



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

Curso Académico:

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores José Luis y Rosa por darme la oportunidad de haber realizado este trabajo final de carrera. Asimismo, gracias José Luis por todo lo aprendido en este periodo, y gracias Rosa, por enseñarme, ayudarme y soportarme en cada día (y noche) de laboratorio.

De igual modo, me gustaría agradecer a todo el personal del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) por estar siempre dispuestos a ayudar, por compartir vuestra experiencia y, sobre todo, por vuestro trato personal. En este sentido me llevo grandes compañeros, sin los cuales se habría hecho un poco cuesta arriba tantas horas de trabajo. Y, en especial, gracias Julia por animarme cuando los bajones podían conmigo y gracias Laura, por ser compañera y amiga dentro y fuera del CBIT, por tus golosinas, por las notas antes de irte y por acompañarme hasta la hora del cierre.

Hacer también una mención especial a mi familia ya que sin su esfuerzo y apoyo nada de esto hubiese sido posible. En especial, gracias a mi madre, mi padre y mi hermana, por darlo todo por mí y enseñarme así que, con esfuerzo, todo es posible.

Por último, no puedo acabar estos agradecimientos sin dedicar unas palabras a Alfredo, la persona con quien más tiempo he pasado estos años en Valencia, de quién he aprendido a ser más fuerte y a crecer profesional, pero, sobre todo, personalmente. Gracias por estar siempre, en las buenas y la no tan buenas, ya que contigo no puedo decir que haya habido unas “malas”.

Resumen

La expansión y diferenciación de las células madre mesenquimales supone uno de los pasos clave dentro de las terapias enfocadas a la regeneración de tejido con técnicas de ingeniería tisular. Este trabajo busca combinar las ventajas de los materiales sintéticos y naturales para desarrollar medios de cultivo tridimensionales en los que las células encuentren superficies adherentes y, por otra parte, puedan desarrollar interacciones célula-célula en tres dimensiones. Así, los medios de medios de cultivos estarán basados en micropartículas poliméricas de un polisacárido con otras de un poliéster biodegradable, que tendrán unos rangos de tamaños reproducibles a nivel celular para guiarla diferenciación *in vitro* de células madre mesenquimales (MSCs).

Para el desarrollo del sistema de cultivo 3D, se han evaluado y optimizado los métodos de fabricación de las micropartículas, obteniendo, por un lado, microesferas de ácido poliláctico en un rango de tamaños 150-200 μm , que proporcionan una superficie lo suficientemente rígida y químicamente compatible para permitir la adhesión celular, y por otro lado, microesferas de quitosano de tamaños equivalentes. Además de la fabricación de las microesferas, se ha analizado y caracterizado sus estructuras mediante lupa binocular y microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), sus propiedades mecánicas mediante un ensayo de compresión confinada, así como el grado de hinchado en el caso de las esferas de quitosano.

En lo relativo a la caracterización biológica, se han llevado a cabo ensayos biológicos con células madre mesenquimales de médula ósea porcina en tres entornos tridimensionales de cultivo distintos, basados en microesferas de PLLA, microesferas de CHT y mezcla de ambos materiales, respectivamente, con el objetivo de caracterizar la viabilidad, proliferación y diferenciación celular con los sistemas materiales desarrollados.

Palabras clave: microesferas, células madre mesenquimales, cultivo 3D, proliferación celular, diferenciación osteogénica, ingeniería tisular.

Resum

L'expansió i diferenciació de les cèl·lules mare mesenquimales suposa un dels passos clau dins de les teràpies enfocades a la regeneració de teixit amb tècniques d'enginyeria tisular. Este treball busca combinar els avantatges dels materials sintètics i naturals per a desenrotllar busca desenvolupar mitjans de cultiu tridimensionals en què les cèl·lules troben superfícies adherents i, d'altra banda, puguen desenrotllar interaccions cèl·lula-cèl·lula en tres dimensions. Així, els mitjans de cultius estaran basats en micropartícules polimèriques d'un polisacàrid amb un altre d'un polièster biodegradable, que tindran uns rangs de grandàries reproduïbles a nivell cel·lular per a guiar la diferenciació in vitro de cèl·lules mare mesenquimals (MSCs) .

Per al desenvolupament del sistema de cultiu 3D, s'han avaluat i optimitzat els mètodes de fabricació de les micropartícules, obtenint, d'una banda, microesferes d'àcid polilàctic en un rang de grandàries 150-200 μm , que proporcionen una superfície prou rígida i químicament compatible per a permetre l'adhesió cel·lular, i d'altra banda, microesferes de quitosano de grandàries equivalents. A més de la fabricació de les microesferes, s'ha analitzat i caracteritzat les seues estructures per mitjà de lupa binocular i microscòpia electrònica d'agranat d'emissió de camp (FESEM) , les seues propietats mecàniques per mitjà d'un assaig de compressió confinada, així com el grau d'unflat en el cas de les esferes de quitosano.

Quant a la caracterització biològica, s'han dut a terme assajos biològics amb cèl·lules mare mesenquimals de medul·la òssia porcines en tres entorns tridimensionals de cultiu distints, basats en microesferes de PLLA, microesferes de CHT i mescla d'ambdós materials, respectivament, amb l'objectiu de caracteritzar la viabilitat, proliferació i diferenciació cel·lular amb els sistemes materials desenvolupats.

Paraules clau: microesferes, cèl·lules mare mesenquimales, cultiu 3D, proliferació cel·lular, diferenciació osteogènica, enginyeria tisular"

Abstract

The expansion and differentiation of mesenchymal stem cells is one of the key aspects within therapies focused on the regeneration of tissue with tissue engineering techniques. This work seeks to combine the advantages of synthetic and natural materials to develop three-dimensional culture environment in which the cells find adherent surfaces and, on the other hand, can develop cell-cell interactions in three dimensions. Thus, the culture system will be based on polymer microparticles of a polysaccharide with others of a biodegradable polyester, which will have a range of cell-level reproducible sizes to guide in vitro differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs).

For the development of the 3D culture system, the microparticle manufacturing methods have been evaluated and optimized, obtaining, on the one hand, polylactic acid microspheres in a size range 150-200 μm , which provide a sufficiently rigid surface and chemically compatible to allow cell adhesion and, on the other hand, chitosan microspheres of equivalent sizes. In addition to the manufacture of the microspheres, their structures have been analyzed and characterized by stereoscopic microscope and field scanning electron microscopy (FESEM), their mechanical properties by means of a confined compression test, as well as the degree of swelling in the case of the chitosan spheres.

Regarding to biological characterization, biological assays with porcine bone marrow mesenchymal stem cells were carried out in three different three-dimensional culture environments, based on PLLA microspheres, CHT microspheres and mixing of both materials, respectively, with the objective of characterizing cell viability, proliferation and differentiation with developed material systems.

Key words: microspheres, mesenchymal stem cells, 3D cell culture, cell proliferation, osteogenic differentiation, tissue engineering.

Abreviaturas

ALP	Fosfatasa alcalina
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas
BM-MSCs	Células madre mesenquimales de médula ósea
CaPs	Fosfatos cálcicos
CHT	Quitosano
CLF	Cloroformo
DMBA	Diaminobenzaldehido
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DMMB	Tinción azul 1,9-dimetilmetileno
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiamotetraacético
FBS	Suero bovino fetal
FESEM	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo
GAGs	Glicosaminoglicanos
HA	Ácido hialurónico
HCl	Ácido clorhídrico
MSCs	Células madre mesenquimales
Mw	Peso molecular promedio en masa
OCP	Fosfato octocálcio
PBE	Buffer de digestión
PCL	Policaprolactona
pNNP	p-nitrofenilfosfato
PGA	Ácido poliglicólico
PMMA	Polimetilmetacrilato
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Copolímero de ácido poliláctico y ácido poliglicólico
PLLA	Ácido poliláctico
P/S	Penicilina/streptomicina
PU	Poliuretano
PVA	Alcohol polivinílico
RGD	Secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (Arginina-Glicina-Aspártico)
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta

Índice de figuras

Figura 1. El origen y las correspondientes localizaciones de las células óseas. Bone cell biology: the regulation of development, structure and function in the skeleton. Am J Anat. 1988; 183:1-44.	2
Figura 2. Representación de la guía del comportamiento celular por medio de las características biofísicas del sustrato. (Leach & Whitehead, 2017).....	5
Figura 3. Esquema sobre la preferencia de diferenciación de las hMSCs hacia osteoblastos y adipocitos o células del músculo liso (CML) en función de la densidad de siembra celular en cultivo in vitro con medio de diferenciación.....	7
Figura 4. Esquema representativo de como la extensión celular puede ser regulada mediante cambios en la composición, propiedades mecánicas, topografía y geometría de los biomateriales (Yulin Li, Xiao, & Liu, 2017)	14
Figura 5. Representación esquemática de las características biofísicas de los biomateriales sobre la diferenciación de las MSCs. (Los parámetros físicos tienen el mismo color que sus tipos celulares correspondientes)	15
Figura 6. Montaje para la transformación de PLLA cristalino a PLLA amorfo.....	21
Figura 7. Montaje para la fabricación de las microesferas de PLLA.....	22
Figura 8. Esquema del montaje y procedimiento simplificado para la producción de las microesferas de quitosano.....	24
Figura 9. Esquema de la máquina del ensayo de compresión confinada y el montaje realizado.	27
Figura 10. Esquema del proceso de desarrollo del sistema de microesferas volumen-volumen para cada uno de los materiales empleados.	29
Figura 11. Imágenes representativas obtenidas por lupa binocular de las microesferas producidas a, a) 150 rpm, b) 200 rpm, c) 300 rpm, d) 750 rpm.	38
Figura 12. Distribución de diámetros de las esferas de PLLA a distintas velocidades de agitación. La representación se corresponde con el porcentaje de esferas contabilizadas en cada uno de los intervalos de tamaño establecidos	39
Figura 13. Comparación entre microesferas de PLLA aglomeradas a 500 rpm (a) y no aglomeradas a 750 rpm (b).....	40
Figura 14. Imágenes obtenidas mediante FESEM de las microesferas de PLLA producidas a 150 rpm (a), 300 rpm (b), 750 rpm (c,d). Se exponen las dos tandas de producción de las microesferas de PLLA para comprobar que la estructura esférica se presentaba en ambas.	42
Figura 15. Microesferas de PLLA al 6% w/v (izquierda) y al 10% w/v (derecha), ambas obtenidas a 200 rpm. Imágenes obtenidas mediante lupa binocular.	43
Figura 16. Microesferas obtenidas tras la optimización del proceso con quitosano al 2,5% w/v, a un voltaje de 4 kV (a), 6 kV (b), 8kV (c) y 10 kV (d). Imágenes tomadas mediante lupa binocular.	44
Figura 17. Distribución de tamaño de las microesferas de quitosano a los diferentes voltajes.	45

Figura 18. Microesferas de quitosano 10 kV en estado hinchado (a) y tras ser secadas mediante desecador (b).....	46
Figura 19. Microesferas de quitosano liofilizadas. a) Microesferas en las paredes del vial manteniendo su estructura esférica; (b) Microesferas en el fondo del vial presentando una morfología aplastada. Imágenes tomadas con lupa binocular	47
Figura 20. Curvas de tensión-deformación para las muestras de PLLA.....	48
Figura 21. Curvas de tensión-deformación para las muestras de CHT	49
Figura 22. Curvas de tensión-deformación para las muestras de CHT:PLLA	50
Figura 23. Valor módulo promedio de los sistemas de microesferas de CHT:PLLA y los sistemas de microesferas CHT. Estos han sido analizados mediante t-test ($p < 0,05$) haciendo uso del programa GraphPad Prism 7.03.....	50
Figura 24. Curva de calibrado para el ensayo de DNA a día 0	51
Figura 25. Curva de calibrado para el ensayo de DNA a día 14	52
Figura 26. Representación a escala logarítmica del número de células adheridas en cada sistema material de microesferas. Se ha empleado esta escala para obtener una mejor visualización y comparación de los resultados.	53
Figura 27. Curva de calibrado para el ensayo de ALP a día 0.....	54

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los biomateriales en función con su comportamiento dentro del cuerpo humano	8
Tabla 2. Características que deberían cumplir idealmente los biomateriales enfocados a ser usados como un sustituto óseo.	11
Tabla 3. Tabla de estándares para obtener curva de calibrado en el ensayo de DNA	32
Tabla 4. Tabla de estándares para obtener curva de calibrado en el ensayo de ALP.....	33
Tabla 5. Tabla de estándares para obtener curva de calibrado en el ensayo de GAGs.....	34
Tabla 6. Tabla de estándares de hidroxiprolina para obtener curva de calibrado en el ensayo de colágeno total.....	37
Tabla 7. Estadísticos descriptivos de las esferas de PLLA en función de la velocidad de agitación. Los parámetros que se presentan fueron obtenidos mediante el software de imagen imageJ y el software de análisis estadístico GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Inc, California).....	40
Tabla 8. Estadísticos descriptivos para las esferas de quitosano a distintos voltajes.....	45
Tabla 9. Grado de hinchado promedio de las microesferas de quitosano empleando el proceso de liofilización para obtener el peso seco.	46
Tabla 10. Resultados del ensayo fosfatasa DNA a tiempo 0 (24 h), tiempo 1 (día 0) y tiempo 14 (día 15).	52
Tabla 11. Resultados del ensayo fosfatasa alcalina a tiempo 0 (24 h), tiempo 7 (día 8) y tiempo 14 (día 15).....	54
Tabla 12. Resultados de glicosaminoglicanos a tiempo 0 (24 h) y tiempo 14 (día 15).	55

Índice

Documento I: Memoria

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades del tejido óseo	1
1.1.1 Componentes celulares del tejido óseo	1
1.1.2 Patologías y defectos óseos	3
1.2 Estrategias en ingeniería tisular para la regeneración ósea.....	4
1.2.1 Células madre mesenquimales (MSC).....	4
1.2.2 Biomateriales empleados en regeneración ósea	8
1.2.3 Quitosano (CHT)	12
1.2.4 Ácido poli-L-láctico (PLLA)	13
1.3 Células mesenquimales en entorno 3D.....	14
1.4 Antecedentes. Uso de microesferas para cultivo celular.....	16
4.1 Materiales y reactivos	20
4.2 Obtención y caracterización de las microesferas.....	20
4.2.1 Obtención de microesferas de PLLA.....	20
4.2.2 Distribución de tamaños de las microesferas de PLLA obtenidas.....	23
4.2.3 Caracterización morfológica de las microesferas de PLLA.....	23
4.2.4 Obtención de microesferas de quitosano	23
4.2.5 Distribución de tamaños de las esferas de quitosano.....	25
4.2.6 Caracterización del hinchado de las microesferas de quitosano	25
4.2.7 Ensayo mecánico de compresión confinada	26
4.3 Esterilización de los materiales	27
4.4 Cultivos celulares.....	28
4.4.1 Aislamiento y cultivo de las BM-MSCs porcinas.....	28
4.4.2 Acondicionamiento de los materiales	29
4.4.3 Proceso de siembra en cultivo celular con microesferas	30
4.4.4 Digestión celular	31
4.4.5 Ensayo de cuantificación de DNA.....	32
4.4.6 Actividad de fosfatasa alcalina (ALP).....	33
4.4.7 Ensayo de glicosaminoglicanos	34
4.4.8 Cuantificación de colágeno total.....	35

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
5.1 Fabricación y caracterización morfológica de las microesferas de PLLA	38
5.2 Fabricación y caracterización morfológica de las microesferas de quitosano	43
5.3 Caracterización del hinchado de las microesferas de quitosano	46
5.4 Caracterización mecánica de las microesferas.....	48
5.5 Cultivos celulares de las microesferas poliméricas y las MSCs	51
6. CONCLUSIONES	57
7. LÍNEAS FUTURAS	58
8. BIBLIOGRAFÍA.....	59

Documento II: Presupuesto

1. OBJETIVOS Y ESTRUCTURA	69
2. PRESUPUESTO DESGLOSADO.....	70
2.1 Cuadros de precios descompuestos por capítulos.....	70
2.2 Presupuesto de ejecución material por capítulos.....	77
3. RESUMEN DEL PRESUPUESTO	79

DOCUMENTO I: Memoria

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del tejido óseo

El hueso es un tejido conectivo mineralizado que es calificado como dinámicamente activo debido a que se encuentra en continua renovación por la actuación conjunta de los tipos celulares existentes en el mismo, convirtiéndolo en el único tejido capaz de regenerar en la mayor parte de ocasiones tras un traumatismo sin formación de tejido cicatricial.

La matriz ósea está compuesta por una fase orgánica y otra fase inorgánica. La fase orgánica está integrada en un 90% por colágenos (principalmente de tipo I) que son responsables de la resistencia a tracción y una porción restante de proteínas no colágenas (osteopontina, osteocalcina, sialoproteína ósea, TGF- β , BMPs). Por otro lado, la fase inorgánica está formada por hidroxapatita carbonatada no estequiométrica en su mayor parte, la cual proporciona la resistencia a compresión.

Se trata de uno de los tejidos más duros del cuerpo humano siendo constituyente principal del esqueleto, sirviendo, así, como soporte de las estructuras físicas y dando protección a los órganos vitales. Asimismo, el hueso se caracteriza por estar altamente vascularizado y por servir como depósito mineral para la homeostasis del nivel de calcio en sangre (Feng, 2009).

1.1.1 Componentes celulares del tejido óseo

A nivel celular, se pueden distinguir básicamente tres tipos celulares: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los **osteoblastos** son células derivadas de las células madre mesenquimales (MSCs), que se encuentran en la superficie del hueso (Figura 1) son identificados como formadoras de hueso, siendo los encargados de la síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea y de supervisar el proceso de mineralización mediante la secreción de fosfatasa alcalina. Cuando los osteoblastos alcanzan la madurez absoluta, estos pueden desaparecer por apoptosis, transformarse en células de revestimiento o en osteocitos. Las células de revestimiento óseo son células metabólicamente inactivas, cuya función, aunque sigue siendo discutida, se ha dicho que juega un papel de regulación en el proceso de reabsorción ósea y que participan también en la diferenciación osteoclástica (Downey & Siegel, 2006; Nakamura, 2007)

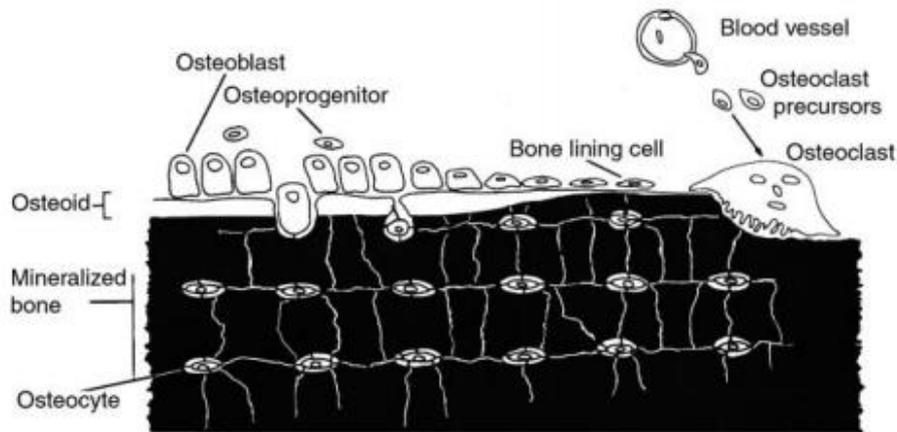


Figura 1. El origen y las correspondientes localizaciones de las células óseas. Bone cell biology: the regulation of development, structure and function in the skeleton. Am J Anat. 1988; 183:1-44.

Una vez los osteoblastos alcanzan ese estadio terminal de diferenciación y quedan rodeados totalmente por osteoide o matriz ósea, se forman los **osteocitos**, los cuales, ya incapaces de dividirse mitóticamente, componen más de un 90% de las células del hueso. A medida que estas células van madurando y se va generando más matriz, los osteocitos van quedando embebidos en lagunas óseas (*lacunae*), las cuales se encuentran rodeadas por matriz ósea calcificada y conectadas unas a otras mediante una serie de canalículos. Estas extensiones citoplasmáticas forman, así, un sincitio celular que posibilita la comunicación osteocítica con las prolongaciones de osteocitos vecinos y con células del revestimiento óseo del entorno permitiendo, de esta forma, abastecer a los osteocitos de nutrientes y oxígeno provenientes de los capilares sanguíneos.

La red interconectada va a llevar también a los osteocitos a que sean capaces de actuar como mecanosensores, transmitiendo cargas y presiones. La sensibilidad a deformaciones mecánicas promueve la traslación de los estímulos mecánicos en señales bioquímicas permitiendo que los osteocitos participen, no sólo en la síntesis de matriz sino también en el proceso de control de la resorción ósea, de una forma más o menos limitada. (Florencio-Silva, Sasso, Sasso-Cerri, Simões, & Cerri, 2015)

Por último, los **osteoclastos** son células de origen hematopoyético encargadas de la resorción ósea, manteniendo la homeostasis del hueso, y que estructuralmente se diferencian del resto de células óseas por su gran tamaño y múltiples núcleos.

1.1.2 Patologías y defectos óseos

Como ya se ha comentado anteriormente, el hueso es un tejido muy vascularizado lo cual es una característica estructural imprescindible para la nutrición y regeneración del mismo. Sin embargo, existen ciertas patologías y condiciones fisiológicas (traumatismos, infecciones, cáncer, alteración metabólica) en las que el defecto óseo alcanza un tamaño crítico a partir del cual el tejido óseo pierde la capacidad de osteoinducción espontánea. En este sentido, la técnica quirúrgica más empleada actualmente para reparar este tipo de defectos es el **injerto de hueso autólogo** (autoinjerto) ya que se evitan los problemas asociados al rechazo inmune o la transmisión de enfermedades. Sin embargo, este método presenta ciertas desventajas como son la cantidad disponible de hueso del paciente y el dolor generado tras la extracción, además de que pueden ser reabsorbidos antes de la regeneración completa y ser menos efectivos cuando se tienen defectos irregulares (Li et al., 2015). Por otro lado, debido a la a que la formación de vasos en el hueso ocurre de forma centripeta (de la periferia al centro del defecto), se ha visto que sistemas de relleno basados en partículas muestran una mejor colonización vascular que los que se presentan en forma de bloques (Duque et al., 2009).

En el campo de la biomecánica también se han usado técnicas que van desde el empleo de prótesis fijas hasta estrategias que favorezcan la regeneración ósea. Entre ellas, la más efectiva es la **osteogénesis por distracción** (Ej: distractor de Ilizarov), la cual se basa en la aplicación de tensión gradual sobre los extremos del defecto, de forma que se fomenta la neoformación ósea longitudinal en dirección del vector fuerza. Esta técnica presenta unas grandes visiones de futuro, sobre todo, cuando se habla de ella en combinación con la ingeniería tisular. Así, los estudios actuales se están focalizando más hacia el desarrollo y la aplicación de sustitutos óseos generados a partir de ingeniería tisular, un concepto que une aspectos de la biología celular, la biomecánica humana y la ciencia de los materiales para formar sistemas que suplan las carencias hasta ahora presentadas.

1.2 Estrategias en ingeniería tisular para la regeneración ósea

1.2.1 Células madre mesenquimales (MSC)

Las **células madre mesenquimales** (MSCs) son un tipo de células no especializadas procedentes del estroma con capacidad de autorrenovación y que presentan potencialidad para diferenciarse en diversos linajes celulares. Estas características las convierten en un punto clave dentro de la Ingeniería Tisular, aunque hoy en día siguen existiendo diversos problemas asociados a su traslación clínica como son el mantenimiento del fenotipo durante el cultivo *in vitro*, la heterogeneidad de los grupos celulares o las estrategias óptimas para conseguir la reparación deseada (Chamberlain, Fox, Ashton, & Middleton, 2007).

Fueron las primeras células de origen no hematopoyético que se aislaron de médula ósea, pudiendo ser expandidas durante varios pases de cultivo sin perder la capacidad para diferenciarse. Sin embargo, para poder detectar la presencia de MSCs dentro de la médula ósea, dónde conviven varios tipos celulares, se han definido algunos estándares para aislar las células en base a su relativa facilidad para ser obtenidas (Via, Frizziero, Oliva, & Oliva, n.d.), así como por sus propiedades de adherencia durante el cultivo en monocapa (la cual sirve para diferenciarlas del linaje hematopoyético) y la expresión de antígenos específicos de superficie como el CD105⁺, CD90⁺, CD73⁺ y CD45⁻ (Lin, Xin, Dai, & Lue, 2013). Asimismo, estas son capaces de secretar determinadas señales tróficas, angiogénicas e inmunomoduladoras.

Dentro del campo de la Ingeniería Tisular, para aprovechar las características de las MSCs, los biomateriales que interaccionen con las mismas deben poseer ciertos requisitos que idealmente se resumen en bioactividad, biodegradabilidad y bicompatibilidad, de forma que se puedan reproducir las características de la ECM natural de manera lo más análoga posible. Una vez cumplido esto, será necesario tener en cuenta la interacción de las células con el material en tanto que sea posible la adhesión de estas. El evento de adhesión al sustrato resulta imprescindible por el hecho de que las MSCs necesitan un anclaje, ya que, de lo contrario, entrarían en quiescencia o incluso apoptosis por la ausencia del mismo (proceso también conocido como 'anoikis')(Anderson, Sahoo, Ulijn, Dalby, & Anderson, 2016).

En este sentido, se está desarrollando el estudio de como guiar la diferenciación de las MSCs hacia el fenotipo deseado mediante la modificación de las propiedades biofísicas de los materiales que actúan como sustratos, la cuales incluyen composición, características mecánicas, porosidad o topografía (Figura 2). Esta guía es llevada a cabo a través de integrinas (Figura 2A, representadas por los colores marrón y gris) las cuales se unen a secuencias peptídicas (Figura 2A, representadas en verde y morado) de la ECM promoviendo la adhesión, proliferación y diferenciación de las MSCs.

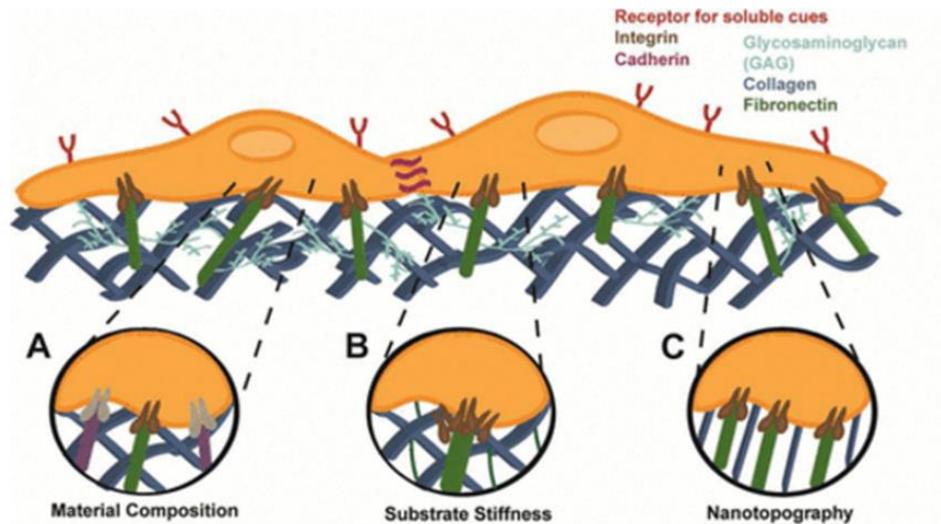


Figura 2. Representación de la guía del comportamiento celular por medio de las características biofísicas del sustrato. (Leach & Whitehead, 2017).

Las MSCs también reconocen la rigidez de la matriz mediante la agrupación de integrinas transmembrana (Figura 2B), lo cual determina la extensión de las células y su fuerza de anclaje, uniendo el citoesqueleto intracelular a la ECM. Los cambios en el citoesqueleto generan una cascada de señales que son transducidas al núcleo, modulando la expresión génica y generando, así, cambios en el fenotipo celular. Otro factor influyente sobre el comportamiento celular es la topografía (Figura 2C), la cual puede determinar el alineamiento celular y aumentar las adhesiones focales y la polimerización de la actina.

La médula ósea como fuente de células madre mesenquimales

Una gran variedad de estudios resalta la posibilidad de uso de las MSCs derivadas de médula ósea para aplicaciones ortopédicas y de regeneración tisular ósea como alternativa al empleo de osteoblastos comprometidos. En médula ósea se han definido dos grupos de células madre presentes en la misma: células madre hematopoyéticas (dan lugar a las células de la sangre), y MSCs. La fuente por excelencia de aislamiento de MSCs ha sido la médula ósea, aunque también pueden provenir y ser aisladas de una extensa variedad de tejidos y órganos alternativos (tejido adiposo, músculo esquelético, sangre de cordón umbilical y gelatina de Wharton's, pulpa dental, líquido amniótico, piel, sistema nervioso...) (Via et al., n.d.). No obstante, los tejidos más empleados son la médula ósea, la sangre de cordón umbilical y el tejido adiposo. Aunque todos ellos presentan las características nativas de las MSC's, el mantenimiento de estas, su diferenciación, así como la morbilidad del tejido tras la extracción, varía según el método empleado. (Rebelatto et al., 2008).

En médula ósea, el 0.001-0.01% de las células mononucleares son MSCs (Beyer Nardi & Da Silva Meirelles, 2006), mostrándose un éxito de aislamiento del 100% para las mismas y una formación de monocapa en cultivo entre los días 3 y 4. Sin embargo, cuando las MSCs son extraídas de esta fuente, resulta necesario tener en cuenta aspectos como la edad del donante (ya que disminuyen su tasa de proliferación y diferenciación con la misma) o la invasividad del procedimiento para la extracción de la muestra. Por ello, las dificultades de uso de MSCs a partir de médula ósea radican más en el procedimiento de extracción de la muestra y la selección adecuada de los pacientes, y no tanto en la calidad y/o caracterización de las mismas, como ocurre en otras fuentes como el tejido adiposo, en el que se expresa de forma temprana el antígeno CD34 (marcador de células hematopoyéticas/células endoteliales, no mesenquimales) o en las obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical, con una menor tasa de eficiencia en el aislamiento y cierta incapacidad de diferenciación adipogénica. (Bieback, Kern, Klüter, & Eichler, 2004; Kern, Eichler, Stoeve, Klüter, & Bieback, 2006; Mitchell et al., 2006)

En humanos, el método tradicionalmente empleado para la obtención de MSCs a partir de médula ósea es la técnica de aspiración, en la que normalmente se introduce una aguja por la cresta ilíaca hasta alcanzar la médula para obtener la muestra, la cual es diluida posteriormente para obtener las células deseadas. Aunque también se han estudiado otras localizaciones posibles (tibia, fémur), estas han mostrado ser menos efectivas en cuanto a cantidad de MSCs obtenidas (Narbona-Carceles, Vaquero, Suárez-Sancho, Forriol, & Fernández-Santos, 2014).

Expansión y diferenciación in vitro de células madre mesenquimales

Como se ha comentado anteriormente, la capacidad de autorenovación de las MSCs resulta de gran interés. Sin embargo, estas células presentan un número limitado de pases *in vitro* antes de entrar en senescencia y parar su proliferación. En este sentido, varios estudios confirman que las MSCs de médula ósea (BM-MSCs) poseen una gran habilidad de expansión, mientras que las células derivadas de tejido adiposo y de tejido muscular pierden su capacidad proliferativa en los pases 7 y 4, respectivamente (Sakaguchi, Sekiya, Yagishita, & Muneta, 2005; Sekiya et al., 2002).

En lo relativo a expansión de MSCs, se ha visto que en un sistema de cultivo tridimensional se produce un mayor número de células que cuando este se realiza sobre placa de cultivo bidimensional, aumentando asimismo el potencial de estas para llegar a una diferenciación osteogénica y adipogénica. Asimismo, se sabe que la densidad de siembra celular es un factor que afecta al compromiso que adoptan las MSCs hacia un linaje u otro (Figura 3), lo cual puede venir dado por una disminución de la adhesión y expansión celular en el cultivo o por un aumento en el contacto célula-célula y en la señalización paracrina (Higuchi, Ling, Chang, Hsu, & Umezawa, 2013).



Figura 3. Esquema sobre la preferencia de diferenciación de las hMSCs hacia osteoblastos y adipocitos o células del músculo liso (CML) en función de la densidad de siembra celular en cultivo *in vitro* con medio de diferenciación.

Los resultados mostrados en la Figura 3 son los sugeridos para MSCs cultivadas con medio de diferenciación específico de cada linaje. Sin embargo, esto ha sido discutido en ciertos trabajos en los que estas células han sido cultivadas con y sin medio diferenciador, viéndose que no solo la densidad de siembra afecta al compromiso de las MSCs. En este sentido, irregularidades a escala nanométrica han mostrado estimular la diferenciación hacia osteoblastos en ausencia de medio diferenciador. Por otro lado, teniendo en cuenta que la geometría que adoptan las MSCs es otro factor clave en su diferenciación, es posible establecer una correlación entre topografía de sustrato, diferenciación y densidad celular, ya que la densidad de siembra determina el grado de extensión celular que guiará el comportamiento de las MSCs. (Chen et al., 2016)

1.2.2 Biomateriales empleados en regeneración ósea

Los biomateriales constituyen un componente integral en Ingeniería Tisular ya que son los que van a intentar reproducir la matriz extracelular nativa del tejido a regenerar o inducir a dicha regeneración al promover el crecimiento y diferenciación celular. Estos se clasifican en materiales metálicos, cerámicos, poliméricos (sintéticos o naturales) o composites según su estructura química y su origen natural o sintético, presentando así distintas características morfológicas y estructurales. Aunque todos ellos deben presentar el principio de biocompatibilidad, estos pueden ser clasificados a su vez como bioinertes, bioactivos o biodegradables, una vez entran en contacto con el cuerpo humano.

Tabla 1. Clasificación de los biomateriales en función con su comportamiento dentro del cuerpo humano

Materiales	Función	Ejemplos
Bioinertes	Promueven formación de cápsula fibrosa en la interfaz material-tejido. Resiste largos periodos de tiempo en ambientes corrosivos	Titanio, Cr-Co, Alúmina, Zircona
Bioactivos	Induce la formación de fuertes enlaces químicos entre tejido y material al reaccionar químicamente con los fluidos corporales.	Cerámicas, <i>Bioglass</i>
Biodegradables	Se van degradando a medida que van siendo reemplazados por el tejido huésped	Gran variedad de polímeros y cerámicas

Para que el uso de un biomaterial sea adecuado en regeneración ósea éste debe tener una composición y estructura química similar a la del hueso, de forma que sea posible la adhesión y proliferación celular y la deposición de matriz extracelular. Estos factores proporcionarán un ambiente adecuado para la regeneración ósea *in vivo* y, junto a ellos, será necesario mantener un ratio adecuado de degradación del biomaterial, el cual debe estar directamente asociado al ratio de regeneración del nuevo tejido (Willians, 1992).

Cuando estos materiales son usados solos deben expresar características o mecanismos que promuevan esa regeneración ósea, tales como la osteoconducción (Tabla 2). Este es el caso de las **biocerámicas bioactivas** (hidroxiapatita, β -TCP, OCP), las cuales poseen una excelente biocompatibilidad y una mejor estabilidad que los polímeros y metales en contacto con el cuerpo humano, pues tienen una estructura química que imita la fase mineral del hueso. Sin embargo, estas presentan ciertas desventajas como es la correcta mimetización y distribución del material (sobre todo en defectos complejos) o su inherente fragilidad.

Para superar estas deficiencias lo que se ha hecho es combinar dichas cerámicas con otros polímeros sintéticos, como son los poliésteres, de forma que sea posible obtener un composite que aúne, por un lado, las características de resistencia mecánica y osteoconductividad propias de los fosfatos cálcicos con la buena afinidad celular y biodegradabilidad características de los poliésteres (Arvidson et al., 2011).

Por otro lado, cuando un biomaterial se emplea asociado a determinadas biomoléculas y/o células, este presenta comportamientos variables dependiendo de si su naturaleza es biológica o sintética. Así, por un lado, los **materiales naturales** tales como colágeno, fibrina, quitosano, alginato, seda y ácido hialurónico han sido empleados en diversos campos y, especialmente en regeneración ósea, por presentar una bioactividad que les permite interactuar de forma prácticamente espontánea con las células al entrar en contacto con ellas. Además, la mayoría de polímeros naturales se caracterizan por ser biocompatibles y biodegradables.

Uno de los biomateriales naturales más empleados es el **colágeno**, siendo este la proteína más abundante en el cuerpo humano y, en concreto, el mayor componente del tejido óseo. Se caracteriza por ser un biomaterial biocompatible, biodegradable y osteoconductor, pudiendo adoptar distintas formas de producción (geles, nanofibras, espumas, soluciones inyectables). Sin embargo, para mejorar sus propiedades mecánicas e intentar simular la composición orgánico-natural del hueso, el colágeno se ha combinado con fosfatos cálcicos (CaPs), formando sistemas biomiméticos que facilitan la adhesión y proliferación celular, así como un incremento en la osteoconducción, la osteointegración y la osteogénesis cuando es implantado *in vivo*. Por otro lado, la **gelatina**, al ser la forma desnaturalizada del colágeno, presenta características similares a este, pero con una mayor solubilidad en agua y un menor coste, consiguiéndose asimismo mejorar sus propiedades al encontrarse en forma de composite (Polo-Corrales, Latorre-Esteves, & Ramirez-Vick, 2014).

Otro biopolímero natural ampliamente usado en las últimas décadas es el **quitosano**, un polisacárido cargado positivamente, gracias a lo cual puede interactuar electrostáticamente con moléculas y membranas de carga negativa. Presenta una excelente biocompatibilidad, lo cual juega también un papel importante en la modulación de la morfología y diferenciación celular, y se ha visto que es muy versátil en cuanto a realizar modificaciones sobre el mismo, permitiendo realizar estudios que han llegado a calificarlo como un material osteoconductor (R.A.A. Muzzarelli et al., 1994). En este sentido, el quitosano es uno de los pocos compuestos que cumplen las necesidades de bioactividad, biodegradabilidad y osteoconductividad a la vez, haciéndolo un biomaterial idóneo para su empleo en regeneración ósea.

En contraposición al quitosano, el **alginato** se presenta como un polisacárido cargado negativamente que suele ser empleado en forma de hidrogeles, los cuales suelen formarse por reticulación con cationes divalentes (como el Ca^{2+}) (Sun et al., 2012). En el caso del **ácido hialurónico**, este se caracteriza más por su excelente viscoelasticidad y su solubilidad en agua, siendo también idóneo en una amplia gama de aplicaciones en regeneración ósea. Sin embargo, los materiales naturales siguen presentando a día de hoy problemas que derivan principalmente en la funcionalización y la fabricación de estos, lo cual ha dado paso a que se recurra a otras alternativas naturales que tengan propiedades superiores, como el caso de la **seda**, adecuada sobre todo a la regeneración de hueso, cartílago y ligamentos (Anadón & Luis, 2008).

Pero por lo que cada vez se está mostrando un mayor interés es en el estudio de **materiales sintéticos**, los cuales, además de mostrar una procesabilidad y características más adaptables, pueden ser combinados con los materiales naturales para formar composites que reúnan las propiedades adecuadas, tanto a nivel biológico como estructural (Yu, Tang, Gohil, & Laurencin, 2015).

Como ya se ha comentado, uno de los principales objetivos en IT es implantar un scaffold que pueda mantener su estructura y propiedades durante el tiempo necesario para que se dé la formación de nuevo tejido, pero que finalmente desaparezca, es decir, se degrade siendo reemplazado por dicho tejido. Así, dentro de las familias de polímeros sintéticos biodegradables más empleados en regeneración ósea destacan los poliésteres alifáticos, sobre todo el **ácido poliláctico (PLA)**, el **ácido poliglicólico (PGA)** y su **copolímero (PLGA)**, los cuales son hidrolizados por el cuerpo humano generando producto para el mismo, cumpliendo así los principios de biocompatibilidad y biodegradabilidad. De hecho, estos polímeros, junto con la PCL y sus respectivos copolímeros, han sido aprobados por la FDA (*US Food and Drug Administration*) para su uso *in vivo* en diferentes aplicaciones clínicas. Así, otro poliéster ampliamente empleado es la **policaprolactona (PCL)**, la cual ha estado más enfocada a la fabricación de implantes a largo plazo ya que, debido a su mayor cristalinidad e hidrofobicidad (en comparación con los poliésteres anteriores), su ratio de degradación es bastante lento, del orden de años. (Pitt et al., 1990)

Aunque estos poliésteres poseen ciertas desventajas como la presentación de zonas no reconocibles a nivel celular o la baja osteoconductividad, estas han sido superadas mediante la modificación superficial y/o estructural de dichos materiales a través de métodos tales como la inmovilización de moléculas bioactivas (péptidos y proteínas), recubrimientos de dopamina o su combinación con nanopartículas de hidroxiapatita (Kao et al., 2015; Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010; Wang et al., 2013). Además, estos polímeros también se caracterizan por presentar una estructura altamente hidrófoba que, como ya se ha comentado anteriormente, podría ser una desventaja para la regeneración del tejido, se han introducido una serie de técnicas de modificación superficial como el tratamiento por plasma (aunque sus efectos no son permanentes) o la combinación con materiales naturales (colágeno, quitosano) que ha permitido solventar este problema (Wu, Shaw, Lin, Lee, & Yang, 2006).

El problema de estos polímeros biodegradables es que resulta complicado conseguir un equilibrio adecuado entre su grado de degradación *in vivo* y la formación del nuevo tejido. Por ello, también existen otros polímeros que están recibiendo un gran interés en campo óseo, en especial los **poliuretanos (PUs)**, con los cuales es posible obtener un rango más amplio de propiedades morfológicas y mecánicas en comparación con los polímeros biodegradables empleados habitualmente, mostrando a su vez una buena adhesión celular y niveles favorables de diferenciación osteogénica (Zanetta et al., 2009). De hecho, se han desarrollado PUs biodegradables y no porosos que muestran características mecánicas similares a los PMMAs (metacrilatos) empleados como cementos óseos (Guelcher et al., 2008).

Actualmente, en el empleo de todos ellos en regeneración ósea se está apostando por la incorporación de cerámicas bioactivas en las matrices poliméricas (HA/PLA, fosfato tricálcico/PLGA, HA/PLC, Colágeno/HA, PGA/ β -TCP) para conseguir las propiedades necesarias para el diseño de un sustituto óseo (Puppi et al., 2010), tal y como se ha comentado anteriormente.

Sin embargo, no hay un biomaterial óptimo, sino que existen una gran cantidad de variables a tener en cuenta tales como la geometría que se le da para un tamaño de defecto concreto, las características bioquímicas y biológicas del biomaterial, así como los costes y consideraciones éticas asociadas a las complicaciones del proceso quirúrgico. Aun así, idealmente un sustituto óseo debería cumplir las siguientes características (Bose, Roy, & Bandyopadhyay, 2012):

Tabla 2. Características que deberían cumplir idealmente los biomateriales enfocados a ser usados como un sustituto óseo.

CARACTERÍSTICAS	FUNCIÓN
BIOCOMPATIBILIDAD	Capacidad de entrar en contacto con el tejido vivo sin causar una reacción tóxica, dañina o fisiológica ni un rechazo inmunológico
BIODEGRADABILIDAD	Capacidad de descomponerse temporalmente como resultado de una actividad biológica y/o química
OSTEOINDUCCIÓN	Capacidad de inducir la diferenciación de las células mesenquimales indiferenciadas en osteoblastos que formen tejido óseo
OSTEOCONDUCCIÓN	Función estructural para favorecer la invasión de vasos sanguíneos y la formación de nuevo tejido óseo
PROPIEDADES MECÁNICAS	Debe combinar la capacidad de soportar idealmente las cargas sobre el tejido óseo y la transmisión de estas
VASCULARIZACIÓN	Capacidad de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos que proporcionen oxígeno y nutrientes a las células

1.2.3 Quitosano (CHT)

El quitosano es un polímero natural, derivado de la desacetilación de la quitina, que presenta grupos amino e hidroxilo reactivos, los cuales posibilitan la funcionalización y modificación química del material con el objetivo de obtener un comportamiento físico y/o biológico determinado. Estructuralmente, se trata de un polímero semicristalino cuya solubilidad depende del grado de desacetilación o, lo que es lo mismo, de la cantidad de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano. Así, mientras que a pH mayores que 7 es insoluble en soluciones acuosas, cuando se encuentra en ácidos diluidos se produce una protonación de los grupos amino que da lugar a que el quitosano quede cargado positivamente, mejorando dicha solubilidad (Croisier & Jérôme, 2013,). Esto es lo que explica que sea soluble en medios ácidos, en los que se genera la conversión del polisacárido en un polielectrolito por protonación del grupo amino de la unidad de repetición D-glucosamina (Riccardo A A Muzzarelli, 2009). En este sentido, el ácido acético se ha presentado como medio idóneo de disolución del quitosano por las propiedades de viscosidad de la solución, así como de otros parámetros relacionados con la solubilidad, como es el grado de protonación (Rinaudo & Desbrieres, 1999)

Esta naturaleza policationica resulta de gran interés en ingeniería tisular ya que permite su interacción electrostática con moléculas aniónicas de interés como son los glicosaminoglicanos (GAGs) o los proteoglicanos (Dutta, n.d.; El-sherbiny & El-baz, 2015), lo cual da paso a una correcta organización de la matriz extracelular. Además, presenta una baja reacción a cuerpo extraño, así como una actividad antibacteriana intrínseca y propiedades hemostáticas. Se ha dicho que estas últimas podrían estar asociadas a la presencia de esas cargas positivas presentes en la cadena del quitosano, las cuales interaccionarían con las membranas de bacterias y células (cargadas negativamente), respectivamente (Croisier & Jérôme, 2013)

Además, presenta una biocompatibilidad inherente que viene dada, en su mayor parte parte, por presentar una estructura molecular similar a la de los glicosaminoglicanos (GAGs), lo cual juega también un papel importante en la modulación de la morfología y diferenciación celular. De hecho, ciertos investigadores han hecho uso de esta característica y lo han empleado en la fabricación de microesferas de PLGA (hidrófobo) para promover la adhesión celular (Mitra et al., 2012).

Todas estas propiedades, lo han convertido en un material idóneo para distintas aplicaciones de regeneración de piel, nervios, cartílago y hueso (Riccardo A A Muzzarelli, 2009). Concretamente en regeneración ósea, el uso del quitosano ha venido dado por sus características de biodegradabilidad, biocompatibilidad, osteoconductividad, y por su relativa fácil procesabilidad (Przekora, 2014). En este sentido, se podría destacar que promueve el reclutamiento de células osteoprogenitoras y la adhesión celular, así como la diferenciación de las MSC hacia el linaje osteoblástico (Kim et al., 2003). De hecho, es posible realizar cambios en la porosidad del quitosano en tanto que sus propiedades de osteoconductividad y formación ósea se ven mejoradas tanto *in vitro* como *in vivo* (Cruz et al., 2010).

1.2.4 Ácido poli-L-láctico (PLLA)

El poli (ácido L-láctico)(PLLA), tras su aprobación por la FDA (US Food and Drug Administration) a principios de los 70's para su uso *in vivo*, ha ido recibiendo un interés progresivo en aplicaciones médicas y farmacéuticas, no sólo por sus propiedades sino también por otros aspectos de interés como es su disponibilidad total a partir de fuentes naturales (Rasal, Janorkar, & Hirt, 2010).

Respecto a sus características físico-químicas, se trata de un esteroisómero del ácido poliláctico (PLA) que se caracteriza por ser un polímero **biocompatible** metabolizado por el organismo, que presenta algunas características como son la **biodegradabilidad**, basada en la hidrólisis, y unas **propiedades mecánicas** adecuadas que han permitido su uso en una amplia gama de aplicaciones en ámbito biomédico (suturas, liberación de fármacos...), y más concretamente en regeneración ósea (Casalini et al., 2011; Gunatillake, Adhikari, & Gadegaard, 2003). De hecho, su uso ha estado enfocado en gran parte al campo de ortopedia ya que, además de las propiedades descritas anteriormente, presenta un módulo elástico similar al del hueso cortical (Qureshi et al., 2014). De igual modo, se ha visto que es posible obtener un ratio de degradación del polímero que, no solo se adecua al del hueso (6 meses a 2 años, dependiendo del tipo y forma del implante), sino que también permite mantener sus propiedades mecánicas características durante la regeneración de dicho tejido (Qi et al., 2014).

Otro factor importante a tener en cuenta de este polímero es que, por su pertenencia a la familia de los poliésteres, presenta una superficie **hidrofóbica** que hace que los grupos funcionales a los que se unen las moléculas activas no sean expuestos, lo cual no es lo más adecuado en términos de adhesión y proliferación celular (Armentano et al., 2009). Por tanto, en este tipo de materiales resulta necesario el empleo de técnicas que aumenten la interacción célula-material, de forma que se pueda guiar el comportamiento celular. En este sentido, existe una gran variedad de técnicas de modificación superficial, como son la inmovilización de moléculas bioactivas (fibronectina, secuencias peptídicas RGD), el tratamiento de plasma, la irradiación UV, los tratamientos láser, la hidrólisis, la aminólisis (Zhu, Mao, & Gao, 2013) o la inmovilización covalente de dendrímeros amino terminales (Katzur et al., 2012), todos ellos desarrollados para llevar a cabo modificaciones químicas y/o físicas sobre las superficies de los poliésteres. Estos cambios resultan de gran interés ya que se ha mostrado algunos de ellos, como es el incremento de la rigidez o la disminución del ángulo de contacto (aumento de la hidrofiliidad), aumentan la adhesión de las MSCs al sustrato (Armentano et al., 2009; Dalby, Gadegaard, & Oreffo, 2014)

Otra de las propiedades ampliamente estudiada en polímeros y, especialmente en el PLLA es la **crystalinidad** debido a su notable influencia sobre las características del mismo. El PLLA estereoregular es semicristalino con una temperatura de transición vítrea situada en torno a los 60°. Por otro lado, presente una temperatura de fusión que, aunque teóricamente se sitúa en torno a los 207 °C, debido a la presencia de pequeños cristales en forma de imperfecciones, ciertas ramificaciones e impurezas, llevan a considerar esta de aproximadamente 170-180 °C (Rasal et al., 2010).

1.3 Células mesenquimales en entorno 3D

En las últimas décadas, se ha venido prestando un gran interés por el estudio de las características topográficas de las superficies 2D y sus posibles efectos sobre la respuesta celular debido a que se han presentado como experimentos de relativa fácil accesibilidad y reproducibilidad. Sin embargo, el reto ahora es reproducir el comportamiento celular, pero a nivel 3D, puesto que la mayoría de células humanas residen en microambientes que requieren una reconstrucción más compleja, como ocurre en el caso del hueso.

Los sistemas 2D y 3D presentan ciertas similitudes en aspectos de adhesión y contracción celular, pero difieren en muchos otros como puede ser la composición de las adhesiones focales o la morfología celular. En los microambientes 3D, a diferencia de lo que ocurre en los sustratos 2D, las adhesiones focales y fibrilares pueden darse de manera simultánea en un mismo lugar, y además, proporcionar una serie de señales bioquímicas y físicas que regulan de forma temporoespacial las funciones celulares de una manera más eficiente (Cukierman, 2001; Wozniak, Modzelewska, Kwong, & Keely, 2004). Asimismo, los ambientes tridimensionales presentan unos mayores grados de libertad en términos de rigidez, lo cual permite variar parámetros geométricos de estos, confiriéndoles a las células una forma más redondeada o más alargada, con menor o mayor número de adhesiones focales, respectivamente.

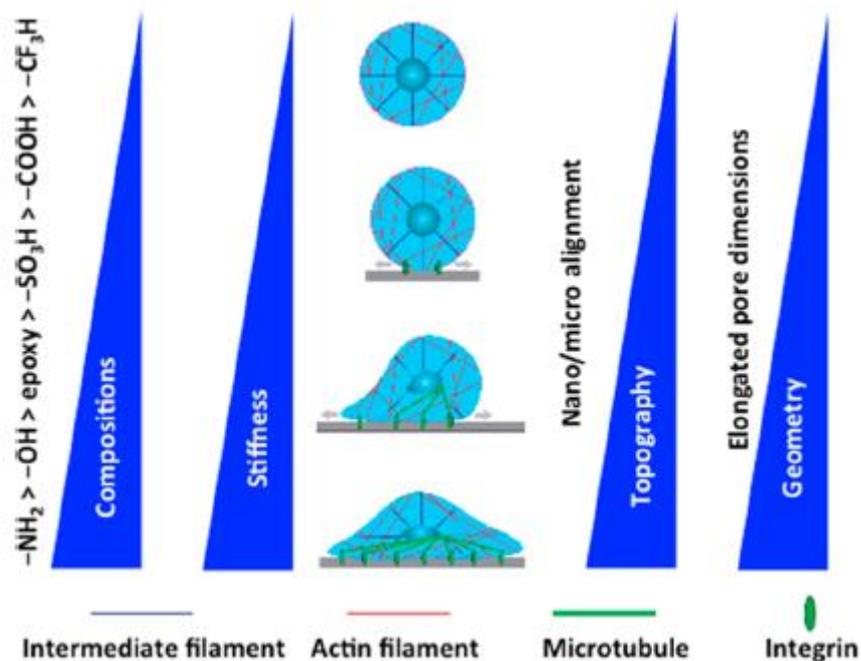


Figura 4. Esquema representativo de como la extensión celular puede ser regulada mediante cambios en la composición, propiedades mecánicas, topografía y geometría de los biomateriales (Yulin Li, Xiao, & Liu, 2017)

Estas adhesiones determinan cómo se van a ir extendiendo las células y, por tanto, la morfología final de las mismas. En este sentido, materiales con composiciones específicas y determinadas propiedades mecánicas y estructurales podrán generar cambios a nivel celular. Así, por ejemplo, substratos con carga positiva (modificados con grupos $-CF_3H$, $-COOH$, $-SO_3H$, epoxy, $-OH$ y NH_2) y una hidrofiliidad moderada (ángulo de contacto $40-60^\circ$) favorecerán esta situación de expansión (Figura 4), al igual que en substratos con elevada rigidez, en los que se obtendrán formas celulares más alargadas (Arima & Iwata, 2007; Chang et al., 2014). Además, se ha visto que en varios tipos de células la proliferación se podría ver inhibida cuando estas interactúan con superficies que no son lo suficientemente rígidas, como es el caso de las células madre, en las es necesario que el sustrato presente un módulo de Young de al menos 100 Pa (Figura 4).

En el caso específico de hueso, un módulo elástico de 25-40 kPa resulta suficiente en una superficie bidimensional para favorecer la osteogénesis (Guilak et al., 2009). Por otro lado, están los métodos de cultivo 3D incentivan las interacciones célula-células y célula-ECM, promoviendo la secreción paracrina de citoquinas terapéuticas por parte de estas y permitiendo, así, una mayor supervivencia celular (Xu, Shi, Xu, & Zhang, 2016).

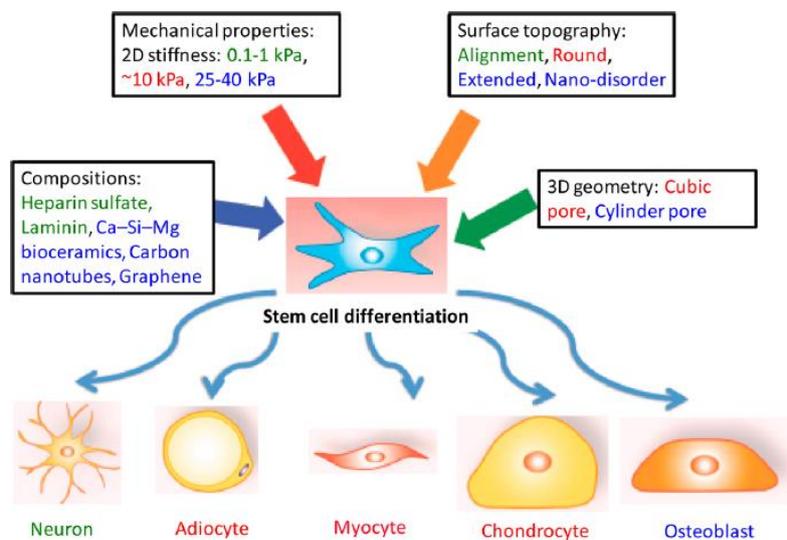


Figura 5. Representación esquemática de las características biofísicas de los biomateriales sobre la diferenciación de las MSCs. (Los parámetros físicos tienen el mismo color que sus tipos celulares correspondientes)

En referencia a la hidrofiliidad, se sabe que las células necesitan un ambiente hidrófilo para crecer. Sin embargo, se ha demostrado que cierta hidrofobicidad por parte del sustrato es necesaria para una mejor adhesión y crecimiento celular. La principal razón se fundamenta en el hecho de que una superficie totalmente hidrófila no permite la adsorción de las proteínas que regulan la adhesión celular (fibronectina, vitronectina, colágeno, laminina), por lo que se proponen, así, las superficies parcialmente hidrófobas como la mejor opción para ello (Ma & Su, 2013).

1.4 Antecedentes. Uso de microesferas para cultivo celular

El uso y estudio de microesferas (1-1000 μm) enfocadas a ingeniería tisular ha crecido de manera considerable en los últimos años, sobre todo para su empleo futuro como material inyectable. Pueden ser fabricadas mediante diversos métodos, entre los que destacan las emulsiones (simples o dobles), evaporación de solvente o las técnicas de *spray-drying*. Su empleo *in vitro* ha sido tradicionalmente llevado a cabo a través de cultivos en monocapa, en los que la literatura ha demostrado que las células poseen un comportamiento diferente cuando se compara con la configuración 3D: en 2D la proliferación suele ser mayor, pero a largo plazo las células pierden sus características fenotípicas (Leferink et al., 2015).

Aunque no son el método más empleado, resulta necesario destacar que las microesferas poseen una gran variedad de ventajas relativas a los materiales ya que su producción puede ser controlada por unos parámetros físicos concretos, consiguiendo el rango de tamaño deseado para la aplicación objetivo. Por otro lado, llevan asociada una mejor respuesta fisiológica por la posibilidad de emplearlas con terapias menos invasivas, permitiendo así un proceso de recuperación más rápido. Además, permiten la remodelación del tejido mientras las células van generando su propia matriz, sin ser este un proceso dependiente de factores como la degradación del material.

En la realización de este tipo de cultivos tridimensionales una de las técnicas empleadas es el uso de microesferas, con distintos enfoques dependiendo del propósito final de estudio. En algunos casos, lo que se ha hecho es la encapsulación de células en microesferas poliméricas (Mansouri, Salehi, Omrani, Niknam, & Ardehshiryajimi, 2017; Yuan, Leong, & Chan, 2011) de forma que es posible retener las características celulares y de fenotipo, un paso imprescindible para entender la fisiología de un tejido concreto, así como evaluar la diferenciación y expresión de ciertos marcadores característicos.

Por otro lado, también se han realizado cultivos con microesferas para estudiar interacción de las estas con ciertos grupos celulares para fines concretos, viéndose que el tamaño y forma de las esferas no siempre debe ser mínimo y totalmente esférico, respectivamente (Foster, Yazdanian, & Audus, 2001). Así, por ejemplo, Foster et al. comprobaron que en la respuesta fagocítica de las células pulmonares sería preferible un tamaño menor mientras que para la liberación controlada de fármacos un tamaño mayor es lo esencial.

En otros casos, la funcionalidad de las microesferas ha estado más enfocada a actuar como superficie de adherencia y guía durante el cultivo celular. En este sentido, Mitra et al. emplearon dicha estructura para ver la eficacia de ciertas drogas quimioterapéuticas sobre la respuesta de células tumorales, haciendo uso de microesferas de PLGA-gelatina para simular dicho comportamiento *in vivo*. A estas se les adicionó quitosano para solventar los problemas celulares asociados a la hidrofobicidad del PLGA ya que, aunque la gelatina por si sola ya posee secuencias RGD que promueven la adhesión y migración celular, su combinación con el quitosano mejora dicho aspecto. Además, la estructura

porosa facilitaba la infiltración de las células proliferativas, comprobándose, a su vez, que este tipo de estructuras promovían la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (colágenos y fibronectina).

El estudio sobre micropartículas poliméricas también ha sido llevado a cabo por el grupo de Biomateriales e Ingeniería tisular (CBIT) de la Universidad Politécnica de Valencia para la regeneración de cartílago, en el que se usaban células del espacio subcondral del propio animal mediante una incisión y estas entraban en contacto con las micropartículas, las cuales se ha visto que favorecen la adhesión y migración celular, dando paso a una regeneración exitosa del cartílago del animal. Algo parecido es lo que se quiere probar en este trabajo, pero enfocado al tejido óseo, de forma que se compruebe si las microesferas de quitosano y PLLA promueven la diferenciación ósea *in vitro* de las MSCs y si, por tanto, pueden considerarse materiales adecuados para ser empleados como soporte tridimensional en regeneración ósea.

2. MOTIVACIÓN

En las últimas décadas, se ha experimentado un aumento en la expectativa de vida de la población global, así como cambios en los estilos de vida, que han supuesto, en general, un incremento en los casos de fracturas, las cuales quedan también directamente relacionadas con enfermedades y traumatismos que suponen un desgaste y pérdida del tejido óseo. De hecho, este tejido es el segundo más trasplantado del mundo, produciéndose una media de 4 millones de injertos o sustitos óseos y un total de 15 millones de fracturas en todo el mundo de forma anual (Brydone, Meek, & Maclaine, 2010). Para la recuperación de esos pacientes, resulta necesario el desarrollo de técnicas o mecanismos que promuevan y no comprometan sus condiciones de vida. En este sentido, la Ingeniería Tisular juega un papel importante en el desarrollo de biomateriales y soportes que sean capaces reemplazar, reparar o inducir dicha regeneración ósea.

Dentro de la Ingeniería Tisular, las microesferas están recibiendo actualmente especial atención para ser empleadas en regeneración ósea debido a sus características y ventajas, en tanto que actuarían como un soporte funcional que puede rellenar temporal o permanentemente la zona dañada, pudiendo también ser empleados como sistemas de liberación controlada de fármacos o, incluso, cumpliendo ambas funciones a la vez. Para conseguir el desarrollo de estos sistemas, resulta imprescindible su evaluación *in vitro* en tanto que sea posible ver y optimizar las características del sistema con el objetivo de obtener la respuesta celular deseada.

Por todo ello, la hipótesis de este trabajo se basa en el hecho de que empleando dos tipos de microesferas poliméricas con distintas características mecánicas, químicas y biológicas es posible inducir la diferenciación de las MSCs hacia el linaje osteogénico, con la motivación de que pueda servir en un futuro como ayuda a la neoformación ósea de un defecto mediante procedimientos mínimamente invasivos.

3. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo es el desarrollo un medio de cultivo 3D, basado en microesferas de PLLA y quitosano, en el que las células encuentren superficies a las que adherirse y, de igual forma, puedan desarrollar interacciones célula-células en un ambiente tridimensional en busca de llegar al fenotipo deseado. El papel de las esferas de PLLA es el de proporcionar una superficie más rígida, que sea química y estructuralmente afín a las células para permitir su adhesión, mientras que las de quitosano actuarían permitiendo la difusión de nutrientes y favoreciendo la vascularización, dos aspectos claves para la supervivencia celular.

Para alcanzar este propósito, será necesario y estudio y desarrollo de los siguientes **objetivos específicos**:

- Estudio bibliográfico de las características de las células madre mesenquimales y los aspectos clave para guiar su diferenciación, así como de los biomateriales que van a ser empleados para ello.
- Desarrollar microesferas en un rango de diámetros que vendrán dados por cambios en los parámetros que resulten significativos en su síntesis.
- Optimización del proceso de producción de las microesferas.
- Caracterización de la reproducibilidad de los tamaños y de las características superficiales de las microesferas mediante el análisis morfológico de estas.
- Caracterización del comportamiento de las esferas en medio húmedo, quedando aquí incluida su respuesta mecánica mediante un ensayo de compresión confinada.
- Caracterización biológica para evaluar la viabilidad y diferenciación de las células madre mesenquimales en el entorno de cultivo tridimensional desarrollado.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales y reactivos

Para la elaboración de las microesferas se ha empleado, por un lado, ácido poli(L-láctico) de grado médico de Corbion Purac (Purasorb PL-18), cloroformo (Scharlab) y poli(vinil alcohol) (Sigma-Aldrich) y por otro lado, quitosano de grado médico UP B 80/20, (NovaMatrix Protasan), hidróxido sódico (Scharlab), sulfato de sodio decahidratado (Sigma-Aldrich, Fluka Analytical) y ácido acético glacial (Scharlab).

En lo referente al cultivo celular se empleó de manera general medio DMEM High Glucose (Biowest) suplementado con 1% de penicilina/streptomina (100 ud/mL – 100 mg/mL) (Gibco) y FBS (Fetal Bovine Serum Hyclone) (Fisher). Para el proceso de tripsinización se hizo uso del reactivo Trypsin-EDTA (Solution A, 0.25% Trypsina and EDTA (1:5000) In Puck's Saline) (Invitrogen). Para los ensayos específicos de diferenciación, se detallan materiales y reactivos en la explicación de los mismo.

4.2 Obtención y caracterización de las microesferas

En el desarrollo de este trabajo se ha sintetizado dos tipos de microesferas poliméricas destinadas al cultivo celular, basadas en ácido poli-L-láctico y en quitosano, cada una con propiedades y funciones distintas.

4.2.1 Obtención de microesferas de PLLA

Antes de comenzar con la fabricación de las microesferas de PLLA se realizó una transformación de la estructura cristalina del PLLA a la estructura amorfa para facilitar la posterior disolución del polímero. El polímero tenía que ser calentado por encima de la temperatura de fusión (por eso se calentó a 210 °C) y ser enfriado lo suficientemente rápido para evitar que el adquiera de nuevo una estructura ordenada. En este proceso, con la estufa precalentada a 210 °C, se realizó un montaje sobre una rejilla metálica, tal como se muestra en la Figura 6, introduciendo previamente la grana de PLLA en el interior de los poros de un molde de teflón cilíndrico. Este montaje se mantuvo en el interior de la estufa durante 30-45 minutos, tras lo cual se retiraron las partes metálicas y se dejó secar al aire durante 5 minutos. El PLLA amorfo que quedaba entre los poros del molde sería el empleado en las emulsiones posteriores.

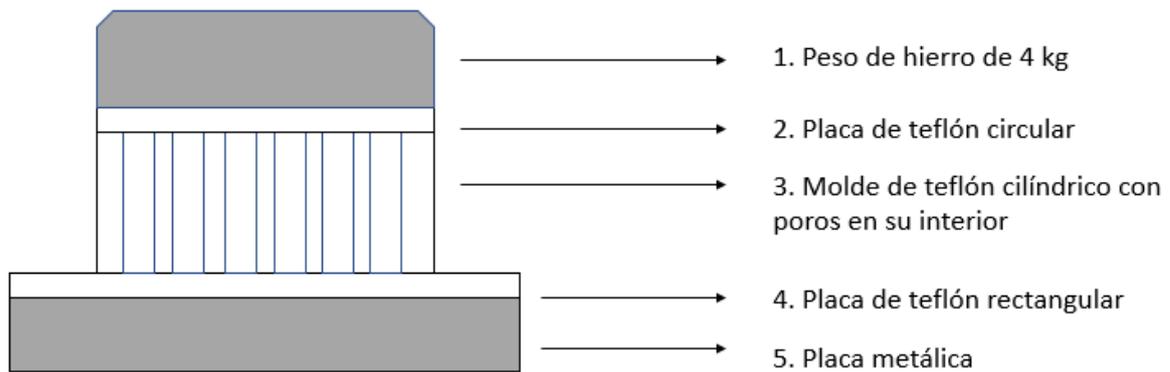


Figura 6. Montaje para la transformación de PLLA cristalino a PLLA amorfo

Las microesferas de PLLA se obtuvieron por el método de emulsión aceite/agua (O/W) con evaporación del disolvente. La fase no acuosa estaba formada por una disolución de PLLA en cloroformo al 3% w/v y la fase emulsificante (fase acuosa) consistía en una solución de PVA (polivinilalcohol) al 4% w/v. Tras esto, se procedió a homogeneizar las soluciones. La de PLLA se dejó en agitación magnética durante unas horas, mientras que la de PVA se mantuvo en estufa (Estufa de convección forzada, BINDER, Germany) a temperatura 85 °C durante 1-2 días, procediendo a su agitación cuando resultaba necesario.

Tras esto, se procedió a la disposición de la bomba de inyección de disoluciones (Syringe-Pump NE-1000, New Era Pump Systems Inc., Estados Unidos) y al montaje del equipo de agitación por emulsión. Una vez realizado el montaje, se puso en agitación a 300 rpm los 200 mL de fase acuosa para conseguir también su homogenización.

A continuación, se añadieron los 20 mL de la disolución de PLLA-CLF gota a gota sobre la sobre los 200 mL de la fase emulsificante, la cual estaría previamente ya a la velocidad correspondiente a la síntesis (200, 300, 500 o 750 rpm). Para realizar este goteo, se hizo uso de una jeringa de 20 mL acoplada a la bomba a una velocidad de 1mL/min. Una vez finalizado el goteo de toda la disolución, se esperó 30 minutos para que terminaran de romper las últimas gotas y, seguidamente, se añadieron 150 mL de agua desionizada para favorecer la evaporación del cloroformo. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 24 horas a la velocidad establecida según la síntesis. Tras finalizar este proceso de agitación, se realizaron cuatro lavados de las esferas con agua desionizada en un agitador orbital, en el cual se mantenían durante 2 horas. Tras esto, eran retiradas del orbital y, una vez las esferas se encontraban en el fondo del vaso de precipitado, se procedió a realizar el siguiente lavado.



Figura 7. Montaje para la fabricación de las microesferas de PLLA

Tras la emulsión y los correspondientes lavados, las microesferas fueron transferidas a una placa Petri de vidrio, con la mínima cantidad de agua posible, la cual se eliminó posteriormente por secado en estufa a 37°C. Tras finalizar dicho proceso, se separaron las esferas adheridas a la placa haciendo uso de una pequeña espátula metálica.

Por último, las esferas fueron sometidas a un tratamiento de plasma mediante la cámara de plasma Piccolo (Plasma Electronic, Alemania) para modificar las propiedades superficiales e incrementar la mojabilidad del material. Para ello, se realizó un tratamiento con gas argón y con los siguientes parámetros: presión inicial de gas de 50 Pa, flujo de gas 80%, tiempo de homogenización de 15 s, potencia del generador del 60% y tiempo de tratamiento de 600 s. A continuación, se introdujeron las microesferas en la cámara, estando previamente colocadas sobre la placa Petri pero sin cobertura, de forma que estuviesen lo bastante cerca del magnetrón (los iones se generan en un volumen cilíndrico de unos 10 cm de diámetro alrededor del mismo). Así, una vez se aplicó el primer tratamiento, se procedió a mover suavemente las esferas para realizar un segundo tratamiento análogo de forma que se abarcaran las superficies que no habían estado expuestas durante el primero.

4.2.2 Distribución de tamaños de las microesferas de PLLA obtenidas

Puesto que uno de los objetivos de este trabajo era estudiar el rango de tamaños de las microesferas de PLLA obtenidas con la respectiva variación paramétrica, se realizó una distribución de tamaños para cada una de estas situaciones. Para ello, previamente se obtuvieron las imágenes de las microesferas mediante lupa binocular (MZ APO, Leica Microsystems, Alemania). Tras ello, se realizó el procesamiento de dichas imágenes mediante el software de análisis ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, Estados Unidos), el cual posee la opción “Analyze Particles” que permitía obtener de forma automática los tamaños de las partículas. Sin embargo, este proceso no pudo ser totalmente automático para todas las esferas por la morfología obtenidas, ante lo que se decidió hacer uso de un diámetro equivalente para hallar el tamaño de estas.

4.2.3 Caracterización morfológica de las microesferas de PLLA

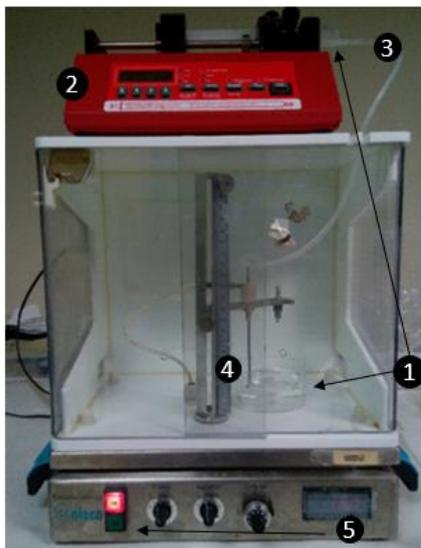
La morfología de las micropartículas de PLLA se observó mediante Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de campo (FESEM)(Ultra 55, Zeiss Auriga Compact, Alemania). Las imágenes fueron tomadas a 1 kV, obteniendo así una mayor resolución superficial de las esferas por una baja penetración del haz de electrones. Para observar la morfología estructural de estas esferas, se realizó un recubrimiento de platino en condiciones de vacío previo a la visualización en FESEM mediante el dispositivo JFC 1100 (JEOL, Japón).

4.2.4 Obtención de microesferas de quitosano

Las esferas de quitosano fueron sintetizadas mediante un proceso basado en la inyección de la disolución polimérica sobre un baño coagulante aplicando una diferencia de potencial. Esta metodología fue llevada a cabo en base a la habilidad de un campo eléctrico para deformar la interfase de una gota, de forma que, si se aplica un campo eléctrico sobre cualquier gota, la carga eléctrica genera una fuerza electrostática dentro de la gota (fuerza de Coulomb) que compite con las fuerzas cohesivas intrínsecas de la misma. Cuando esta fuerza de Coulomb supera la tensión superficial de la misma, esta rompe pudiendo alcanzar tamaños micro o incluso nanométricos.

Por otro lado, el baño coagulante estaba formado por una mezcla de etanol y solución precipitante formada por una base (NaOH), de manera que cuando ambas soluciones entran en contacto se produce una neutralización del ácido y la base, la cual da lugar a la formación de la esfera. Esta mezcla se preparó en una proporción volumétrica 30/70, respectivamente.

Así, previamente se prepararon las soluciones que componían la solución precipitante, en una proporción volumétrica 10/30/60, siendo estas soluciones hidróxido sódico (NaOH) 1M en agua desionizada, sulfato de sodio decahidratado ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) en agua desionizada y agua desionizada para el resto del volumen, respectivamente. Por otro lado, se preparó también una solución de quitosano 2,5% w/v en ácido acético glacial al 2% en agua desionizada, tras lo cual se mantuvo en nevera durante 2 días hasta la total disolución del polímero. Todas las disoluciones fueron filtradas para eliminar partículas del ambiente o restos no disueltos (en el caso del quitosano), evitando así la formación de esferas con partículas que pudieran interferir en posterior contacto celular.



- 1 Preparación del baño coagulante con solución precipitante y etanol
- 2 Bomba de inyección a velocidad 70 $\mu\text{L}/\text{min}$
- 3 Cargado de la disolución de quitosano en el tubo conectado a la jeringa
- 4 Colocación del electrodo a la altura establecida
- 5 Aplicación del voltaje requerido (4,6,8 ó 10 kV)

Figura 8. Esquema del montaje y procedimiento simplificado para la producción de las microesferas de quitosano.

Una vez se disponía de las soluciones, se procedió al montaje del encapsulador y el resto de componentes necesarios para realizar la síntesis de las microesferas. Así, se colocó un cristalizador de vidrio de 100 mL en una posición tal que el electrodo del encapsulador quedara parcialmente sumergido por su extremo. A continuación, se colocó una aguja de 0.2 mm (comprobando previamente que no estaba obstruida) en la parte inferior del conducto de inyección del encapsulador. Tras esto, se hizo uso de una jeringa de 12 mL que se conectó a una de las salidas de un tubo flexible, con el cual se cargó la solución de quitosano, previamente agitada. Esta solución se cargó lentamente para evitar la entrada de aire en el tubo flexible y que pudiera influir en el posterior flujo continuo de goteo. La otra parte del tubo se conectó al soporte que contenía a la aguja. Una vez hecho esto, se acopló la jeringa a una bomba de inyección, situada sobre el encapsulador, la cual dispensaría la solución polimérica a una velocidad de 70 $\mu\text{L}/\text{min}$. Antes de empezar el goteo, se añadió la solución precipitante y el etanol al cristalizador, manteniéndola en agitación magnética constante (40% de agitación).

Tras el proceso de montaje, se cerró el encapsulador y se puso en marcha la bomba. Una vez cayeron unas pocas gotas, se aplicó el voltaje correspondiente a la síntesis (4, 6, 8 o 10 kV) manteniendo la agitación de la solución precipitante. Finalizado el goteo de la solución, se quitó el potencial y se paró tanto la agitación como la bomba. Las esferas obtenidas se dejaron decantar y, a continuación, se retiró al máximo la solución precipitante. Tras esto, las esferas de quitosano fueron transferidas a recipientes de plástico de 400 mL para realizar los lavados de las mismas.

Para los lavados se empleó agua desionizada: se aspiraba el sobrenadante, se añadía agua limpia y, removiendo ligeramente, se dejaban decantar para volver a aspirar el agua del lavado, siempre evitando aspirar esferas. Se realizaron tantos lavados como fueran necesarios hasta que el pH del agua de lavado fuera aproximadamente neutro (4-5 lavados). Una vez alcanzado dicho pH, las esferas fueron transferidas a un tubo Falcon de 50 mL y completadas hasta el volumen total con agua miliQ. Tras esto, se almacenaron en nevera con un periodo inferior a una semana ya que el polímero se degrada con el tiempo.

4.2.5 Distribución de tamaños de las esferas de quitosano

Puesto que las microesferas de quitosano fueron obtenidas a varios voltajes, se llevó a cabo un análisis de cómo variaba el tamaño de las mismas al cambiar dicho parámetro. De forma análoga a lo que se hizo con las de PLLA, se obtuvieron las imágenes de las microesferas mediante lupa binocular (MZ APO, Leica Microsystems, Alemania), realizando un posterior procesamiento de estas imágenes mediante el software de análisis ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, Estados Unidos). Este proceso tuvo que ser manual debido tanto a la superposición de partículas como por las pequeñas dispersiones que creaba el agua en la interfase al crear la máscara binaria.

4.2.6 Caracterización del hinchado de las microesferas de quitosano

Para caracterizar el hinchado de las microesferas de quitosano, tras sus respectivos lavados, se mantuvieron en agua durante 48 horas con el objetivo de alcanzar su estado de equilibrio de hinchado. Tras esto, se procedió a realizar distintos métodos que pudieran servir para comprobar la diferencia de tamaños obtenidos según las esferas se encontraran en estado húmedo o seco.

Tras probar distintas técnicas, la que resultó más óptima para caracterizar el hinchado fue el de cambios en el peso mediante la liofilización de las microesferas. Para ello, se les retiró toda el agua posible y, a continuación, se añadieron a un vial, intentando que quedara la máxima cantidad de esferas posibles sobre las paredes del mismo. Tras esto, se congelaron mediante 2 etapas para evitar la formación de grandes cristales de hielo que dañasen la estructura de la esfera.

Primero, se introdujeron en congelador a -20° durante 24 horas y, posteriormente, se transfirieron a un congelador a -80° otras donde se dejaron 4 horas. Pasado este tiempo, se liofilizaron. Así, el grado de hinchado (Q_w) fue obtenido antes y después de la liofilización de dichas esferas mediante fórmula I, donde W_s y W_d son los pesos de las microesferas hinchadas y en seco, respectivamente.

$$Q_w = \frac{W_s - W_d}{W_s} \quad (I)$$

En un primer momento se pensó caracterizar este cambio volumétrico mediante su secado al aire, intentando eliminar la máxima cantidad de agua de forma progresiva durante un día entero. Tras esto se mantuvieron en desecador durante 4 horas para eliminar los posibles restos de agua que pudieran quedar. Sin embargo, finalmente las esferas mostraron una estructura colapsada que no permitía su comparación con la presentada en estado húmedo. Otra de las pruebas realizadas seguía una metodología muy parecida al método anterior, difiriendo en que, una vez las microesferas se encontraban en agua, se iba añadiendo etanol al vial hasta completarlo. Tras ello fueron pasadas a un portamuestras dónde se mantuvieron evaporando el etanol. Sin embargo, tras analizar las fotografías se comprobó que, de nuevo, se obtuvo una morfología colapsada tras la evaporación del medio de hinchado.

4.2.7 Ensayo mecánico de compresión confinada

Se realizó un ensayo mecánico de compresión confinada para estudiar las características mecánicas de cada uno de los sistemas de microesferas. Para ello, se emplearon 5 réplicas de cada una de las composiciones de microesferas (PLLA puro, CHT puro, CHT:PLLA 50:50) con el objetivo de obtener sus respectivos módulos de Young. Durante el proceso todas las microesferas fueron embebidas en medio DMEM, destacando que las de quitosano se mantuvieron previamente en dicho medio durante 24 horas a 4°C para que alcanzaran el equilibrio en su estado hinchado. Posteriormente, se registraron los valores de fuerza aplicada en cada instante temporal para calcular los respectivos valores de tensión, T_x , por medio de la fórmula (II), donde F_x es la fuerza aplicada por el equipo y d el diámetro del sistema de microesferas ensayadas. Por otro lado, también se calculó la deformación para cada instante a partir de la fórmula (III), donde Dc es el desplazamiento corregido por el factor 0,007025 de la máquina (F_c) y F la fuerza a la que se ve sometido el sistema en cada instante de tiempo.

$$T = \frac{F}{A} \rightarrow T_x = \frac{F_x}{\pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2} \quad (II)$$

$$\varepsilon = \frac{Dc - Dc_0}{l_0} = \frac{[\text{Desplazamiento} + (F \cdot F_c)]}{l_0} \quad (III)$$

Estos ensayos fueron llevados a cabo en el equipo SCM400 98 (Figura 9), y se realizaron a una velocidad de 1 mm/min hasta alcanzar una fuerza máxima de 10 N. Se tomó un volumen de 1 mm de espesor para cada una de las tres composiciones. Una vez finalizados los ensayos, se realizó un análisis de los datos a partir del cual se obtuvo el módulo de Young de los materiales. Para ello, se analizaron las pendientes de cada uno de los ensayos en la región lineal inicial de las curvas de tensión-deformación obtenidas.

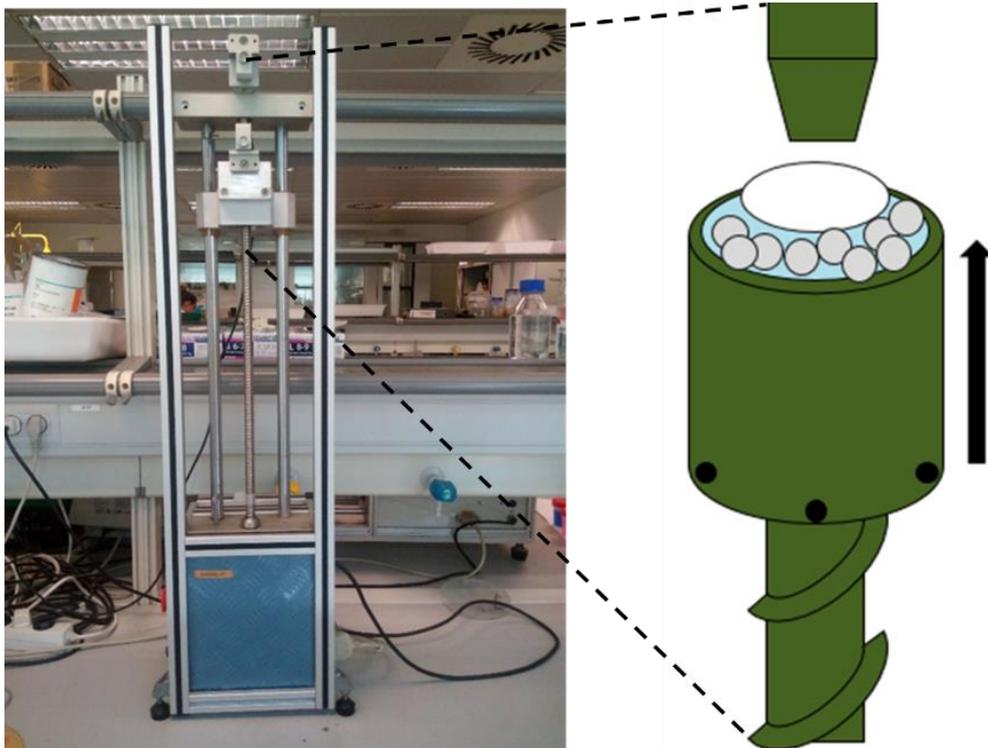


Figura 9. Esquema de la máquina del ensayo de compresión confinada y el montaje realizado.

4.3 Esterilización de los materiales

Puesto que todas las esferas obtenidas iban a ser empleadas en cultivo *in vitro*, se llevó a cabo una esterilización sobre las mismas que difería dependiendo de material.

En el caso de las microesferas de PLLA, tras la realización del tratamiento de plasma descrito en el apartado 4.2.1, estas fueron esterilizadas mediante ultravioleta (UV) bajo campana de flujo laminar, previamente a la siembra celular. Dichas esferas se mantuvieron bajo UV en placa Petri durante 30 minutos, manteniendo el flujo apagado. Pasado este tiempo, se apagó el UV para remover ligeramente las microesferas, para lo cual se encendió el flujo laminar previamente. Tras esto, se encendió de nuevo el UV, dejando reposar las esferas bajo campana otros 30 minutos.

Por otro lado, las microesferas de quitosano, una vez se encontraban pH próximo a 7, se mantuvieron en el tubo Falcon hasta su empleo en cultivos. Antes de comenzar el cultivo celular, se intercambió el agua del tubo por etanol 70% para iniciar el proceso de desinfección. Tras esto, se llevaron a cabo 3 lavados con agua miliQ. Una vez las esferas habían sedimentado, se intercambió el agua por DPBS. Por último, se aplicó un proceso de desinfección con antibióticos de las microesferas. Para ello, se realizaron 4 lavados con una solución compuesta de ampicilina 0'1 mg/ml en agua mQ estéril (ampicilina, Sigma-Aldrich), previamente preparada. Se continuó con 1 lavado de anfotericina B (Fungizone; Sigma-Aldrich) 1'25 µg/mL y ampicilina 0'1mg/mL en agua miliQ estéril, tras lo cual se dejaron 3 horas a temperatura ambiente bajo campana. Para finalizar este proceso de desinfección, se realizaron 2 lavados con penicilina/estreptomicina 100 U/mL en agua miliQ estéril.

4.4 Cultivos celulares

4.4.1 Aislamiento y cultivo de las BM-MSCs porcinas

Se utilizaron células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea de cerdo. Estas células fueron extraídas de la médula ósea de la cabeza del fémur, aisladas siguiendo un protocolo de aislamiento basado en la capacidad de adherencia de dichas células y testadas mediante ensayos de diferenciación hacia los tres linajes principales (condrogénico, osteogénico y adipogénico).

Los cultivos celulares se realizaron a corto y largo plazo sembrando los materiales con MSCs en pase 3, para asegurar que se han eliminado otros tipos celulares. Estas fueron previamente descongeladas y sometidas a un proceso de expansión partiendo de células en pase 1, hasta conseguir la densidad celular requerida para la siembra de los materiales.

La expansión se realizó en flascos tratados de 75 cm² de superficie de cultivo con una densidad celular inicial de 4000 células/cm² y adicionando a cada uno de ellos 10 mL de medio DMEM (Sigma-Aldrich) de alta concentración en glucosa (4,5 mg/mL) suplementado con P/S 1% y FBS 10%, provisto a su vez de Glutamax. Las células se cultivaban hasta estar próximas a la confluencia (70-90% de la superficie), momento en el cual se tripsinizaban y volvían a sembrar para evitar que comenzasen a diferenciarse al entrar en contacto entre ellas. Los flascos se mantenían en un incubador a una temperatura de 37°C con atmósfera húmeda al 5% de CO₂, realizando cambios del medio de cultivo cada 3-4 días bajo campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Por otro lado, con el fin de controlar el crecimiento celular, se hizo uso de un microscopio óptico invertido.

4.4.2 Acondicionamiento de los materiales

Antes de comenzar la siembra celular fue necesario adecuar las microesferas tal cual iban a ser empleadas en el cultivo, y todo el proceso fue realizado bajo campana de flujo laminar en condiciones de asepsia. En este sentido, se decidió hacer un cultivo celular volumen-volumen, con un valor total 20 μL para cada una de las combinaciones de los materiales. Debido a que se iba a trabajar con volúmenes, las microesferas de PLLA fueron depositadas con espátula en eppendorfs de 1,5 mL hasta alcanzar un volumen de 100 μL , tras lo cual se les añadieron otros 100 μL de disolución penicilina/streptomicina 100 U/mL en agua mQ, preparando un total de 200 μL . En el caso de las esferas de quitosano, se procedió de forma análoga a las de PLLA, difiriendo en que fueron tomadas con pipeta Pasteur para su transferencia al eppendorf. De esta forma, se disponía de todas las microesferas desinfectadas y en estado húmedo, así como de unos volúmenes conocidos a partir de los cuales se haría la distribución volumétrica en los eppendorfs que iban a ser empleados en cultivos.

Las micropartículas se distribuyeron por grupos de eppendorfs y posteriormente se ordenaron según las condiciones de cultivo asociadas. En el caso de los materiales puros, se hizo uso de los eppendorfs preparados y se tomaron 40 μL , resuspendiendo la solución a la hora de tomarla, de forma que como volumen final se tenía 20 μL material – 20 μL sobrenadante. Para los casos de mezcla de materiales, se realizó un proceso similar, pero depositando 20 μL de quitosano y 20 μL de PLLA. Tras esto, se retiró el sobrenadante y se añadieron 300 μL de medio DMEM con FBS 10%, dejándolos en incubación a 37° *overnight* (Figura 10).

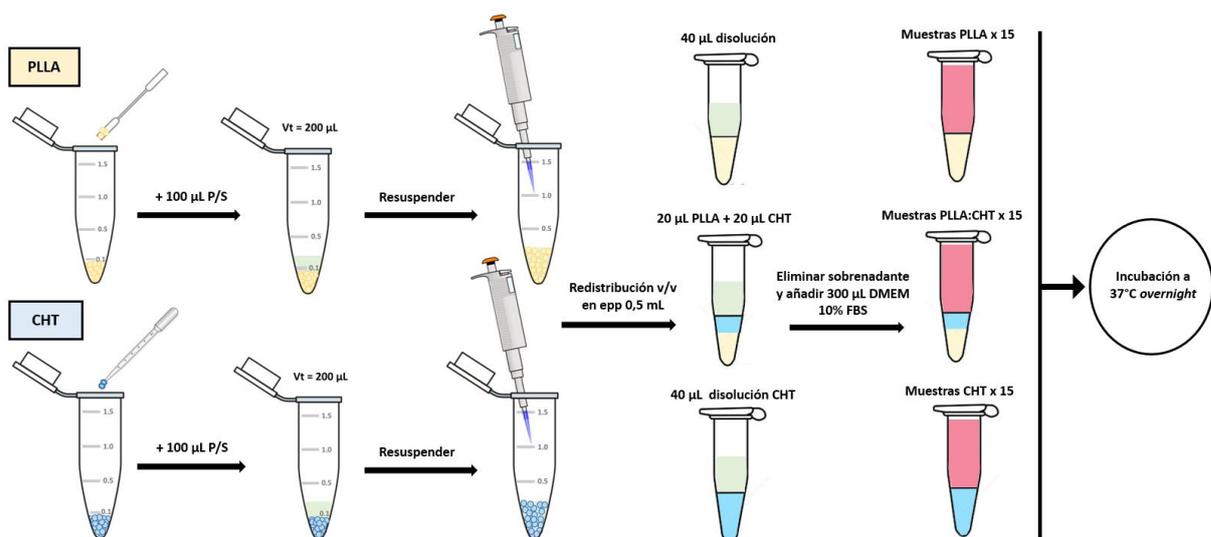


Figura 10. Esquema del proceso de desarrollo del sistema de microesferas volumen-volumen para cada uno de los materiales empleados.

La adición de este medio se realizó para que, por un lado, el material se encontrara humedecido previamente con el mismo medio con el que se realizaría la siembra y, por otro lado, para que en aquellos materiales en los que sea posible queden adheridas proteínas involucradas en la adhesión celular (las cuales están en el suero) de forma que puedan mejorar la adhesión inicial.

4.4.3 Proceso de siembra en cultivo celular con microesferas

En total fueron preparadas 4 muestras por material y por cada una de las 2 condiciones de cultivo (medio basal y osteogénico) y 9 muestras extras (3 por material) para realizar pruebas previas a cada uno de los ensayos. Así, se trabajó con un total de 45 muestras.

Para comenzar la siembra celular sobre estos materiales fue necesario un paso previo de tripsinización para despegar las MSCs, las cuales han sido cultivadas hasta pase 3 siguiendo el protocolo explicado en el apartado 4.4.1. En dicho proceso de tripsinización se retiró el medio de los flascos, tras lo cual se realizaron 2 lavados con DPBS ^(-/) para eliminar los restos de proteínas del suero, ya que inactivan la tripsina. A continuación, se añadieron 3 mL de tripsina por flascón y se incubaron a 37° durante 3 minutos. Tras esto, se añadió el doble de volumen de medio con FBS 10 % que de tripsina; es decir, 6 mL a cada flascón para la inactivación de la tripsina

El sobrenadante de cada uno de los flascos fue retirado y añadido a un mismo Falcon de 50 mL. Se comprobó bajo el microscopio que no quedaban células adheridas y se centrifugó la suspensión celular 250 rcf (g) durante 5 minutos para obtener un pellet.

Se eliminó el sobrenadante mediante volcado del tubo y se añadieron 10 mL de medio de cultivo sobre el mismo Falcon, para tener un volumen conocido a la hora de hacer un conteo celular. Para conocer dicha cantidad, se contaron las células haciendo uso de una cámara de Neubauer. Asimismo, se también se empleó la tinción de Trypan Blue (en proporción 1:1 con un pequeño volumen de suspensión celular tomado para el conteo (100 μ L) empleadas en el conteo) para distinguir las células vivas de las muertas (azules). De esta forma, la concentración celular fue obtenida según la siguiente expresión:

$$\text{Número de células} = N^{\circ} \text{ medio de células vivas} \times \text{factor de dilución con Tripan} \times \text{factor de dilución de la cámara de Neubauer} \times \text{volumen total de la suspensión celular}$$

Puesto que se iban a preparar un total de 45 muestras con 10 μ L cada una y una densidad celular de 150.000 células por muestra, se decidió resuspender 8.250.000 células en 550 μ L de medio, un exceso de suspensión a la concentración celular requerida para posibles errores de pipeteo.

Sabiendo que en 10 mL se tenía un total de 10.300.000 células, para obtener una cantidad de 8.250.000 células eran necesarios 8 mL de medio. Sabiendo esto, se tomaron estos 8 mL, se añadieron a otro Falcon y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Una vez se tuvo el pellet, se retiró el sobrenadante y, tras resuspender en 550 μ L, esta cantidad fue depositada sobre un eppendorf de 1,5 mL. Tras esto, se tomaron los materiales distribuidos en eppendorfs, se les retiró el medio y se añadió una suspensión de células de 10 μ L, tal y como se ha comentado.

Para realizar este último proceso, dicha suspensión fue depositada entre las esferas, removiendo suavemente al final para crear una distribución célula-material lo más homogénea posible. Las muestras se mantuvieron en incubador a 37° durante 2 horas, tras lo cual se añadió medio basal, volviéndose a mantener a 37 °C durante un periodo de 24 horas.

4.4.4 Digestión celular

Para realizar 3 de los ensayos propuestos fue necesario digerir las membranas celulares y extraer el contenido celular. Por ello, se llevó a cabo una digestión con la enzima papaína, ya que la solución resultante es compatible con los ensayos propuestos.

Para proceder a la digestión de las muestras, una vez retiradas del congelador, se centrifugaron a 650 g 5 min a 4 °C y se les retiraron los restos de DPBS de lavados que pudiera haber. Se les añadió 250 μ L de solución de digestión a cada una y se les aplicó una agitación mediante vórtex. Estas muestras se mantuvieron con el tubo sellado en estufa a 60 °C durante 18 horas para completar el proceso de digestión.

Tras este proceso de incubación, se les aplicó un centrifugado suave para precipitar los restos de material al fondo del microtubo y transferir la solución de digestión. Después del proceso de incubación, se almacenaron a 4°C hasta su ensayo (para DNA, un máximo de 3 horas).

En este protocolo se añadieron 250 μ L de papaína a cada muestra, estando la enzima disuelta en un buffer específico. Este buffer se denomina *Papain Extract Buffer* (PBE) y para 100 mL se añadieron 653 mg de fosfato sódico dibásico anhídrido (Na_2HPO_4) (46 mM), 745 mg de fosfato de sodio monobásico monohidratado (54 mM) y 1 mL de EDTA a 500 mM y pH 8, en agua miliQ. El EDTA es un agente quelante que elimina las sales liberadas del interior de la célula tras la rotura de membranas. Una vez se tenía esto, se ajustó el pH a 6,5 haciendo uso de HCl y NaOH concentrado. A continuación, se preparó la disolución de digestión con una concentración final de L-cisteína hydrochloride hydrate de 1,575 mg/mL (Sigma-Aldrich) y enzima papaína a concentración final de 3,875 U/ml (Papain from papaya latex, Sigma-Aldrich).

4.4.5 Ensayo de cuantificación de DNA

Para la evaluar la eficiencia de siembra y proliferación celular, se ha hecho una cuantificación de DNA mediante el uso del kit Quant-iT™ PicoGreen dsDNA (Invitrogen, CA), un colorante fluorescente ultrasensible que se intercala en ácidos nucleicos de cadena doble y permite cuantificar el DNA en solución.

Una vez se disponía de las muestras y reactivos necesarios, se prepararon los estándares en PBE a partir de una disolución stock a 100 µg/mL, tal como se aprecia en la Tabla 3. Se homogenizó la disolución de digestión y se centrifugó a 650 g 5 min y 4 °C, tras lo cual se pasó el sobrenadante a otro microtubo sin coger el material. Los estándares preparados y las muestras se distribuyeron en una placa negra Optiplate 96F (28,7 µL/pocillo, 3 repeticiones por muestra), homogeneizando previamente. A continuación, se añadieron 100 µL/pocillo del buffer TE1X, preparado a partir del stock a 20X. Este buffer fue empleado también para realizar la dilución 1:200 de PicoGreen, de la cual se añadieron 71,3 µL/pocillo.

Tabla 3. Tabla de estándares para obtener curva de calibrado en el ensayo de DNA

Estándar	Volúmenes	Concentración final (ug/ml)	Concentración ng/well
STD 0	1 mL PBE	0	0
STD 1	1 µL estándar DNA + 2 mL PBE	0,05	1,435
STD 2	1 µL estándar DNA + 1 mL PBE	0,1	2,87
STD 3	2 µL estándar DNA + 998 µL PBE	0,2	5,74
STD 4	3 µL estándar DNA + 995 µL PBE	0,3	8,61
STD 5	5 µL estándar DNA + 990 µL PBE	0,5	14,35
STD 6	10 µL estándar DNA + 985 µL PBE	1	28,7
STD 7	15 µL estándar DNA + 980 µL PBE	1,5	43,05

Esta placa fue incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos, cubriendo la placa para protegerla de la luz. Tras esto, se realizó la lectura de la fluorescencia en espectrofotómetro de placas a una excitación de 485 nm y una longitud de onda de 535 nm.

4.4.6 Actividad de fosfatasa alcalina (ALP)

La técnica empleada para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina mediante un ensayo colorimétrico basado en la capacidad de la ALP en convertir el sustrato p-nitrofenilfosfato (pNPP) en p-nitrofenol. Este producto resultante tiene una coloración amarilla a pH alcalino cuya intensidad es directamente proporcional a la actividad de la enzima, de forma que la absorbancia se puede medir con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm.

En este ensayo se determinó la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) soluble excretada, presente en el medio de cultivo de las muestras, el cual fue retirado a día 1, 7 y 14. Dicho ensayo se llevó a cabo haciendo uso del kit Sensolyte.

Puesto que se ensayaron dos condiciones de cultivo (condiciones de no inducción de diferenciación y de inducción de diferenciación hacia la línea osteogénicas), se prepararon los estándares de fosfatasa alcalina del kit (Alkaline Phosphatase Standard, Calf Intestinte 10 µg/mL) en medio de cultivo DMEM con FBS 10%. Los estándares siempre se deben preparar en el mismo medio en el que se encuentran las muestras a ensayar, para obtener el background que produce el propio medio y que no se puede asociar con la actividad de la enzima o en general con resultados positivos.

Se obtuvo la cantidad de ALP presente en el medio retirado de las muestras mediante la medición de la actividad de una serie de muestras estándar preparadas con concentraciones conocidas de ALP que permiten obtener una curva lineal. Estos estándares se prepararon obteniendo la disolución más concentrada y, a partir de esta, se hicieron una serie de diluciones seriadas, de acuerdo con la Tabla 4.

Tabla 4. Tabla de estándares para obtener curva de calibrado en el ensayo de ALP

Estándar	Volúmenes	Concentración final (µg/mL)
STD 0	160 µL medio de cultivo	0
STD 1	160 µL disolución 2 + 160 µL medio cultivo	0,00125
STD 2	160 µL disolución 3 + 160 µL medio cultivo	0,0025
STD 3	160 µL disolución 4 + 160 µL medio cultivo	0,005
STD 4	160 µL disolución 5 + 160 µL medio cultivo	0,01
STD 5	160 µL disolución 6 + 160 µL medio cultivo	0,02
STD 6	160 µL disolución 7 + 160 µL medio cultivo	0,04
STD 7	3 µL de disolución stock (10 µg ALP/mL)+ 372 µL medio de cultivo	0,08

Se dispusieron las muestras en la placa y a continuación se añadió el sustrato. Se agitó el contenido de la placa durante 1 min en agitador orbital y se incubó durante un periodo de tiempo que va desde los 30 a los 60 minutos (40 minutos para muestras sin medio de diferenciación y 60 minutos para las de medio de diferenciación) dependiendo de cuando se prevé que la reacción se saturará y sobrepasará los límites en los que la absorbancia es lineal. Transcurrido este tiempo se procedió a parar la reacción con un buffer de parada (fosfato) mediante pipeta multicanal para medir el producto resultante de la actividad de la fosfatasa a ese tiempo. La proporción final de los 3 componentes del ensayo (muestra, sustrato y buffer de parada) siempre será 1:1:1 con un volumen total de un mínimo de 100 μ l y un máximo de 200 μ l. Las muestras fueron leídas a A405 nm por triplicado, haciendo uso del espectrofotómetro de placas. De esta forma, se midió la concentración de p-nitrofenol en el ensayo y se correlacionó con las concentraciones estándares.

4.4.7 Ensayo de glicosaminoglicanos

Los glicosaminoglicanos son unos de los componentes más abundantes en el microambiente celular, los cuales poseen grupos sulfato que hacen posible su interacción con proteínas, formando proteoglicanos que se encuentran situados sobre la superficie celular y en la matriz extracelular. Así, los GAGs, junto a los proteoglicanos, van a influir en diversos procesos tales como la regulación enzimática y los eventos de adhesión, crecimiento, migración o diferenciación celular. En este ensayo se ha decidido determinar la cantidad total de GAGs en base a los cambios en la absorción espectral de la tinción 1,9-dimetileno azul (DMMB) cuando se une a los GAGs. En este sentido, se prepararon los estándares, para lo cual se empleó una disolución de partida de condroitin sulfato (CHS) en PBE a una concentración de 100 μ g/mL en un eppendorf con 1 mg de condroitin en 1 mL de PBE, a partir de la cual se obtuvieron los estándares que aparecen en la Tabla 5.

Tabla 5. Tabla de estándares para obtener curva de calibrado en el ensayo de GAGs

Standard	GAG(ng/well)	Concentración de GAGs (μg/mL)	Volumen stock a 100 (μg/mL)	Volumen de PBE (V total: 400 (μL))
STD0	0	0	0	400
STD 1	50	2,5	10	390
STD 2	100	5	20	380
STD 3	200	10	40	360
STD 4	400	20	80	320
STD 5	600	30	120	280
STD 6	800	40	160	240
STD 7	1000	50	200	200

Por otro lado, se procedió a la descongelación y homogenización de las muestras, puesto que, en caso de no realizar el ensayo en las 24 horas posteriores a la finalización del proceso de digestión celular, dicha disolución de muestra digerida debe almacenarse a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Así, se depositaron $40\text{ }\mu\text{L}$ de cada una de las muestras en eppendorfs de $1,5\text{ mL}$.

A continuación, se añadieron otros $60\text{ }\mu\text{L}$ de PBE sobre cada muestra objeto de estudio para completar hasta los $100\text{ }\mu\text{L}$. Este ensayo se realizó en eppendorfs porque lo que se hace es añadir el colorante que se une a los glicosaminoglicanos, los cuales fueron recuperados por centrifugación, formando un pellet. Finalmente, se disoció el colorante unido a los glicosaminoglicanos y se midió la absorbancia del medio resultante de disociación, permitiendo correlacionar la cantidad de colorante disociado con la cantidad de glicosaminoglicanos.

De esta forma, una vez se disponía de estándares y muestras preparadas con un volumen final de $100\text{ }\mu\text{L}$, se les añadió 1 mL de DMMB a cada microtubo. Estos fueron incubados 30 minutos a temperatura ambiente sobre un agitador orbital, proporcionándoles así una suave agitación, y centrifugados a 15.000 G durante otros 10 minutos. En este punto, todos los GAGs presentes en la muestra debían haberse unido al colorante y haber sido forzados a ir al fondo del tubo para formar un pellet de color. Así, seguidamente se retiró el sobrenadante mediante volcado en un paso, de forma que se mantuviera el pellet obtenido adherido al fondo del tubo. A continuación, se añadió 1 mL de agente disociador de la tinción en cada microtubo y se agitó mediante vórtex cada uno de ellos hasta romper el pellet. Finalmente, se añadieron $200\text{ }\mu\text{L}$ de cada muestra y estándar (por triplicado) sobre placa P96 transparente, para ser leídas paralelamente en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 656 nm (con una agitación previa de la placa).

4.4.8 Cuantificación de colágeno total

El objetivo de este ensayo era determinar la cantidad de colágeno presente en la muestra mediante la cuantificación de hidroxiprolina oxidada. Esto se realizó mediante la degradación del colágeno para poder separar el aminoácido hidroxiprolina (característico de la molécula de colágeno), que cuando está en su forma oxidada se une al compuesto DMBA (diaminobenzaldehído).

Para realizar este proceso de degradación del colágeno, se usaron $100\text{ }\mu\text{L}$ de muestra de células digerida con papaína, recogiendo el sobrenadante tras haber centrifugado previamente para desplazar los restos de material al fondo del tubo. A continuación, se añadieron $100\text{ }\mu\text{L}$ de HCl $37\text{ }\%$ a cada tubo, sellando bien los microtubos para evitar la evaporación del contenido y se incubó a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas, tras lo cual los tubos se dejaron enfriar y se centrifugaron a 5000 g durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron secadas a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h aproximadamente. El precipitado se resuspendió en $200\text{ }\mu\text{L}$ de agua miliQ.

Por otro lado, fue necesario la preparación de la solución stock de hidroxiprolina para los estándares. Para ello, se preparó una disolución de 1 mg/mL de cis-4-Hydroxy-L-proline en agua mQ, almacenándose en nevera a 4 °C.

- **Preparación buffer citrato**

Para cada 100 mL de disolución se añadieron 80 mL de agua miliQ, 4,61 g ácido cítrico monohidratado (0,239 M), 11,98 g de acetato de sodio trihidratado (0,88M), 7,22 g de acetato de sodio anhidro (0,88 M), 3,4 g hidróxido de sodio (0,85 M) y 1,26 mL de ácido acético glacial. Tras esto se ajustó el pH a 6,1 (usando disoluciones concentradas de NaOH 10 M o HCl 12 M) y se enrasó con agua miliQ hasta los 100 mL. Por último, se filtró con papel Whatman y se almacenó en nevera a 4 °C.

- **Assay buffer**

Justo antes del ensayo, teniendo el buffer citrato previamente preparado, se procedió a la preparación del buffer del ensayo justo antes del mismo. Para ello, se añadieron 1,5 mL de n-propanol (1-propanol), 1 mL de agua mQ y 5 mL de buffer citrato.

- **Reactivo Cloramina T (para una placa)**

Justo antes del ensayo también fue necesario preparar el reactivo de Cloramina T. Para ello se preparan 141 mg de Cloramina T (0,124 M) y 0,5 mL de agua miliQ, incubando esta disolución en estufa a 60 °C durante 10 min para disolverla. A continuación, se añadieron 0,5 mL de n-propanol, 4 mL De buffer citrato y se cubrió con papel de aluminio hasta su uso.

- **Reactivo DMBA**

También en fresco, se preparó el reactivo DMBA con 6 mL de n-propanol, 3 mL de ácido perclórico 70%, 4,5 g de DMBA (Mw = 149'19 g/mol), el cual se mantuvo en tubo con aluminio hasta su uso.

Los estándares de hidroxiprolina fueron preparados mediante una disolución de 50 µg/mL a partir de la de 1mg/mL. Todos las disoluciones y estándares fueron preparados en PBE (ya que la muestra de digestión está preparada en dicho buffer) hasta un volumen total de 1 mL.

Tabla 6.Tabla de estándares de hidroxiprolina para obtener curva de calibrado en el ensayo de colágeno total

Estándar	Volumen 50 ug/mL HYP (uL)	Volumen PBE (uL)	ng HYP/ well
STD 0	0	1000	0
STD 1	5	995	15
STD 2	20	980	60
STD 3	40	960	120
STD 4	70	930	210
STD 5	100	900	300
STD 6	125	875	375
STD 7	150	850	450

Para la cuantificación de la hidroxiprolina se añadieron 60 μ L (por triplicado) de los estándares y de las muestras en una placa de 96. Sobre estos, haciendo uso de una pipeta multicanal se añadieron 20 μ L de buffer de Assay buffer y 40 μ L de reactivo Cloramina T. A continuación, se cubrió la placa con papel de aluminio y se procedió a su incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la oxidación de la hidroxiprolina por completo. Tras esto, se añadieron 80 μ L de reactivo DMBA, lo cual debe ser homogéneo (por lo se hizo uso de una pipeta multicanal y puntas con filtros) ya que el DMBA en solución tiene una coloración amarillenta que fácilmente mancha el material. Por último, la placa se cubrió con sellador de placas SealPlate, dejándola en horno a 60 °C durante 20 minutos. Tras este proceso de incubación, se dejó enfriar, se eliminó el SealPlate con cuidado y se leyó en el espectrofotómetro con el filtro de 580 nm.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Fabricación y caracterización morfológica de las microesferas de PLLA

La fabricación de las microesferas de PLLA se realizó de acuerdo con el protocolo explicado en el apartado 6.2.1, del que, como se verá a continuación, fue necesario realizar ciertas pruebas a fin de comprender la morfología obtenida.

En una primera tanda de síntesis, todas las esferas fueron llevadas a cabo siguiendo un mismo procedimiento para comprobar si existían diferencias entre ellas. Así, en un principio, el único parámetro que se varió fue la velocidad de agitación durante el proceso de emulsión, ya que este es un factor que influye en el tamaño de las partículas.

Los diámetros de las microesferas no pudieron ser obtenidos de forma automática debido a que las esferas no mostraban una forma totalmente esférica (Figura 11). Por ello, se decidió hacer uso de un diámetro esférico equivalente, como es el diámetro de Feret, que se define como la distancia entre dos líneas paralelas que son tangenciales al contorno de la proyección la partícula bajo una dirección fija (Pabst & Gregorova, 2007). Aunque estos valores pueden variar según el plano de la partícula tomado, todas las medidas fueron obtenidas en una dirección de 180° que minimizara los errores.

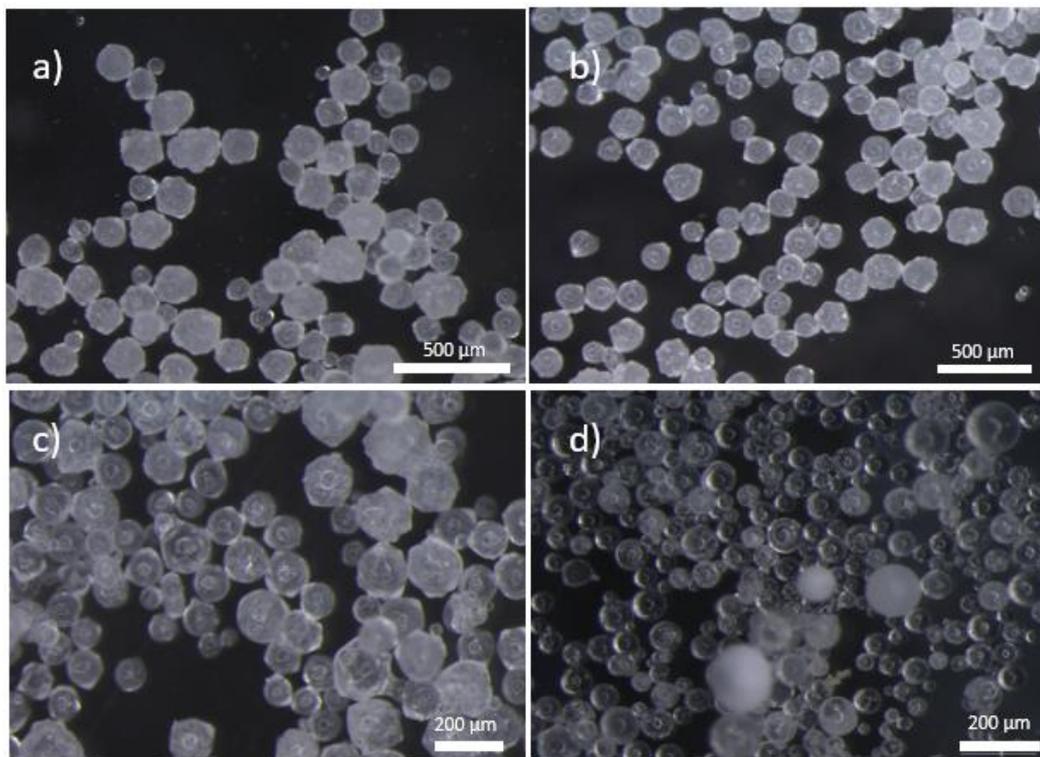


Figura 11. Imágenes representativas obtenidas por lupa binocular de las microesferas producidas a, a) 150 rpm, b) 200 rpm, c) 300 rpm, d) 750 rpm.

Así, realizando un análisis sobre las imágenes obtenidas por lupa binocular, pudo obtenerse un diámetro medio de las esferas para cada una de las velocidades establecidas comprobándose que, conforme aumenta la velocidad de agitación, el tamaño promedio que se obtiene para estas es menor, tal y como se puede observar de forma cuantitativa en la Tabla 7.

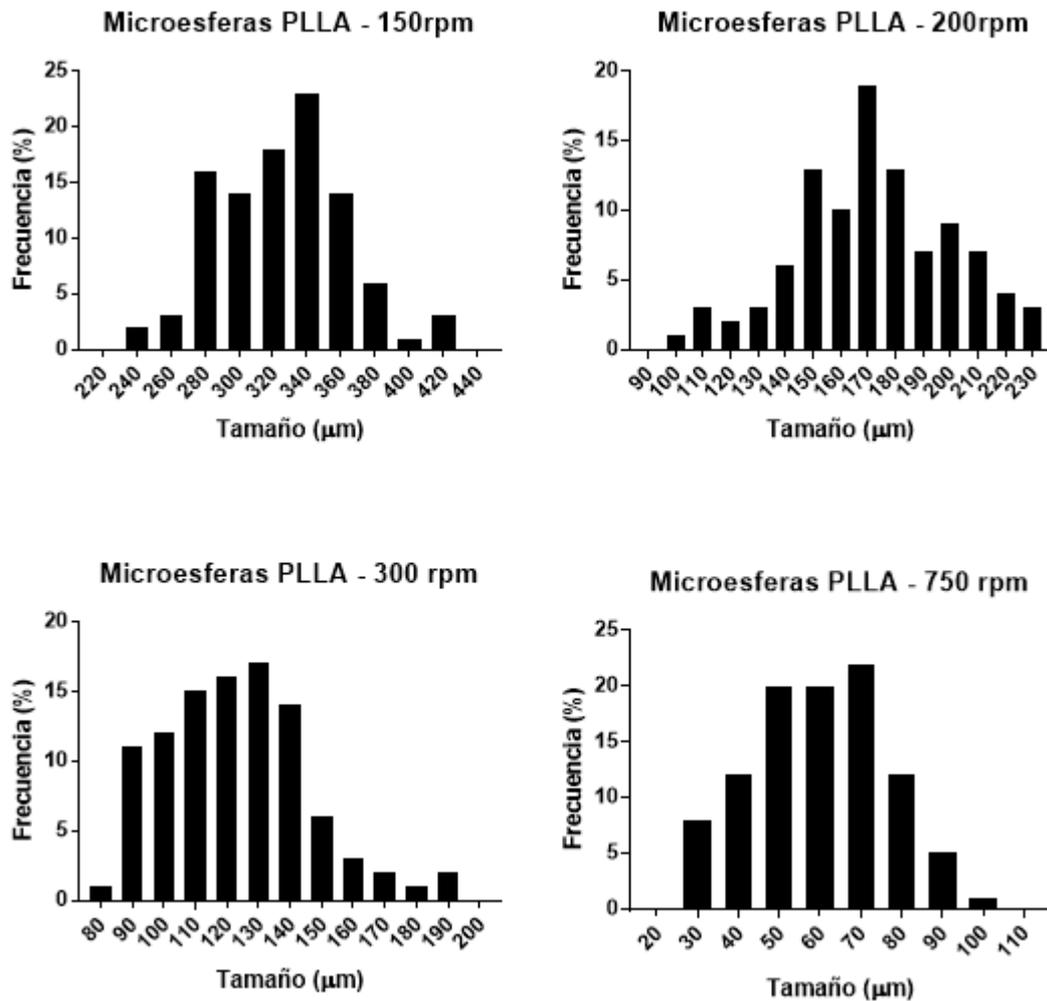


Figura 12. Distribución de diámetros de las esferas de PLLA a distintas velocidades de agitación. La representación se corresponde con el porcentaje de esferas contabilizadas en cada uno de los intervalos de tamaño establecidos

Tabla 7. Estadísticos descriptivos de las esferas de PLLA en función de la velocidad de agitación. Los parámetros que se presentan fueron obtenidos mediante el software de imagen imageJ y el software de análisis estadístico GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Inc, California)

Velocidad agitación (rpm)	N total	Media (μm)	Desviación estándar (μm)	Mínimo (μm)	Máximo (μm)	Mediana (μm)
150	120	324,85	37,87	234,27	423,304	327,97
200	120	171,59	28,33	96,77	229,68	169,69
300	120	122,81	22,62	81,787	191,43	120,7
500	120	-	-	-	-	-
750	120	59,44	16,36	25,12	100,06	59,184

En este sentido, se pudo comprobar que, a medida que aumenta la velocidad de agitación, el tamaño promedio de las microesferas se reduce, obteniéndose a su vez una menor dispersión en el grupo correspondiente a una mayor agitación. Esto puede resultar de interés en el procesado posterior de las mismas, ya se si se quiere hacer uso de una población homogénea de tamaños será necesario el empleo de tamices de distintos tamaños y, por tanto, posiblemente sea necesario llevar a cabo numerosas síntesis para obtener una cantidad razonable de micropartículas.

A la velocidad establecida como 500 rpm fue imposible obtener una imagen clara que permitiera analizar microscópicamente la estructura de las esferas ya que se dio una aglomeración de las mismas. Esto pudo ser debido a la presencia de restos de PVA (polímero de la disolución emulsificante) que pudieran haberse formado durante la emulsión o que quizá no se consiguió eliminar durante los lavados de las microesferas.

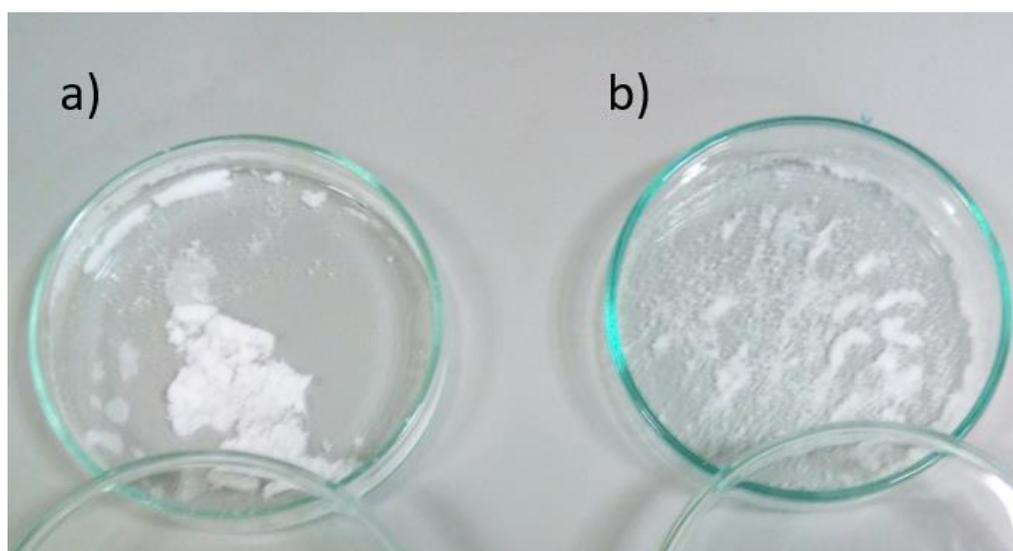


Figura 13. Comparación entre microesferas de PLLA aglomeradas a 500 rpm (a) y no aglomeradas a 750 rpm (b)

Posteriormente, se recurrió a la visualización de las microesferas en FESEM para observar con mayor resolución superficial las esferas obtenidas. Así, fue posible comprobar que las microesferas presentaban una superficie microporosa que vendría dada por la evaporación del cloroformo durante la síntesis de estas.

Por otro lado, lo que llamó la atención fue la estructura tridimensional que presentaban las microesferas ya que no era una esfera única sino una especie de “aglomeración” de esferulitas, tal y como se muestra en la Figura 14. Estas esferulitas consisten en agregados de cristalitas¹ que se generan de forma radial a partir de unos centros de nucleación (suelen estar inicializados por pequeñas partículas de impurezas).

En las imágenes de FESEM se vio que, a medida que se aumentaba la velocidad de agitación de la emulsión, la superficie totalmente esferulítica obtenida inicialmente para 150 rpm, se iba convirtiendo en una superficie prácticamente lisa cuando se alcanzaban 750 rpm. Los tamaños de las esferulitas llegan a ser bastante elevados en el caso de la velocidad de 150 rpm, estando en el rango de 100 μm , lo que supone una relativa baja velocidad de nucleación. Esto, a su vez, parece indicar que, a medida que se aumenta la velocidad, lo que se obtienen son esferulitas más pequeñas y de morfología más alisada hasta la consecución de las micropartículas totalmente esféricas características de la velocidad de 750 rpm. En este sentido, es posible comprobar también como los crecimientos de los cristales avanzan hasta que los frentes de crecimiento chocan unos con otros, apreciándose unas regiones limitantes que se van haciendo más planas conforme avanza la velocidad de síntesis.

¹ Cristalitas: pequeñas regiones cristalinas ordenadas incrustadas en la matriz amorfa y desordenada de un polímero.

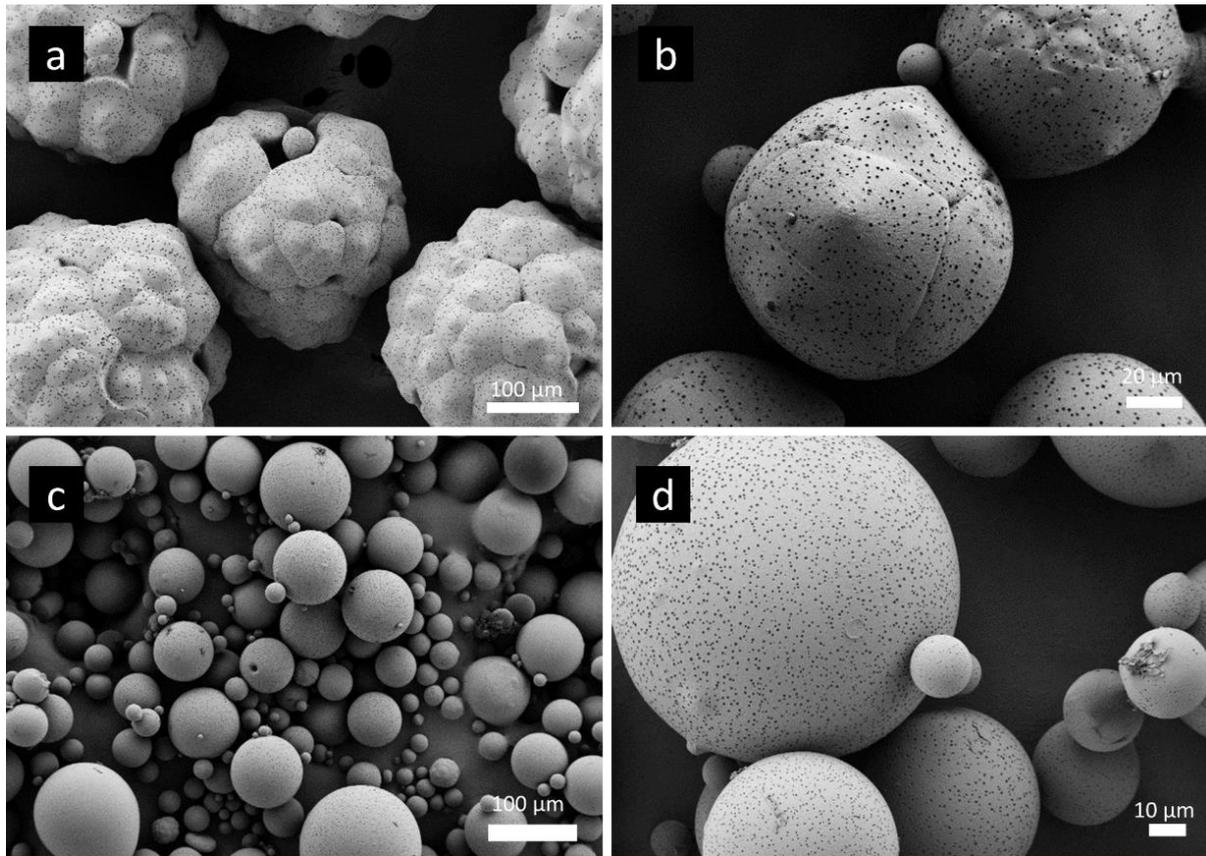


Figura 14. Imágenes obtenidas mediante FESEM de las microsferas de PLLA producidas a 150 rpm (a), 300 rpm (b), 750 rpm (c,d). Se exponen las dos tandas de producción de las microsferas de PLLA para comprobar que la estructura esférica se presentaba en ambas.

En función de los tamaños celulares, así como de los tamaños mínimos que podían ser obtenidos por aplicación de diferencia de potencial en las esferas de quitosano obtenidas, se decidió que el rango de diámetros óptimo era el que se obtenía a una velocidad de agitación de 200 rpm. Fundamentalmente, se pretendía obtener un sistema de cultivo homogéneo, de manera que se diese una interacción adecuada entre las células y el material, así como entre las células y su entorno, por lo que se buscaba tener tamaños de partículas semejantes. Asimismo, se vio que la eficiencia de producción por cada síntesis se situaba en torno a los 150 mg para el tamaño de 150-200 µm, lo cual resultaba relativamente accesible a la hora de reproducir la producción de este tipo de esferas para ser empleadas en cultivo celular. Es por ello que, aunque esa estructura esferulítica no se presentaba en un principio como un problema para realizar el cultivo con MSCs (ya que este tipo celular muchas veces responde mejor frente a superficies con cierto patroneado superficial), se llevaron a cabo ciertas pruebas, variando parámetros que pudieran afectar a la morfología final de la esfera en tanto que fuera posible obtener una superficie lisa a esta velocidad.

Se tomó como base que la concentración era un factor que podría influir en la morfología esferulítica, ante lo cual se cambió la concentración de polímero de la fase no acuosa (PLLA) a 6% w/v y 10% w/v y se realizó la emulsión convencional a una velocidad de 200 rpm para ambas. Sin embargo, la estructura de esferulitas se mantuvo (Figura 15) cambiando solo el tamaño de las esferas, las cuales presentaron tamaños superiores debido al aumento de la concentración, un factor que afectó también al flujo de inyección durante el proceso de fabricación.

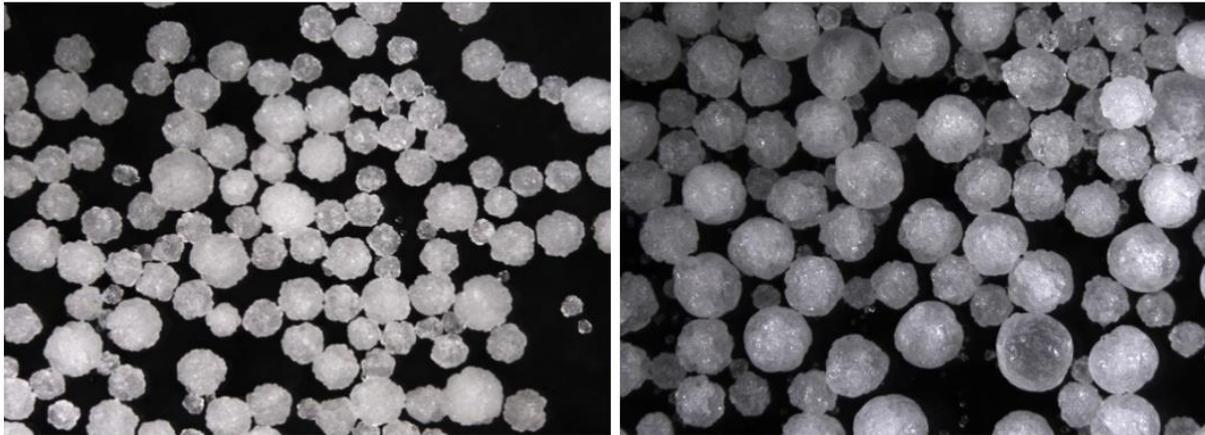


Figura 15. Microesferas de PLLA al 6% w/v (izquierda) y al 10% w/v (derecha), ambas obtenidas a 200 rpm. Imágenes obtenidas mediante lupa binocular.

Otro cambio llevado a cabo fue eliminar del protocolo el paso de adición de los 150 mL de agua pensando que podía causar una inestabilidad en a la formación de las esferas. Sin embargo, se siguieron obteniendo morfologías similares a la expuestas anteriormente.

5.2 Fabricación y caracterización morfológica de las microesferas de quitosano

Uno de los objetivos de este proyecto se centraba en la optimización del protocolo de fabricación de las microesferas para obtener los tamaños y morfologías buscadas. En este sentido, para llegar al protocolo descrito en el punto 6.2.4 fue necesario realizar ciertas modificaciones a fin de obtener microesferas a los diferentes voltajes que se había establecido. La principal modificación se centró en realizar cambios en la concentración de polímero ya que cuando eran elevadas (por encima del 3% w/v CHT) las esferas obtenidas tenían un tamaño superior al buscado, mientras que cuando eran muy diluidas (por debajo del 2% w/v CHT) la gota no era capaz de aguantar el voltaje al que se veían sometidas y al caer sobre el baño coagulante ni siquiera se formaba la esfera.

Ante esto, se vio que la concentración óptima para superar estas deficiencias era la de 2,5% w/v de quitosano. De forma paralela, se realizaron otros cambios como la variación del flujo de inyección de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 70 $100 \mu\text{L}/\text{min}$, la cual, aunque enlentecía un poco el proceso, permitía que las esferas se formaran adecuadamente al hacer posible el paso de la disolución polimérica por una aguja con menor diámetro de luz.

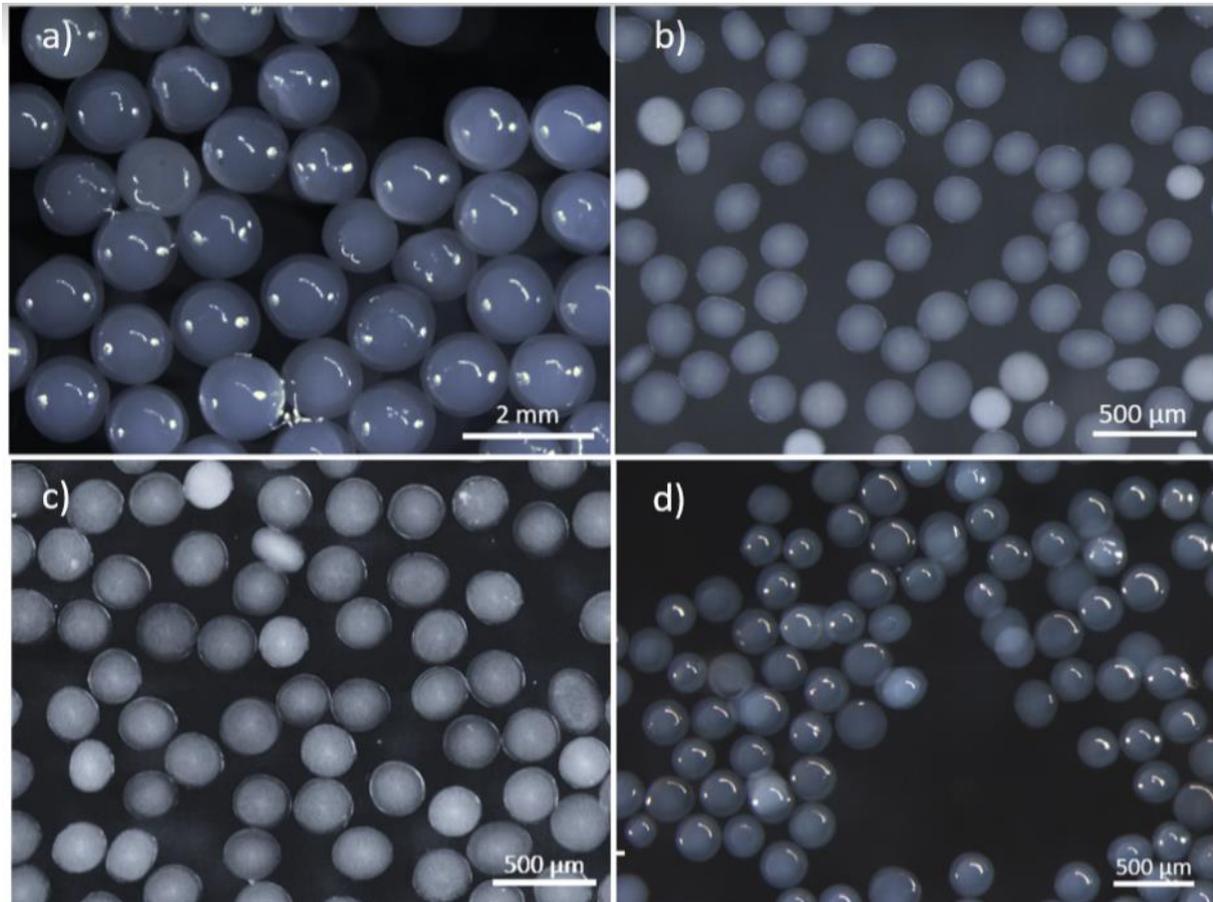


Figura 16. Microesferas obtenidas tras la optimización del proceso con quitosano al 2,5% w/v, a un voltaje de 4 kV (a), 6 kV (b), 8kV (c) y 10 kV (d). Imágenes tomadas mediante lupa binocular.

Para su caracterización morfológica, fueron observadas en lupa binocular (Figura 16) un total de $n=4$ imágenes para poder obtener un rango de tamaños representativo que queda relegado en los histogramas de la Figura 17. Sin embargo, llamó la atención que cuando se calcularon los estadísticos de cada grupo de esferas, el tamaño promedio de las mismas era decreciente conforme aumentaba el voltaje, excepto a voltaje 10 kV (Tabla 8). Esto podría atribuirse a que la síntesis de 10 kV fue realizada un día distinto al resto y las condiciones del ambiente (humedad, temperatura, etc.) son un factor que puede alterar con relativa facilidad la actuación del campo eléctrico al que se ven sometidas las esferas de quitosano durante su proceso de producción.

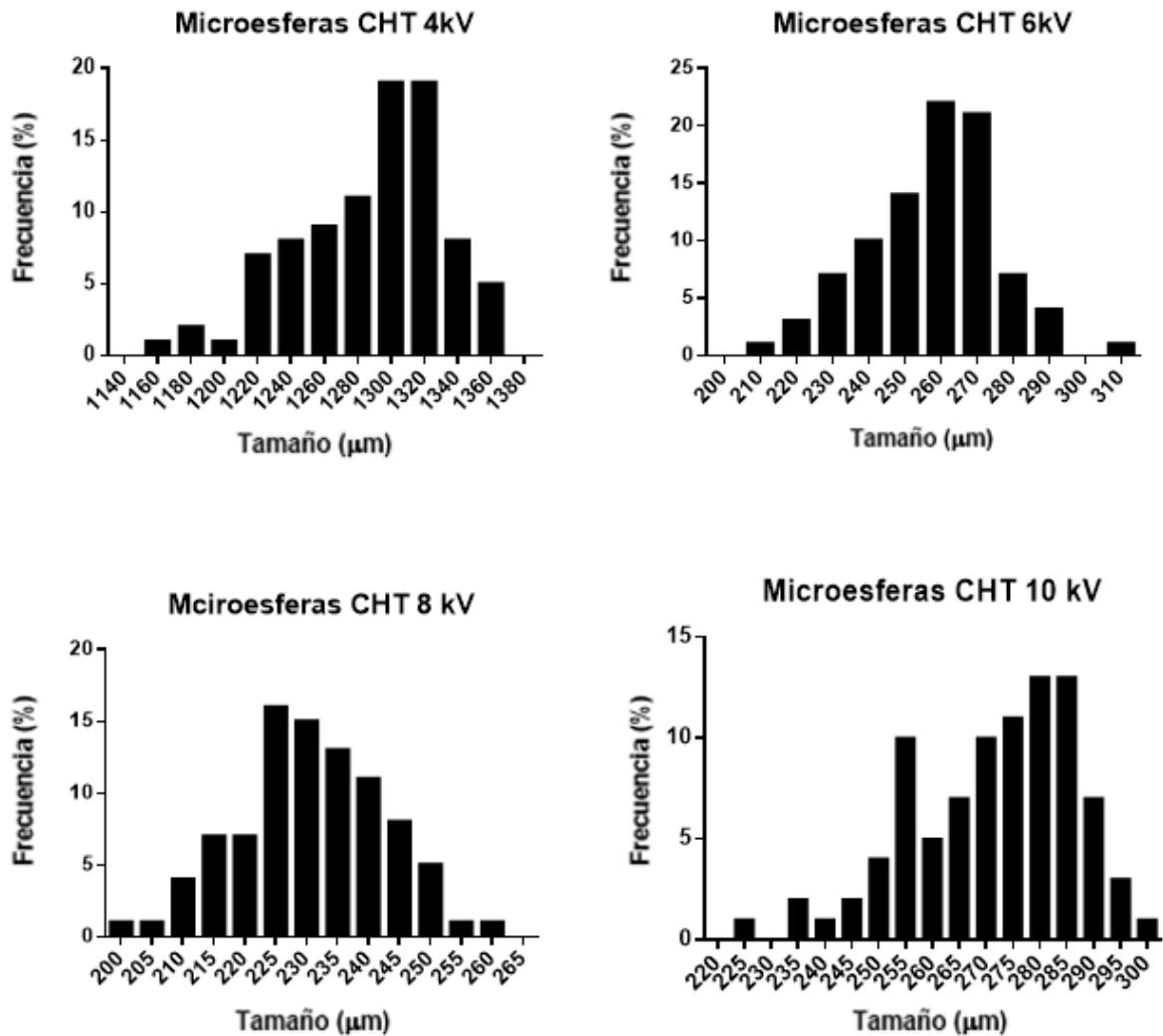


Figura 17. Distribución de tamaño de las microsferas de quitosano a los diferentes voltajes.

Tabla 8. Estadísticos descriptivos para las esferas de quitosano a distintos voltajes.

Voltaje (kV)	N total	Media (µm)	Desviación estándar (µm)	Mínimo (µm)	Máximo (µm)	Mediana (µm)
4	120	1287,03	44,92	1158	1369	1297,5
6	120	256,76	17,92	207	305	258
8	120	230,74	11,97	200,81	261,27	230,05
10	120	271,38	15,26	224,17	299,94	275,96

5.3 Caracterización del hinchado de las microesferas de quitosano

La primera técnica empleada para llevar a cabo esta caracterización pretendía estudiar el comportamiento de hinchado por cambios volumétricos de la estructura de las microesferas al ser secadas al aire. Sin embargo, dicho proceso no pudo ser completado ya que, una vez el agua fue eliminada por completo mediante el empleo de desecador, las microesferas perdieron su estructura tridimensional (Figura 18b), presentando una morfología colapsada que impedía compararlas con su estado inicial de hinchado.

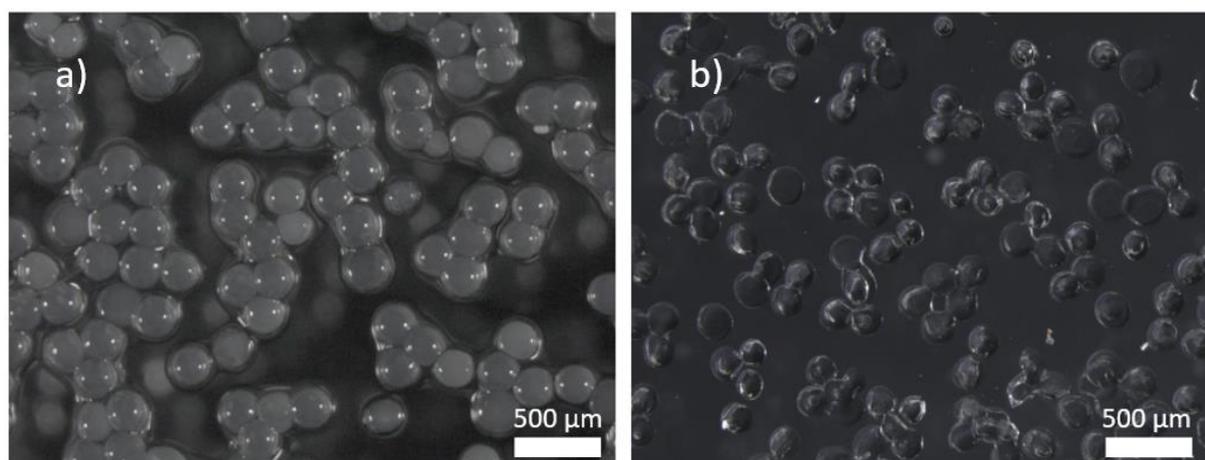


Figura 18. Microesferas de quitosano 10 kV en estado hinchado (a) y tras ser secadas mediante desecador (b).

Posteriormente, en vista a los resultados obtenidos, se pensó en la valoración del hinchado de las microesferas mediante peso en vez de mediante volumen. Dichas microesferas fueron pesadas en estado húmedo y, tras ser secadas por liofilización, se obtuvieron los resultados que se exponen en la Tabla 9.

Tabla 9. Grado de hinchado promedio de las microesferas de quitosano empleando el proceso de liofilización para obtener el peso seco.

Muestra	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Grado de hinchado (%)	Grado hinchado promedio (%) ± SD
1	142,5	29,4	384,7	366,4 ± 37,286
2	175,3	35,7	391	
3	173,2	40,9	323,5	

Estos resultados resultan congruentes con las imágenes analizadas tras liofilizar las esferas de quitosano, ya que una gran parte de las que se quedaban en el fondo del vial presentaban una morfología colapsada. En este caso, en la muestra 1 se depositó una pequeña porción de microesferas en el fondo, en la muestra 2 dicha cantidad se intentó mantener lo más análoga posible a la muestra anterior, con la diferencia de que se dejó una mayor cantidad de agua en la interfase, lo que explicaría un mayor peso en estado húmedo. Por otra parte, en la muestra 3 se depositaron una mayor cantidad de esferas en el fondo, así como una mayor cantidad de agua en la interfase, en comparación con las muestras anteriores.

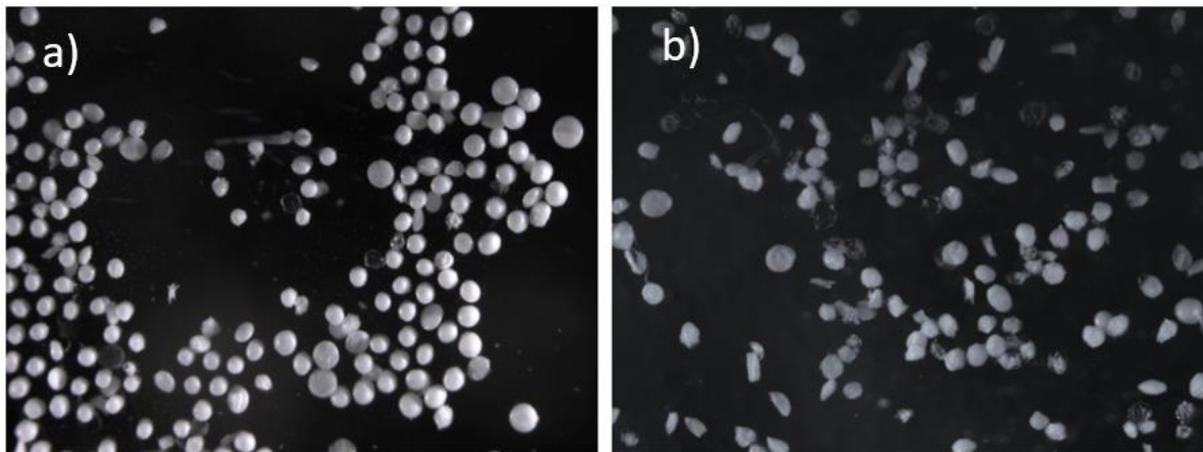


Figura 19. Microesferas de quitosano liofilizadas. a) Microesferas en las paredes del vial manteniendo su estructura esférica; (b) Microesferas en el fondo del vial presentando una morfología aplastada. Imágenes tomadas con lupa binocular

Respecto a la liofilización de las esferas se vio que para obtener una morfología procesable debían situarse en un soporte distinto del plano habitual, ya que sobre este las esferas perdían su estructura esférica durante la liofilización. Así, este ensayo permitió, además de la caracterización del hinchado, comprobar que las esferas en las paredes del vial mantienen su estructura tridimensional a diferencia de las que quedan en el fondo, tal como se puede ver en la Figura 19. Esto resulta de interés, ya que en una futura aplicación de las microesferas estas deberán ser liofilizadas para evitar la degradación temprana del quitosano, la cual se acentúa, sobre todo, cuando se encuentra a temperaturas superiores a 5°C y/o en contacto con soluciones ácidas (durante la hidrólisis el ácido actúa como catalizador, rompiendo las cadenas de polímero) (Szymańska & Winnicka, 2015).

5.4 Caracterización mecánica de las microesferas

La caracterización mecánica de las microesferas se realizó en base a un ensayo de compresión confinada, tal y como se expone en el apartado 4.2.7. De esta forma, se ensayaron 3 grupos de sistemas de microesferas basados en PLLA puro, mezcla de PLLA y quitosano, y CHT puro, respectivamente, obteniéndose para cada uno de ellos las curvas de tensión-deformación. En la Figura 20 se muestra un gráfico conjunto de las curvas de tensión-deformación de las 3 réplicas de los sistemas de microesferas basadas en PLLA.

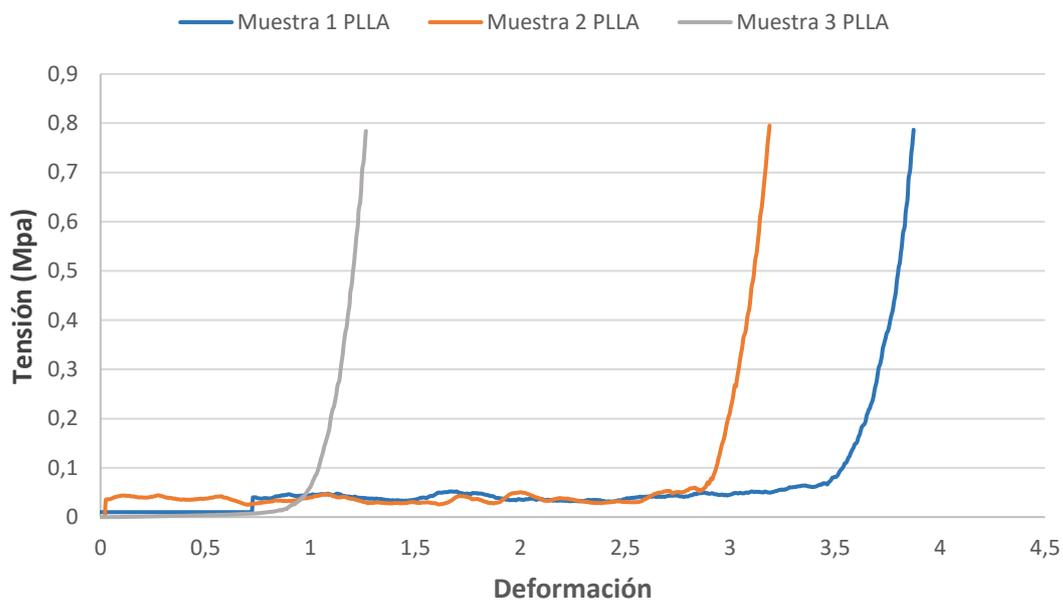


Figura 20. Curvas de tensión-deformación para las muestras de PLLA

Las curvas de PLLA muestran una primera región prácticamente invariante en torno al valor 0 de tensión que es distinta según la réplica. Esto no habría que tenerlo en cuenta ya que esta zona se corresponde con la expulsión del líquido (DMEM) a través de los agujeros del cilindro que contenía a las esferas. De hecho, el punto de referencia de este ensayo es en el que el pistón entra en contacto con la superficie del líquido. Sin embargo, no se observó ninguna de deformación lineal intermedia que permitiera evaluar el módulo de Young. Esto puede ser debido a que cuando entraban en contacto con la fina placa de teflón situada sobre ellas (con un diámetro ligeramente menor al del recipiente cilíndrico que contenía las esferas para evitar registrar valores asociados a fricción), estas microesferas, al ser tan rígidas, en vez de deformarse tendían a escapar a la superficie.

Sin embargo, en el caso de las microesferas de quitosano ocurría algo similar al tramo inicial de la curva de tensión-deformación por eliminación del líquido, pero con la diferencia respecto a las de PLLA de que sí se observaba un tramo inicial de pendiente baja, pero apreciable, que se corresponde con la zona de comportamiento elástico de las esferas de quitosano. Así, a partir de dicha curva puede determinarse el módulo de Young como la pendiente de la curva en el tramo lineal.

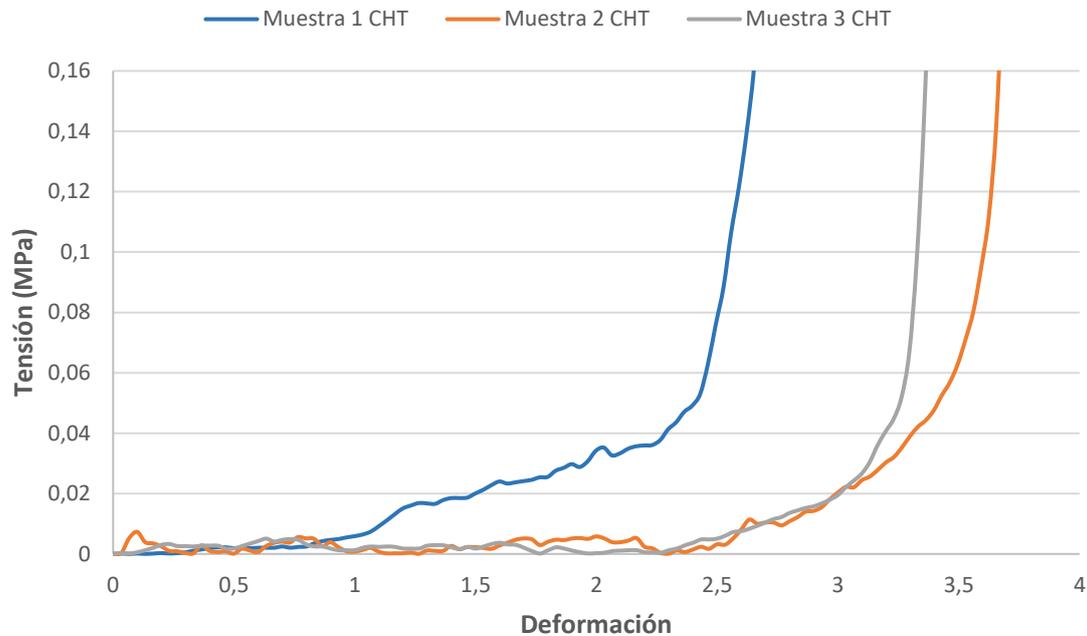


Figura 21. Curvas de tensión-deformación para las muestras de CHT

De esta forma, para calcular el módulo de Young se ha hecho un promedio de las 3 curvas asociadas a las muestras de CHT ensayadas, obteniéndose un módulo promedio final de $0,04 \pm 0,018$ MPa. Asimismo, el material de mezcla PLLA:CHT mostró también una zona lineal que permitió estudiar su comportamiento mecánico, tal como se puede apreciar en la Figura 22. Analizando la pendiente de esta zona, se obtuvo de forma análoga el módulo de Young, mostrando un valor promedio de $0,059 \pm 0,007$ MPa. Dichos valores resultan razonables ya que la estructura analizada estaba basada en microesferas, con comportamiento distinto al que pueden tener films o bloque (aunque están en un rango aceptable, no resulta directamente comparable a los datos consultados en bibliografía), y estas no presentaban entrecruzamiento (con el que se obtendrían valores mayores).

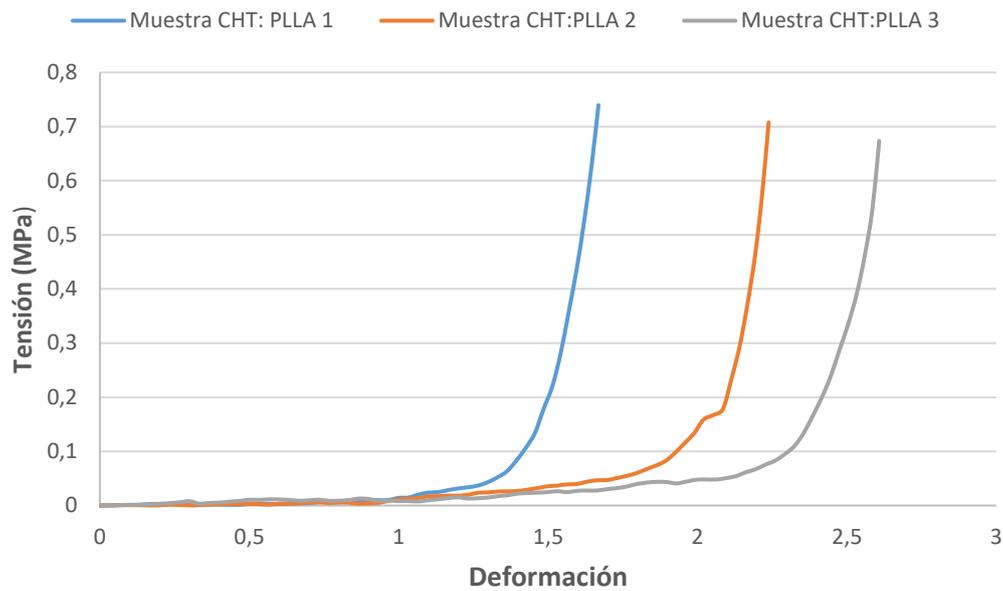


Figura 22. Curvas de tensión-deformación para las muestras de CHT:PLLA

En base a estos resultados se puede comprobar que la adición de esferas de PLLA, más rígidas, al sistema de esferas de quitosano puro permite mejorar sus propiedades mecánicas, con un aumento del módulo mecánico de 0,04 MPa (CHT puro) a 0,059 MPa (CHT:PLLA), lo cual supone un aumento del módulo elástico en un 47,5 %, resultando este un cambio estadísticamente significativo (p -valor $<0,05$).

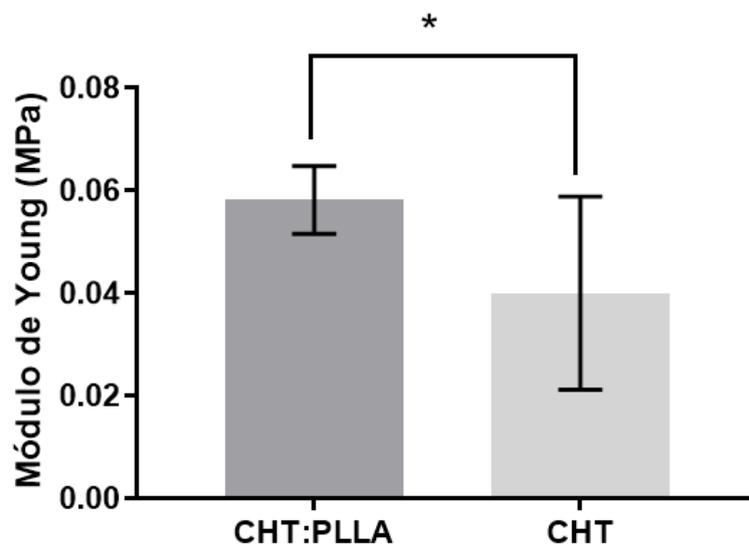


Figura 23. Valor módulo promedio de los sistemas de microesferas de CHT:PLLA y los sistemas de microesferas CHT. Estos han sido analizados mediante t-test (p <0,05) haciendo uso del programa GraphPad Prism 7.03

5.5 Cultivos celulares de las microesferas poliméricas y las MSCs

En base a las características químicas y biológica del CHT y el PLLA, mencionadas en los apartados 1.2.3 y 1.2.4, respectivamente, se decidió que estos fueran los biomateriales componentes de las microesferas que entrarían en contacto directo con las células mesenquimales. Las microesferas de PLLA actuarían como material de adhesión celular gracias a su carácter parcialmente hidrófobo inducido por una modificación superficial mediante tratamiento de plasma, previamente realizada al cultivo celular. Por otro lado, las microesferas de quitosano impedirían el contacto directo entre las microesferas rígidas y, gracias a su carácter de hidrogel, jugarían un papel importante en la difusión de nutrientes y la vascularización. Es por ello que, entre los objetivos de este trabajo, además del diseño de un sistema de cultivo tridimensional, se quería evaluar la respuesta de las MSCs en este ambiente.

Respecto al **ensayo de DNA**, se prepararon los estándares a partir de una disolución stock de 100 µg/mL para definir una curva patrón a partir de la cual se pudieran obtener los parámetros de fluorescencia correspondientes a cada material. Así, teniendo en cuenta las concentraciones expuestas en la Tabla 4, fue posible obtener una recta de calibrado lineal, con un coeficiente de correlación de 0,9995 para el tiempo 0 (24 horas).

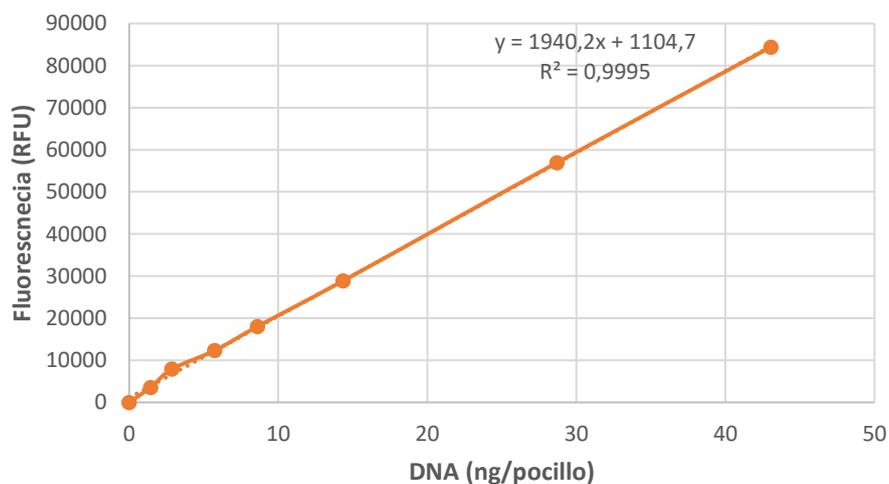


Figura 24. Curva de calibrado para el ensayo de DNA a día 0

Para tiempo 14 (día 15) se siguió un procedimiento análogo al de tiempo 0, difiriendo en que las muestras de PLLA fueron diluidas 1:10 en TE1X ya que, tras realizar un ensayo previo (con diluciones 1:10, 1:100 y 1:200), se vio que eran los valores asociados a esta dilución los que entraban dentro de la curva sin llegar a saturar.

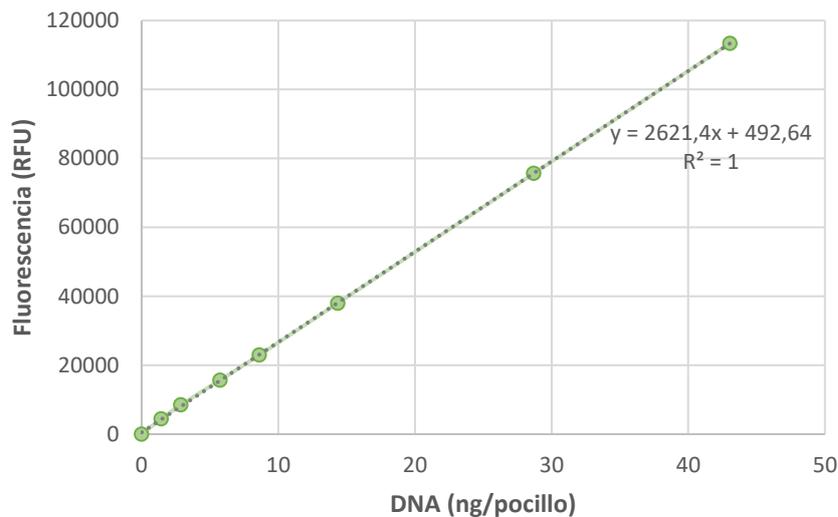


Figura 25. Curva de calibrado para el ensayo de DNA a día 14

De esta forma, se pudieron obtener los ng/pocillo para las muestras de cada tipo de material, tiempo y condición de cultivo. Esta concentración permitió calcular la cantidad de DNA total por pocillo multiplicando los ng/pocillo por un factor de dilución, el cual se determinó sabiendo que se cada pocillo contenía 28,7 μ L de una solución total de digestión de 250 μ L. Por último, sabiendo que cada célula contiene 9,55 μ g de DNA, fue posible obtener un promedio del número total de células adheridas a cada material.

Tabla 10. Resultados del ensayo fosfatasa DNA a tiempo 0 (24 h), tiempo 1 (día 0) y tiempo 14 (día 15).

	Condición	Material	Nº medio células	\pm SD
T0	MND	PLLA	93994,9	7825,5
		PLLA:CHT	521,7	982,2
		CHT	56,4	73,8
T14	MD	PLLA	110023,8	8678,5
		PLLA:CHT	812,3	301,8
		CHT	24,7	48,4
	MD	PLLA	117640,2	2466,5
		PLLA:CHT	1290,8	239,8
		CHT	49,7	99,5

* MND: medio de no inducción de diferenciación; MD: medio de diferenciación

** \pm : desviación estándar

Con todo ello, fue posible concluir que existía, en los materiales sobre los que se hizo la siembra, cierta proliferación celular respecto a la población inicialmente adherida (Tabla 10), aunque esta fue muy pequeña teniendo en cuenta un período de 14 días del cultivo celular. Sin embargo, es posible ver una clara adhesión y supervivencia por parte de las MSCs en el material de PLLA, principalmente (Figura 26). En este sentido se comprueba que es en el CHT en el que se obtiene una menor eficiencia de siembra, prácticamente inapreciable y con bastante error, lo cual es normal, ya que las MSCs necesitan cierta hidrofobicidad y rigidez por parte del sustrato para adherirse.

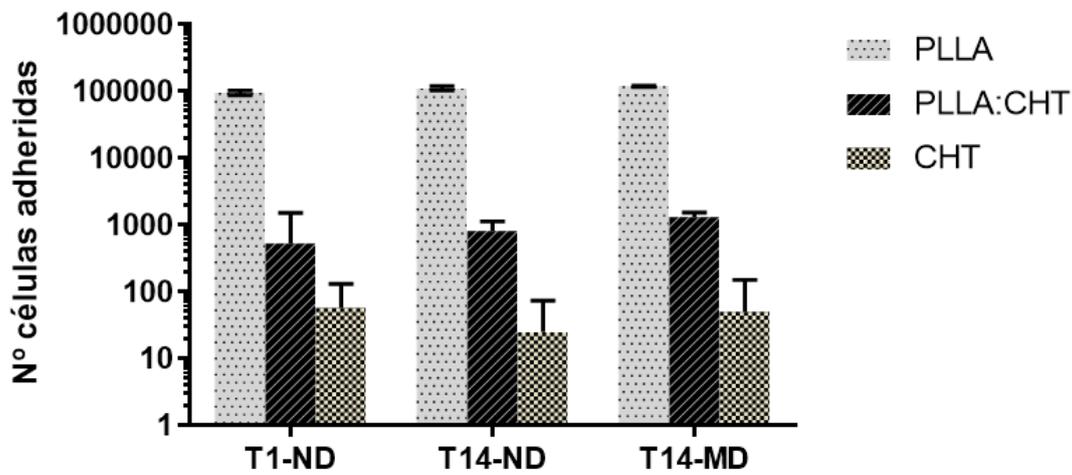


Figura 26. Representación a escala logarítmica del número de células adheridas en cada sistema material de microesferas. Se ha empleado esta escala para obtener una mejor visualización y comparación de los resultados.

Para calcular la eficiencia de siembra se dividió el número de células adheridas, obtenidas a partir de la tabla X entre la densidad celular inicial (150000 células). Por otro lado, si se compara porcentualmente entre materiales se aprecia que en el único en el que se dio una adhesión razonable por parte de las MSCs fue en el PLLA, con una eficiencia de siembra a tiempo 1 respecto a la siembra inicial del 62,7 % y una proliferación a tiempo 14 del 17,1% cuando se cultivaban con medio de no inducción de diferenciación y del 25,2% cuando se hacía con medio de diferenciación.

Los siguientes ensayos se realizaron teniendo en cuenta que los osteoblastos, durante su maduración, secretan ciertas proteínas de la matriz ósea entre las que se incluye el colágeno tipo I, la fosfatasa alcalina y la sialoproteína ósea (Jensen, Gopalakrishnan, & Westendorf, 2010). De esta forma, uno de los ensayos de centraba en medir la **actividad de fosfatasa alcalina**, una enzima, expresada por los osteoblastos, que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, lo cual contribuye a la mineralización del osteoide. Así, la ALP es considerado un marcador de diferenciación temprana de los osteoblastos, aumentando su actividad conforme va avanzando la actividad osteoblástica.

Para tiempo 0, se calculó la curva de calibrado (Figura 27) a partir de las concentraciones estándares y las absorbancias obtenidas para estos. Sin embargo, para la determinación de dicha curva fue necesario descartar los valores de absorbancia mayores que 2 ya que a partir de este valor se considera que se alcanza la saturación y los resultados no presentan un comportamiento lineal.

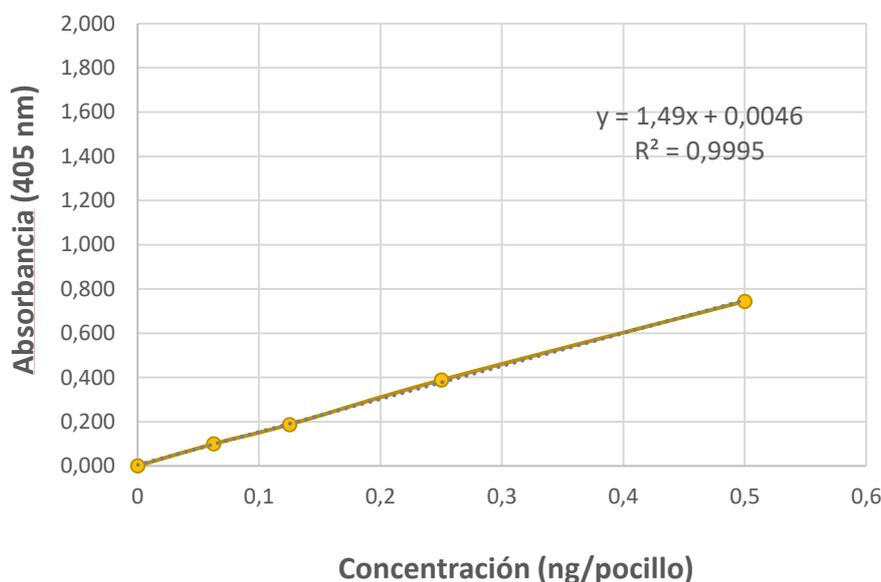


Figura 27. Curva de calibrado para el ensayo de ALP a día 0

En el caso de los tiempos 7 y 14, se procedió de manera análoga a la expuesta para tiempo 0, con la diferencia de que se consideraron dos condiciones para ambos tiempos: muestras con medio de diferenciación y muestras sin medio de diferenciación. Así, tras el tratamiento de los datos obtenidos, los resultados se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados del ensayo fosfatasa alcalina a tiempo 0 (24 h), tiempo 7 (día 8) y tiempo 14 (día 15).

	Condición	Material	Absorbancia	ng/mL
T0	MND	PLLA	0,208 ± 0,07	2,741 ± 0,092
		PLLA:CHT	0,207 ± 0,136	2,717 ± 0,211
		CHT	0,113 ± 0,039	1,461 ± 0,517
T7	MND	PLLA	0,126 ± 0,016	1,910 ± 0,315
		PLLA:CHT	0,182 ± 0,028	3,032 ± 0,556
		CHT	0,165 ± 0,020	2,689 ± 0,398
T14	MND	PLLA	0,211 ± 0,044	4,149 ± 0,954
		PLLA:CHT	0,166 ± 0,036	3,174 ± 0,78
		CHT	0,049 ± 0,032	0,640 ± 0,662

* MND: medio de no inducción de diferenciación

** ± : desviación estándar

A la vista de estos resultados es posible comprobar que sólo el PLLA y la mezcla muestran una actividad de ALP razonable. Esto es debido a que, como se ha visto en el ensayo anterior las células no se adhieren al CHT y, por tanto, conforme va avanzando el período de incubación, el ALP existente se va degradando, llegando en T14 a estar incluso por debajo de la desviación de los datos. Las condiciones con medio osteogénico no han podido ser analizadas por la incoherencia de los datos, en los que la propia señal del estándar 0 superaba las de estas muestras. Esto puede ser debido a que el medio de la curva tiene ALP fresco, mientras que el de las muestras contiene FBS incubado 2 días por lo que es posible que haya habido degradación de la ALP del FBS.

En referencia al **ensayo de glicosaminoglicanos**, se hallaron las curvas patrón en base a la absorbancia dada por el reactivo DMMB cuando se une a los GAGs sulfatados debido a su carácter catiónico. Puesto que sólo en PLLA se obtuvieron un número razonable de células, era de esperar que sólo este presentara valores de GAGs lo suficientemente elevados para poder darles cierta significancia. A todo esto, se suma que el DMMB no proporciona valores precisos cuando las concentraciones de GAGs se sitúan por debajo de los 5 µg/mL (Barbosa et al., 2003) y, en este caso, todos los valores son menores que dicho umbral.

Tabla 12. Resultados de glicosaminoglicanos a tiempo 0 (24 h) y tiempo 14 (día 15).

	Condición	Material	Absorbancia	µg/mL
T0	MND	PLLA	0,027 ± 0,008	1,060 ± 0,389
		PLLA:CHT	0,007 ± 0,003	0,092 ± 0,078
		CHT	0,005 ± 0,001	0,023 ± 0,036
T14	MD	PLLA	0,048 ± 0,016	2,293 ± 0,811
		PLLA:CHT	0,005 ± 0,003	0,127 ± 0,133
		CHT	0,005 ± 0,003	0,141 ± 0,139
	MD	PLLA	0,066 ± 0,008	3,194 ± 0,400
		PLLA:CHT	0,008 ± 0,003	0,311 ± 174
		CHT	0,003 ± 0,002	0,067 ± 0,065

* MND: medio de no inducción de diferenciación

** ± : desviación estándar

Por otro lado, y como ya se ha comentado, el colágeno tipo I es una proteína que también es sintetizada por los osteoblastos, siendo la más abundante de la matriz ósea. Esta síntesis resulta necesaria para la deposición de matriz mineralizada. Así, por considerarlo un marcador temprano de diferenciación osteogénica, otro de los ensayos se basó en la cuantificación de esta proteína por medio de la unión de un compuesto colorimétrico a la hidroxiprolina.

El **colágeno total** de cada muestra fue determinado sabiendo que aproximadamente un 13,5% del colágeno es hidroxiprolina. Sin embargo, los valores de absorbancia fueron tan bajos (ya que era necesario restar el blanco del estándar), que se superaba el rango de sensibilidad del espectrofotómetro impidiendo así obtener unos resultados cuantificables. Esto, aunque puede ser debido a que el volumen tomado fuera muy bajo (era el mínimo recomendable para este ensayo), la cantidad de muestra de la que se disponía no permitía trabajar con otros volúmenes mayores.

6. CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Grado se ha llevado a cabo el desarrollo de entornos tridimensionales basados en técnicas de ingeniería tisular para estudiar y promover la diferenciación de las MSCs hacia el linaje osteoblástico.

Para el establecimiento de los sistemas de cultivo *in vitro* se han fabricado dos tipos de microesferas. Por un lado, las microesferas de PLLA, que han sido obtenidas mediante emulsión por evaporación de solvente (O/W) a distintas velocidades, comprobándose que, disminuyendo o aumentando las velocidades de agitación es posible obtener estructuras superficiales esferulíticas o más lisas y diámetros de partícula más altos o más bajos, respectivamente. Por otro lado, se ha conseguido optimizar el proceso de fabricación de las microesferas de quitosano, mediante cambios en la concentración, la velocidad de inyección y el lumen de aguja de inyección, para conseguir rangos de tamaño menores a lo que en un principio se obtenían (alrededor de 450 μm). Haciendo un balance sobre los tamaños y morfologías asociadas para ambos tipos de esferas, se ha llegado a la conclusión de que los parámetros más adecuados se correspondían con las esferas de PLLA obtenidas a 200 rpm y las esferas de quitosano a 10 kV. Por otro lado, en relación también a las microesferas de quitosano, se estudiaron diversos métodos para comparar su estructura en estado húmedo y seco, deduciéndose que la mejor técnica para ello es la liofilización, por mantener su forma esférica, siempre y cuando dichas esferas no se sitúen directamente sobre una superficie horizontal. Este método también ha servido para establecer una técnica de almacenaje de las microesferas de quitosano de forma que, cuando tengan que ser empleadas, solo será necesario rehidratarlas.

Por otro lado, en los ensayos mecánicos de compresión confinada sólo se han podido determinar los módulos de Young de los sistemas de CHT y CHT:PLLA, llevando a establecer unos módulos promedio de 0,040 MPa y 0,059 MPa, respectivamente. Sin embargo, las microesferas de PLLA no han podido ser evaluadas en este sistema por el comportamiento y carácter rígido presentado.

Una vez se disponía de todas las esferas, estas fueron empleadas para elaborar el sistema 3D de cultivo *in vitro* con MSCs. De los resultados obtenidos se concluye que el sistema de microesferas de PLLA permite obtener una eficiencia de siembra aceptable, a diferencia de los otros materiales; sin embargo no se observa una proliferación elevada a lo largo del tiempo, aunque la población celular se mantiene. En caso de los materiales de cultivo PLLA:CHT y CHT puro no existe apenas adhesión y proliferación.

7. LÍNEAS FUTURAS

Como líneas futuras a este trabajo se propone realizar estudios similares variando los tamaños de las microesferas o modificando sus propiedades, sobre todo para las de quitosano, ya que ha sido con las que se ha obtenido unos peores resultados. Estas podrían ser entrecruzadas, para mejorar sus características mecánicas, aunque resultaría necesario evaluar los posibles problemas de citotoxicidad o de irregularidad estructural que pueden venir derivados de dicho entrecruzamiento.

En el sentido celular, podría aumentarse la densidad de siembra inicial para ver si se establece una respuesta distinta a la obtenida, pero teniendo en cuenta que no es el objetivo de este trabajo que se forme un pellet de células, sino que estas interactúen con su entorno y este sea capaz de promover su diferenciación. Por otro lado, también sería interesante usar algún ensayo de tinción celular como DAPI o, si en estadios de diferenciación más avanzados, Alizarin Red, para comprobar mediante imágenes si realmente existen o no células en determinadas ocasiones o si, por el contrario, es el método de cuantificación empleado el que carece de precisión.

Por último, uno de los retos futuros de este proyecto futuro sería el estudio y la optimización técnicas de microfluídica para mejorar el rendimiento de los procesos descritos, sobre todo para las de PLLA, así como tener un control sobre estos mucho más eficiente. Esto, junto a una mejor comprensión de la respuesta de las MSCs en un ambiente como este, serían los puntos clave para obtener un entorno tridimensional adecuado para la consecución de todos los objetivos descritos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Anadón, C., & Luis, J. (2008). La seda como biomaterial en Medicina Regenerativa. *Eubacteria ISSN 1697-0454*, N^o. 20, (20), 19. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/dcart?info=link&codigo=2934749&orden=202312>
- Anderson, H. J., Sahoo, J. K., Ulijn, R. V, Dalby, M. J., & Anderson, H. J. (2016). Mesenchymal Stem Cell Fate : Applying Biomaterials for Control of Stem Cell Behavior. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00038>
- Arima, Y., & Iwata, H. (2007). Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*, 28(20), 3074–3082. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.013>
- Armentano, I., Ciapetti, G., Pennacchi, M., Dottori, M., Devescovi, V., Granchi, D., ... Alava, M. (2009). Role of PLLA Plasma Surface Modification in the Interaction with Human Marrow Stromal Cells. *Journal of Applied Polymer Science*, 114(6), 3602–3611. <https://doi.org/10.1002/app>
- Arvidson, K., Abdallah, B. M., Applegate, L. A., Baldini, N., Cenni, E., Gomez-Barrena, E., ... Finne-Wistrand, A. (2011). Bone regeneration and stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(4), 718–746. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01224.x>
- Barbosa, I., Garcia, S., Barbier-Chassefière, V., Caruelle, J. P., Martelly, I., & Papy-García, D. (2003). Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology*, 13(9), 647–653. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg082>
- Beyer Nardi, N., & Da Silva Meirelles, L. (2006). Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 174, 249–282. <https://doi.org/10.1007/3-540-31265-X-11>
- Bieback, K., Kern, S., Klüter, H., & Eichler, H. (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22(4), 625–634. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-4-625>
- Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>

- Brydone, A. S., Meek, D., & Maclaine, S. (2010). Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 224(12), 1329–1343. <https://doi.org/10.1243/09544119JEIM770>
- Casalini, T., Rossi, F., Santoro, M., Perale, G., Chimica, D., Chimica, I., ... Milano, P. (2011). Structural Characterization of Poly- L -lactic Acid (P L LA) and Poly (glycolic acid)(PGA) Oligomers. *International Journal of Molecular Sciencies*, 3857–3870. <https://doi.org/10.3390/ijms12063857>
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(11), 2739–49. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0197>
- Chang, H., Huang, C., Lin, K., Kao, W., Liao, H., You, Y., ... Shyue, J. (2014). E ffect of Surface Potential on NIH3T3 Cell Adhesion and Proliferation. *The Journal of Physical Chemistry*, 118(26), 14464–14470.
- Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., ... Shi, Y. (2016). Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death and Differentiation*, 23(7), 1128–1139. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.168>
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780–792. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>
- Cruz, D. M. G., Gomes, M., Reis, R. L., Moratal, D., Salmerón-Sánchez, M., Ribelles, J. L. G., & Mano, J. F. (2010). Differentiation of mesenchymal stem cells in chitosan scaffolds with double micro and macroporosity. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 95(4), 1182–1193. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32906>
- Cukierman, E. (2001). Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science*, 294(5547), 1708–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1064829>
- Dalby, M. J., Gadegaard, N., & Oreffo, R. O. C. (2014). interactions to influence stem cell fate. *Nature Publishing Group*, 13(6), 558–569. <https://doi.org/10.1038/nmat3980>
- Downey, P. A., & Siegel, M. I. (2006). Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther*, 86(1), 77–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16386064>
- Duque, H., Chaves, D. M., Olate, S., Alfonso, G., Chaves, M., Netto, C., & An, R. (2009). Análisis

- Histológico del Proceso de Reparación en Defectos Óseos . Reconocimiento de Defectos Críticos. *Int. J. MORPHOL.*, 27(4), 1121–1127. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022009000400027>
- Dutta, P. K. (n.d.). *Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine*.
- El-sherbiny, I. M., & El-baz, N. M. (2015). *A Review on Bionanocomposites Based on Chitosan and Its Derivatives for Biomedical Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2473-0>
- Feng, X. (2009). Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Curr Chem Biol*, 3(2), 975–990. <https://doi.org/10.2174/187231309788166398>.Chemical
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Foster, K. a, Yazdani, M., & Audus, K. L. (2001). Microparticulate uptake mechanisms of in-vitro cell culture models of the respiratory epithelium. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(1), 57–66. <https://doi.org/10.1211/0022357011775190>
- Guelcher, S. A., Srinivasan, A., Dumas, J. E., Didier, J. E., McBride, S., & Hollinger, J. O. (2008). Synthesis, mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of polyurethane networks from lysine polyisocyanates. *Biomaterials*, 29(12), 1762–1775. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.046>
- Guilak, F., Cohen, D. M., Estes, B. T., Gimble, J. M., Liedtke, W., & Chen, C. S. (2009). Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell*, 5(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.016>
- Gunatillake, P. A., Adhikari, R., & Gadegaard, N. (2003). Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*, 5, 1–16. <https://doi.org/10.22203/eCM.v005a01>
- Higuchi, A., Ling, Q. D., Chang, Y., Hsu, S. T., & Umezawa, A. (2013). Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate. *Chemical Reviews*, 113(5), 3297–3328. <https://doi.org/10.1021/cr300426x>
- Jensen, Gopalakrishnan, & Westendorf, J. J. (2010). Regulation of Gene Expression in Osteoblasts. *Biofactors*, 36(1), 25–32. <https://doi.org/10.1002/biof.72>.Regulation
- Kao, C.-T., Lin, C.-C., Chen, Y.-W., Yeh, C.-H., Fang, H.-Y., & Shie, M.-Y. (2015). Poly(dopamine) coating of 3D printed poly(lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and*

Engineering: C, 56, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.06.028>

Katzur, V., Eichler, M., Deigele, E., Stage, C., Karageorgiev, P., Geis-Gerstorfer, J., ... Müller, R. (2012). Surface-immobilized PAMAM-dendrimers modified with cationic or anionic terminal functions: Physicochemical surface properties and conformational changes after application of liquid interface stress. *Journal of Colloid and Interface Science*, 366(1), 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.09.029>

Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*, 24(5), 1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>

Kim, S. E., Park, J. H., Cho, Y. W., Chung, H., Jeong, S. Y., Lee, E. B., & Kwon, I. C. (2003). Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: Implications for cartilage tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 91(3), 365–374. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00274-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00274-8)

Leach, J. K., & Whitehead, J. (2017). Materials-Directed Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering and Regeneration. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, acsbiomaterials.6b00741. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00741>

Leferink, A. M., Santos, D., Karperien, M., Truckenmuller, R. K., van Blitterswijk, C. A., & Moroni, L. (2015). Differentiation capacity and maintenance of differentiated phenotypes of human mesenchymal stromal cells cultured on two distinct types of 3D polymeric scaffolds. *Integrative Biology*, 7(12), 1574–1586. <https://doi.org/10.1039/C5IB00177C>

Li, Y., Chen, S. K., Li, L., Qin, L., Wang, X. L., & Lai, Y. X. (2015). Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of Orthopaedic Translation*, 3(3), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2015.05.002>

Lin, C. S., Xin, Z. C., Dai, J., & Lue, T. F. (2013). Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histology and Histopathology*, 28(9), 1109–1116. <https://doi.org/HH-11-330> [pii]

Ma, G., & Su, Z. (2013). *Microspheres and microcapsules in biotechnology: Design, preparation and applications*. *Microspheres and Microcapsules in Biotechnology: Design, Preparation and Applications*. <https://doi.org/10.4032/9789814364621>

Mansouri, V., Salehi, M., Omrani, M. davood, Niknam, Z., & Ardeshiryajimi, A. (2017). Collagen-

- alginate microspheres as a 3D culture system for mouse embryonic stem cells differentiation to primordial germ cells. *Biologicals*. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.04.003>
- Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., ... Gimble, J. M. (2006). Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *Stem Cells*, 24(2), 376–385. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0234>
- Mitra, M., Mohanty, C., Harilal, A., Maheswari, U. K., Sahoo, S. K., & Krishnakumar, S. (2012). A novel in vitro three-dimensional retinoblastoma model for evaluating chemotherapeutic drugs. *Molecular Vision*, 18(July 2011), 1361–78. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3369889&tool=pmcentrez&render_type=abstract
- Muzzarelli, R. A. A. (2009). Chitins and chitosans for the repair of wounded skin , nerve , cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 167–182. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.002>
- Muzzarelli, R. A. A., Mattioli-Belmonte, M., Tietz, C., Biagini, R., Ferioli, G., Brunelli, M. A., ... Biagini, G. (1994). Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, 15(13), 1075–1081. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(94\)90093-0](https://doi.org/10.1016/0142-9612(94)90093-0)
- Nakamura, H. (2007). Morphology , Function , and Differentiation of Bone Cells. *Journal of Hard Tissue Biology*, 16(1), 15–22. <https://doi.org/10.2485/jhtb.16.15>
- Narbona-Carceles, J., Vaquero, J., Suarez-Sancho, S. B. S., Forriol, F., & Fernandez-Santos, M. E. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cell aspirates from alternative sources: Is the knee as good as the iliac crest? *Injury*, 45(S4), S42–S47. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(14\)70009-9](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(14)70009-9)
- Pabst, W., & Gregorova, E. (2007). Characterization of particles and particle systems. *ICT Prague*, 1–122. Retrieved from http://vscht.cz/sil/keramika/Characterization_of_particles/CPPS_English_version_.pdf
- Pitt, C. G., Chasin, M., Domb, A., Ron, E., Mathiowitz, E., Langer, R., ... Grossman, S. (1990). Poly (E-caprolactone) and its copolymers. In *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (pp. 71–120). [https://doi.org/10.1016/0223-5234\(91\)90162-G](https://doi.org/10.1016/0223-5234(91)90162-G)
- Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M., & Ramirez-Vick, J. E. (2014). Scaffold Design for Bone Regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(1), 15–56. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9127>

- Przekora, A. (2014). Biological properties of novel chitosan-based composites for medical application as bone substitute, *9*(6). <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0297-y>
- Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A. M., & Chiellini, E. (2010). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, *35*(4), 403–440. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006>
- Qi, Z. R., Zhang, Q., Tan, L. L., Lin, X., Yin, Y., Wang, X. L., ... Wang, Y. (2014). Comparison of degradation behavior and the associated bone response of ZK60 and PLLA in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *102*(5), 1255–1263. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34795>
- Qureshi, A. T., Terrell, L., Monroe, W. T., Dasa, V., Janes, M. E., Gimble, J. M., & Hayes, D. J. (2014). Antimicrobial biocompatible bioscaffolds for orthopaedic implants. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *8*(5), 386–395. <https://doi.org/10.1002/term.1532>
- Rasal, R. M., Janorkar, A. V., & Hirt, D. E. (2010). Progress in Polymer Science Poly (lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*, *35*(3), 338–356. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.12.003>
- Rebelatto, C. K., Aguiar, A. M., Moretão, M. P., Senegaglia, A. C., Hansen, P., Barchiki, F., ... Correa, A. (2008). Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *233*(7), 901–13. <https://doi.org/10.3181/0712-RM-356>
- Rinaudo, M., & Desbrieres, J. (1999). Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan, *3861*(October 2016). [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00056-7)
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., & Muneta, T. (2005). Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis and Rheumatism*, *52*(8), 2521–2529. <https://doi.org/10.1002/art.21212>
- Sekiya, I., Larson, B. B. L., Smith, J. J. R., Pochampally, R., Cui, J.-G., & Prockop, D. J. (2002). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem ...*, *20*(6), 530–541. <https://doi.org/10.1634/stemcells.20-6-530>
- Sun, J.-Y., Zhao, X., Illeperuma, W. R. K., Chaudhuri, O., Oh, K. H., Mooney, D. J., ... Suo, Z. (2012). Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature*, *489*(7414), 133–136. <https://doi.org/10.1038/nature11409>

- Szymańska, E., & Winnicka, K. (2015). Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md13041819>
- Via, A. G., Frizziero, A., Oliva, F., & Oliva, F. (n.d.). Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources Corresponding author :, 154–162.
- Wang, D. X., He, Y., Bi, L., Qu, Z. H., Zou, J. W., Pan, Z., ... Ding, J. D. (2013). Enhancing the bioactivity of Poly(lactic-co-glycolic acid) scaffold with a nano-hydroxyapatite coating for the treatment of segmental bone defect in a rabbit model. *International Journal of Nanomedicine*, *8*, 1855–1865. <https://doi.org/10.2147/IJN.S43706>
- Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L., & Keely, P. J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1692*(2–3), 103–119. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.007>
- Wu, Y. C., Shaw, S. Y., Lin, H. R., Lee, T. M., & Yang, C. Y. (2006). Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. *Biomaterials*, *27*(6), 896–904. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.002>
- Xu, Y., Shi, T., Xu, A., & Zhang, L. (2016). 3D spheroid culture enhances survival and therapeutic capacities of MSCs injected into ischemic kidney. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *20*(7), 1203–1213. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12651>
- Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V., & Laurencin, C. T. (2015). Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Advanced Healthcare Materials*. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400760>
- Yuan, M., Leong, K. W., & Chan, B. P. (2011). Three-dimensional culture of rabbit nucleus pulposus cells in collagen microspheres. *Spine Journal*, *11*(10), 947–960. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2011.07.004>
- Zanetta, M., Quirici, N., Demarosi, F., Tanzi, M. C., Rimondini, L., & Farè, S. (2009). Ability of polyurethane foams to support cell proliferation and the differentiation of MSCs into osteoblasts. *Acta Biomaterialia*, *5*(4), 1126–1136. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.12.003>
- Zhu, Y., Mao, Z., & Gao, C. (2013). Aminolysis-based surface modification of polyesters for biomedical applications. *RSC Adv.*, *3*(8), 2509–2519. <https://doi.org/10.1039/C2RA22358A>

Documento II: Presupuesto

1. OBJETIVOS Y ESTRUCTURA

El objetivo principal del desarrollo estructurado de un presupuesto reside en establecer los costes de este proyecto, así como servir de guía en la estimación presupuestaria de proyectos afines.

La estructura del siguiente documento se ha dividido en dos secciones de coste económico en las que se engloba un primer punto de precios descompuesto por capítulos, cada uno de los cuales se compone de las distintas fases llevadas a cabo durante dicho capítulo, exponiendo el coste de cada uno de los recursos empleados según la actividad llevada a cabo durante el proyecto.

Por otro lado, en el caso de maquinaria, los equipos se han presupuestado teniendo en cuenta la amortización de los mismos en un periodo de 10 años. Esto puede calcularse empleando la ecuación:

$$A = \frac{t \cdot C}{T} \quad (IV)$$

Siendo C el precio unitario por hora en función del coste del equipo, t el tiempo de uso de cada equipo y T el periodo de amortización (considerado de 10 años para todos los equipos).

2. PRESUPUESTO DESGLOSADO

2.1 Cuadros de precios descompuestos por capítulos

A continuación, se muestra el cuadro de precios desglosado en 6 capítulos de los reactivos, materiales, equipos y mano de obra en función de la etapa del proceso en la que fueron usado. Para distinguir cada uno de los grupos se ha empleado una nomenclatura que hace referencia a Reactivos (R), Material (M), Maquinaria (MQ), Equipos de Protección Individual (EPI) y Mano de Obra (MO).

Capítulo 1. Obtención de las microsferas de PLLA					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
1.1		u	Síntesis del PLLA amorfo		
R	0,2	g	PLLA de grado médico	2,74	0,55
MQ	1	h	Estufa	0,02	0,02
MT	1	u	Molde circular de teflón con agujeros pasantes	3	3,00
				Total	3,57
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
1.2		u	Preparación de las disoluciones		
R	0,6	g	PLLA amorfo	2,74	1,64
R	20	mL	Cloroformo	0,035	0,70
R	0,2	L	Agua destilada	0,01	0,002
R	8	g	PVA	0,476	3,81
MT	1	u	Frasco de vidrio de rosca 50 mL	2,75	2,75
MT	1	u	Frasco de vidrio de rosca 1 L	3,94	3,94
MT	2	u	Pipeta Pasteur de vidrio	0,04	0,08
MT	1	u	Vaso de precipitado 25 mL	1,09	1,09
MT	1	u	Cuchara-espátula metálica	3,32	3,32
MQ	48	h	Estufa de ventilación forzada	0,02	0,96
MQ	1	h	Balanza de precisión	0,01	0,01
MQ	12	h	Agitador magnético	0,01	0,12
				Total	18,42

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
1.3		u	Emulsión para la obtención de las microesferas de PLLA		
R	0,15	L	Agua destilada	0,1	0,015
MT	1	u	Vaso de precipitado alto 600 mL	2,03	2,03
MT	1	u	Tubo de plástico flexible	0,02	0,02
MT	1	u	Jeringa 20 mL (20 mm diámetro)	0,24	0,24
MT	1	u	Aguja 25G	0,5	0,50
MT	2	u	Pinza 3 dedos	8,45	16,90
MQ	24	h	Agitador de emulsión	0,01	0,24
MQ	0,5	h	Bomba de inyección	0,015	0,008
				Total	19,95
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
1.4		u	Lavado, secado y tratamiento de las esferas		
R	1,6	L	Agua destilada	0,1	0,16
MT	1	u	Jeringa 20 mL	0,24	0,24
MT	1	u	Placa Petri de vidrio	2,32	2,32
MT	1	u	Pipeta Pasteur de vidrio	0,04	0,04
MT	1	u	Espátula metálica	2,25	2,25
MQ	8	h	Agitador de vaivén	0,01	0,08
MQ	24	h	Estufa a 37 °C	0,02	0,48
MQ	1	h	Cámara de plasma	0,04	0,04
				Total	5,61

Capítulo 2. Obtención de las microesferas de quitosano					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
2.1		u	Preparación de las disoluciones		
R	8	g	Hidróxido sódico (NaOH)	0,04	0,32
R	28,98	g	Sulfato de sodio decahidratado	0,056	1,62
R	1,2	L	Agua destilada	0,1	0,12
R	0,6	mL	Ácido acético glacial	24,18	14,51
R	0,75	g	Quitosano de grado médico	7,5	5,63
MT	2	u	Bote de plástico 200 mL	1,25	2,50
MT	1	u	Frasco de vidrio de rosca 250 mL	2,3	2,30
MT	1	u	Micropipeta de volumen variable	110	110,00
MT	6	u	Puntas micropipeta	0,01	0,06
MQ	24	h	Agitador magnético	0,01	0,24
MQ	144	h	Nevera	0,01	1,44
				Total	138,74
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
2.2		u	Síntesis de las microesferas		
R	30	mL	Etanol	0,01	0,30
MT	1	u	Jeringa 12 mL	0,22	0,22
MT	1	u	Tubo de plástico flexible	0,02	0,02
MT	1	u	Cristalizador 70 mm	3,95	3,95
MT	1	u	Aguja Luer Lock	1,5	1,50
MQ	8	h	Encapsulador	0,12	0,96
				Total	6,95

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
2.3		u	Lavado y tratamiento de las microesferas		
R	1	L	Agua miliQ	3	3,00
R	50	mL	Etanol 70%	0,01	0,50
MT	1	u	Tubo de centrifuga 50 mL	0,23	0,23
MT	1	u	Pipeta Pasteur de plástico	0,2	0,20
				Total	3,93

Capítulo 3. Caracterización de las microesferas obtenidas					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
3.1		u	Grado de hinchado de esferas de quitosano		
MT	1	u	Pipeta Pasteur de plástico	0,2	0,20
MT	3	u	Vial de vidrio	0,54	1,62
MQ	2	h	Balanza de precisión	0,01	0,02
MQ	24	h	Liofilizadora	0,12	2,88
				Total	4,72
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
3.2		u	Caracterización morfológica		
MQ	4	h	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo	25	100,00
				Total	100,00

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
3.3		u	Ensayo de compresión confinada		
R	0,1	L	DMEM alto contenido en glucosa	21,2	2,12
MQ	12	h	Microtest de ensayo mecánico	0,1	1,20
				Total	3,32
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
3.4		u	Cultivos celulares		
R	256,5	mL	DMEM alto contenido en glucosa	0,03	7,70
R	45,5	mL	Suero fetal bovino	0,91	41,41
R	15	mL	Penicilina/streptomicina	0,141	2,12
R	0,1	mL	Amphicilina	10,45	1,05
R	0,25	mL	Anfotericina B	0,69	0,17
R	75	mL	Tripsina/EDTA	0,12	9,00
R	100	mL	DPBS -/-	0,05	5,00
R	0,016	mg	Dexametasona	2,22	0,04
R	0,15	g	β -glicerol fosfato	5,02	0,75
R	0,8	mg	L-Acido ascorbico fosfato	17,26	13,81
R	170	assay	Quant-it Pico green dsDNA assay Kit (2000 assays) 1ml	0,27	45,90
R	1	kit	SensoLyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit Colorimetric	296	296,00
R	51	assay	Sulfated glycosaminoglycan kit (Blyscan)	2,6	132,6
R	20	g	DMMB	2,4	48,00
R	3	mg	Papaína	1,92	5,76
R	1,26	mg	L-Cysteine hydrochloride hydrate	2,52	3,18
R	40	mg	Cis-4-Hydroxy-D-Proline	0,16	6,40
R	40	mL	1-propanol	0,02251	0,90
R	0,5	g	Cloramina T	0,305	0,15
R	4,5	g	DMBA	150,4	676,80
R	15	mL	Ácido perclórico 70%	0,268	4,02
R	6	g	Ácido cítrico monohidratado	0,111	0,67
R	20	g	Acetato de sodio trihidratado	0,206	4,12

R	10	g	Acetato de sodio anhídrido	0,0956	0,96
R	20	g	Hidróxido de sodio	0,028	0,56
R	5	mL	Ácido acético glacial	30,225	151,13
R	3	L	Agua miliQ	3	9,00
MT	9	u	Flascon T75	2,5	22,50
MT	8	u	Placa de cultivo P96	2,18	17,44
MT	804	u	Eppendorf 0,5 mL	0,01	8,24
MT	384	u	Eppendorf 1,5 mL	0,01	3,84
MT	32	u	Pipeta serológica 5 mL	4,72	151,04
MT	16	u	Pipeta serológica 10 mL	8,48	135,68
MT	12	u	Pipeta serológica 25 mL	14,4	172,80
MT	4	u	Falcon 50 mL	0,16	0,64
MT	5	u	Falcon 25 mL	0,14	0,70
MT	4000	u	Puntas micropipeta	0,01	40,00
MT	1	u	Micropipeta multicanal	295	295,00
MT	1	u	Espátula metálica	2,25	2,25
MT	1	u	Propipeta	125	125,00
MQ	504	h	Incubador 37°C	0,06	30,24
MQ	4	h	Microscopio óptico invertido de contraste de fases	0,13	0,52
MQ	1	h	Centrífuga	0,03	0,03
MQ	0,5	h	pH-metro EUTECH	0,01	0,005
MQ	0,5	h	Espectrofotómetro	0,14	0,07
MQ	336	h	Congelador -80°C	0,09	30,24
				Total	2503,40

Capítulo 4. Material de protección individual

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
4.1		u	Materiales empleados durante las distintas etapas de los procesos		
EPI	1	u	Bata de laboratorio	15,40	15,40
EPI	1	X100 u	Guantes desechables látex	7,48	7,48
EPI	0,5	X100 u	Guantes desechables nitrilo	10,17	5,09
EPI	1	u	Guantes de protección térmica	30	30,00
EPI	1	u	Máscara de gases	29,50	29,50
EPI	1	u	Máscara de partículas	6,09	6,09
EPI	1	u	Gafas de seguridad	2,40	2,40
				Total	95,96

Capítulo 5. Software y hardware informático de trabajo					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario/tiempo uso (€)	Total (€)
4.1		u	Material informático de análisis y tratamiento de datos		
MT	1	u	Licencia educativa de Microsoft Office 365 (UPV)	0	0,00
MT	1	u	Procesador de imágenes ImageJ	0	0,00
MT	1	u	GraphPad Prism 7.03	21,075	21,08
MT	1	u	PC (Core i5 7th Gen, 8 Gb RAM)	815	815,00
				Total	836,08

Capítulo 6. Personal					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
5.1		u	Reuniones de seguimiento y supervisión del trabajo		
MO	300	h	Ingeniera Biomédica	30	9000,00
MO	30	h	Tutor del trabajo	60	1800,00
MO	40	h	Co-tutor del trabajo	40	1600,00
				Total	12400,00

2.2 Presupuesto de ejecución material por capítulos

Capítulo 1. Obtención de microesferas de PLLA					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
1.1	3	u	Síntesis de PLLA amorfo	3,57	10,70
1.2	16	u	Preparación de las disoluciones	18,42	294,78
1.3	16	u	Emulsión para la obtención de las microesferas	19,95	319,24
1.4	16	u	Lavado, secado y tratamiento de las microesferas	5,61	89,76
				Total Capítulo 1	714,49

Capítulo 2. Obtención de las microesferas de quitosano					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
2.1	1	u	Preparación de las disoluciones	138,74	138,74
2.2	8	u	Síntesis de las microesferas	6,95	55,60
2.3	8	u	Lavado y tratamiento de las microesferas	3,93	31,44
				Total Capítulo 3	225,78

Capítulo 3. Caracterización de las microesferas obtenidas					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
3.1	1	u	Grado de hinchado de las microesferas de quitosano	4,72	4,72
3.2	1	u	Caracterización morfológica	100	100,00
3.3	1	u	Ensayo de compresión confinada	3,32	3,32
3.4	2	u	Cultivos celulares	2503,40	5006,80
				Total Capítulo 3	5114,84

Capítulo 4. Materiales de protección individual					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
4.1	1	u	Materiales empleados en durante las distintas etapas de los procesos	95,96	95,96
				Total Capítulo 4	95,96

Capítulo 5. Software y hardware informático de trabajo					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario/tiempo uso (€)	Total (€)
5.1	1	u	Material informático de análisis y tratamiento de datos	836,08	836,08
				Total Capítulo 5	836,08

Capítulo 6. Personal					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
6.1	1	u	Reuniones de seguimiento y supervisión del trabajo	12800	12400,00
				Total Capítulo 6	12400,00

Con estos resultados y conociendo las cantidades promedio de microesferas que se han obtenido por cada síntesis, es posible determinar el coste que supondría producir una determinada cantidad de las mismas. Así, para 1 síntesis de microesferas de PLLA se obtiene una media de 200 mg a un coste total de 47,55 euros. Por tanto, el coste de 1 g de microesferas de PLLA equivale a 237,75€. Por otro lado, para las microesferas de quitosano, aunque este variaba según la cantidad de disolución cargada, en una síntesis se obtendrían 0,8-1 g, por lo que, si evaluación el coste/g, este sería de aproximadamente 149,62 €/g.

3. RESUMEN DEL PRESUPUESTO

El presupuesto general se corresponde con un resumen de los presupuestos por capítulos, constituyendo la suma de los importes de estos al precio de ejecución material. A este último se le ha sumado los gastos generales (considerando un 15% de estos) y los gastos indirectos (asociados al mantenimiento de los equipos, suministros, obras...) para obtener el presupuesto de ejecución por contrata. Para obtener el presupuesto total, se le ha sumado al presupuesto de ejecución por contrata un 21% correspondiente al IVA (Impuesto sobre el Valor Añadido).

Código	Descripción	Importe (€)
Capítulo 1	Obtención de microesferas de PLLA	714,49
Capítulo 2	Obtención de microesferas de quitosano	225,78
Capítulo 3	Caracterización de las microesferas obtenidas	5114,84
Capítulo 4	Material de protección individual	95,96
Capítulo 5	Software y Hardware informático de trabajo	836,08
Capítulo 6	Personal	12400,00
	Presupuesto de ejecución material	19787,15
	Gastos generales (15%)	2908,07
	Gastos indirectos UPV (8%)	1550,97
	Presupuesto de ejecución por contrata	24246,19
	IVA (21%)	5091,70
	PRESUPUESTO TOTAL	29337,89

El presupuesto total de este proyecto asciende a **VEINTINUEVE MIL TRESCIENTOS TREINTA Y SIETE EUROS CON OCHENTA Y NUEVE CÉNTIMOS.**