	35.58	0.01
MAT.32	0.000055	L	DPBS	175.00	0.01
MAQ.01	0.75	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
MAQ.02	0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
MO.01	1.5	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	18.00
%0400	4	%	Costes indirectos	20.40	0.82
%0404	4	%	Recursos auxiliares	21.22	0.85
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 50 µL sin FN ni HGF":					22.07
1.3.2	02.03.02	u	Gelificación hidrogeles 50 µL con FN		
MAT.30	0.003625	g	PEG-SG	426.00	1.54
MAT.32	0.000036	L	DPBS	175.00	0.01
MAT.49	0.000018	L	Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)	41,450.00	0.75
MAT.34	0.000056	L	Fibronectina (FN)	34,491.00	1.93
MAQ.01	1.25	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
MAQ.02	0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
MO.01	3	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	36.00
%0400	4	%	Costes indirectos	40.27	1.61
%0404	4	%	Recursos auxiliares	41.88	1.68
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 50 µL con FN":					43.56
1.3.3	02.03.03	u	Gelificación hidrogeles 50 µL con HGF		
MAT.30	0.003625	g	PEG-SG	426.00	1.54
MAT.31	0.000181	L	Medio DMEM	35.58	0.01
MAT.32	0.000036	L	DPBS	175.00	0.01
MAT.49	0.000018	L	Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)	41,450.00	0.75
MAQ.01	1.25	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
MAQ.02	0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
MO.01	3	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	36.00
%0400	4	%	Costes indirectos	38.35	1.53

	%0404		4	%	Recursos auxiliares	39.88	1.60
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 50 µL con HGF":							41.48
1.3.4	02.03.04	u	Gelificación hidrogeles 50 µL con FN				
	MAT.30		0.0055	g	PEG-SG	426.00	2.34
	MAT.32		0.000055	L	DPBS	175.00	0.01
	MAT.34		0.000067	L	Fibronectina (FN)	34,491.00	2.31
	MAQ.01		0.75	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MAQ.02		0.167	h	Balanza de precisión	0.15	0.03
	MO.01		3	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	36.00
	%0400		4	%	Costes indirectos	40.70	1.63
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	42.33	1.69
Precio total subcapítulo "Gelificación hidrogeles 50 µL con FN":							44.02
2. Caracterización de hidrogeles							
2.1 Medición de propiedades mecánicas in situ							
2.1.1	03.01.01	u	Medición de propiedades mecánicas in situ				
	MAQ.04		0.75	h	Reómetro	10.00	7.50
	MO.01		1	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	12.00
	%0400		4	%	Costes indirectos	19.50	0.78
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	20.28	0.81
Precio total subcapítulo "Medición de propiedades mecánicas in situ":							21.09
2.2 Medición de propiedades mecánicas en hidrogeles gelificados/hinchados							
2.2.1	03.02.01	u	Medición de propiedades mecánicas en hidrogeles gelificados/hinchados				
	MAQ.04		0.25	h	Reómetro	10.00	2.50
	MO.01		0.3	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	3.60
	%0400		4	%	Costes indirectos	6.10	0.24
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	6.34	0.25
Precio total subcapítulo "Medición de propiedades mecánicas en hidrogeles gelificados/hinchado":							6.59
3.3 EWC							
2.3.1	03.03.01	u	EWC				
	MAQ.02		2	h	Balanza de precisión	0.15	0.30
	MAQ.06		24	h	Liofilizadora	1.35	32.40
	MAQ.05		24	h	Desecadora	0.03	0.72
	MO.01		10	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	120.00
	%0400		4	%	Costes indirectos	153.42	6.14
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	159.56	6.38
Precio total subcapítulo "EWC":							165.94
3. Desnaturalización de FN							
3.1	4.01	u	Desnaturalización de FN				

MAT.35	0.00001	L	TCEP	123,000.00	1.23
MAT.36	0.00065	L	Urea	175.77	0.11
MAT.34	0.000167	L	Fibronectina (FN)	34,491.00	5.76
MAT.32	0.008373	L	DPBS	175.00	1.47
MAT.38	0.00015	L	Yodoacetamida	42.21	0.01
MAT.26	0.5	L	Agua milliQ	0.20	0.10
MAT.23	1	u	Falcon de ultracentrifuga 50 mL	0.10	0.10
MAT.27	0.01	L	Etanol absoluto	3.93	0.04
MAT.28	0.01	L	Etanol 90%	119.80	1.20
MAQ.07	0.3	h	Ultracentrifuga	0.13	0.04
MO.01	5	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	60.00
%0400	4	%	Costes indirectos	70.06	2.80
%0404	4	%	Recursos auxiliares	72.86	2.91
Precio total subcapítulo "Desnaturalización de FN":					75.77
3.2	4.02	u	Medición de eficiencia de la desnaturalización		
	MAQ.08	0.25	h	Lector de fluorescencia (NanoDrop)	0.04 0.01
	MO.01	0.3	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00 3.60
	%0400	4	%	Costes indirectos	3.61 0.14
	%0404	4	%	Recursos auxiliares	3.75 0.15
Precio total subcapítulo "Medición de eficiencia de la desnaturalización":					3.90
3.3	4.03	u	Electroforesis SDS-PAGE		
	MAT.55	24.2	g	Tris	0.14 3.39
	MAT.56	0.01016	L	Ácido clorhídrico (HCl)	92.10 0.94
	MAQ.03	0.5	h	Agitador magnético	0.01 0.01
	MAQ.10	2.25	h	Equipo de electroforesis (MINIPROTEAN)	0.02 0.05
	MAT.25	0.1685	L	Agua destilada	0.20 0.03
	MAT.39	0.00255	L	Acrilamida-bisacrilamida	189.28 0.48
	MAT.41	0.0001	L	Persulfato amónico	130.56 0.01
	MAT.42	0.000015	L	TEMED	2,790.00 0.04
	MAT.44	1	L	TrisGlicina SDS 1X	9.20 9.20
	MAT.34	0.000037	L	Fibronectina (FN)	34,491.00 1.28
	MAT.47	0.5	L	Azul de Coomassie	3.32 1.66
	MO.01	4	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00 48.00
	MO.03	8	h	Cotutor/a responsable del proyecto	45.00 360.00
	%0400	4	%	Costes indirectos	425.09 17.00
	%0404	4	%	Recursos auxiliares	442.09 17.68
Precio total subcapítulo "Electroforesis SDS-PAGE":					459.77

4. Liberación de FN_d y FN_m						
4.1	5.01	u	Liberación de FN_d y FN_m			
	MAT.48	1	u	Kit DuoSet ELISA	640.00	640.00
	MAT.32	0.001068	L	DPBS	175.00	0.19
	MO.01	5	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	60.00
	%0400	4	%	Costes indirectos	700.19	28.01
	%0404	4	%	Recursos auxiliares	728.20	29.13
Precio total subcapítulo "Liberación de FN_d y FN_m":						757.33
5. Liberación de HGF						
5.1	6.01	u	Encapsulación del HGF en hidrogeles			
	MAT.50	0.07	u	Marcador fluorescente (kit DyLight-488 NH Ester)	249.00	17.43
	MAT.49	0.0001	L	Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)	41,450.00	4.15
	MAT.32	0.02	L	DPBS	175.00	3.50
	MAT.52	1	u	Paquetes de tampones borato	4.63	4.63
	MAT.22	2	u	Mini membrana de diálisis (10K MWCO)	4.24	8.48
	MO.01	2	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	24.00
	%0400	4	%	Costes indirectos	62.19	2.49
	%0404	4	%	Recursos auxiliares	64.68	2.59
Precio total subcapítulo "Encapsulación del HGF en hidrogeles":						67.27
5.2	6.03	u	Medición y cuantificación de la liberación			
	MO.01	3	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	36.00
	MO.03	3	h	Cotutor/a responsable del proyecto	45.00	135.00
	%0400	4	%	Costes indirectos	171.00	6.84
	%0404	4	%	Recursos auxiliares	177.84	7.11
Precio total subcapítulo "Medición y cuantificación de la liberación":						184.95
6. Cultivo celular						
6.1	7.01	u	Suspensión celular			
	MAT.32	0.01	L	DPBS	175.00	1.75
	MAT.54	0.01	u	Tripsina	409.50	4.10
	MAQ.07	0.05	h	Ultracentrifuga	0.13	0.01
	MO.03	1	h	Cotutor/a responsable del proyecto	45.00	45.00
	%0400	4	%	Costes indirectos	50.86	2.03
	%0404	4	%	Recursos auxiliares	52.89	2.12
Precio total subcapítulo "Suspensión celular":						55.01
6.2	7.02	u	Encapsulación celular en hidrogeles			

	MAT.24		9	u	Filtro 0.22	18.00	162.00
	%0400		4	%	Costes indirectos	162.00	6.48
Precio total subcapítulo "Encapsulación celular en hidrogeles":							168.48
6.3	7.03	u	Estudio de la viabilidad celular				
	MAT.53		1	u	Kit LIVE/DEAD Cell Viability Assay	834.00	834.00
	MAQ.01		0.5	h	Estufa 37°C	0.01	0.01
	MO.03		2	h	Cotutor/a responsable del proyecto	45.00	90.00
	%0400		4	%	Costes indirectos	924.01	36.96
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	960.97	38.44
Precio total subcapítulo "Estudio de la viabilidad celular":							999.41
7. Equipos de protección individual y seguridad							
7.1	8.01	u	EPIs				
	EPI.01		1	u	Bata de laboratorio	22.50	22.50
	EPI.02		4	u	Guantes de látex (caja)	5.95	23.80
	EPI.03		1	u	Máscara de gases	30.50	30.50
	%0400		4	%	Costes indirectos	76.80	3.07
Precio total subcapítulo "EPIs":							79.87
8. Material inventariable/fungible							
8.1	9.01	u	Material inventariable/fungible				
	MAT.01		1	u	Pinzas de laboratorio	8.73	8.73
	MAT.02		3	u	Espátula metálica	3.66	10.98
	MAT.03		1	u	Micropipeta 1000 µL	215.00	215.00
	MAT.04		1	u	Micropipeta 200 µL	215.00	215.00
	MAT.05		1	u	Micropipeta 100 µL	215.00	215.00
	MAT.06		1	u	Micropipeta 20 µL	215.00	215.00
	MAT.07		1	u	Micropipeta 10 µL	215.00	215.00
	MAT.08		3	u	Caja puntas micropipeta 1000 µL	65.25	195.75
	MAT.09		3	u	Caja puntas micropipeta 200 µL	39.16	117.48
	MAT.10		3	u	Caja puntas micropipeta 100 µL	65.25	195.75
	MAT.11		3	u	Caja puntas micropipeta 20 µL	60.20	180.60
	MAT.12		3	u	Caja puntas micropipeta 10 µL	52.60	157.80
	MAT.13		50	u	Tubo Eppendorf 2 mL	0.08	4.00
	MAT.14		200	u	Tubo Eppendorf 1.5 mL	0.07	14.00
	MAT.15		300	u	Tubo Eppendorf 0.5 mL	0.05	15.00
	MAT.16		1	u	Placa petri 80 mm	1.13	1.13
	MAT.17		21	u	Viales de cristal 50 mL	0.17	3.57
	MAT.18		21	u	Tapas viales de cristal 50 mL	0.01	0.21
	MAT.19		5	u	Placas de pocillo profundo P-48	2.81	14.05
	MAT.20		2	u	Placas de pocillo negras P-96	5.52	11.04

	MAT.21		1	u	Vaso de precipitados 25 mL	3.56	3.56
	MAT.23		2	u	Falcon de ultracentrifuga 50 mL	0.10	0.20
	MAT.57		10	u	Pipeta Pasteur	0.02	0.20
	%0400		4	%	Costes indirectos	2,009.05	80.36
Precio total subcapítulo "Material inventariable/fungible":							2,089.41
9. Reuniones de proyecto							
9.1	10.01	u	Reuniones de planificación				
	MO.01		20	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	240.00
	MO.02		30	h	Tutor/a responsable del proyecto	45.00	1,350.00
	MO.03		30	h	Cotutor/a responsable del proyecto	45.00	1,350.00
	%0400		4	%	Costes indirectos	2,940.00	117.60
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	3,057.60	122.30
Precio total subcapítulo "Reuniones de planificación":							3,179.90
9.2	10.02	u	Reuniones de resultados				
	MO.01		5	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	60.00
	MO.02		5	h	Tutor/a responsable del proyecto	45.00	225.00
	MO.03		5	h	Cotutor/a responsable del proyecto	45.00	225.00
	%0400		4	%	Costes indirectos	510.00	20.40
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	530.40	21.22
Precio total subcapítulo "Reuniones de resultados":							551.62
9.3	10.03	u	Redacción/correcciones				
	MO.01		180	h	Graduado/a de Ingeniería Biomédica	12.00	2,160.00
	MO.02		10	h	Tutor/a responsable del proyecto	45.00	450.00
	MO.03		10	h	Cotutor/a responsable del proyecto	45.00	450.00
	%0400		4	%	Costes indirectos	3,060.00	122.40
	%0404		4	%	Recursos auxiliares	3,182.40	127.30
Precio total subcapítulo "Redacción/correcciones":							3,309.70

Tabla 17. Cuadro de precios descompuestos.

6. CUADRO DE PRESUPUESTOS PARCIALES

En la Tabla 6 se presenta el cuadro de presupuestos parciales, en el que se recoge el presupuesto agrupado por capítulos.

CUADRO DE PRESUPUESTOS PARCIALES						
Presupuesto parcial nº 1. Síntesis de hidrogeles						
Núm.	Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
1.1 Síntesis de hidrogeles sin FN para reología						
1.1.1	02.01.01	u	Gelificación hidrogeles 350 µL sin FN	2	45.97	91.94
1.1.2	02.01.02	u	Gelificación hidrogeles 350 µL sin FN Ratio 1:0.75	3	41.27	123.81
1.1.3	02.01.03	u	Gelificación hidrogeles 350 µL sin FN Ratio 1:0.5	3	36.24	108.72
1.1.4	02.01.04	u	Gelificación hidrogeles 300 µL sin FN Ratio 1:1	1	43.15	43.15
1.1.5	02.01.05	u	Gelificación hidrogeles 300 uL sin FN Ratio 1:0.75	2	39.01	78.02
1.1.6	02.01.06	u	Gelificación hidrogeles 300 µL sin FN Ratio 1:0.5	2	34.85	69.70
1.1.7	02.01.07	u	Gelificación hidrogeles 100 µL para encapsulación celular Ratio 1:1	1	42.58	42.58
1.1.8	02.01.08	u	Gelificación hidrogeles 100 µL para encapsulación celular Ratio 1:0.75	1	41.19	41.19
1.1.9	02.01.09	u	Gelificación hidrogeles 100 uL para encapsulación celular Ratio 1:0.5	1	39.80	39.80
1.2 Síntesis hidrogeles 200 µL						
1.2.1	02.02.01	u	Gelificación hidrogeles 200 µL sin FN Ratio 1:1	1	39.48	39.48
1.2.2	02.02.02	u	Gelificación hidrogeles 200 µL sin FN Ratio 1:0.75	2	34.38	68.76
1.2.3	02.02.03	u	Gelificación hidrogeles 200 µL sin FN Ratio 1:0.5	2	29.75	59.50
1.2.4	02.02.04	u	Gelificación hidrogeles 250 µL con FN	1	44.77	44.77
1.3 Síntesis hidrogeles 50 µL						
1.3.1	02.03.01	u	Gelificación hidrogeles 50 µL sin FN y sin HGF	1	22.07	22.07
1.3.2	02.03.02	u	Gelificación hidrogeles 50 uL con FN	2	43.56	87.12
1.3.3	02.03.03	u	Gelificación hidrogeles 50 µL con HGF	1	41.48	41.48
1.3.4	02.03.04	u	Gelificación hidrogeles con FN	2	44.02	88.04
Total presupuesto parcial nº 1. Síntesis de hidrogeles:					1,090.13	
Presupuesto parcial nº 2. Caracterización de hidrogeles						
Núm.	Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
2.1 Medición de propiedades mecánicas in situ						
2.1.1	03.01.01	u	Medición de propiedades mecánicas in situ	17	21.09	358.53
2.2 Medición de propiedades mecánicas en hidrogeles gelificados/hinchados						
2.2.1	03.02.01	u	Medición de propiedades mecánicas en hidrogeles gelificados/hinchados	24	6.59	158.16

2.3 EWC						
2.3.1	03.03.01	u	EWC	2	165.94	331.88
Total presupuesto parcial nº 2. Caracterización de hidrogeles:					848.57	
Presupuesto parcial nº 3. Desnaturalización de FN						
Núm.	Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
3.1	4.01	u	Desnaturalización de FN	2	75.77	151.54
3.2	4.02	u	Medición de eficiencia de la desnaturalización	2	3.90	7.80
3.3	4.04	u	Electroforesis SDS-PAGE	2	459.77	919.54
Total presupuesto parcial nº 3. Desnaturalización de FN:					1,078.88	
Presupuesto parcial nº 4. Liberación de FN_d y FN_m						
Núm.	Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
4.1	5.01	u	Liberación de FN _d y FN _m	1	757.33	757.33
Total presupuesto parcial nº 4. Liberación de FN_d y FN_m:					757.33	
Presupuesto parcial nº 5. Liberación de HGF						
Núm.	Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
5.1	6.01	u	Encapsulación del HGF en hidrogeles	1	67.27	67.27
5.2	6.03	u	Medición y cuantificación de la liberación	1	184.95	184.95
Total presupuesto parcial nº 5. Liberación de HGF:					252.22	
Presupuesto parcial nº 6. Cultivo celular						
Núm.	Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
6.1	7.01	u	Suspensión celular	1	55.01	55.01
6.2	7.02	u	Encapsulación celular en hidrogeles	1	168.48	168.48
6.3	7.03	u	Estudio de la viabilidad celular	1	999.41	999.41
Total presupuesto parcial nº 6. Cultivo celular:					1,222.90	
Presupuesto parcial nº 7. Equipos de protección individual y seguridad						
Núm.	Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
7.1	8.01	u	EPIs	1	79.87	79.87
Total presupuesto parcial nº 7. Equipos de protección individual y seguridad:					79.87	
Presupuesto parcial nº 8. Material inventariable/fungible						
Núm.	Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
8.1	9.01	u	Material inventariable/fungible	1	2,089.41	2,089.41
Total presupuesto parcial nº 8. Material inventariable/fungible:					2,089.41	
Presupuesto parcial nº 9. Reuniones de proyecto						
Núm.	Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
9.1	10.01	u	Reuniones de planificación	1	3,179.90	3,179.90
9.2	10.02	u	Reuniones de resultados	1	551.62	551.62
9.3	10.03	u	Redacción/correcciones	1	3,309.70	3,309.70
Total presupuesto parcial nº 9. Reuniones de proyecto:					7,041.22	

Tabla 18. Cuadro de presupuestos parciales.

7. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL Y POR CONTRATA

Presupuesto de ejecución material

	Importe (€)
1. Síntesis de hidrogeles	1090.13
2. Caracterización de hidrogeles	848.57
3. Desnaturalización de FN	1078.88
4. Liberación de FN _a y FN _m	757.33
5. Liberación de HGF	252.22
6. Cultivo celular	1,222.90
7. Equipos de protección individual y seguridad	79.87
8. Material inventariable/fungible	2,089.41
9. Reuniones de proyecto	7,041.22
Total:	14,460.53

Asciende el presupuesto de ejecución material a la expresada cantidad de TRECE MIL QUINIENTOS OCHENTA Y DOS EUROS CON ONCE CÉNTIMOS.

Tabla 19. Presupuesto de ejecución material.

Presupuesto de ejecución material	14,460.53
13% de gastos generales	1,879.87
0% de beneficio industrial	0.00
Suma	16,340.40
21% IVA	3,431.48
Presupuesto de ejecución por contrata	19,771.88

Asciende el presupuesto de ejecución por contrata a la expresada cantidad de DIECINUEVE MIL QUINIENTOS CINCUENTA Y SEIS EUROS CON OCHENTA Y OCHO CÉNTIMOS.

Tabla 20. Presupuesto de ejecución por contrata.