



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIEROS  
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

# ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE HEPATOCITOS EN HIDROGELES DE ORIGEN NATURAL PARA TERAPIA CELULAR HEPÁTICA.

AUTOR: JULIO RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ

TUTORA: GLORIA GALLEGO FERRER

COTUTORA: LAIA TOLOSA PARDO

CURSO ACADÉMICO 2018-2019



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi tutora Dra. Gloria Gallego y mi cotutora Dra. Laia Tolosa por darme la oportunidad de realizar mi Trabajo Fin de Grado en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) de la Universitat Politècnica de València y en la Unidad Mixta de Investigación en Hepatología Experimental del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IISLAFE). No cabe duda que estaré eternamente agradecido por la profesionalidad, empatía y paciencia que han mostrado conmigo, además de la predisposición a apoyarme en todo lo que necesitare. También quiero dar un agradecimiento especial al Dr. Juan Jairo Vaca González por ayudarme a dar mis primeros pasos en un laboratorio.

Quisiera dar las gracias además a todo el personal del CBIT e IISLAFE, por los almuerzos donde surgían soluciones a los problemas que teníamos y donde un mal día o un experimento fallido acababa en sonrisa. Sin olvidarme del Dr. Joaquín Ródenas, de Sandra Clara y María Guillot, quienes han sido un apoyo fundamental durante todos estos meses. Y a Estefanía Cabezas por su siempre amabilidad y sincera ayuda.

Además de ellos, quisiera también acordarme de mis compañeros de carrera, que han ido siempre a mi lado. Agradecer a mis amigos, más que compañeros, Ryan Hosn y Alejandro Jareño, por dejarme compartir este viaje con vosotros y por nunca habernos rendido ante nada.

Finalmente, nunca viviré lo suficiente para agradecer a mi familia todo lo que hacen y harán por mí, el apoyo incondicional que siempre han mostrado. Sin ellos este proyecto no habría sido posible.



## RESUMEN

El hígado es un órgano vital que lleva a cabo más de 500 funciones, principalmente metabólicas y de regulación de otros órganos. Las patologías hepáticas donde el único tratamiento efectivo es el trasplante de hígado, provocan la búsqueda de alternativas, dado que el número de donantes es muy inferior a los casos diagnosticados.

Así pues, la terapia celular hepática se perfila como tratamiento alternativo para recuperar y estabilizar funciones metabólicas perdidas a causa de las enfermedades. A pesar de ser una alternativa prometedora no ofrece a nivel clínico los resultados esperados, debido al bajo grado de injerto celular y supervivencia de los hepatocitos tras el trasplante. Este tipo de terapia permite observar a corto plazo una ligera mejora, pero más allá de 3 días la población celular infundida decae drásticamente.

En el presente Trabajo Fin de Grado, se propone un estudio donde se evalúe el comportamiento celular en hidrogeles de origen natural como entorno 3D para solventar la limitación del injerto y supervivencia celular a largo plazo. Para ello, se realizará un estudio de las propiedades mecánicas de un hidrogel preparado en diversas condiciones, una valoración de la viabilidad de un cultivo en el hidrogel y un estudio de la funcionalidad celular en el hidrogel.

El hidrogel seleccionado es inyectable, facilitando su manejabilidad. Está formado por cadenas de gelatina y ácido hialurónico modificadas con injertos de tiramina, permitiendo realizar una gelificación *in situ* sin producir citotoxicidad. Ambas sustancias están presentes en gran parte de la matriz extracelular del organismo, siendo un hidrogel biocompatible y biodegradable.

El objetivo último de este trabajo ha sido seleccionar las condiciones óptimas de formación del hidrogel y su composición para obtener una mayor viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos encapsulados, de cara a una futura aplicación en terapia celular avanzada.

Para completar el trabajo, se ha puesto a punto un modelo de fallo hepático en animales de experimentación. En un futuro se pretende demostrar que las células encapsuladas en el hidrogel pueden ser implantadas en el hígado de estos animales y recuperar su función de manera más eficaz que mediante la inyección de células sin hidrogel.

**Palabras clave:** hígado, terapia celular, cultivo celular, hidrogel inyectable, propiedades mecánicas, viabilidad y funcionalidad celular.

## RESUM

El fetge és un òrgan vital que du a terme més de 500 funcions, principalment metabòliques i de regulació d'altres òrgans. Les patologies hepàtiques on l'únic tractament efectiu és el trasplantament de fetge, provoquen la cerca d'alternatives, atès que el nombre de donants és molt inferior als casos diagnosticats.

Així, doncs, la teràpia cel·lular hepàtica es perfila com a tractament alternatiu per a recuperar i estabilitzar funcions metabòliques perdudes a causa de les malalties. Malgrat que és una alternativa prometedora no ofereix a nivell clínic els resultats esperats, a causa del baix grau d'empelt cel·lular i supervivència dels hepatòcits després del trasplant. Este tipus de teràpia permet observar a curt termini una lleugera millora, però més enllà de 3 dies la població cel·lular infosa decau dràsticament.

En el present Treball Fi de Grau, es proposa un estudi on s'avalua el comportament cel·lular en hidrogels d'origen natural com a entorn 3D per a resoldre la limitació de l'empelt i supervivència cel·lular a llarg termini. Per això, es realitzarà estudi de les propietats mecàniques d'un hidrogel preparat en diverses condicions, una valoració de la viabilitat d'un cultiu en el hidrogel i un estudi de la funcionalitat cel·lular en el hidrogel.

L'hidrogel seleccionat és injectable, facilitant el seu maneig. Està format per cadenes de gelatina i àcid hialurònic modificades amb empelts de tiramina, permetent realitzar una gelificació *in situ* sense produir citotoxicitat. Ambdós substàncies estan presents en gran part de la matriu extracel·lular de l'organisme, sent un hidrogel biocompatible i biodegradable.

L'objectiu últim d'aquest treball ha estat seleccionar les condicions òptimes de formació del hidrogel i la seva composició per obtenir una major viabilitat i funcionalitat dels hepatòcits encapsulats, de cara a una futura aplicació en teràpia cel·lular avançada.

Per completar el treball, s'ha posat a punt un model de insuficiència hepàtica en animals d'experimentació. En un futur es pretén demostrar que les cèl·lules encapsulades en l'hidrogel poden ser implantades en el fetge d'aquests animals i recuperar la seva funció de manera més eficaç que mitjançant la injecció de cèl·lules sense hidrogel.

**Paraules clau:** fetge, teràpia cel·lular, cultiu cel·lular, hidrogel injectable, propietats mecàniques, viabilitat i funcionalitat cel·lular.

## ABSTRACT

The liver is a vital organ that performs more than 500 functions, mainly metabolic and of regulation of other organs. The hepatic pathologies where the only effective treatment is the liver transplantation, leads to search of alternatives, since the number of donors is lower than the diagnosed cases.

Thus, hepatic cell therapy is outlined as an alternative treatment to recover and stabilize metabolic functions lost due to diseases. Despite being a promising alternative, it does not offer the expected results at a clinical level, due to the low cell engraftment and survival of hepatocytes after transplantation. This type of therapy allows a slight improvement to be observed in the short term, but beyond 3 days the infused cell population drops drastically.

In the present Bachelor Thesis, we propose a study where the cellular behavior in hydrogels of natural origin is evaluated as 3D environment to solve the limitation of the graft and cellular survival in the long term. A study of the mechanical properties of a hydrogel prepared in different conditions, an assessment of the cell viability in the hydrogel and a study of the functionality of cells within the hydrogel will be carried out.

The proposed hydrogel is injectable, enabling its handling. It is formed by gelatin and hyaluronic acid chains modified with tyramine grafts that allow an *in-situ* gelation without producing cytotoxicity. Both substances are present in a large part of the extracellular matrix of the organism, being the hydrogel biocompatible and biodegradable.

The ultimate goal of this work has been to select the optimal conditions for the formation of the hydrogel and its composition to obtain greater viability and functionality of the encapsulated hepatocytes, in view of a future application in advanced cell therapy.

To complete the study, an animal model of liver failure has been developed. This model will serve in the future to demonstrate that cells encapsulated in the hydrogel can be implanted in the liver of these animals and recover their function more effectively than by injection of cells without hydrogel.

**Keywords:** liver, cell therapy, cell culture, injectable hydrogel, mechanical properties, cell viability and functionality.



## ÍNDICE GENERAL

### Documentos contenidos en el TFG

- Memoria
- Presupuesto

### ÍNDICE GENERAL

#### DOCUMENTO I: MEMORIA

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

#### ANEXOS

#### DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

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



# DOCUMENTO I: MEMORIA



## ÍNDICE DE LA MEMORIA

<b>1. MOTIVACIÓN</b> .....	15
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	17
3.1. El hígado.....	18
3.2. Enfermedades hepáticas.....	22
3.3. Necesidad de alternativas al trasplante hepático.....	27
3.3.1. Terapia celular hepática.....	28
3.4. Fundamentos de hidrogeles.....	31
3.5. Materiales empleados en la síntesis.....	32
3.5.1. Gelatina (Gel).....	32
3.5.2. Ácido hialurónico (HA).....	33
3.6. Métodos de gelificación.....	34
3.7. Cultivo celular (HepG2).....	35
3.8. Técnicas para evaluación de viabilidad y funcionalidad celular.....	36
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	40
<b>5. NORMATIVA</b> .....	42
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	44
6.1. Materiales.....	44
6.2. Síntesis de gelatina con injerto de tiramina (Gel-Tyr).....	45
6.3. Síntesis de ácido hialurónico con injerto de tiramina (HA-Tyr).....	46
6.4. Grado de sustitución (Tyr) de los hidrogeles.....	48
6.5. Reticulación de hidrogeles.....	49
6.6. Ensayo por reometría. ....	50
6.7. Encapsulamiento celular en los hidrogeles.....	52
6.8. Viabilidad y funcionalidad celular.....	53
6.8.1. Viabilidad celular.....	53
6.8.2. Funcionalidad celular.....	53
6.9. Modelo animal de fallo hepático.....	56
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	58
7.1. Caracterización de los hidrogeles: grado de sustitución y reometría.....	58
7.2. Cultivo celular: viabilidad y funcionalidad.....	63
7.3. Selección del hidrogel.....	67
7.4. Modelo animal.....	69
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	71
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	72



## 1. MOTIVACIÓN

La principal motivación para la realización del trabajo de fin de grado (TFG) en el campo de la ingeniería tisular deriva de una experiencia personal. Por casualidad, tuve que ser intervenido en ambas rodillas en las que se me practicó una plastia de los ligamentos cruzados. El cirujano me comentó que experimentalmente se estaban llevando a cabo intervenciones que consistían en la regeneración de tejido mediante terapia celular y scaffolds. Esa conversación despertó mi interés por la medicina regenerativa y seguí sus recomendaciones, estudiando el Grado en Ingeniería Biomédica y eligiendo un trabajo fin de grado íntimamente relacionado con la ingeniería tisular.

Desde el primer momento en que empecé los estudios universitarios, tuve claro que quería acabar realizando algo similar a las actividades que he desarrollado estos meses, un nicho científico-técnico donde poder aplicar los conocimientos adquiridos. Las asignaturas que despertaron mi interés fueron Biomateriales, Anatomía Patológica, Histología, Bioquímica y Biotecnología. Sin duda, aquella que más influyó fue Biomateriales, en la que a través del profesor conocí el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT), donde he realizado gran parte de la experimentación de este trabajo. Estoy convencido de que fue una gran decisión empezar mi experiencia práctica en un laboratorio lleno de expertos y profesionales que han influenciado de forma positiva el desarrollo de este trabajo.

Por otro lado, los conocimientos adquiridos durante el desarrollo del trabajo de fin de grado son los siguientes:

- Biopolímeros: química y aplicaciones
- Síntesis química de hidrogeles
- Caracterización de propiedades mecánicas: reometría
- Caracterización química: grado de injerto
- Cultivos celulares
- Encapsulamiento celular en hidrogeles
- Evaluación de la viabilidad celular
- Caracterización funcional de cultivos
- Histología de tejidos hepáticos

## 2. OBJETIVOS

La falta de órganos para trasplante debido a la escasez de donantes y el aumento de la incidencia y mortalidad en pacientes con enfermedades hepáticas de distinta etiología como un fallo hepático agudo produce la necesidad de explorar alternativas viables para solucionar esta problemática. La ingeniería tisular contempla la regeneración del tejido dañado mediante una diversidad de técnicas.

El encapsulamiento de células en un hidrogel inyectable como tratamiento es una técnica ya empleada en otros tipos de patologías y se empieza a explorar para la recuperación de la función hepática, ya que las células trasplantadas llevarían a cabo las funciones de las que carece el hígado. El uso de una matriz 3D como entorno celular pretende mejorar aspectos como la diferenciación y funcionalidad de las células con respecto a la inyección de células sin matriz (terapia celular pura). Las técnicas más recientes proponen la inyección de sustancias precursoras del hidrogel junto con las células, ocurriendo la gelificación y el encapsulamiento de las células *in situ* mediante reacciones no citotóxicas. Se desea que el hidrogel se entrecruce con el tejido huésped, favorezca el crecimiento de capilares desde el tejido sano y que las células encapsuladas sean capaces de regenerar el tejido dañado. Hasta el momento, no hay ningún producto en el mercado, basado en hidrogeles inyectables, para la regeneración de zonas dañadas de hígado. La literatura no es capaz de dar un hidrogel óptimo en cuanto a composición y tipo celular a emplear, por lo que es necesario explorar alternativas.

El objetivo principal del presente trabajo consiste en hallar las condiciones óptimas para encapsular células hepáticas en un hidrogel inyectable de cara a obtener una alta viabilidad y una mejora funcional de éstas en el entorno 3D.

Los componentes elegidos para fabricar el hidrogel han sido el ácido hialurónico y la gelatina, ya que forman parte de la matriz extracelular de gran parte de los tejidos humanos. El hecho de que sean inyectables facilitaría su incorporación al tejido.

Para poder seleccionar las condiciones óptimas, se llevarán a cabo la caracterización de los hidrogeles. Por una parte, se analizarán las propiedades mecánicas del material mediante reometría obteniendo el módulo de almacenamiento a cizalla y el tiempo de gelificación. Por otra parte, se realizará la encapsulación de hepatocitos a distintas densidades celulares y distintos medios y se valorará el cultivo celular haciendo hincapié en la viabilidad y una valoración funcional mediante ureogénesis.

Para completar el trabajo, se pondrá a punto un modelo de fallo hepático en animales de experimentación. En un futuro se pretende demostrar que las células encapsuladas en el hidrogel pueden ser implantadas en el hígado de estos animales y recuperar su función de manera más eficaz que mediante la inyección de células sin hidrogel.

### 3. ANTECEDENTES

El hígado es un órgano de vital importancia en el cuerpo ya que realiza más de 500 funciones diferentes (“Liver: Anatomy and Functions | Johns Hopkins Medicine,” n.d.). Además, es el órgano central para el metabolismo y regula otros órganos y/o procesos vitales. El trasplante de hígado es el único tratamiento curativo para las enfermedades hepáticas en estado terminal (end-stage liver diseases, en inglés), limitado éste por la disponibilidad de donantes, por lo que existe una necesidad de explorar alternativas al trasplante de órgano.

En particular, la ingeniería tisular, a través de sus tres principales pilares sobre los que se fundamenta, intenta abordar la regeneración de cualquier tejido. Los tres principales pilares son:

- Células: elegidas acorde al tejido dañado, asume un rol principal debido a que la regeneración tisular depende de las interacciones que establezca con el scaffold y el tejido.
- Scaffold (andamiaje, en castellano): biomaterial donde se incluye las células y debe cumplir requisitos de biodegradabilidad y biocompatibilidad, entre otros. Es el soporte que debe favorecer la proliferación, migración y diferenciación celular en los estadios tempranos de regeneración.
- Señalización: son factores bioquímicos o procesos de mecanotransducción que modulan el comportamiento celular dentro del scaffold.

Así pues, en esta introducción se realizará una revisión de los conceptos que se van a abordar en este trabajo, intentando de forma clara y concisa explicar de dónde procede la problemática actual de la patología y las diversas soluciones que propone la medicina actual y la ingeniería tisular.

### 3.1. El hígado

El hígado, es uno de los principales órganos del cuerpo y supone entre un 2-3% del peso corporal, siendo el órgano más grande. Está situado en el hemisferio derecho del cuerpo, protegido por la caja torácica y anclado en posición por los ligamentos hepáticos (Abdel-Misih & Bloomston, 2010). Destaca anatómicamente ya que está diferenciado en dos lóbulos, a su vez estos se dividen en porciones (Figura 1).

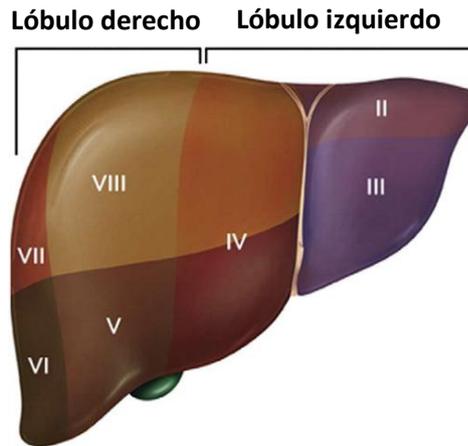


FIGURA 1. DISPOSICIÓN DE LÓBULOS POSTERIORES DEL HÍGADO. DIBUJO OBTENIDO DE (Abdel-Misih & Bloomston, 2010).

Las funciones desempeñadas por el hígado están estrechamente relacionadas con la irrigación sanguínea del mismo. El hígado recibe un cuarto de la sangre bombeada, siendo un porcentaje mucho mayor con respecto al resto de órganos. Este suministro es dual, es decir, viene por dos vías: arteria hepática (Figura 2) y vena porta (Figura 3). La primera supone un 30% aproximadamente del suministro total y la vena porta un 70%. Así pues, una disfunción o daño hepático puede conllevar problemas más graves dado que en el hígado se detoxifica la sangre y recircula de nuevo por el organismo.

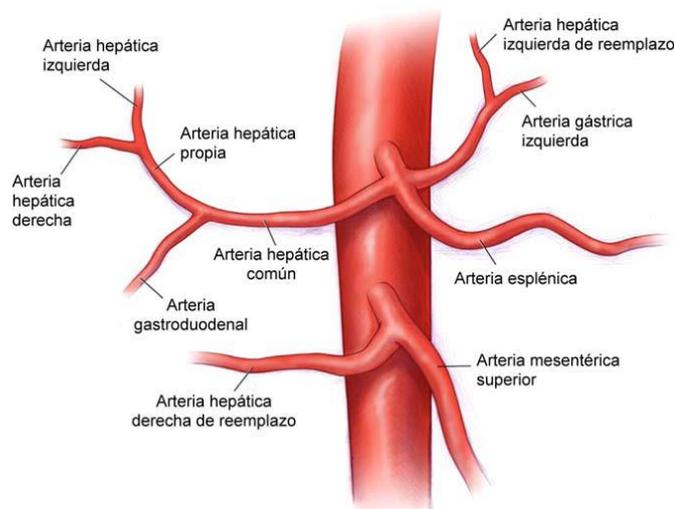


FIGURA 2. ESQUEMA ARTERIAL DEL HÍGADO. DIBUJO OBTENIDO DE (Sibulesky, 2013)

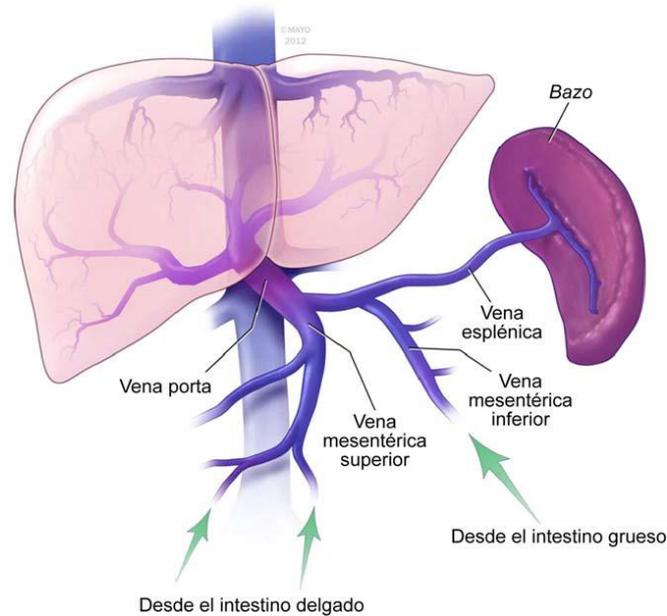


FIGURA 3. ESQUEMA VENOSO DEL HÍGADO. DIBUJO OBTENIDO DE (Sibulesky, 2013)

Las principales funciones que cumple el hígado son:

- Catabolismo y anabolismo de proteínas y colesterol
- Detoxificación de la sangre
- Conversión de glucosa a glucógeno
- Transporte de desechos mediante la bilis

El hígado presenta una estructura altamente organizada que soporta sus funciones. La estructura básica del hígado es el lóbulo, una estructura hexagonal delimitada por seis triadas portales donde la parte central es la vena. A nivel celular, el hígado está formado por células parenquimales (hepatocitos y colangiocitos) y células no parenquimales que incluyen las células endoteliales sinusoidales, las células de Kupffer y las células estrelladas. Los hepatocitos son las células más abundantes del parénquima hepático y representan hasta un 70 % del total de la masa hepática (Figura 4).

El hepatocito realiza funciones principales como la síntesis y almacenamiento de proteínas, colesterol, sales biliares y glicoproteínas. Además, cabe destacar su función en la transformación de carbohidratos en glucógeno, almacenado como reserva energética. No obstante, también es responsable de procesos de detoxificación de fármacos y otras sustancias químicas gracias a los procesos de biotransformación que llevan a cabo los enzimas hepáticos.

Por otro lado, las células no parenquimales suponen el 20% restante de células hepáticas. Las células de Kupffer, están ubicadas en el lumen del sinusoides son las principales células del sistema fagocítico, siendo así el tejido hepático el mayor concentrador de macrófagos del organismo. También desempeñan funciones como el metabolismo de lipoproteínas, liberación de factores de crecimiento y mediadores inflamatorios. Por su parte, las células endoteliales forman la pared del sinusoides delimitando los vasos que irrigan el órgano.

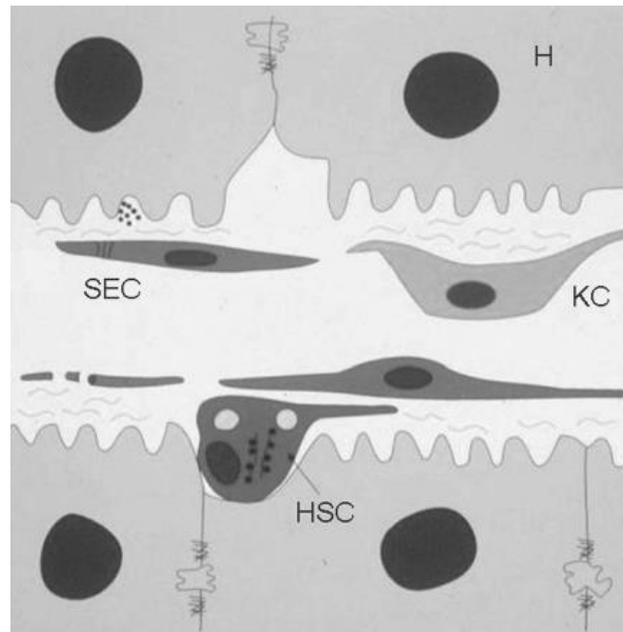


FIGURA 4. ESQUEMA DEL SINUSOIDE HEPÁTICO: HEPATOCITO (H), CÉLULA ENDOTELIAL (SEC), CÉLULA HEPÁTICA ESTRELLADA (HSC) Y CÉLULAS KUPFFER (KC). DIBUJO OBTENIDO DE (Clària & Titos, 2004)

Generalmente en el sinusoides se encuentra una zona llamada *espacio de Disse* donde se encuentran las células de Ito, involucradas en la secreción de matriz extracelular y colágeno tipo III tras procesos lesivos que afecten al hígado. Además de encontrar lipocitos encargados del almacenamiento de lípidos. (Clària & Titos, 2004).

Una vez conocido el grupo de células hepáticas es necesario estudiar qué tipo de matriz extracelular (ECM) rodea a éstas, ya que la elección de los biomateriales para la síntesis de hidrogeles dependerá de su composición.

Normalmente los órganos poseen dos membranas basales y una cuantiosa ECM situada entre las células epiteliales y las endoteliales, pero el hígado sólo posee una membrana basal y una pequeña cantidad de ECM, que pese a ello confiere al hígado cohesión mecánica y resistencia. Por otra parte, asume un papel importante en procesos biológicos como la diferenciación, proliferación y migración celular, además, incluso en procesos fisiopatológicos como la fibrogenesis (Martinez-Hernandez & Amenta, 1993).

En términos de composición la ECM está formada principalmente por colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. El colágeno se puede hallar de varios tipos y morfología, formando bandas anchas como el colágeno tipo I, fibras desordenadas de colágeno tipo III o involucrado en la conexión de otros tipos de proteínas como el colágeno tipo V y VI. Glicoproteínas como la fibronectina y laminina, a pesar de estar presentes en menor cantidad, también juegan un papel importante asociadas generalmente al colágeno u otras proteínas. Finalmente, en la ECM hepática también se hallan proteoglicanos como el condritin sulfato, ácido hialurónico y decorina, entre otros (Bedossa & Paradis, 2003).

### 3.2. Enfermedades hepáticas

Las enfermedades hepáticas en estado terminal (ESLD, del inglés *end-stage liver disease*), tanto debido a un fallo hepático agudo (ALF, del inglés *acute liver failure*) como crónico y los defectos metabólicos hepáticos que suponen una amenaza para la vida, son una causa importante de mortalidad a nivel mundial e implican unos costes sanitarios elevados. Aunque existen diferentes aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades hepáticas en estado terminal, el trasplante de hígado es el único tratamiento curativo para estas patologías irreversibles, pero está limitado por la falta de donantes.

Aunque existen otros tipos de patologías hepáticas, sólo se comentarán aquellas susceptibles de ser tratadas con terapia celular, ya que son el objetivo del presente trabajo. De hecho, la terapia celular hepática se postula como una opción terapéutica para recuperar y estabilizar la función perdida en el caso de enfermedades metabólicas congénitas, ALF o ESLD y en aquellos pacientes no considerados como elegibles para trasplante de órgano. A continuación se clasifica las enfermedades hepáticas según su etiología: desórdenes congénitos y desórdenes adquiridos (Tabla 1):

**TABLA 1. DESÓRDENES CONGÉNITOS HEPÁTICOS (Forbes, Gupta, & Dhawan, 2015)**

1. Desórdenes congénitos: Errores congénitos del metabolismo
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome tipo 1 Criggler-Najjar</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Defectos en ciclos de urea                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Déficit de ornitina transcarbamilasa</li> <li>○ Deficiencia tipo 1 en síntesis de carbamoil fosfato</li> <li>○ Citrulinemia</li> <li>○ Deficiencia de argininosuccinato liasa</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo 1                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Tipo Ia</li> <li>○ Tipo Ib</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedad Refsum</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fenilcetonuria</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deficiencia de factor VII</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipercolesterolemia familiar                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Colestasis intrahepática progresiva familiar</li> </ul> </li> </ul>

## 2. Desórdenes adquiridos

- Fallo hepático agudo
- Fallo hepático agudo crónico
- Esteatohepatitis no alcohólica

### 3.2.1. Desórdenes congénitos

El desarrollo de las enfermedades congénitas ocurre en etapa prenatal, en los tres primeros meses del embarazo. Dentro de los desórdenes congénitos hepáticos más importantes se encuentran: la enfermedad de Wilson, GSD-I y los déficits en ciclos de urea.

Las metabopatías, científicamente llamadas ECM, son patologías donde se produce una alteración de una proteína o enzima que bloquea uno o varios procesos metabólicos, produciendo así una carencia en el órgano (Thomas & Van Hove, n.d.). La incidencia es aparentemente baja, 1 de cada 800 neonatos nace con una patología metabólica. (Pico, Lorenzo, & Bermúdez, 2008).

Un estudio de la facultad de medicina de Santiago de Compostela clasificó las patologías en tres grupos:

- ECM por intoxicación
- ECM por déficit energético
- ECM de moléculas complejas

Por una parte, las que provocan una intoxicación se basan en la acumulación de metabolitos dado un bloqueo en su vía metabólica específica, afectando sobre todo al sistema nervioso central. Las que se producen por déficit energético están causadas por el bloqueo en las etapas finales de las vías metabólicas dado que no se usa de forma eficaz la energía, afectando así al sistema muscular. Por último, déficits en la síntesis o degradación de moléculas de carácter complejo, producen síntomas crónicos que usualmente presentan progresión hacia patologías graves como megalias, disfunciones neurológicas, etc. (Saudubray, Ogier de Baulny, & Charpentier, 2018).

Asimismo, la enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo I, es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por una disfunción en procesos metabólicos de

carbohidratos. La deficiencia en el complejo G6Pasa, implicado en la glicólisis y glucogénesis, da lugar a acumulaciones de glucógeno en ciertos órganos como el hígado, riñones e intestino delgado, provocando así hipoglucemia severa.

La enfermedad de Wilson también es un error congénito debido a su carácter autosómico recesivo, cuyo síntoma principal es la acumulación de cobre en algunos órganos siendo los de mayor predisposición el hígado y el cerebro. La vía por la que el cobre entra en contacto con el hígado es por la sangre venosa.

El hepatocito como unidad celular es capaz de ofrecer una respuesta al aumento de cobre, aumentando la velocidad de excreción de cobre cuando es necesario, siempre y cuando se esté bajo condiciones fisiológicas (Gollan & Deller, 1973). Por lo general, en casos de gran acumulación la mayoría de estos tratamientos incluyen sustancias quelantes, sustancias que se unen con gran firmeza a metales con iones pesados siendo ampliamente usados para esta patología, extrayendo así el cobre del cuerpo impidiendo su absorción por los hepatocitos. D-penicilamina, trientina o tetratiomolibdato son ejemplos de medicamentos que incorporan estas sustancias (Roberts & Schilsky, 2008).

### 3.2.2. Desórdenes adquiridos

Los desórdenes adquiridos, al contrario que los congénitos son patologías desarrolladas tras el nacimiento. También podemos referir este concepto a una patología desarrollada por la afección de otra que la precede, dando lugar a enfermedades más graves. Entre los desórdenes hepáticos adquiridos más relevantes encontramos: fallo hepático agudo, fallo hepático agudo crónico y hepatitis C.

En el caso de fallo hepático agudo (ALF) se trata de una enfermedad rara y los datos demográficos son un poco dispersos. En un estudio realizado en EE.UU se puede extrapolar que dicha patología afecta a una pequeña fracción de la población, unos 1600 casos por año (Bower, Johns, Margolis, Williams, & Bell, 2007).

A grandes rasgos, el ALF es un síndrome multiorgánico ocasionado en pacientes sanos provocando una disminución funcional de las células hepáticas. En 1993 O'Grady acuñó una definición que hoy en día sigue siendo utilizada "*condición potencialmente reversible, consecuencia de una lesión hepática severa, con un inicio de encefalopatía a las 8 semanas de los primeros síntomas y en ausencia de una enfermedad hepática preexistente*" (O'Grady, Schalm, & Williams, 1985). Sin evidencias de una predisposición por género, en cuanto a raza hay una ligera predisposición a un cierto tipo de etiología, ocurriendo igual cuando se atiende según la edad del paciente (Bower et al., 2007).

Hay una gran diversidad con respecto a la etiología de la patología (Figura 5), en varios estudios se ha determinado que más de la mitad de los casos de ALF tienen su origen debido a los medicamentos, el más recurrente la intoxicación por acetaminofén (paracetamol). El resto de posibles etiologías corresponden a otro tipo de patologías con origen vírico como la hepatitis B, hepatitis C, de origen autoinmune, otras de carácter hereditario como la enfermedad de Wilson, etc. (Lee, 2008; Wei et al., 2007).

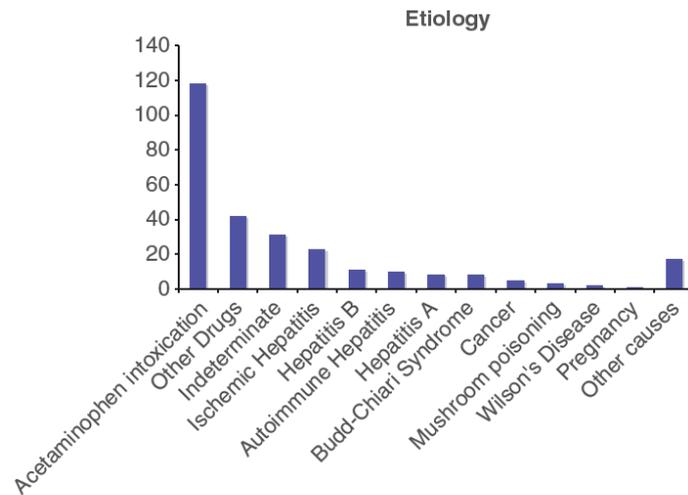


FIGURA 5. ETIOLOGÍA ALF SUECIA 2007 (N=279) (Wei et al., 2007)

El único tratamiento actual de este síndrome es el trasplante ortotópico de hígado, debido a que la disfunción hepática que se produce es tan severa que por el momento no hay otra alternativa aprobada clínicamente.

A su vez, existe una variante del ALF la cual sigue siendo un síndrome multiorgánico llamado fallo hepático agudo crónico (ACLF). Aparentemente tienen la misma epidemiología, pero distinta etiología, ya que esta procede de pacientes con una cirrosis o enfermedad hepática preexistente (Solà & Ginès, 2017).

Asimismo, la hepatitis C tiene origen vírico, por lo tanto, rara vez es heredado o transmitido por otra vía que no sea la sangre. Considerado como pandemia viral, afecta aproximadamente a 170 millones de personas (Georg, Lauer, Bruce, & Walker, 2001). En España se estima que el número de personas infectadas estaría en torno a 600.000 personas, pero son datos dispersos obtenidos mediante encuestas en diversas autonomías (Bruguera & Forns, 2006).

La metodología para diagnosticarla tiene dos vías a través de la detección de anticuerpos específicos y test moleculares para partículas víricas (Poynard, Yuen, Ratziu, & Lai,

2003). Si se detecta a tiempo, cabe la posibilidad de cura mediante antivíricos específicos para la hepatitis C, como el interferón alfa. Estos medicamentos tienen un coste desmesurado provocando que sea inviable su uso para la gran mayoría de pacientes (Georg et al., 2001),(C.W., L., & M.J., 2005). La mayor parte de los esfuerzos, al no existir una vacuna, se centran en la prevención (Bruguera & Forns, 2006; C.W. et al., 2005), pues la única forma de contagiarla es mediante la sangre, reduciendo las posibilidades de infección.

Por último, el hígado graso no alcohólico (NAFL) está incrementando su participación al respecto en incidencia de enfermedades terminales hepáticas. A primera vista parece igual que la patología inducida por alcoholismo, pero esta abarca una amplio abanico de estadios de daño hepático, desde una simple esteatosis a una cirrosis (P., 2002).

La prevalencia es difícil de determinar puesto que para obtener datos se recogen mediante medidas indirectas como ultrasonidos o análisis de sangre (Schwimmer et al., 2006). A pesar de que existen diferencias cuando comparamos entre rangos de edad, en la mayoría de los casos existe alguna patología previa que la provoca, tal como la obesidad, diabetes tipo 2, etc. (Farrell & Larter, 2006; P., 2002).

La sintomatología es difusa, el hígado graso no produce problemas graves en los primeros estadios: fatiga, malestar y sensación de compresión en el lado superior derecho del abdomen (P., 2002). Solo al realizar un estudio en profundidad mediante técnicas histopatológicas, detección de aminotransferasas o ultrasonidos, se puede llegar a un diagnóstico con rigor.

### 3.3. Necesidad de alternativas al trasplante hepático

Las enfermedades terminales hepáticas como el fallo hepático agudo o fallo hepático crónico, suponen una importante causa de mortalidad a nivel mundial además de una carga para la economía sanitaria (Tolosa, Pareja, & Gómez-lechón, 2016). Según el *European Liver Transplant Registry* el número de donantes desde 1968 a 2015 ha sido de 128.216 casos (“Donor data - European Liver Transplant Registry - ELTR,” n.d.), siendo ínfimo en comparación al número de pacientes que necesitan un órgano (Figura 6).

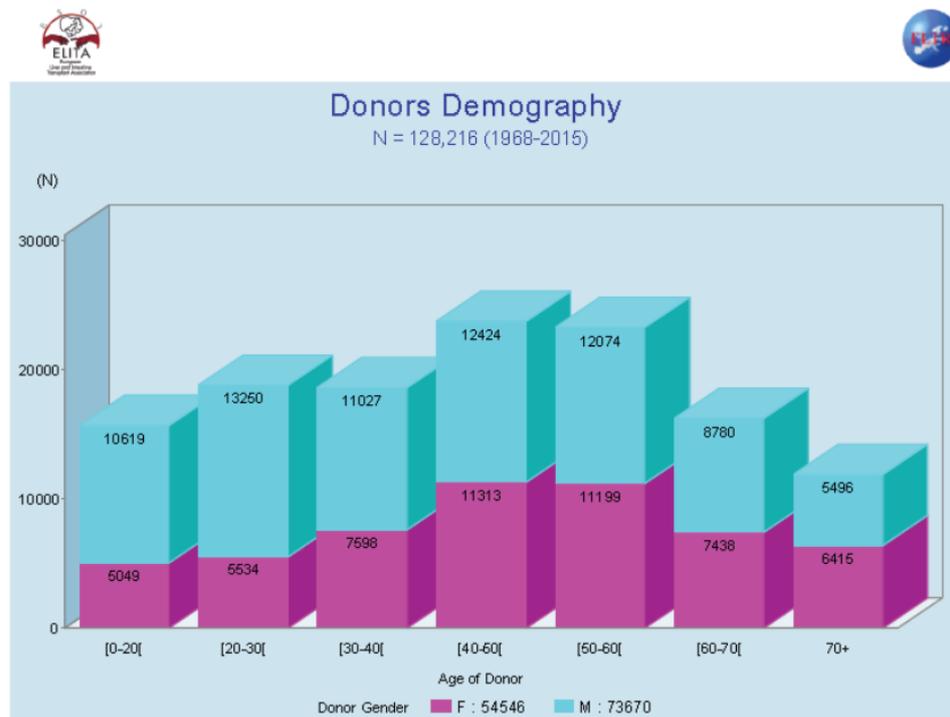


FIGURA 6. GRÁFICA DEL NÚMERO DE DONANTES (1965-2015). IMAGEN OBTENIDA DE (“Donor data - European Liver Transplant Registry - ELTR,” n.d.)

Aunque el trasplante de órgano es el único tratamiento efectivo y curativo para las enfermedades hepáticas anteriormente mencionadas, está limitado por la disponibilidad de órganos, lo que limita su uso a un determinado número y tipo de pacientes. A pesar del incremento de donantes durante las últimas décadas sigue sin poder cubrir la demanda. La falta de donantes ha llevado a los centros de trasplante a extender los criterios para aceptar órganos marginales, pero la demanda de órganos incrementa. Este hecho repercute directamente en los tiempos de espera, estado del paciente y por ende la mortalidad en lista de espera. Además, hay que considerar que el OLT también presenta una serie de limitaciones como el riesgo de desarrollar fibrosis del injerto trasplantado.

La discrepancia entre la oferta y la demanda, hace que sea necesario realizar una selección de candidatos idóneos a trasplante según ciertas condiciones. Se Excluye a pacientes con

poca probabilidad de supervivencia post-trasplante debido a enfermedades hepáticas terminales o por sucesos extrahepáticos con mal pronóstico, y a aquellos pacientes cuya esperanza de vida sea mayor sin el trasplante (Prieto, Aguilera, Berenguer, Pina, & Benlloch, 2007). También hay que considerar que en el caso de pacientes pediátricos puede haber dificultades quirúrgicas o tener que recurrir a una reducción del órgano trasplantado.

Debido a estas limitaciones, se han propuesto diversas alternativas al OLT como el xenotrasplante, la terapia génica o la terapia celular hepática (TCH). Desde el punto de vista clínico, la TCH podría ser una alternativa al OLT en el caso de ALF, para corregir desórdenes metabólicos o para mantener la funcionalidad hepática en aquellos pacientes que no reúnen los criterios de elegibilidad para OLT debido a una edad avanzada, otras enfermedades o por riesgos cardiovasculares, entre otros.

### 3.3.1. Terapia celular hepática

La terapia celular hepática (TCH) es una técnica que tiene como objetivo recuperar las deficiencias funcionales del hígado, mediante trasplante celular en los pacientes vía sistema porta. La idea es que las células infundidas se integran en el parénquima hepático, recuperando la función. El hecho de preservar el hígado nativo hace que la TCH sea un proceso menos radical e invasivo que el trasplante hepático y además se pueden realizar infusiones repetidas. Además, el proceso es simple, lo que implica un menor tiempo de hospitalización y reduciendo los riesgos potenciales de mortalidad/morbilidad.

En primera instancia, se planteó como un reemplazo definitivo al trasplante de hígado, pero los primeros trasplantes celulares evidenciaron algunas limitaciones como el complejo aislamiento celular, la pérdida de viabilidad y funcionalidad de las células tras la criopreservación, la falta de fuentes adecuadas para obtener células de buena calidad y la baja capacidad de adhesión de las células trasplantadas.

En la actualidad la terapia celular no ha supuesto un tratamiento definitivo para los pacientes, sino que ha permitido mejorar la calidad de vida del paciente excluido de trasplante, frenar la progresión del daño a la espera de un órgano o bien, para mantener la función hepática hasta que el hígado nativo regenere por ejemplo tras una resección hepática mayor.

Debido a las dificultades de trasplantar una masa celular adecuada, monitorizar la función o diagnosticar el rechazo, la corrección de la enfermedad tras la TCH ha resultado ser parcial o transitoria y la necesidad de TO no se ha revertido (Soltys et al. 2017). En este sentido, se han identificado distintos factores que limitan la aplicación generalizada de la terapia celular hepática. Por un lado, el incremento de la demanda de terapias celulares hepáticas con hepatocitos no puede satisfacerse debido a la escasez de

fuentes adecuadas de tejido hepático. Los hígados que se usan actualmente para el aislamiento de hepatocitos de uso clínico son aquellos rechazados para TO (órganos marginales, esteatósicos o con tiempo de isquemia fría/caliente prolongado).

A pesar de las mejoras de los procesos de aislamiento de hepatocitos, las células aisladas a partir de estos órganos a menudo presentan una viabilidad y una calidad funcional insuficientes que no pueden garantizar unos resultados clínicos satisfactorios (Soltys et al. 2017; Gramignoli et al. 2015). La criopreservación permite el almacenaje de las células por largos periodos de tiempo (Puppi et al. 2012); sin embargo, la congelación puede tener efectos perjudiciales en la viabilidad y la función metabólica de los hepatocitos. Otra limitación destacable es el hecho de que los hepatocitos adultos no proliferan *in vitro*, y por tanto, las células no pueden expandirse para tratar a más pacientes. Finalmente, una limitación reconocida de los procedimientos de infusión celular es el hecho de que la mayoría de las células (hasta el 70% de las trasplantadas) no sobreviven a largo plazo tras el trasplante, debido a su eliminación y muerte por anoikis. Esa falta de *engraftment* o implantación en el hígado receptor limita los efectos a largo plazo de la TCH.

La obtención de células, por una parte, está limitada por el tipo celular, ya que principalmente se opta por el uso de células madre. Por otra parte, por la necesidad de una gran cantidad para una alta efectividad y que el estado de las células no sea óptimo debido a las condiciones del donante. Una vez abordado el tema de la fuente celular, sin un alto grado de injerto la cantidad es irrelevante puesto que son expulsadas, siendo difícil la evaluación de los beneficios a tiempos largos de la terapia celular (Forbes et al., 2015).

Parte de la investigación actual en torno a la terapia celular se centra en la forma de romper las limitaciones anteriormente mencionadas. Una de las alternativas planteadas a la falta de fuentes celulares adecuadas es el uso de células IPSC's, células adultas reprogramadas a un estado de indiferenciación donde expresan genes y factores para mantener el fenotipo de célula madre inducido. Existen protocolos ya definidos para obtener células con fenotipo hepático (HLC's, hepatocyte-like cells) (Figura 7). El uso de HLC's derivadas de IPSC's permitiría tener células de manera ilimitada y disponibles tanto para tratamientos programados como de emergencia. .

Otra de las fuentes celulares alternativas exploradas es el uso de células madre de hígado o hepatic stem cells (HSCs). La única empresa que realiza actualmente ensayos clínicos de tipo II con células HSC's es Promethera con resultados alentadores [30].

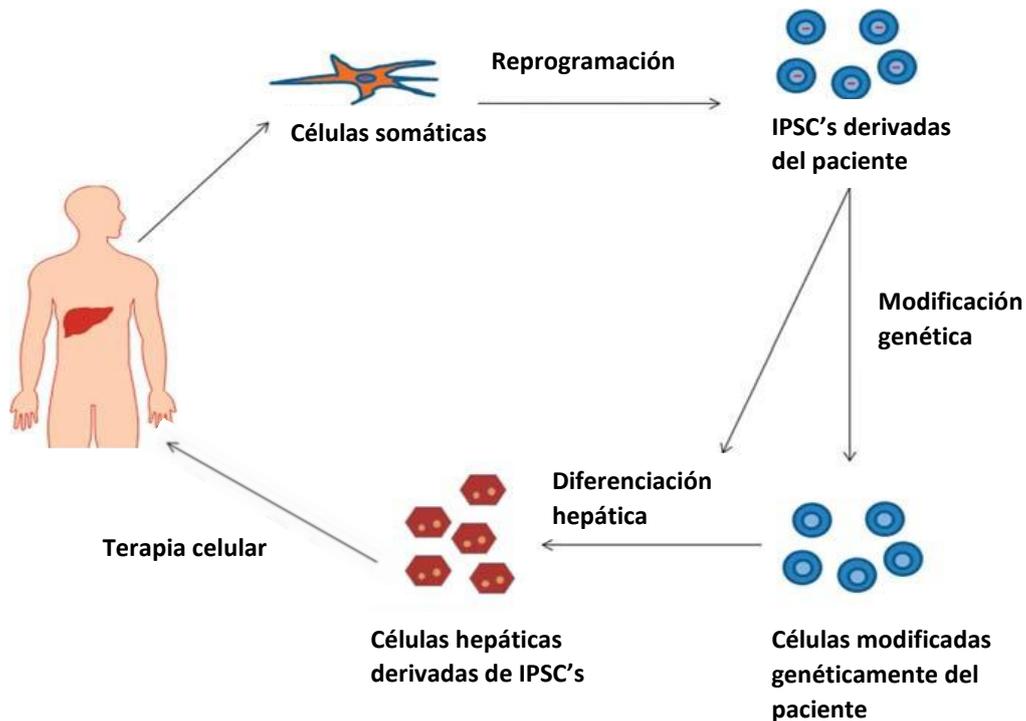


FIGURA 7. DIAGRAMA DE PASOS EN TERAPIA CELULAR CON IPSC'S. DIBUJO OBTENIDO DE (Tolosa et al., 2016)

Por otra parte, en la mejora del grado de adhesión o anidación celular se han experimentado multitud de métodos, la principal razón para ello es la cantidad de células que se pierden tras el trasplante celular, estimando ente un 80%-90% de la población [31]. Entre las diferentes estrategias propuestas para mejorar en *enfragment* de las células trasplantadas se encuentran el precondicionamiento del hígado receptor mediante irradiación, embolización parcial o el uso de fármacos vasoconstrictores, o bien la encapsulación de células o el uso de órganos decelularizados que permitan retener las células, y por lo tanto, mantener la funcionalidad y los efectos de estas a largo plazo.

### 3.4. FUNDAMENTOS DE HIDROGELES

Los hidrogeles son retículos tridimensionales capaces de absorber agua en gran cantidad, siendo insolubles en ella (Figura 8). La propiedad que confiere dicha característica es el grado de entrecruzamiento que existe entre las cadenas flexibles del hidrogel, siendo indirectamente proporcional la relación entre el hinchado del hidrogel y el grado de entrecruzamiento (Vilariño-Feltrer.G, 2017).

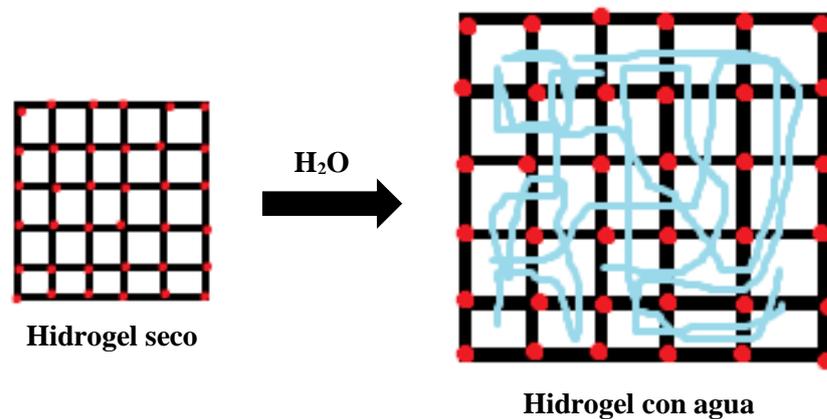


FIGURA 8. ESTRUCTURA DE UN HIDROGEL (NEGRO), AGUA (AZUL) Y ENTRECruzAMIENTOS (ROJO). ESQUEMA REALIZADO POR EL AUTOR PRESENTE DEL TFG.

Las propiedades físicas que poseen los hacen un reclamo para aplicaciones de índole biomédico o farmacéutico. Principalmente la biocompatibilidad que muestran con el cuerpo humano ya ofrece un punto de partida para explotar sus posibles aplicaciones. Según el tejido en el cual sea implantado, el hidrogel deberá cumplir una serie de requisitos específicos de propiedad mecánica, por ejemplo (Ratner, Hoffman, Schoen, & Lemons, 2013).

Por lo general, para cualquier tipo de tejido se definen requisitos como no generar una reacción citotóxica, ser biodegradable (permitiendo un balance entre desaparición del material y formación de tejido nuevo), que su aplicación no suponga un reto técnico y replicar las condiciones del tejido en términos de nicho celular. Por ende, la imitación del tejido nativo pretende mejorar aspectos como la proliferación, diferenciación y adhesión celular, indispensable para llevar a cabo una eficiente regeneración tisular.

Con respecto a la facilidad de uso o implantación de un hidrogel, existe un tipo en particular que son los hidrogeles inyectables, donde la gelificación ocurre "*in situ*" y puede estar mediada a través de una gran variedad de vías. En particular en el presente trabajo la gelificación se realizará con los conjugados de tiramina de los materiales que a continuación se explicarán, en presencia de la enzima peroxidasa (HRP) y catalizando la oxidación mediante el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Poveda-Reyes et al., 2016; Radhakrishnan, Subramanian, Krishnan, & Sethuraman, 2017).

### 3.5. Materiales empleados en la síntesis

#### 3.5.1. Gelatina (Gel)

La gelatina, predecesora del colágeno, obtenida mediante la desnaturalización del colágeno es considerada polímero natural (Figura 9). Contiene dominios de adhesión celular y es altamente biocompatible. Además, al ser de carácter proteico su estructura química contiene grupos carboxilo y amina que permiten modificar las propiedades de la gelatina (Zhou et al., 2012).

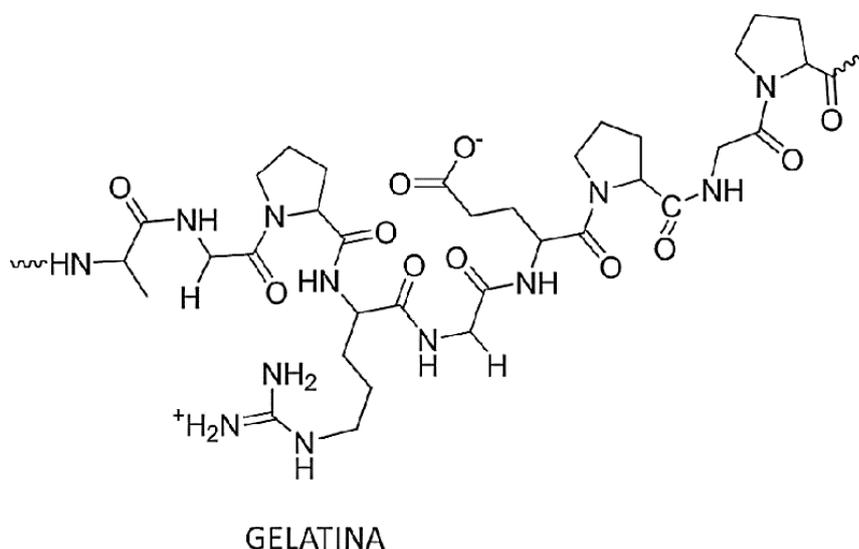


FIGURA 9. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA GELATINA (Ortega, Rodríguez, & Aguilar, 2012)

De forma natural la gelatina forma un hidrogel físico a una temperatura aproximada de 20°C y se disuelve en agua a una temperatura mayor, lo que limita sus aplicaciones biomédicas, ya que a la temperatura corporal de 37°C es líquida. Por otra parte, la gelatina cuenta con propiedades mecánicas pobres, por lo que de forma usual se encuentra entrecruzada con otros polímeros que cubren dicha carencia (Grover et al., 2012).

No obstante, las aplicaciones de la gelatina en biomedicina son extensas tal y como demuestran los estudios realizados. Por ejemplo, el estudio del uso de la gelatina para materiales del campo oftalmológico (Rose et al., 2014) o el estudio en reconstrucción de tejido vascular (Boccafoschi, Habermehl, Vesentini, & Mantovani, 2005). Incluso a pesar de sus bajas propiedades mecánicas, también se han llevado a cabo estudios en tejidos más duros, como el óseo o el cartílago (Sommar et al., 2010), siempre siendo un material secundario que aporta funciones de adhesión celular, o encapsulamiento celular.

### 3.5.2. Ácido hialurónico (HA)

El ácido hialurónico es un polisacárido con alto peso molecular, componente mayoritario de la matriz extracelular de muchos tejidos. En particular es un glicosaminoglicano formado por la repetición de unidades disacáridas ( $\beta$ -1,4-D-ácido glucurónico y  $\beta$ -1,3-N-acetil-D-glucosamina) (Figura 10) (Kurisawa, Chung, Yang, Gao, & Uyama, 2005).

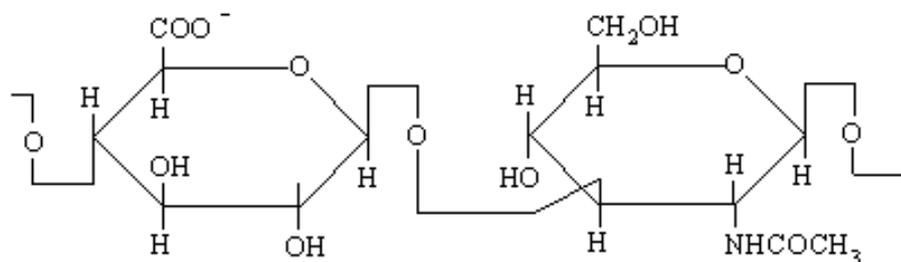


FIGURA 10. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL DISACÁRIDO DE ÁCIDO HIALURÓNICO (Necas, Bartosikova, Brauner, & Kolar, 2008)

En los tejidos dañados la presencia de una matriz abundante de ácido hialurónico en estadios tempranos, ayuda a la migración de células al foco de la lesión además de aumentar la proliferación (Collins & Birkinshaw, 2008). Los productos de degradación de éste regulan la respuesta inflamatoria y estimulan procesos angiogénicos (Turley, Noble, & Bourguignon, 2002).

Con respecto a la estructura química cabe destacar que en presencia de un medio acuoso los grupos carboxilo y N-acetil forman enlaces por puente de  $H^+$ , manteniendo así la rigidez del hidrogel y facilitando la absorción de agua (Ortega et al., 2012). Confiriendo así dentro de los polímeros naturales unas propiedades mecánicas razonablemente buenas.

En consecuencia, su uso en el campo de la biomedicina es muy extenso, desde sistemas de liberación de fármacos (Palumbo, Pitarresi, Mandracchia, Tripodo, & Giammona, 2006; Prestwich, 2011), regeneración de cartílago articular (Li et al., 2018), en sistemas para evaluar la renovación y diferenciación de células madre embrionarias (Gerecht et al., 2017), pruebas de evaluación de medicamentos “drug screening”, modelos tumorales (Burdick & Prestwich, 2011) e incluso para aplicaciones en tejido adiposo (Tan et al., 2009).

### 3.6. Métodos de gelificación

La gelatina y el ácido hialurónico, componentes principales del presente trabajo, muestran diversas técnicas para llevar a cabo la gelificación. Los hidrogeles atienden a otra clasificación en función del método empleado, pueden ser hidrogeles físicos o químicos.

La gelatina forma hidrogeles químicos, por ejemplo, en presencia de genipin o carbodiimidias, con la desventaja que estas reacciones son citotóxicas siendo inviable una gelificación en presencia de células (Olde Damink et al., 1996; Zhang et al., 2016). Otros estudios utilizan la luz, con el uso de sustancias fotosensibles o luz UV (Shin, Olsen, & Khademhosseini, 2012). No obstante, como ya se ha comentado la gelatina de forma espontánea a una temperatura de 20°C se encuentra en un estado de gel, dando lugar a geles dependientes de la temperatura. La principal limitación del uso de la temperatura es que el cuerpo humano siempre se encuentra sobre los 37°C siendo imposible encontrarla en estado de gel dentro del cuerpo si no se actúa de forma química.

Por su parte, el ácido hialurónico también presenta la capacidad de formar hidrogeles químicos a través de sustancias como las carbodiimidias o la divinilsulfona (Sannino, Demitri, & Madaghiele, 2009). Tal y como ocurre con la gelatina, muchas de las reacciones de formación de hidrogeles químicos son citotóxicas, imposibilitando la encapsulación celular durante la gelificación. Sin embargo, para el ácido hialurónico también existen métodos para sintetizar hidrogeles químicos a partir de macrómeros con doble enlace que pueden ser iniciados con luz UV entrecruzando mediante reacciones no citotóxicas.

Los estudios recientes plantan la gelificación enzimática con objetivo preparar hidrogeles sin producir dichas reacciones que provocan daño a nivel celular, tanto para la gelatina como para el ácido hialurónico. Varios estudios emplean la transglutaminasa (Hennink & van Nostrum, 2012) o la peroxidasa (HRP) en presencia de pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Darr & Calabro, 2009).

### 3.7. Cultivo celular (HepG2)

Las investigaciones en sus primeras fases no utilizan las células que presumiblemente son las objetivo, ya que en algunos casos son de difícil obtención. Para ello, a lo largo de los años se han establecido modelos sustitutivos que imiten parcialmente las funciones y comportamiento de las células.

En cuanto a modelos hepáticos se usan líneas celulares que provienen de tejido tumoral hepático (HepG2, Hep3B, Huh7, etc.). La principal limitación que muestran estas líneas celulares es una carencia de isoenzimas especializadas en procesos metabólicos de fármacos, siempre comparado con hepatocitos humanos (Gómez-Lechon, n.d.).

La línea escogida para simular el comportamiento de hepatocitos es la HepG2 (Figura 11). Al ser la más utilizada, hay una gran caracterización funcional, facilitando la interpretación de resultados. Además, son capaces de realizar funciones hepáticas como la secreción de proteínas plasmáticas y colesterol, metabolismo de lipoproteínas y triglicéridos, síntesis de ácido biliar y glicógeno, además de señalización de la insulina.

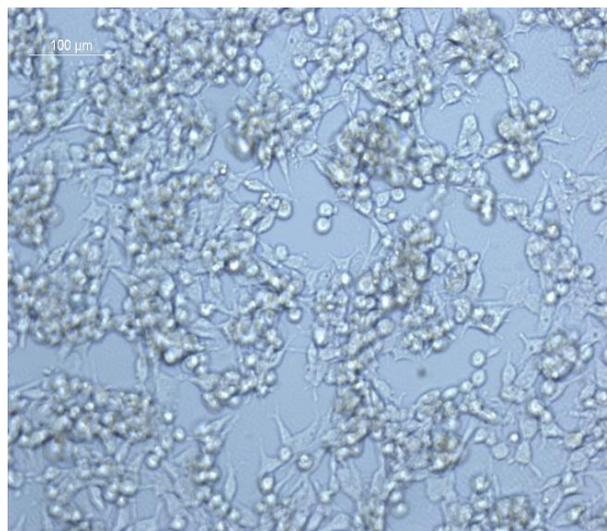


FIGURA 11. LÍNEA CELULAR HEPG2 ENCAPSULADA EN HIDROGEL EN CONTRASTE DE FASES (20X). FOTO REALIZADA POR EL AUTOR PRESENTE DEL TFG

Las ventajas que ofrece sobre otros tipos celulares es su proliferación ilimitada, fenotipo estable, gran disponibilidad y fácil manejo. Tampoco son propensas a generar tumores a pesar de los altos niveles de proliferación y su morfología es parecida a las células epiteliales, como se aprecia en la imagen de microscopía de la Figura 11 (Vinken & Rogiers, 2015). Por ello, se decidió su uso en el presente trabajo, con el fin de evaluar la influencia de los hidrogeles en células hepáticas sin usar hepatocitos primarios.

La línea celular HepG2 mientras no se requieran para el procedimiento experimental, se deben mantener vivas. Para ello se emplea un medio de cultivo con una preparación particular, este medio se compone para un volumen de aproximadamente de 100 mL de:

medio de cultivo F12 50 mL, medio de cultivo L15 50 mL, L-glutamina 1 mL, suero bovino fetal 7 mL, glucosa 0,5 mL, BSA 2 mL, bicarbonato 1,2 mL y antibiótico penicilina/estreptomicina 1 mL. El procedimiento de mantenimiento se basa en un cambio de medio en el frasco cada 2 días y un pase celular para controlar el crecimiento de la población, debido a que dado un nivel de confluencia celular la población no crece más afectando al resto de células.

### 3.8. Técnicas de valoración de viabilidad y funcionalidad

#### 3.8.1. Viabilidad celular

El concepto de viabilidad celular se define como el número de células vivas sobre el número total de células contadas. Para ello, normalmente se llevan a cabo técnicas de fluorescencia o cromáticas, donde no sólo se puede obtener información de la supervivencia de la colonia, sino que también se puede obtener información del citoesqueleto, presencia de proteínas, orgánulos, etc.

Centrando la explicación en términos de viabilidad, para obtener el porcentaje se utilizan técnicas de exclusión donde se diferencian las células vivas de las muertas. A continuación, se detallarán varias técnicas colorimétricas usadas normalmente en ensayos de esta índole:

- Tetrazolium: compuesto que emplea sustancias como MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-3,5-difenilformazan), penetra en las células eucariotas viables. Las células vivas con un metabolismo activo convierten el MTT en una sustancia morada con una absorbancia de 570 nm, las que no están vivas no se tiñen del morado (Figura 12) característico del formazán (Riss et al., 2004).

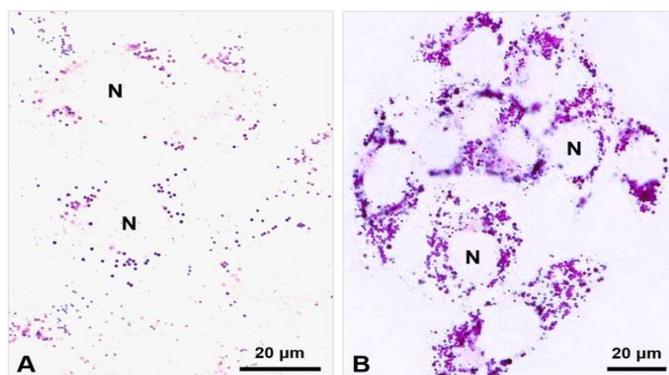


FIGURA 12. EJEMPLO DE TINCIÓN POR MORADO FORMAZÁN. IMAGEN OBTENIDA DE (Riss et al., 2004)

- Neutral red: técnica basada en la incorporación de colorante rojo en los lisosomas de células vivas (Figura 13). Tiene una absorbancia a 540 nm, permitiendo su cuantificación. Los gradientes de pH determinan si la tinción puede penetrar por la membrana, ocurriendo cuando las células están vivas ya que el gradiente de pH es normal. Este gradiente disminuye cuando la célula está muerta, impidiendo la retención de la tinción en los lisosomas (Repetto, del Peso, & Zurita, 2008).

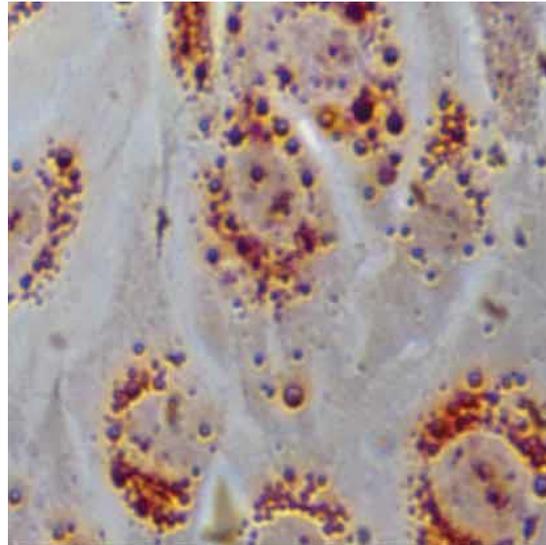


FIGURA 13. EJEMPLO DE TINCIÓN POR NEUTRAL RED (10X). IMAGEN OBTENIDA DE (Repetto et al., 2008)

- Trypan blue: basado en el principio por el cual la membrana celular es capaz de ser impermeable a ciertos tintes, así pues una célula viva tendrá una membrana azul y un muerta tendrá el citoplasma azul (Figura 14) (Strober, 2015).

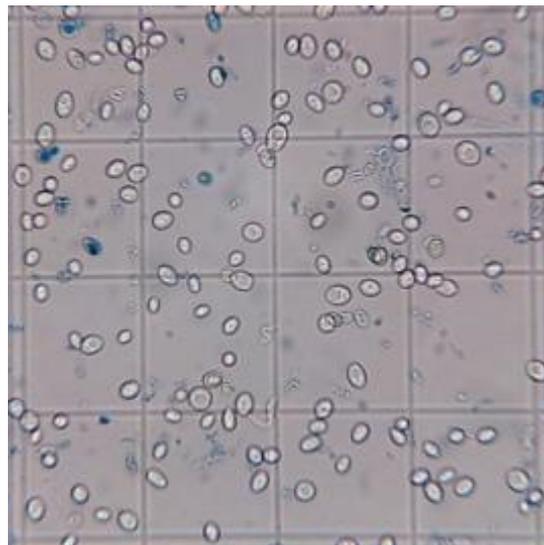


FIGURA 14. EJEMPLO DE TINCIÓN POR TRYPAN BLUE (20X). IMAGEN OBTENIDA DE (STROBER, 2015)

- Hoechst/Propidium: esta tinción usa dos sondas de tinción, ambas se basan en el mismo principio que el trypan blue. Las células vivas quedan completamente teñidas por el Hoechst de azul y las células muertas de un color anaranjado por el Propidium (Figura 15). La combinación de sondas por lo general se suele realizar cuando la cuantificación de células se lleva a cabo mediante equipos que automatizan el proceso, facilitando el reconocimiento de las células a través de la absorbancia de cada sonda, que en este caso son 461 nm y 617 nm.

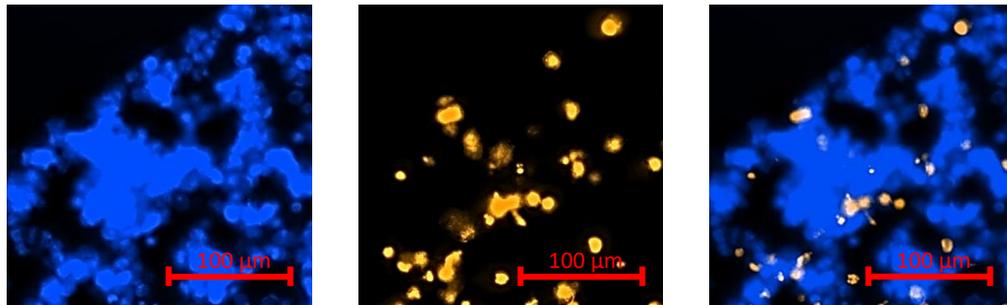


FIGURA 15. EJEMPLO DE TINCIÓN POR HOESCHT (IZQ.), PROPIDIUM (CENTRO) Y RESULTADO DE LA SUPERPOSICIÓN DE AMBAS (DER). IMÁGENES OBTENIDAS POR EL AUTOR DEL PRESENTE TFG.

### 3.8.2. Funcionalidad celular

La funcionalidad celular es otro aspecto importante por evaluar, puesto que es determinante para poder demostrar si el hidrogel propuesto es capaz de mantener el fenotipo del hepatocito, y, con ello, sus funciones específicas. Hay una gran cantidad de pruebas de funcionalidad hepática. En este trabajo se explicarán el que se ha realizado y los que se llevarán a cabo en un futuro.

- Síntesis de albúmina: la síntesis y secreción de esta sustancia es una función hepática importante, de hecho, diariamente se producen unos 10 g. Si esta cantidad decrece es un importante signo de patología hepática, pero hay otros factores como la nutrición y factores hormonales que deben estar presentes a la hora de interpretar resultados (Limdi & Hyde, 2003). Además, es una sustancia usada para evaluar el grado de adhesión celular en terapia celular.
- Actividad del citocromo p-450 (CYP's): son hemoproteínas involucradas en el metabolismo de medicamentos, sustancias químicas y otros tipos de sustratos de origen endógeno. El déficit de este tipo de proteínas causa enfermedades hepáticas de tipo tóxico por acumulación de residuos farmacológicos, sobre todo.

- Ureogénesis: la síntesis y excreción de urea es una de las principales funciones básicas de los hepatocitos. Este proceso permite eliminar el amoniacó que proviene de los compuestos nitrogenados. La conversión de amoniacó en urea se lleva a cabo en el hígado, mientras que su eliminación se hace por medio de la orina. es por tanto, una función primordial y específica hepática que se ha estudiado mediante este tipo de metodología tanto en modelos animales de rata y cerdo demostrando su eficacia (MEIJER, LOF, RAMOS, & VERHOEVEN, 1985; Uchino et al., 1991).

## 4. JUSTIFICACIÓN

La medicina y la investigación biomédica durante los últimos años han seguido caminos paralelos, de forma que en la época actual los biomateriales han supuesto una completa innovación y mejora en una infinidad de aspectos médicos. Ante la creciente demanda de tratamientos alternativos que mejoren la medicina actual, la amplia gama de biomateriales ofrece la posibilidad de sintetizar productos y nuevas metodologías acordes a las necesidades que se plantee.

En términos de regeneración hepática se ha escogido como biomaterial la mezcla polimérica de una proteína como la gelatina y un polisacárido como el ácido hialurónico. Ambas sustancias están presentes en la matriz extracelular (ECM) de muchos tejidos del organismo. En particular, en la ECM hepática encontramos colágeno de varios tipos, precursor de la gelatina, y en menor proporción ácido hialurónico. El papel de la gelatina en nuestro trabajo es favorecer la adhesión y proliferación celular. El papel del ácido hialurónico es aportar propiedades mecánicas e hidratación, mejorando la difusión de nutrientes a las células encapsuladas en los hidrogeles. Bajo este pretexto se fundamenta la elección de ambas sustancias. La mezcla de ambas ya se ha empleado en otros estudios, demostrando capacidad de diferenciación condrocítica de células madre mesenquimales (Sanmartín-Masiá, Poveda-Reyes, & Gallego Ferrer, 2017).

La forma de implantar las células en nuestra metodología es encapsulándolas en hidrogeles inyectables, mediante técnicas poco invasivas. En la preparación de éstos el soluto (gelatina y/o ácido hialurónico) normalmente se disuelve en una sustancia isotónica determinada (buffer) y optimizada para que la gelificación sea completa. Sin embargo, los hepatocitos primarios son células muy delicadas y su mantenimiento en ese buffer afecta su la viabilidad y funcionalidad. Por lo tanto, en el presente trabajo nos planteamos como novedad explorar un medio más amigable para los hepatocitos para disolver y entrecruzar los hidrogeles.

Lo que presentamos es una comparación de las propiedades mecánicas, tiempo de gelificación, viabilidad y funcionalidad celular de los distintos hidrogeles en el buffer habitual y en un medio de cultivo, con objeto de analizar qué medio es más adecuado para los hepatocitos. Asimismo, hemos optimizado la cantidad de células a encapsular en los hidrogeles para que haya suficiente contacto celular y la vez que aseguramos reacción de gelificación. Se ha comparado la respuesta de una composición de hidrogel mezcla de gelatina y ácido hialurónico con los hidrogeles puros, de cara a seleccionar la composición óptima.

El uso de hidrogeles pretende dar solución a las limitaciones de la terapia celular actual, basada en el trasplante de células autólogas o alogénas sin soporte externo. En estos tratamientos a los 2-3 días del trasplante el grado de injerto celular es muy bajo, perdiéndose un 80% o 90% de la población celular, sin dar resultados a largo plazo. Nuestro trabajo se basa en la hipótesis de que el encapsulamiento de los hepatocitos en las matrices de hidrogeles permitirá fijar las

células en la zona de hígado a regenerar sin pérdida de población celular y con mejora de funcionalidad, conferida por el entorno 3D.

Para completar el trabajo, se ha puesto a punto un modelo de fallo hepático en animales de experimentación. En un futuro se pretende demostrar que las células encapsuladas en el hidrogel pueden ser implantadas en el hígado de estos animales y recuperar su función de manera más eficaz que mediante la inyección de células sin hidrogel.

## 5. NORMATIVA

La normativa en la cual se enmarca la parte experimental del presente trabajo, está extraída del Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST). Los experimentos, se regirán por los Reales Decretos y leyes que tengan relación con la manipulación y almacenamiento de sustancias y residuos biológicos y químicos.

- Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales.
- REAL DECRETO 833/1988, de 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, básica de residuos tóxicos y peligrosos.
- REAL DECRETO 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo (Artículo 5.3).
- REAL DECRETO 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.
- REAL DECRETO 485/1997, de 14 de abril, sobre disposiciones mínimas en materia de señalización de seguridad y salud en el trabajo (Anexo I.2; II.1; III.3).
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (BOE 124, 24 de mayo de 1997, págs.. 16100-16115)
- REAL DECRETO 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo (Artículos 5.2.c, 7.4.c).
- REAL DECRETO 614/2001, de 8 de junio, sobre disposiciones mínimas para la protección de la salud y seguridad de los trabajadores frente al riesgo eléctrico.
- ORDEN ESS/1451/2013, de 29 de julio, por la que se establecen disposiciones para la prevención de lesiones causadas por instrumentos cortantes y punzantes en el sector sanitario y hospitalario.

- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio
- Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Materiales

Una vez ya introducida la composición general de los hidrogeles (Gel y HA), se procede detallar todos los reactivos o materiales empleados en el proceso de obtención de estos.

En el proceso de síntesis de hidrogeles, gelatina porcina (tipo A, gel strength 300), ácido hialurónico de streptococo (sal sódica), horseradish peroxidase (HRP) tipo IV, peróxido de hidrógeno (30% w/w en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidrocloreuro de tiramina (Tyr - 98%), ácido 2-(N-morfino)etanosulfónico (MES - 99%), N-hidroxisuccinimida (NHS - 98%), membrana de diálisis para gelatina (12.400 MWCO), membrana de diálisis para ácido hialurónico (3500 MWCO). Siendo estos los reactivos y compuestos necesarios para la parte de síntesis de biomateriales procedentes de la distribuidora Sigma-Aldrich (Alemania). Exceptuando el hidrocloreuro N-(3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida (EDC) procedente de Iris Biotech GmbH (Sanmartín-Masiá et al., 2017). Además, para reacciones de neutralización o modificación de pH se utilizó ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH).

En la parte de cultivo celular se usaron distintos reactivos y compuestos, tanto para la encapsulación como para el cultivo. Se usó tripsina (Gibco), PBS (Gibco), placas p48 (VWR), frascos de cultivo 25 mL y 75 mL y los diversos medios de cultivos y buffers.

El buffer isotónico Calcium Free Krebs Ringer Buffer (CF-KRB) empleado en la síntesis de los hidrogeles, se puede preparar de forma manual todo disuelto en agua mQ añadiendo 5 mM de cloruro potásico, 25 mM de HEPES, 1 mM de dihidrógenofosfato de potasio y 115 mM de cloruro sódico. El medio de cultivo HepG2 empleado en el cultivo celular y cultivo celular de células ya encapsuladas, se prepara también de forma manual con medio comercial F12 volumen 50 mL (Gibco Ref 21765-029), medio comercial L15 volumen 50 mL (Gibco 11415-049), L-Glutamina 3,5 mM (Biochrom K0283), suero bovino fetal (SBF LINU-8460), glucosa 1 M (Sigma Aldrich), BSA 2 mM (Sigma Aldrich), bicarbonato comercial 1 M (Grifols) y mezcla de antibióticos penicilina y estreptomicina.

En cuanto a la evaluación de los cultivos se requirió de compuestos como, hoescht y propidium, de la casa comercial Sigma-Aldrich, para el estudio de la viabilidad celular y el kit "*QuantiChrom*" de la casa comercial Bioassys, para la funcionalidad celular.

Finalmente, en la puesta a punto del modelo animal se utilizó un ratón SCID (inmunodeprimido) y acetaminofén (Paracetamol). Para la tinción empleada en la valoración histológica se empleó hematoxilina de Harrys (Panreac) y eosina alcohólica (Sigma), además los kit de valoración de transaminasas también proceden de la casa comercial Sigma-Aldrich.

## 6.2. Síntesis de gelatina con injerto de tiramina (Gel-Tyr)

La inclusión de tiramina en las cadenas de gelatina se produce mediante la reacción de los grupos carboxilo (-COOH) de la gelatina con los grupos amina (-NH<sub>2</sub>) de la tiramina tal y como describe Kurisawa (Kurisawa et al., 2005; Sakai, Hirose, Taguchi, Ogushi, & Kawakami, 2009).

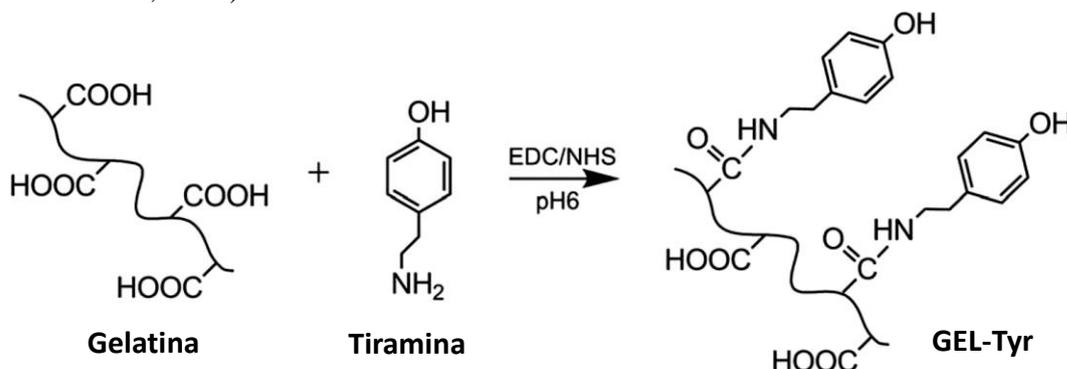


FIGURA 16. PROCESO DE INJERTO DE TIRAMINA (GEL-TYR) (Sakai et al., 2009)

El procedimiento (Figura 16) que se ha seguido para su obtención está estandarizado (Poveda-Reyes et al., 2016), para los ratios calculados (Tabla 3).

En primer lugar se prepara una disolución de 20 mL de agua mQ con 0.4 g de gelatina en obteniendo una disolución 20 mg/mL, añadiendo 50 mM de MES actuando como estabilizador de pH, dejando en agitación a 60°C durante 30 min. Después se adiciona el hidrocloreuro de tiramina (HCl-Tyr), agitando 20 min a temperatura ambiente obteniendo así el injerto de tiramina. Como el injerto introduce protones H<sup>+</sup> en la disolución es necesario un reajuste a pH 6, utilizando NaOH a una concentración 0,1 M sin volumen específico. Se añaden 7,36 mg de NHS en agitación a 30 min y por último se añade a la disolución, EDC en agitación a 37°C durante 24 h.

Tras realizar el injerto de tiramina, para obtener un producto más refinado se emplea una membrana de diálisis (12.400 MWCO), se purifica la disolución durante 2 días con agua destilada (3 cambios al día).

Una vez terminado el proceso de diálisis se congela 24 h a -80°C preparando la disolución para un proceso de liofilización que durará 3 días, último paso para la obtención de la materia prima.

TABLA 3. RATIOS MOLARES EN EL INJERTO DE TIRAMINA (GEL-TYR)

Tyr : COOH	EDC : COOH	EDC : Tyr	NHS : EDC
2 : 1	2 : 1	1 : 1	1 : 10

### 6.3. Síntesis de ácido hialurónico con injerto de tiramina (HA-Tyr)

Siguiendo para el ácido hialurónico un método de injerto análogo al de la Gel (Sakai et al., 2014), el procedimiento (Figura 17) y las cantidades de los reactivos van acorde a los ratios molares (Tabla 4).

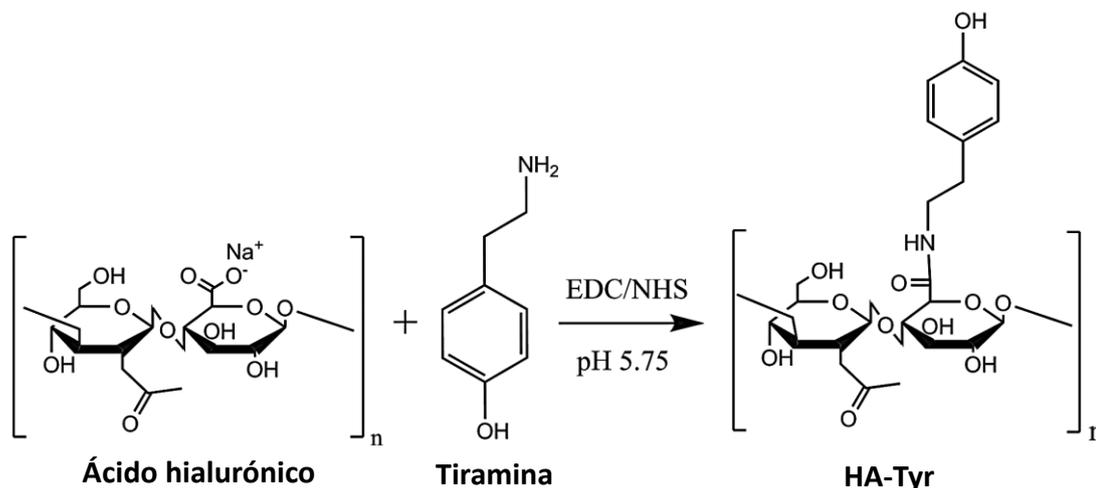


FIGURA 17. PROCESO DE INJERTO DE TIRAMINA (HA-TYR) (Poveda-Reyes et al., 2016)

Para obtener el conjugado de tiramina de HA hay dos etapas diferenciadas: obtención de ácido hialurónico de bajo peso molecular e injerto de tiramina.

En la obtención de un el ácido hialurónico de bajo peso molecular se prepara una disolución de 500 mg de HA en 50 mL de agua mQ, dejado en agitación 4 h aproximadamente para una completa homogeneización y se ajusta el pH a 0,5 añadiendo HCl. La disolución a tan bajo pH se mantiene en agitación a 37 °C durante 24 h para que tenga lugar la degradación ácida obteniendo una reducción del peso molar de 1.200.000 Da a 350.000 Da. Posteriormente, se ajusta el pH a 7 mediante la adición de NaOH, neutralizando así la disolución.

A continuación se dializa con una membrana 3.500 MWCO durante 3 días con agua destilada (3 cambios al día), para retener en la membrana las cadenas de bajo peso molecular. Se congela la disolución a -80 °C y posteriormente se liofiliza obteniendo el HA de bajo peso molecular en seco.

Así pues, tras la obtención de un HA con un menor peso molecular se procede al injerto de tiramina. Para ello, se prepara una disolución de 20 mL de agua mQ, añadiendo 175.3 mg de cloruro sódico (NaCl), 1.08 mg de MES actuando como estabilizador de pH y por último 0.3 mL de NaOH. Tras ajustar la disolución a pH 5,75 se añade 100 mg de HA de bajo peso molecular, se mantiene la disolución en agitación a temperatura ambiente durante 4h.

Una vez disuelto se añade 85.64 mg de HCl-Tyr, se mantiene en agitación a temperatura ambiente unos 15-20 min y ajustando de nuevo la disolución a un pH 5,75. Se adiciona 47.77 mg de EDC y 2.87 mg de NHS, actuando como activador y catalizador de la reacción respectivamente con agitación a 37°C durante 24 h así dando lugar al injerto de moléculas de tiramina en las cadenas de ácido hialurónico.

Como en el procedimiento de la gelatina se purifica la disolución para refinar la materia, empleando una membrana de diálisis de 3500 MWCO, durante 2 días. Los cambios de agua se realizan el primer día con una disolución 150 mM de NaCl y el siguiente día con agua destilada. La disolución ya libre de restos se congela a -80°C para su posterior liofilización durante 4 días, así obteniendo el conjugado de tiramina de ácido hialurónico listo para los procedimientos de reticulación.

La particularidad del injerto de tiramina en HA, es que todos los procesos deben llevarse a cabo con los recipientes cubiertos de papel de aluminio ya que este es fotosensible.

**TABLA 4. RATIOS MOLARES DEL INJERTO DE TIRAMINA (HA-TYR)**

<b>Tyr : COOH</b>	<b>EDC : COOH</b>	<b>EDC : Tyr</b>	<b>NHS : EDC</b>
<b>2 : 1</b>	<b>1 : 1</b>	<b>1 : 2</b>	<b>1 : 10</b>

#### 6.4. Grado de sustitución (Tyr) de los hidrogeles.

Tras síntesis de los conjugados de tiramina de la gelatina (Gel) y del ácido hialurónico (HA), podemos evaluar el grado de sustitución por tiramina en las macromoléculas. Gracias a la técnica de espectrometría se puede obtener la absorbancia de una disolución, extrapolando mediante cálculos posteriores la cantidad de moles sustituidos en el material, dando una estimación en porcentaje de lo que se denomina “*grado de sustitución*”.

El procedimiento se basa en generar una curva patrón del elemento que se desea analizar, en este caso de tiramina. Primero se realiza una disolución de tiramina en agua mQ a una concentración de 1.25 mg/mL, de la cual se harán diluciones seriadas dando lugar a los puntos de la curva (Figura 18), los valores de los puntos son:

- 0.125 mg/mL
- 0,1 mg/mL
- 0,05 mg/mL
- 0,025 mg/mL
- 0,0125 mg/mL

Una vez obtenidas las diluciones, se prepara una disolución de 1,5 mL a 0,1% p/v de Gel-Tyr y HA-Tyr en agua mQ. Encendemos el equipo, fijamos la longitud de onda en 275 nm, calibramos el “zero” que es medir agua mQ sin nada disuelto. A partir de ahí se recogen las medidas de la curva patrón y por último realizamos 3 medidas de volumen 450  $\mu$ L por cada disolución de material para hacer una media y obtener un valor de absorbancia promedio. Cada medida se realizó en una cubeta de volumen 450  $\mu$ L siendo limpiada con agua y aire comprimido en cada uso.

El equipo de espectrofotometría es el modelo “Cary 60 UV-Vis” del fabricante Agilent Technologies, así como las cubetas de cuarzo del mismo fabricante.

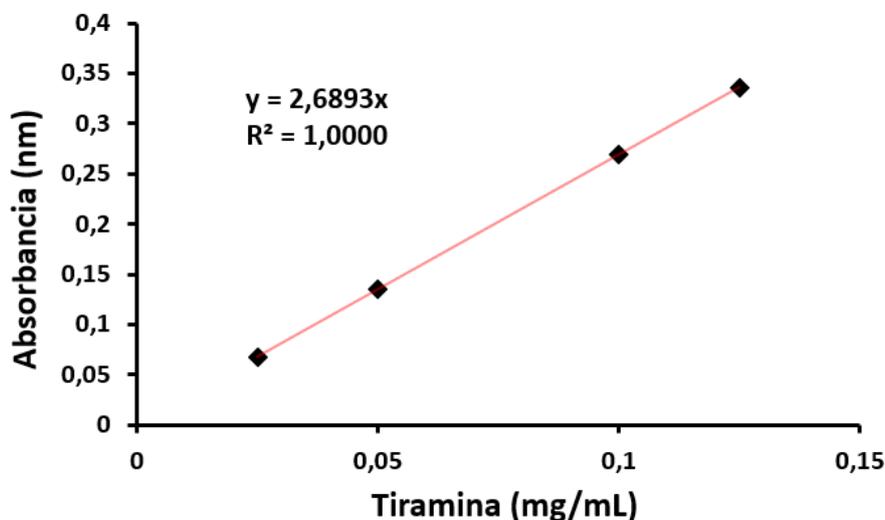


FIGURA 18. CURVA PATRÓN DE TIRAMINA. CADA PUNTO ES LA MEDIA DE 3 MEDICIONES INDIVIDUALES.

### 6.5. Reticulación de hidrogeles

El injerto de tiramina de ambos compuestos va a permitir obtener hidrogeles que solo contengan uno de ellos o ambos, dando lugar a mezclas con propiedades mecánicas modificables. La reticulación ocurrirá de forma enzimática mediante HRP y  $H_2O_2$ , para ello todos los compuestos están sujetos a una proporción.

- 80% de Gel, HA o la mezcla Gel/HA (20/80)
- 10% HRP
- 10%  $H_2O_2$

A modo de ejemplo para un hidrogel de prueba para medir por reometría con volumen 350  $\mu$ L, las proporciones toman los siguientes valores:

- 280  $\mu$ L del material disuelto (Gel o HA) al 2% p/v
- 35  $\mu$ L de HRP a una concentración de 12,5 ud/mL
- 35  $\mu$ L de  $H_2O_2$  a una concentración de 20 mM

Todas las alícuotas se realizan en el buffer CF-KRB o el medio de cultivo correspondiente, el hidrogel puede reticularse en una superficie como una placa p48 o Parafilm. Primero se procede con la disolución del material principal y se adiciona el HRP, sin dejar pasar mucho tiempo ya que las enzimas pueden inactivarse por dilución. Por último, dejamos la gota en la superficie deseada, y o bien se echan gotas de  $H_2O_2$  por encima o pueden introducirse con cuidado para una mejor homogeneización. Una vez transcurrido un tiempo determinado para cada composición (tiempo de gelificación), la reticulación está completa (Figura 19).



FIGURA 19. EJEMPLO DE HIDROGELES RETICULADOS: GELATINA (IZQ.) Y ÁCIDO HIALURÓNICO (DER.)

## 6.6. Ensayo por reometría.

Los hidrogeles según su composición, tendrán unas propiedades mecánicas u otras, así pues, la caracterización de estas es de gran importancia, sobre todo de cara a la elección de la condición óptima de hidrogel. La reología se define como la ciencia que estudia la deformación y el flujo de materia, aceptada la definición cuando en 1929 se fundó la *American Society of Reology* (Barnes, Hutton, & Walters, 1989). Siendo propiedades como la viscoelasticidad, elasticidad y plasticidad evaluadas.

En nuestro caso determinaremos el módulo de almacenamiento a cizalla ( $G'$ ), una medida del módulo elástico de los hidrogeles, y el tiempo de gelificación ( $T_{gel}$ ). Los procesos de mecanotransducción dependen por completo de la capacidad del material de resistir las fuerzas ejercidas por la célula, por lo que es importante trabajar con hidrogeles de una cierta rigidez. A su vez mediante una estimación lineal, se puede obtener el tiempo de gelificación ( $T_{gel}$ ) a partir de la medida de la reacción de gelificación en el reómetro, parámetro para tener en cuenta en el proceso de encapsulación celular. El equipo usado es el reómetro Discovery HR-2 Hybrid de TA Instruments.

Los ensayos reológicos permitirán cuantificar dichas propiedades mecánicas cuando los hidrogeles son sometidos a una deformación. Son ensayos dinamomecánicos de tiempo, deformación y frecuencia, se obtuvo la cuantificación de  $G'$  y una aproximación del tiempo de transición de líquido a gel.

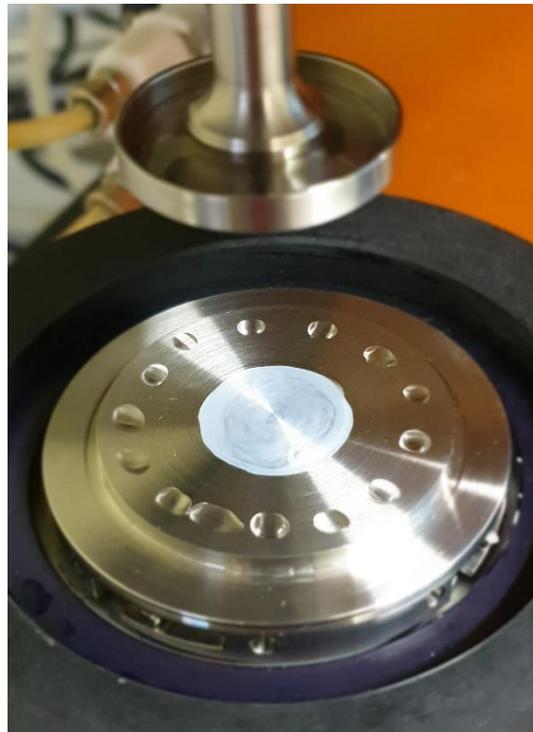


FIGURA 20. EJEMPLO DE MEDIDA POR REOMETRÍA DE UN HIDROGEL (GEL) AL 2%.

En cuanto al procedimiento experimental, se usó un cabezal de acero inoxidable de 20 mm de diámetro (Figura 20) el cual se calentó a 37°C requiriendo el uso de un dispositivo llamado “*solvent trap*” para minimizar la pérdida de solvente durante el ensayo, así teniendo en cuenta que posteriormente las células se cultivan a dicha temperatura. El tiempo de experimentación varió entre 20-30 min, esto es debido a que en función de la composición del gel,  $G'$  se estabilizará en un tiempo mayor o menor, fijando a su vez la deformación al 1% y la frecuencia a 1 Hz.

Se realizaron dos barridos más, uno en deformación variando desde 0.01% a 20% fijando la frecuencia a 1Hz determinando así el rango de viscoelasticidad lineal. Y un barrido en frecuencia de 0.1 Hz a 10 Hz fijando esta vez la deformación al 1% ya que la estabilización del módulo de almacenamiento a cizalla ( $G'$ ) explica las propiedades viscoelásticas del hidrogel. Las últimas mediciones también se llevaron a cabo a una temperatura de 37°C en pro de mantener las condiciones en todo momento. En la imagen anterior se muestra un ejemplo de hidrogel medido en reómetro (Figura 20).

Los hidrogeles tienen propiedades viscoelásticas, para cuantificar sus propiedades mecánicas como el módulo de almacenamiento a cizalla se deberá confirmar que las medidas se realizan en el rango lineal viscoelástico. Por ello mediante el barrido en frecuencia se puede determinar si la tendencia de los datos es lineal, tomando como valor de módulo el obtenido a 1 Hz.

De igual modo, las mediciones en el rango viscoelástico lineal del proceso de gelificación posibilitan obtener una medida del tiempo de gelificación. A partir de ajustes lineales a tiempos cortos y tiempos largos de la medida, en la intersección que forman ambas rectas se define el tiempo de gelificación, tal y como se puede observar en la siguiente imagen (Figura 21) a modo de ejemplo.

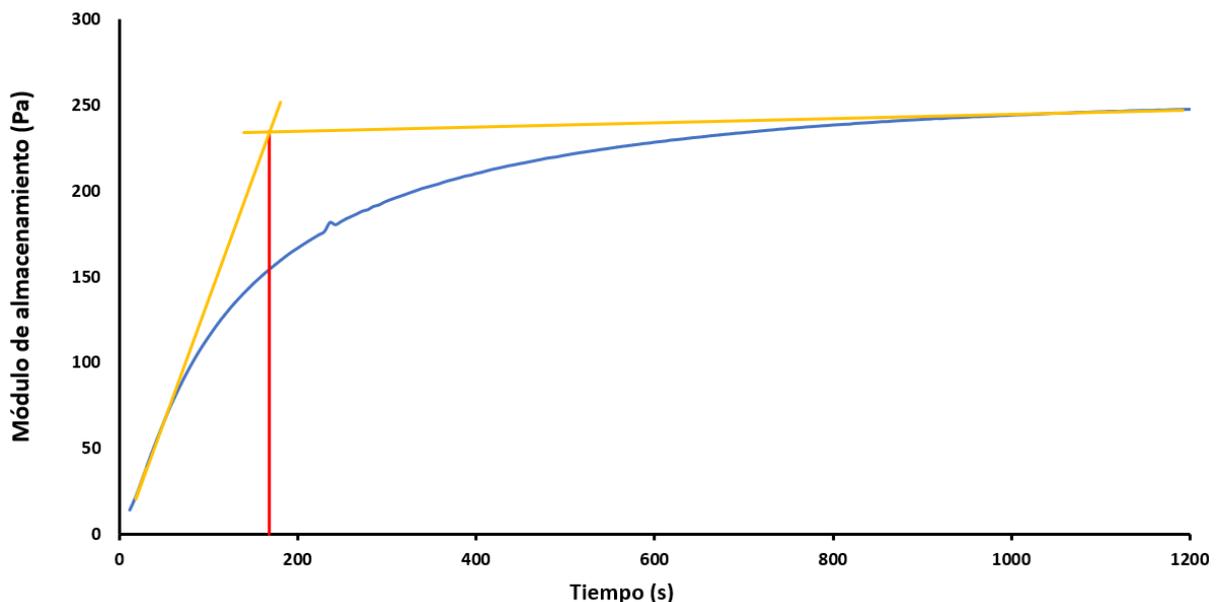


FIGURA 21. EJEMPLO DE ESTIMACIÓN DEL TIEMPO DE GELIFICACIÓN.

### 6.7. Encapsulamiento celular en los hidrogeles.

La encapsulación de las células permitirá evaluar el entorno 3D que aporta el hidrogel, variando el resultado según la composición de éste. Al trabajar con células, se ha de trabajar en unas condiciones de esterilidad, para ello todo el protocolo se realizará bajo una campana de flujo laminar continuo, atendiendo también a la esterilidad de los reactivos y compuestos requeridos. Se ha usado la línea celular de hepatoma humano HepG2, una de las líneas celulares más usadas en hepatología tanto para estudios de hepatotoxicidad como para estudios de funcionalidad y de señalización.

El protocolo que se siguió es una adaptación de uno ya existente (Moulisová et al., 2017), modificado según el planteamiento de los ensayos. Se prepara una disolución al 2% (p/v) del material deseado, si se trata de Gel con 1 h a 37°C es suficiente. Por otro lado, si se desea HA con 4 h bastaría, pero por precaución se deja “*overnight*” asegurando así una completa disolución.

Se filtra la disolución anterior para obtener un producto “estéril”. El tamaño de poro del filtro puede variar entre 0.22 µm. Una vez llegado a este punto teniendo el material a punto, empezamos el proceso de obtención de la cantidad de células requerida.

Sobre el frasco que contiene las células HepG2, se retira el medio de cultivo. Se realiza un lavado con PBS para eliminar restos de medio. Posteriormente, las células se incuban durante 3-4 minutos con una enzima llamada tripsina a 37°C, para levantar las células, quedando así en suspensión. Se añade medio de cultivo, donde la presencia de suero bovino fetal (SBF) inactivará la tripsina para evitar efectos adversos en las células. Con el medio se recuperan las células y se centrifugan a 1500 rpm durante 3 minutos, obteniendo un pellet y un sobrenadante que se retirará. El pellet se resuspende en un volumen conocido de medio de cultivo. El conteo celular se realiza extrayendo una alícuota de 10 µL de la suspensión celular y con la cámara de Neubauer. Una vez determinada la densidad celular, se procede a separar las células correspondientes según su uso. En un primer momento se sopesó evaluar dos densidades celulares 200.000 y 400.000 por hidrogel, pero los resultados que posteriormente se detallarán, hizo que la densidad fijada fuera de 200.000.

Se preparan alícuotas de HRP y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la gelificación [34]. Se centrifugan los eppendorf con la suspensión celular, 1500 rpm durante 3 minutos para tener la cantidad de células deseada y se resuspenden en la solución con el biomaterial correspondiente en presencia de HRP, obteniendo así a las células dentro del material aún líquido.

En una placa de 48 pocillos no tratada se deposita una gota de 90 µL (resultado de 80 µL de material disuelto y 10 µL de HRP). Rápidamente se añaden 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promoviendo así la reacción enzimática que dará lugar a la gelificación. Tras esperar un tiempo prudente a la gelificación completa de los hidrogeles, se cubren estos con 200 µL de medio de cultivo HepG2 para cubrir las necesidades celulares, siendo este sustituido cada 2 días.

## 6.8. Viabilidad y funcionalidad celular

### 6.8.1. Viabilidad celular

El comportamiento celular una vez encapsuladas dentro de un hidrogel no es tal y como lo harían en el organismo, por ello se requiere una valoración sobre la viabilidad y funcionalidad que desarrollan.

Para evaluar la viabilidad se emplea una técnica ya conocida basada en el uso de sondas fluorescentes. Como sondas se utilizaron:

- Hoescht (Ho): sonda que marca el DNA y por tanto marca todos los núcleos de las células
- Propidium (PI): sonda que marca el núcleo de las células muertas.

Para realizar el marcaje mezclamos las sondas en medio de cultivo de HepG2, donde por cada 1 mL de medio se adiciona 1.5  $\mu$ L de Ho y 1,5  $\mu$ L de PI. Dejando 30 minutos en una estufa a 37°C para que la sonda marque, durante este proceso hay que hacerlo sin luz externa ya que afectaría a las sondas negativamente.

Las imágenes se toman a través del equipo (Figura 22) “InCell 6000 analyzer system” (GE Healthcare, USA). Para adquirir un número suficiente de células, se adquieren 12 campos por cada pocillo, y el objetivo empleado fue de 20x. Para cada canal de fluorescencia, se toman las imágenes correspondientes con un ajuste mediante filtros apropiados.

Entrando en profundidad en el análisis de imágenes, se aplica siempre una corrección de fondo (background) antes de cuantificar el número de células. Como referencia de tamaño se coge el núcleo de la célula, que se obtiene a través de un algoritmo Top-Hat. El número total de células se cuantifica mediante la sonda Hoechst y para obtener la viabilidad se realiza una exclusión de células con la sonda Propidium.

Así pues, los datos se ofrecen a través de la interfaz del software para ser analizados posteriormente.

### 6.8.2. Funcionalidad celular

La funcionalidad celular puede valorarse a través de muchas pruebas, dependiendo siempre del tipo celular. Al trabajar con células hepáticas se podrían plantear pruebas como la producción de albúmina, las actividades del citocromo P450 o la capacidad ureogénica de las células. La técnica empleada será la ureogénesis ya que es posible realizarla en la propia placa donde se encuentran los hidrogeles..

Primero preparamos la mezcla de reactivos donde el amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) será transformado en urea siendo ésta cuantificada. Para obtener la mezcla por cada 1mL de solución salina HEPES adicionamos 11.5  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  (84.5 M) y 2  $\mu$ L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 M). De la placa

que se obtiene al finalizar el encapsulamiento celular descrito en el punto 6.7, retiramos el medio de cultivo y añadimos 200  $\mu\text{L}$  o un volumen que sea suficiente para cubrir el hidrogel a cada pocillo de la mezcla anterior.

Finalmente se recoge de nuevo la mezcla ya incubada donde encontraremos la urea, antes de valorarla se debe centrifugar a 5000 rpm durante 3 minutos. Con ello se pretende separar de la urea los restos celulares o sedimentos para que no se produzcan interferencias en la lectura. Pasamos el volumen de urea a otro eppendorf, llegados a este punto se pueden congelar las muestras para valorar un conjunto o proceder con la valoración.

La valoración de urea producida por las células se lleva a cabo según un kit fabricado para ello (Kit Bioassys: QuantiChrom). El protocolo de cuantificación está preestablecido según el fabricante, adaptando éste según las necesidades.

Primero se prepara el patrón de urea, se diluye 1/5 del patrón 50 mg/dL en  $\text{H}_2\text{O}$  quedando una concentración de uso de 0.1 mg/mL. Para obtener la curva se dispone la cantidad de patrón preparado en cada pocillo, según la siguiente tabla (Tabla 2).

**TABLA 2. PREPARACIÓN DE CURVA PATRÓN DE UREA**

<b>Volumen Urea 0.1 mg/mL</b>	<b>0 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>5 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>30 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>40 <math>\mu\text{L}</math></b>
<b>Agua</b>	<b>50 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>45 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>40 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>30 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{L}</math></b>

Las muestras se descongelan y se centrifugan a 8000 rpm durante 3 min, se pipetea 50  $\mu\text{L}$  en un pocillo de la placa p96 del sobrenadante centrifugado. Para los blancos se pipetea el mismo volumen, pero de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en Hepes salino, el usado en la incubación de los hidrogeles.

En el kit vienen dos reactivos A y B, de los cuales se prepara una disolución 1:1, teniendo en cuenta que hay una ventana de 20 min de estabilidad de la mezcla. De esta mezcla se adiciona 200  $\mu\text{L}$  a cada pocillo, independientemente de su contenido, y se mantiene a temperatura ambiente 30 min, protegiendo de la luz la placa para evitar interferencias.

Por último, mediante espectroscopía realizamos una lectura del contenido de los pocillos a 520 nm, obteniendo los datos de absorbancia de cada uno.

Para estimar la producción de urea, primero se representa la absorbancia de la curva patrón de urea (Figura 23), se realiza un ajuste lineal para obtener la ecuación de la recta. A partir de la cual se estima la ureogénesis celular, tomando como la variable “y” la absorbancia y la “x” como la cantidad de urea (Ecuación I).

$$[abs] = (0,0855 * [urea]) + 0,2033 \quad (I)$$

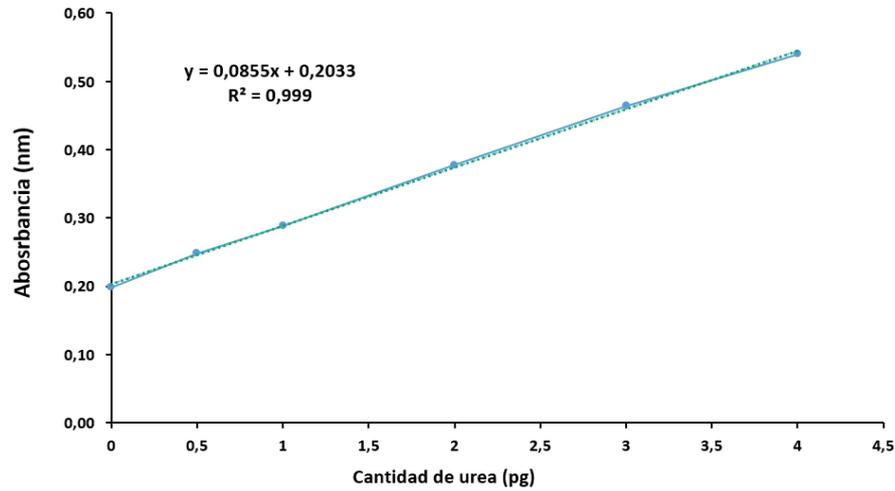


FIGURA 23. REPRESENTACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE UREA OBTENIDA DE FORMA EXPERIMENTAL

### 6.9. Modelo Animal de fallo hepático

Una vez se lleva a cabo la inclusión de las células en hidrogel con su posterior valoración de la viabilidad y funcionalidad, se pretende mediante un modelo animal validar la hipótesis sobre la que se fundamenta todo el experimento.

El animal escogido para crear el modelo son los ratones SCID, una inmunodeficiencia combinada severa provocada por una mutación espontánea de cepa albina genera una carencia de células B y células T en el sistema inmune, otorgando la capacidad de albergar células xenólogas (Ito et al., 2002), debido a que los estudios se realizarán usando células humanas. Los procedimientos y condiciones sobre los que se trabajan están aprobados por el Comité Ético de Bienestar Animal del hospital La Fe (Valencia). Los animales se encuentran en un entorno con comida y agua disponible sin restricciones, un ciclo de luz de 12 h y en una habitación termorregulada, asegurando así unos cuidados óptimos.

Los animales escogidos son ratones macho con edad entre 4-6 semanas. Para inducir el fallo hepático agudo se suministra 400 mg de acetaminofén (paracetamol) por kilogramo. Con el fin de evaluar el daño provocado se procede a realizar tinciones de cortes histológicos hepáticos evaluando controles sanos y animales con daño hepático 24 h después de la inducción del daño (tinción por hematoxilina-eosina). Además, se cuantifica las transaminasas presentes en el suero de los animales tratados ya que se trata de un indicador biológico de daño hepático (Tolosa et al., 2015).

Así pues, los cortes histológicos proceden de un bloque de parafina con el tejido incluido en él. La desparafinación empieza con los cortes dentro de una estufa a 60 °C durante 1 h, posteriormente se realizan dos inmersiones de 10 min cada una en xilol. Realizando a continuación en etanol (100 %) dos pases de 10 min, en etanol (96 %) un pase de 10 min y por último con etanol (70%) 10 min. Se deja en agua destilada hasta empezar con el protocolo de tinción.

La tinción escogida para evaluar histológicamente los cortes procedentes del modelo animal es la hematoxilina-eosina. Tras retirar el portaobjetos del agua destilada procedente del último paso de desparafinación, se sumerge en hematoxilina de Harris 30 s y se lava con agua hasta retirar completamente el excedente. Después se realizan dos pases cortos en alcohol clorhídrico (dilución 1:200 de HCl en etanol 70%), lavamos de nuevo con agua. 5 pases de agua amoniacal (15-20 gotas de amoniaco en agua), lavamos con agua. Y procedemos a cubrir con eosina alcohólica el portaobjetos 30 s, posteriormente se lava de nuevo con agua.

Una vez llegado a este punto, los cortes se han teñido, pero hay que fijarlos y retirar el excedente. Se realizan 20 pases cortos en etanol 96 %, de nuevo 20 pases cortos en etanol 100 % y por último 3 pases cortos en xilol. Con pegamento de montaje colocamos un cubre de vidrio encima del portaobjetos, prestando atención a la formación de burbujas, obteniéndose el corte preparado para ser observado al microscopio.

Las transaminasas son enzimas presentes en el interior de los hepatocitos, niveles elevados son indicadores de lesión celular. Con mayor relevancia están la alaninoamino transferasa (ALT) y la aspartatoamino transferasa (AST), por ello se cuantificarán sus niveles en un control sano y uno con daño hepático inducido.

Ambos protocolos de cuantificación son de la casa comercial Sigma-Aldrich. El primero es el “Kit MAK052”, basado en la catalización del grupo amino de la alanina en  $\alpha$ -cetoglutarato, generando así piruvato y glutamato. Por otro lado, el “MAK055”, cuantifica la cantidad de oxaloacetato y glutamato por la conversión de  $\alpha$ -cetoglutarato y aspartato.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez obtenidos los productos liofilizados de la gelatina y el ácido hialurónico ya descritos (puntos 6.1 y 6.2), y, realizado el proceso de reticulación (punto 6.5) es necesaria una caracterización de las propiedades mecánicas y químicas de los hidrogeles que forman. A su vez, tras la encapsulación celular (punto 6.7) se procederá a realizar un estudio del comportamiento celular (puntos 6.8.1 y 6.8.2).

### 7.1. Caracterización de los hidrogeles: grado de sustitución y reometría

- Grado de sustitución

Tras la obtención de los conjugados de tiramina de gelatina y ácido hialurónico se cuantificó el grado de sustitución de tiramina en las cadenas de ambos, con el fin de conocer la cantidad que había sido injertada.

El tiempo de gelificación es un parámetro dependiente del grado de sustitución, puesto que a mayor cantidad de moléculas de tiramina mayor será el número de posibles enlaces formados en el proceso de gelificación y por ende el tiempo será menor. En total se sintetizó un lote de cada material siendo suficiente para la experimentación.

La metodología empleada para hallar dicho grado se detalla en el apartado 6.4 y en los siguientes gráficos se muestra la concentración de tiramina para cada lote y el grado de sustitución (Figura 30).

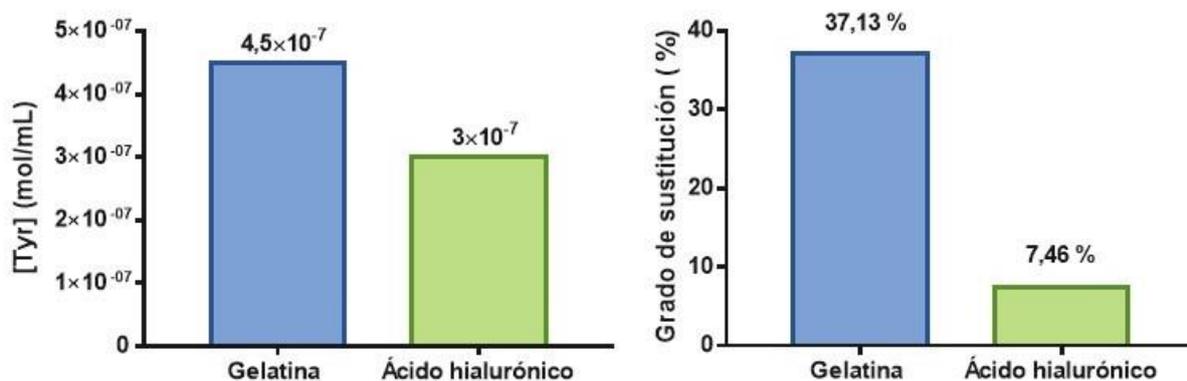


FIGURA 30. CONCENTRACIÓN DE TIRAMINA OBTENIDA EN GELATINA Y ÁCIDO HIALURÓNICO (IZQ.). GRADO DE SUSTITUCIÓN EN GELATINA Y ÁCIDO HIALURÓNICO (DER).

Los resultados muestran un grado de sustitución mayor en Gel con respecto al HA, por una parte se debe a que en la gelatina se encuentra una concentración mayor de tiramina. No obstante, la tiramina reemplaza los grupos -COOH de la Gel y el HA cuya concentración es de 1,2x10<sup>-6</sup> mol/mL y de 4x10<sup>-6</sup> respectivamente. Por ende, a pesar de la poca diferencia entre las concentraciones de tiramina sí que hay una gran diferencia en el grado de sustitución.

- Reometría

El ensayo por reometría se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 6.6. El objetivo es determinar la rigidez del hidrogel y el tiempo de gelificación, realizando así una elección óptima del biomaterial, se realizaron 3 medidas para cada composición.

Al ser un material con propiedades viscoelásticas las medidas deben realizarse en su respectivo rango lineal viscoelástico, así asegurando la veracidad de las mediciones. Para ello en las próximas gráficas (Figura 24 y Figura 25) se representa el módulo complejo ( $G^*$ ) del material para cada solvente con respecto a una deformación desde 0,01 % hasta 20 %, así observando si se trabaja en la región lineal.

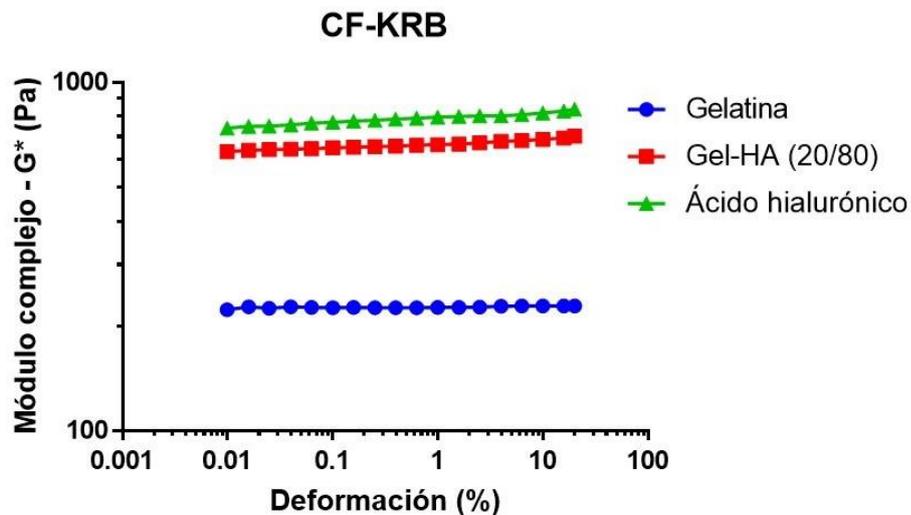


FIGURA 24. REPRESENTACIÓN DE  $G^*$  EN FUNCIÓN DE UNA DEFORMACIÓN ENTRE 0,1% Y 20% CON EL SOLVENTE CF-KRB. CADA CURVA CORRESPONDE A LA MEDIA DE 3 MEDIDAS INDIVIDUALES PARA CADA COMPOSICIÓN.

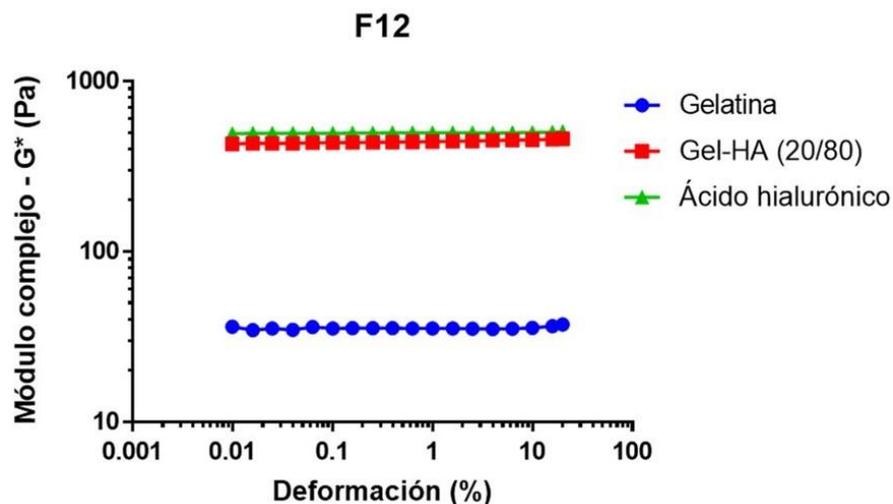


Figura 25. representación de  $g^*$  en función de la deformación (%) con el solvente F12. cada curva corresponde a la media de 3 medidas individuales para cada composición.

En vista del último gráfico (Figura 25), se puede corroborar que las medidas están dentro del rango lineal viscoelástico puesto que  $|G^*|$  se mantiene estable bajo cambios en la deformación. También se muestran las propiedades mecánicas típicas de hidrogeles con la presente composición, siendo de mayor magnitud el HA que la Gel y teniendo en cuenta la proporción empleada en la mezcla Gel-HA (20-80) unas propiedades mecánicas muy similares al HA (Poveda-Reyes et al., 2016).

Por otra parte, el módulo complejo  $G^*$  se compone del módulo de almacenamiento  $G'$  y el módulo de pérdida  $G''$ , para cuantificar los valores de cada uno y así poder estimar un valor de módulo mecánico se observa la dependencia de estos con un variación en frecuencia de 1 Hz hasta 10 Hz. En los siguientes gráficos (Figura 26 y Figura 27) se representa lo mencionado anteriormente.

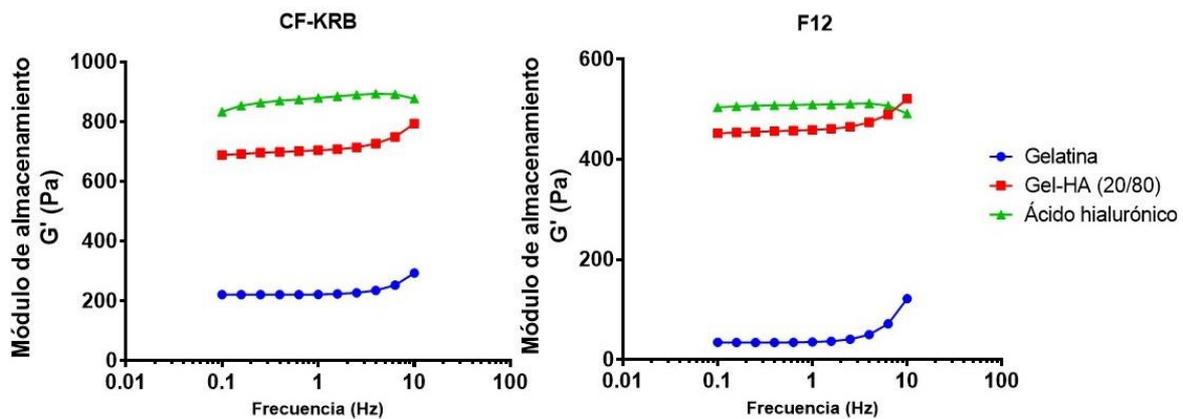


FIGURA 26. REPRESENTACIÓN DE  $G'$  EN FUNCIÓN DE LA FRECUENCIA (HZ) PARA AMBOS SOLVENTES. CADA CURVA CORRESPONDE A LA MEDIA DE 3 MEDIDAS INDIVIDUALES PARA CADA COMPOSICIÓN.

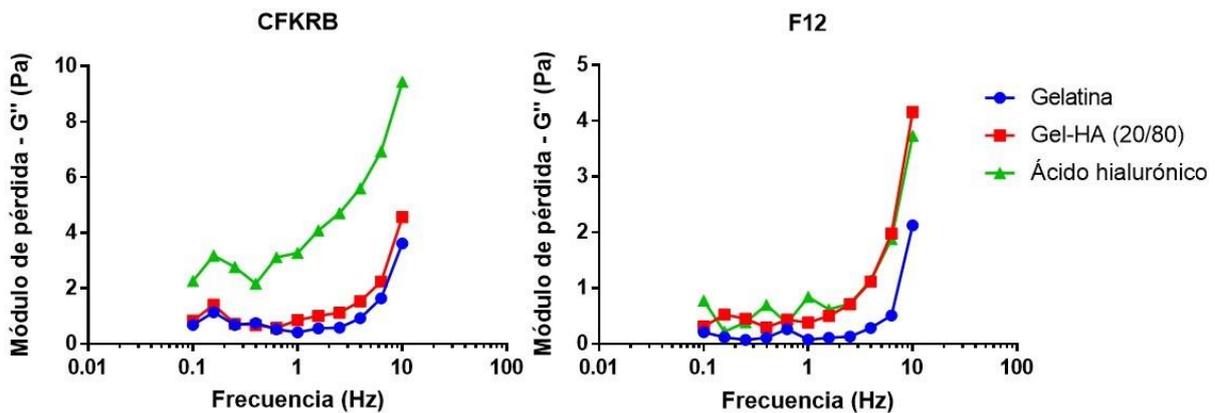


FIGURA 27. REPRESENTACIÓN DE  $G''$  EN FUNCIÓN DE LA FRECUENCIA (HZ) PARA AMBOS SOLVENTES. CADA CURVA CORRESPONDE A LA MEDIA DE 3 MEDIDAS INDIVIDUALES PARA CADA COMPOSICIÓN.

En vista a los resultados se puede observar que  $G'$  es mucho mayor que  $G''$ , por lo que  $G'$  es la mayor contribución al  $G^*$  en todos los tipos de hidrogel. Confirmando así que los

hidrogeles se comportan de forma elástica. Así pues, el valor del módulo mecánico para cada hidrogel será el valor de  $G'$  cuando la medida se realice a 1 Hz.

Una vez comprobado el comportamiento viscoelástico del hidrogel y la similitud entre  $G'$  y  $G^*$  se procede a representar (Figura 28 y Figura 29)  $G'$  en función del tiempo para cada solvente y composición. En particular para el solvente F12 se optó por un tiempo más largo de experimentación debido a que en medidas preliminares no terminó de gelificar bien la mezcla Gel-HA y el HA, aumentando de 20 min a 30 min por ensayo.

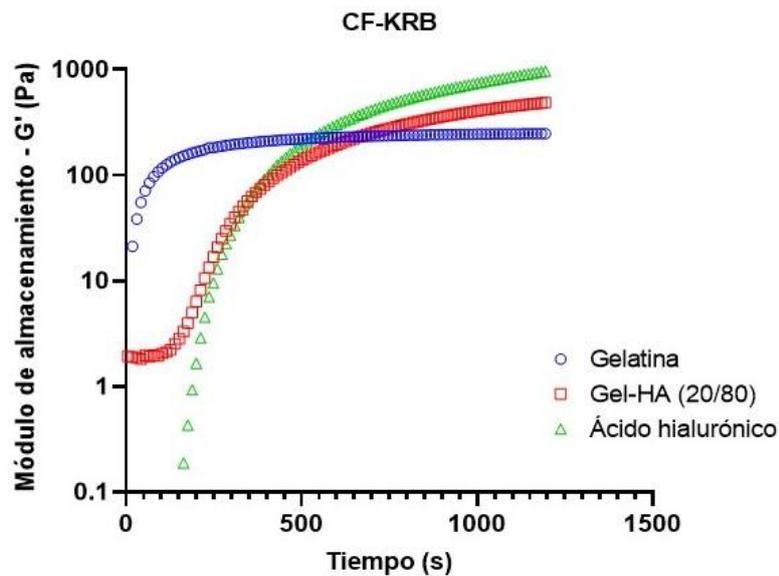


FIGURA 28. REPRESENTACIÓN DE  $G'$  EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (S) CON EL SOLVENTE CF-KRB. CADA CURVA CORRESPONDE A LA MEDIA DE 3 MEDIDAS INDIVIDUALES PARA CADA COMPOSICIÓN.

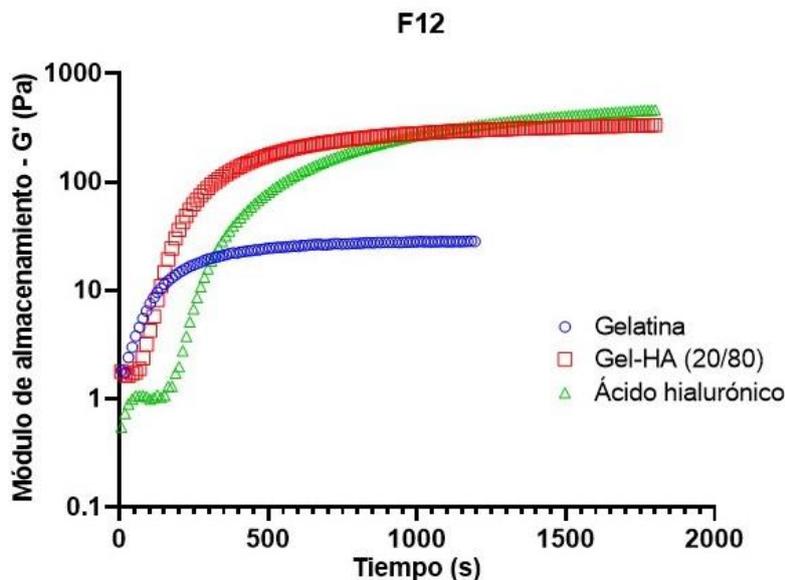


FIGURA 29. REPRESENTACIÓN DE  $G'$  EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (S) CON EL SOLVENTE F12. CADA CURVA CORRESPONDE A LA MEDIA DE 3 MEDIDAS INDIVIDUALES PARA CADA COMPOSICIÓN.

A partir de las anteriores gráficas podemos realizar la estimación de otro parámetro como el tiempo de gelificación, crucial para el encapsulamiento celular y conseguir un entorno 3D. El procedimiento ya explicado en el punto 6.6 proporciona una aproximación de dicho tiempo, en la siguiente tabla (Tabla 3 y Tabla 4) se hará un recopilatorio de los módulos mecánicos de cada tipo de hidrogel y su correspondiente tiempo de gelificación.

Tabla 3. Módulo de almacenamiento (Pa) para cada tipo de hidrogel.

	CF-KRB	F12
	Mód.Almacenamiento (Pa)	Mód.Almacenamiento (Pa)
Gelatina	222 ± 26	35 ± 7
GEL-HA	631 ± 88	459 ± 103
Ácido hialurónico	880 ± 240	509 ± 136

Tabla 4. Tiempo de gelificación (s) para cada tipo de hidrogel.

	CF-KRB	F12
	Tiempo gelificación (s)	Tiempo gelificación (s)
Gelatina	216 ± 21	367 ± 30
GEL-HA	445 ± 54	775 ± 82
Ácido hialurónico	797 ± 117	1389 ± 89

Tal y como era de esperar los resultados (Tabla 6) muestran que el HA puro ofrece un módulo centenares de veces mayor que la Gel, teniendo la mezcla un módulo mecánico cercano al HA. Además, la gelificación en el medio de cultivo F12 produce módulos mecánicos menores que en CF-KRB. A pesar de que la gelatina disminuye las propiedades mecánicas de la mezcla respecto al HA, el motivo de su inclusión en los hidrogeles es su mayor adhesión celular, lo que contribuirá a la mayor viabilidad celular.

Para finalizar la caracterización por reometría de las propiedades físicas de los hidrogeles en la anterior tabla (Tabla 7) se han recogido los tiempos de gelificación para todos los tipos de hidrogeles. Se observa una gran diferencia entre los sintetizados con CF-KRB y F12 siendo mayor en este último, se debe a que por lo general los medios de cultivo contienen sustancias reductoras que interfieren en nuestro caso con las moléculas de oxígeno reactivas liberadas en la reacción de la HRP con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

No obstante, en entre materiales también hay diferencias notorias pero se debe al grado de sustitución de tiramina ya desarrollado anteriormente. En la gelatina al contrario que en el HA hay mucha más concentración de tiramina por mililitro por lo que a un mismo volumen, será más fácil que se formen enlaces en la Gel disminuyendo así el tiempo de gelificación.

## 7.2. Cultivo celular: viabilidad y funcionalidad

Los estudios de viabilidad y funcionalidad celular se realizan de acuerdo con el apartado 6.8, con el objetivo de observar y valorar el comportamiento de células hepáticas en el entorno 3D propuesto, además de comparar con el cultivo celular tradicional en 2D.

Así pues, se cuantifica mediante el marcaje fluorescente con Hoescht (Ho) que permite ver todas las células y el marcaje con yoduro de propidio (PI) que marca las células muerta. A continuación se muestran las imágenes representativas de los cultivos en hidrogel a 1 día (Figura 31) y a 7 días (Figura 32).

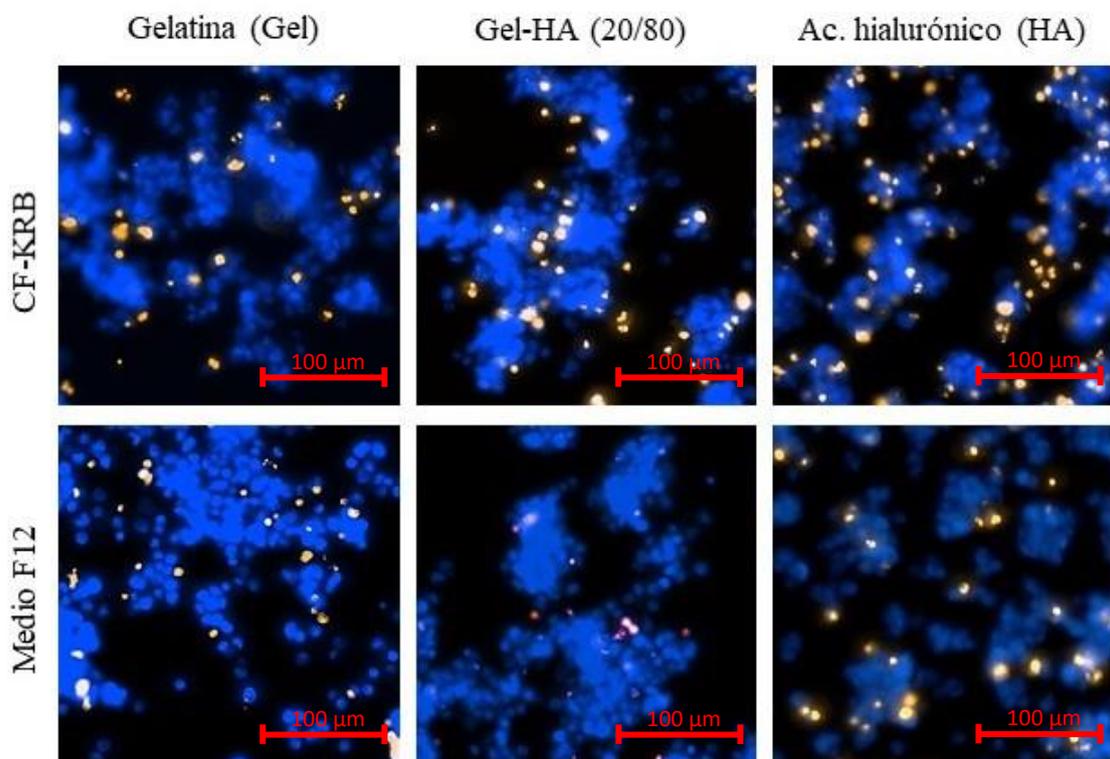


FIGURA 31. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DEL CULTIVO CELULAR A 1 DÍA, EL MARCAJE CELULAR REALIZADO CON LA SONDA HOESCHT (AZUL) VIVAS Y LA SONDA PROPIDIUM (NARANJA) MUERTAS.

En el grupo de imágenes mostrado (Figura 31), a 1 día de cultivo se observa un incremento mayor de células con marcaje PI cuando el solvente usado es el CF-KRB comparado con el marcaje observado en las células preparadas utilizando como solvente el medio de cultivo F12.

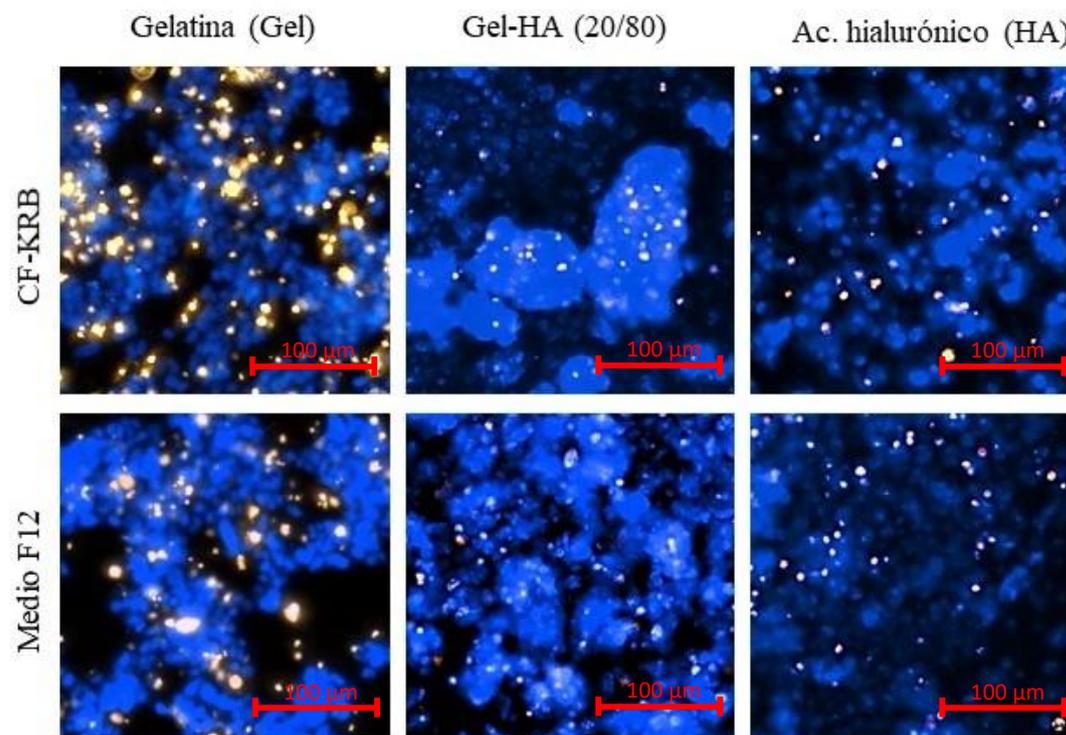


FIGURA 32. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DEL CULTIVO CELULAR A 1 DÍA, EL MARCAJE CELULAR REALIZADO CON LA SONDA HOESCHT (AZUL) VIVAS Y LA SONDA PROPIDIUM (NARANJA) MUERTAS.

A 7 días de cultivo (Figura 32), se observa de forma cualitativa un aumento del volumen celular a causa de la proliferación. No obstante, se realiza una cuantificación del número de células para mostrar de forma precisa la viabilidad celular en hidrogel. Así pues en la siguiente tabla (Tabla 7) se muestra la viabilidad comparada a 1 y 7 días, representando la media de 3 muestras y la desviación estándar de cada una de ellas.

Tal y como se observa en la gráfica (Figura 33) a tiempos cortos de cultivo no se aprecia una diferencia significativa entre los materiales, pero si una ligera mejoría si comparamos por el solvente. A tiempos largos aparece una disparidad mayor evidenciando la influencia del uso del medio de cultivo F12 como solvente. No obstante, se realiza un análisis estadístico a fin de confirmar el comportamiento observado en los hidrogeles, en el siguiente gráfico se muestra la viabilidad media y su desviación estándar.

Primero se realizó un estudio estadístico del principio de homocedasticidad, se optó por utilizar una prueba F (Fisher) para observar si los datos siguen una distribución normal con un intervalo de confianza del 95 %. Al cumplir todos los datos dicho principio se aplicó un estudio ANOVA, así observando la diferencia de medias entre materiales (filas) y solvente (columnas), abarcando así ambas variables. En el gráfico (Figura 33) para discernir entre diferencias significativas de un tipo u otro, se codificó con el símbolo ( \* ) para la significancia entre solvente y con ( # ) para la significancia entre materiales.

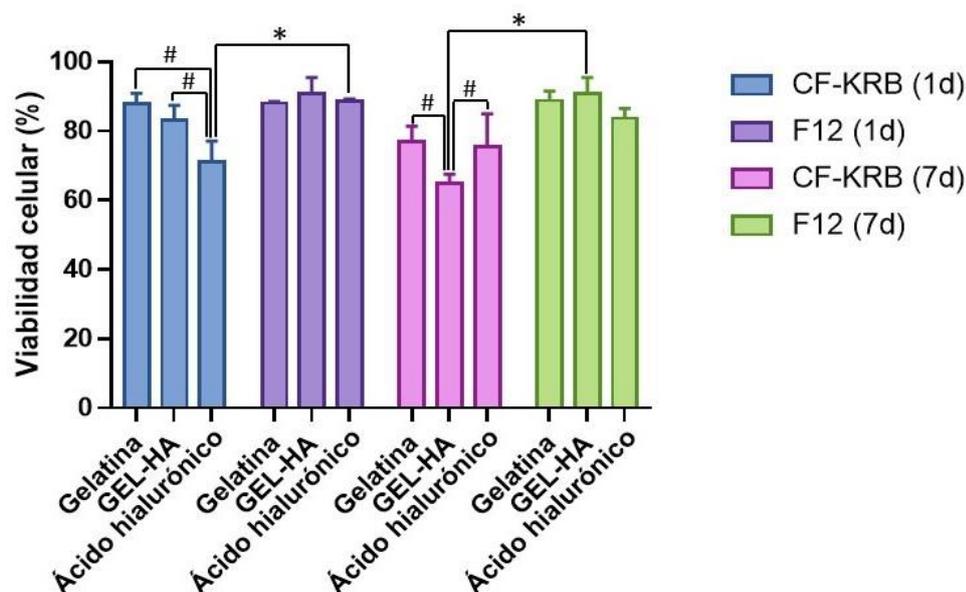


FIGURA 33. GRÁFICA DE VIABILIDAD (%) DE LA LÍNEA CELULAR HEPG2 PARA CADA TIPO DE HIDROGEL A TIEMPOS DE 1 Y 7 DÍAS DE CULTIVO.

Con lo dispuesto a 1 día, en materiales observamos diferencias entre la Gel y Gel-HA ( $p = 0.0061$ ), y, entre Gel y HA ( $p = 0.0005$ ) ambos con el solvente CF-KRB, de igual forma la única diferencia entre medios de cultivo se encuentra en el HA ( $p = 0.0006$ ). Por otra parte, a 7 días hay significancia en Gel y Gel-HA ( $p = 0.0055$ ), y, en HA y Gel-HA ( $p = 0.0098$ ) también con CF-KRB, con respecto a los solventes la diferencia significativa pertenece al Gel-HA ( $p < 0.0001$ ) implicando un grado muy alto de significación.

Así pues, de forma adicional se analizó la tendencia general de los materiales con independencia del medio y del tiempo de cultivo, donde se observó que existe diferencias entre Gel y HA ( $p = 0.021$ ).

A la luz de estos resultados y bajo la hipótesis que se trabaja, a tiempos cortos no se puede optar por un material en concreto pero si se observa una ligera mejoría en términos de viabilidad cuando las células son encapsuladas en hidrogeles sintetizados con medio de cultivo F12. Sin embargo, a tiempos largos esta mejoría se hace muy evidente mostrando la preferencia de un medio de cultivo sobre un buffer isotónico.

La funcionalidad hepática, es otro de los parámetros que se analizó para estudiar el comportamiento en un hidrogel, en concreto se cuantificará la ureogénesis. De acuerdo con el apartado 6.8.2 y una vez obtenidos los datos del lector, los datos se presentan al igual que la viabilidad en la siguiente imagen (Figura 34) Las unidades sobre las que se trabaja son pg/min como magnitud de producción.

A primera vista, observamos a tiempos largos una mayor producción debido a la proliferación que se ha comentado en el apartado de viabilidad lo cual es un buen indicador de comportamiento celular. Además, se observa que los hidrogeles sintetizados con F12 para cada tiempo presentan una mayor producción de urea. Finalmente, la tendencia entre

materiales a tiempos cortos no permite confirmar nada, pero a tiempos largos se observa tanto en CF-KRB como en F12 una notoria mejoría con la mezcla Gel-HA. Asimismo, se realiza otro estudio estadístico de la misma índole.

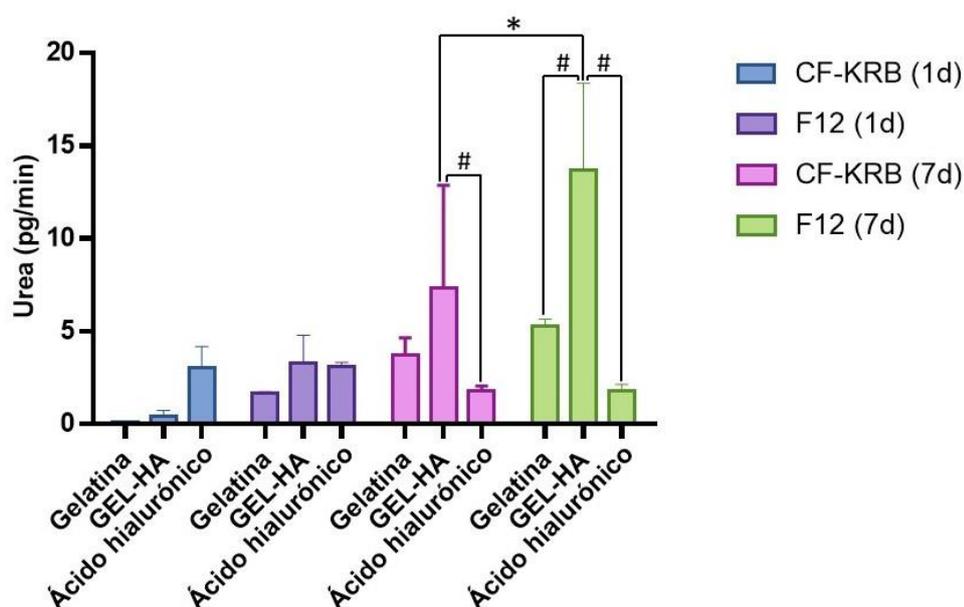


FIGURA 34. GRÁFICA DE UROGÉNESIS (PG/MIN) DE LA LÍNEA CELULAR HEPG2 PARA CADA TIPO DE HIDROGEL A TIEMPOS DE 1 Y 7 DÍAS DE CULTIVO.

El estudio estadístico realizado sobre los datos de ureogénesis es idéntico al utilizado en la viabilidad. Cumpliendo el principio de homocedasticidad con un intervalo de confianza del 95 %, se empleó un estudio ANOVA para hallar diferencias significativas entre las medias de los datos. La simbología empleada en el gráfico (Figura 34) es la misma que en la representación de la viabilidad.

Así pues, existe significancia estadística solo a tiempos largos. En cuanto a materiales dentro de las medidas con el solvente CF-KRB encontramos diferencias entre Gel-HA y HA ( $p = 0.02$ ) y por el F12 hay diferencias entre Gel-HA y Gel ( $p = 0.0004$ ), y, Gel-Ha y HA ( $p < 0.0001$ ). La única significancia a 7 días con respecto a los solventes se da en la mezcla Gel-HA ( $p = 0.01$ ).

También de forma adicional se realizó un análisis de la influencia del material con independencia del solvente y el tiempo, al igual que en la viabilidad. Donde se observan diferencias estadísticas entre la mezcla Gel-HA con respecto a Gel ( $p = 0.0008$ ) y con HA ( $p = 0.0004$ ).

Las diferencias observadas se observan sobre todo a tiempos largos, esto corresponde a que las células han sido capaces de adaptarse al nuevo entorno 3D y a la vista de los resultados el uso de medio de cultivo F12 con el material Gel-HA produce una mejora significativa en la producción de urea, mostrando así una funcionalidad hepática adecuada.

### 7.3. Selección del hidrogel

Tras estudiar las propiedades mecánicas de los hidrogeles y el comportamiento de células hepáticas una vez encapsuladas en su interior se puede discutir qué material resulta más adecuado para la terapia celular con hidrogeles.

La limitación que existía por parte de la terapia celular pura es el grado de anidación de las células trasplantadas, por lo tanto, se requiere un hidrogel con unas propiedades mecánicas altas para poder albergar células hepáticas y soportar las tensiones que generan los tejidos adyacentes, con la suposición que ello solventará en parte el problema. También se necesita que la célula cumpla sus funciones con normalidad, no interfiriendo puesto que sería contradictorio con el objetivo del tratamiento.

Con lo dispuesto en los resultados, se perfila como condición óptima el hidrogel compuesto por la mezcla Gel-HA (20-80) con la síntesis de éste en medio de cultivo F12. Ofrece unas propiedades mecánicas aceptables  $G' = (459,04 \pm 102,98)$  y una funcionalidad alta con una producción de 13,66 pg/min de urea. No obstante, la funcionalidad solo se ha comparado entre materiales y solventes, por ello se realiza una prueba adicional donde se evalúa la ureogénesis en un cultivo 2D en monocapa de células HepG2. Para obtener los datos de este control se sigue la misma metodología que anteriormente.

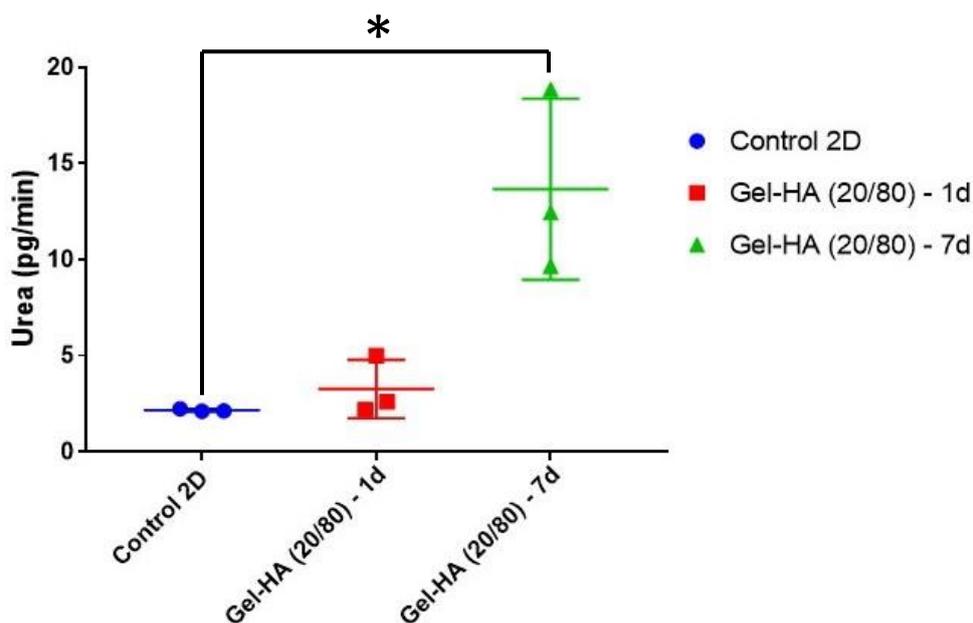


FIGURA 35. COMPARATIVA DE UREOGÉNESIS ENTRE CONTROL 2D EN MONOCAPA Y EL HIDROGEL GEL-HA CON F12. CADA POBLACIÓN CONSTA DE 3 MEDIDAS INDEPENDIENTES.

En el anterior gráfico (Figura 35) se observa a primera vista una gran diferencia a 7 días de cultivo esto se debe a que el control en monocapa mantiene la misma funcionalidad independientemente del tiempo de cultivo. Para confirmar dicha diferencia se recurrió a un análisis estadístico esta vez al comparar solo 3 grupos de datos se optó por una prueba T.

El principio de homocedasticidad se comprobó para así emplear la prueba estadística adecuada, se encontraron diferencias en las varianzas entre el control 2D y ambas

mediciones del cultivo celular, así pues se empleó una prueba Welch para evaluar significancia estadística, marcada de con ( \* ), entre las medias de los valores de muestras con una varianza desigual. A 1 día de cultivo no se observó diferencia significativa ( $p = 0.33$ ) mientras que a 7 días tampoco se encuentra significancia ( $p = 0,051$ ). No obstante, a pesar de no encontrar significación, los resultados evidencian un aumento que presumiblemente debería confirmarse realizando un número mayor de muestras aumentando así la  $n$  experimental y por ende la significancia estadística.

Gracias a este último análisis podemos concluir que de los hidrogeles propuestos, la mezcla Gel-HA ofrece unas buenas propiedades mecánicas y una alta funcionalidad. Cumpliendo así con las necesidades para probar su eficacia en hepatocitos y posteriormente en un modelo animal.

#### 7.4. Modelo animal

En un futuro a corto plazo la eficacia del hidrogel propuesto será probada en un modelo animal, para ello primero se ha de caracterizar el modelo para tener una estimación de parámetros con los que comparar. El estudio de los cortes histológicos ofrece una visión de la morfología de un corte sano y otro con daño hepático inducido mientras que los valores de las transaminasas permiten una cuantificación del daño hepático comparado con los valores de uno sano. El procedimiento para la obtención de cortes histológicos y cuantificación de transaminasas están detallados en el apartado 6.9.

En primer lugar tras realizar la tinción de cortes histológicos con hematoxilina-eosina, en la siguiente imagen (Figura 36) se observa lo siguiente.

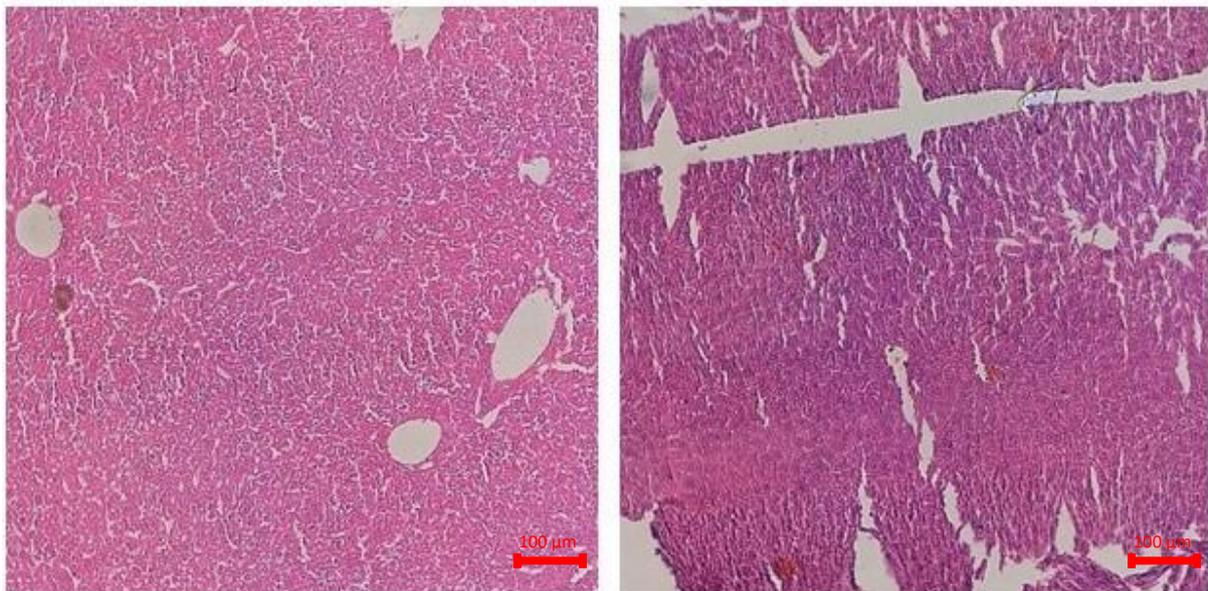


FIGURA 36. CORTES HISTOLÓGICOS DE HÍGADO (RATÓN SCID) CON TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA. CONTROL SANO (IZQ.) Y DAÑO HEPÁTICO A 24H (DAR.)

En la figura anterior se observa una clara diferencia morfológica entre el control y el daño inducido a 24 h, donde el tejido dañado presenta una extendida necrosis tisular provocando un deterioro en el estroma hepático y muerte celular en el parénquima.

Puesto que la tinción de hematoxilina-eosina de cortes histológicos ofrece una valoración cualitativa del daño, se realiza una cuantificación de transaminasas para poder comparar resultados con mayor rigurosidad (Figura 37). Las unidades de las transaminasas son mU/mL, refiriéndose a nanomoles por minuto por mililitro (nmol/min/mL)

Se realiza una prueba F para comprobar el cumplimiento del principio de homocedasticidad, entre el control sano y el control de daño para cada transaminasa. Las varianzas de ambos casos son desiguales con p-valores por debajo de 0,05, así pues se emplea una prueba Welch para observar diferencias en la media.

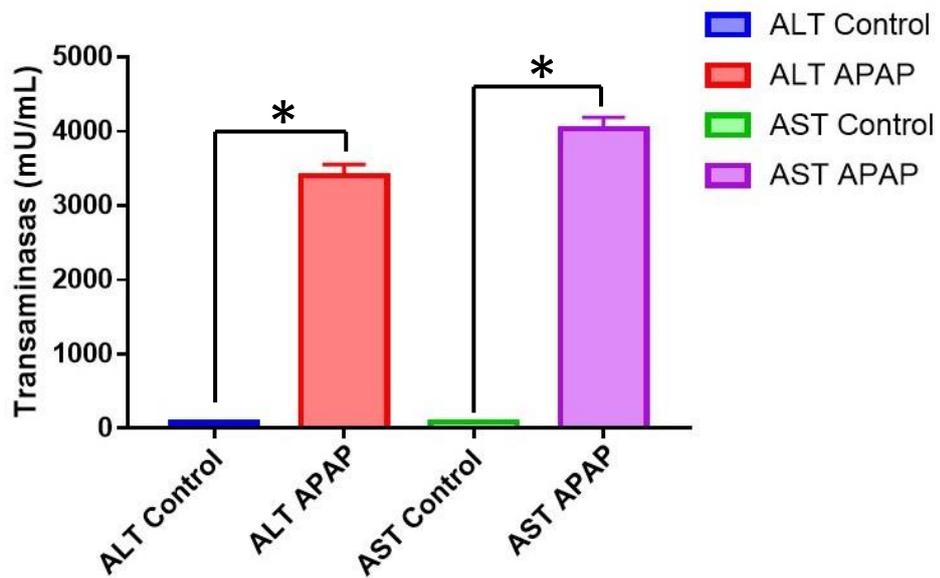


FIGURA 37. VALOR DE LAS TRANSAMINASAS ALT Y AST EN CONTROL SANO Y EN DAÑO INDUCIDO (APAP)

En ambos casos encontramos diferencias significativas, marcadas con un (\*), en la media tal y como era presumible, en este caso para ALT ( $p = 0.0007$ ) y AST ( $p = 0.0005$ ). Así pues, el modelo animal queda caracterizado de forma cualitativa y cuantitativa esperando a comprobar la validez de la propuesta planteada.

## 8. CONCLUSIONES

Los hidrogeles formados de conjugados de tiramina de gelatina y ácido hialurónico, han sido evaluados bajo el marco del presente Trabajo Fin de Grado. En particular se elaboraron tres tipos de hidrogeles correspondiendo a gelatina pura, ácido hialurónico puro y una mezcla Gel-HA en una proporción 20-80 respectivamente.

De acuerdo con los resultados obtenidos las conclusiones que se extraen son las siguientes:

La gelatina presenta bajas propiedades mecánicas, a pesar de poseer mayor grado de reticulación. El ácido hialurónico confiere rigidez a la mezcla, como se observa en las medidas reológicas.

Los tiempos de gelificación varían según el compuesto y el solvente utilizado. Primero con respecto al solvente hay una notoria diferencia debido a la presencia de sustancias reductoras en los medios de cultivo que interfieren en la reacción de los grupos fenol de la tiramina. Así pues la gelificación mediada por CF-KRB será más rápida que con medio de cultivo F12. Por otra parte, la variación del tiempo de gelificación en relación con los compuestos se debe al grado de sustitución de cada sustancia, para la Gel tenemos un 37% y para el HA un 7% de forma aproximada, de tal forma que a mayor número de moléculas de tiramina presentes, menor tiempo de reticulación.

El estudio de la viabilidad refleja, con independencia del tiempo, una preferencia por los hidrogeles sintetizados con medio de cultivo F12, aunque a tiempos cortos la diferencia no es tan significativa como a tiempos largos. La disminución de la viabilidad a 7 días de cultivo en el cultivo con CF-KRB con respecto el realizado en F12 es de un 30% aproximadamente. No obstante, también se comprueba que la viabilidad dentro de los materiales varía, dando mejor resultado en la mezcla Gel-HA explicando así el rol biológico de la Gel y las propiedades mecánicas que aporta el HA. Bajo la condición de síntesis con F12 y la mezcla Gel-Ha se obtuvo una viabilidad a 7 días del 90%.

Finalmente la funcionalidad celular tiene el mismo comportamiento que el observado en la viabilidad. Independientemente del tiempo de evaluación se produce un incremento de la ureogénesis en los hidrogeles elaborados con medio de cultivo F12, además de mostrar a tiempos largos de evaluación una mejor funcionalidad en el hidrogel Gel-HA.

A la vista de los resultados se considera como condición óptima para la terapia celular hepática mediada por hidrogeles, la mezcla de Gel-HA sintetizada con medio de cultivo F12. En un futuro a corto plazo se llevarán a cabo pruebas en un modelo animal ya caracterizado.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Misih, S. R. Z., & Bloomston, M. (2010). Liver Anatomy. *Surgical Clinics of North America*, 90(4), 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>
- Bahde, R., Kapoor, S., Bandi, S., Bhargava, K. K., Palestro, C. J., & Gupta, S. (2013). Directly acting drugs prostacyclin or nitroglycerine and endothelin receptor blocker bosentan improve cell engraftment in rodent liver. *Hepatology*, 57(1), 320–330. <https://doi.org/10.1002/hep.26005>
- Barnes, H. A., Hutton, J. F., & Walters, K. (1989). *An introduction to rheology* (First, Vol. 6). Retrieved from <https://epdf.tips/queue/an-introduction-to-rheologye67a82105c2aa3ad751382349cbcf60e44528.html#>
- Bedossa, P., & Paradis, V. (2003). Liver extracellular matrix in health and disease. *Journal of Pathology*, 200(4), 504–515. <https://doi.org/10.1002/path.1397>
- Boccafroschi, F., Habermehl, J., Vesentini, S., & Mantovani, D. (2005). Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 26(35), 7410–7417. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.052>
- Bower, W. A., Johns, M., Margolis, H. S., Williams, I. T., & Bell, B. P. (2007). Population-based surveillance for acute liver failure. *American Journal of Gastroenterology*, 102(11), 2459–2463. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01388.x>
- Bruguera, M., & Forns, X. (2006). Hepatitis C en España. *Medicina Clinica*, 127(3), 113–117. <https://doi.org/10.1157/13090276>
- Burdick, J. A., & Prestwich, G. D. (2011). Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced Materials*, 23(12), 41–56. <https://doi.org/10.1002/adma.201003963>
- C.W., S., L., F., & M.J., A. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infectious Diseases*, 5(9), 558–567. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed7&NEWS=N&AN=2005386050>
- Clària, J., & Titos, E. (2004). Kupffer cell | La célula de kupffer. *Gastroenterología y Hepatología*, 27(4), 40–49. <https://doi.org/10.1157/13059356>
- Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2008). Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(11), 3335–3343. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3476-4>
- Darr, A., & Calabro, A. (2009). Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(1), 33–44. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3540-0>
- Donor data - European Liver Transplant Registry - ELTR. (n.d.). Retrieved May 16, 2019, from <http://www.eltr.org/Donor-data.html>
- Farrell, G. C., & Larter, C. Z. (2006). Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology*, 43(2 SUPPL. 1), 99–112. <https://doi.org/10.1002/hep.20973>
- Forbes, S. J., Gupta, S., & Dhawan, A. (2015). Review Cell therapy for liver disease : From liver transplantation to cell factory. *Journal of Hepatology*, 62(1), S157–S169. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.040>

- Georg, M., Lauer, M. D., Bruce, D., & Walker, M. D. (2001). *Hepatitis C Virus Infection*. 345(1), 41–52.
- Gerbal-Chaloin, S., Funakoshi, N., Caillaud, A., Gondeau, C., Champon, B., & Si-Tayeb, K. (2014). Human induced pluripotent stem cells in hepatology: Beyond the proof of concept. *American Journal of Pathology*, 184(2), 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.09.026>
- Gerecht, S., Burdick, J. A., Ferreira, L. ., Townsend, S. ., Langert, R., & Vunjak-Novakovic, G. (2017). *Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells*. 104(27), 1–6. Retrieved from [https://twitter.com/Capt\\_Navy/status/903979030092931072](https://twitter.com/Capt_Navy/status/903979030092931072)
- Gollan, J. L., & Deller, J. D. (1973). Studies on the nature and excretion of biliary copper in man. *Clinical Science*, 44, 9–15.
- Gómez-Lechon, M. . (n.d.). *Advanced hepatic cellular models for the preclinical study of drug metabolism and hepatotoxicity*.
- Grover, C. N., Gwynne, J. H., Pugh, N., Hamaia, S., Farndale, R. W., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2012). Crosslinking and composition influence the surface properties, mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films. *Acta Biomaterialia*, 8(8), 3080–3090. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.05.006>
- Hennink, W. E., & van Nostrum, C. F. (2012). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 223–236. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.009>
- Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., ... Nakahata, T. (2002). NOD/SCID/gamma mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, 100(9), 3175–3182. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0207>. Supported
- Kurisawa, M., Chung, J. E., Yang, Y. Y., Gao, S. J., & Uyama, H. (2005). Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid-tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering. *Chemical Communications*, (34), 4312–4314. <https://doi.org/10.1039/b506989k>
- Lee, W. M. (2008). Etiologies of acute liver failure. *Seminars in Liver Disease*, 28(2), 142–152. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1073114>
- Li, L., Yu, F., Zheng, L., Wang, R., Yan, W., Wang, Z., ... Jiang, Q. (2018). Natural hydrogels for cartilage regeneration: Modification, preparation and application. *Journal of Orthopaedic Translation*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.09.003>
- Limdi, J., & Hyde, G. (2003). Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Medical Journal*, 79(November 2002), 307–312. <https://doi.org/10.1136/pmj.79.932.307>
- Liver: Anatomy and Functions | Johns Hopkins Medicine. (n.d.). Retrieved May 6, 2019, from <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/liver-anatomy-and-functions>
- Martinez-Hernandez, A., & Amenta, P. S. (1993). The hepatic extracellular matrix - I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology*, 423(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/BF01606425>
- MEIJER, A. J., LOF, C., RAMOS, I. C., & VERHOEVEN, A. J. (1985). Control of ureogenesis. *European Journal of Biochemistry*, 148(1), 189–196. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08824.x>

- Moulisová, V., Poveda-Reyes, S., Sanmartín-Masiá, E., Quintanilla-Sierra, L., Salmerón-Sánchez, M., & Gallego Ferrer, G. (2017). Hybrid Protein-Glycosaminoglycan Hydrogels Promote Chondrogenic Stem Cell Differentiation. *ACS Omega*, 2(11), 7609–7620. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01303>
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Veterinarni Medicina*, 53(8), 397–411. <https://doi.org/10.17221/1930-VETMED>
- O'Grady, J. G. ., Schalm, S. W., & Williams, R. (1985). Acute liver failure : redefining the syndromes. *The Lancet*.
- Okano, H., Nakamura, M., Yoshida, K., Okada, Y., Tsuji, O., Nori, S., ... Miura, K. (2013). Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circulation Research*, 112(3), 523–533. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.256149>
- Olde Damink, L. H. H., Dijkstra, P. J., van Luyn, M. J. A., van Wachem, P. B., Nieuwenhuis, P., & Feijen, J. (1996). Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*, 17(8), 765–773. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)81413-X](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)81413-X)
- Ortega, F. R., Rodríguez, G., & Aguilar, M. R. (2012). *Comportamiento reológico de geles biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa*. 20, 7–19.
- P., A. (2002). Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Medical Progress*, 346(16), 1221–1231.
- Palumbo, F. S., Pitarresi, G., Mandracchia, D., Tripodo, G., & Giammona, G. (2006). New graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: Synthesis and characterization. *AGRIS*, 2(66(3)), 379–385. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300792164>
- Pico, M. L. C., Lorenzo, J. R. F., & Bermúdez, J. M. F. (2008). Enfermedades congénitas del metabolismo en el período neonatal. *Protocolos de Neonatología*, 434–442.
- Poveda-Reyes, S., Moulisova, V., Sanmartín-Masiá, E., Quintanilla-Sierra, L., Salmerón-Sánchez, M., & Ferrer, G. G. (2016). Gelatin—Hyaluronic Acid Hydrogels with Tuned Stiffness to Counterbalance Cellular Forces and Promote Cell Differentiation. *Macromolecular Bioscience*, 1311–1324. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500469>
- Poynard, T., Yuen, M.-F., Ratziu, V., & Lai, C. L. (2003). Viral hepatitis C. *Lancet (London, England)*, 362(9401), 2095–2100. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15109-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15109-4)
- Prestwich, G. D. (2011). Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. *Journal of Controlled Release*, 155(2), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.04.007>
- Prieto, M., Aguilera, V., Berenguer, M., Pina, R., & Benlloch, S. (2007). Selección de candidatos para trasplante hepático. *Gastroenterología y Hepatología*, 30(1), 42–53. <https://doi.org/10.1157/13097451>
- Radhakrishnan, J., Subramanian, A., Krishnan, U. M., & Sethuraman, S. (2017). Injectable and 3D Bioprinted Polysaccharide Hydrogels: From Cartilage to Osteochondral Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 18(1), 1–26. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01619>
- Ratner, B. ., Hoffman, A. ., Schoen, F. ., & Lemons, J. . (2013). *BIOMATERIALS SCIENCE* (2nd Editio; B. . Ratner, A. . Hoffman, F. . Schoen, & J. . Lemons, Eds.). Retrieved from [http://ilkerpolatoglu.cbu.edu.tr/docs/Introduction to Materials.pdf](http://ilkerpolatoglu.cbu.edu.tr/docs/Introduction%20to%20Materials.pdf)

- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>
- Roberts, E. A., & Schilsky, M. L. (2008). Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology*, 47(6), 2089–2111. <https://doi.org/10.1002/hep.22261>
- Rose, J. B., Pacelli, S., El Haj, A. J., Dua, H. S., Hopkinson, A., White, L. J., & Rose, F. R. A. J. (2014). Gelatin-based materials in ocular tissue engineering. *Materials*, 7(4), 3106–3135. <https://doi.org/10.3390/ma7043106>
- Sakai, S., Ashida, T., Ogino, S., Taya, M., Rose, J. B., Pacelli, S., ... Uyama, H. (2014). Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid-tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering. *Journal of Microencapsulation*, 7(4), 4312–4314. <https://doi.org/10.1039/b506989k>
- Sakai, S., Hirose, K., Taguchi, K., Ogushi, Y., & Kawakami, K. (2009). An injectable, in situ enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 30(20), 3371–3377. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.030>
- Sanmartín-Masiá, E., Poveda-Reyes, S., & Gallego Ferrer, G. (2017). Extracellular matrix–inspired gelatin/hyaluronic acid injectable hydrogels. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 66(6), 280–288. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1201828>
- Sannino, A., Demitri, C., & Madaghiele, M. (2009). Biodegradable cellulose-based hydrogels: Design and applications. *Materials*, 2(2), 353–373. <https://doi.org/10.3390/ma2020353>
- Saudubray, J. M., Ogier de Baulny, H., & Charpentier, C. (2018). Clinical Approach to Inherited Metabolic Diseases. *Inherited Metabolic Epilepsies*, 1–5. <https://doi.org/10.1891/9780826168641.0043>
- Schwimmer, J. B., Deutsch, R., Kahen, T., Lavine, J. E., Stanley, C., & Behling, C. (2006). Prevalence of Fatty Liver in Children and Adolescents. *Pediatrics*, 118(4), 1388–1393. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1212>
- Shin, H., Olsen, B. D., & Khademhosseini, A. (2012). The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules. *Biomaterials*, 33(11), 3143–3152. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.050>
- Sibulesky, L. (2013). Normal liver anatomy. *Clinical Liver Disease*, 2(S1), S1–S3. <https://doi.org/10.1002/cld.124>
- Smets, F., Dobbelaere, D., McKiernan, P., Dionisi-Vici, C., Broué, P., Jacquemin, E., ... Sokal, E. (2019). Phase I/II Trial of Liver Derived Mesenchymal Stem Cells in Pediatric Liver Based Metabolic Disorders. *Transplantation*, 00(00), 1. <https://doi.org/10.1097/tp.0000000000002605>
- Solà, E., & Ginès, P. (2017). Pro: Acute-on-chronic liver failure. *Liver Transplantation*, 23(10), 1318–1324. <https://doi.org/10.1002/lt.24812>
- Sommar, P., Pettersson, S., Ness, C., Johnson, H., Kratz, G., & Junker, J. P. E. (2010). Engineering three-dimensional cartilage- and bone-like tissues using human dermal fibroblasts and macroporous gelatine microcarriers. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 63(6), 1036–1046. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2009.02.072>

- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.]*, 111, 1–3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Tan, H., Ramirez, C. M., Miljkovic, N., Li, H., Rubin, J. P., & Marra, K. G. (2009). Thermosensitive injectable hyaluronic acid hydrogel for adipose tissue engineering. *Biomaterials*, 30(36), 6844–6853. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.058>
- Thomas, J. ., & Van Hove, J. L. . (n.d.). Metabolopatías congénitas. Retrieved May 19, 2019, from Diagnóstico y tratamiento pediátricos, 19e | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical website: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1481&sectionid=97000126>
- Tolosa, L., Caron, J., Hannoun, Z., Antoni, M., López, S., Burks, D., ... Dubart-kupperschmitt, A. (2015). Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury. *Stem Cell Research & Therapy*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0227-6>
- Tolosa, L., Pareja, E., & Gómez-lechón, M. J. (2016). *Clinical Application of Pluripotent Stem Cells : An Alternative Cell-Based Therapy for Treating Liver Diseases ?* 100(12). <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001426>
- Turley, E. A., Noble, P. W., & Bourguignon, L. Y. W. (2002). Signaling Properties of Hyaluronan Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4589–4592. <https://doi.org/10.1074/jbc.r100038200>
- Uchino, J., Matsue, H., Takahashi, M., Nakajima, Y., Matsushita, M., Hamada, T., & Hashimura, E. (1991). A hybrid artificial liver system. Function of cultured monolayer pig hepatocytes in plasma from hepatic failure patients. *ASAIO Transactions*, 37(3), M337-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1751175>
- Vilariño-Feltrer, G. (2017). Tema 3.1: Hidrogeles. *Apuntes Biomateriales 3er Curso Ingeniería Biomédica*.
- Vinken, M., & Rogiers, V. (2015). Protocols in in vitro hepatocyte research. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, 1250, 1–390. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7>
- Wei, G., Bergquist, A., Broomé, U., Lindgren, S., Wallerstedt, S., Almer, S., ... Björnsson, E. (2007). Acute liver failure in Sweden: Etiology and outcome. *Journal of Internal Medicine*, 262(3), 393–401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01818.x>
- Zhang, Y., Wang, Q. S., Yan, K., Qi, Y., Wang, G. F., & Cui, Y. L. (2016). Preparation, characterization, and evaluation of genipin crosslinked chitosan/gelatin three-dimensional scaffolds for liver tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 104(8), 1863–1870. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35717>
- Zhou, Z., Yang, Z., Kong, L., Liu, L., Liu, Q., Zhao, Y., ... Cao, D. (2012). Preparation and characterization of hyaluronic acid hydrogel blends with gelatin. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 51(12), 2392–2400. <https://doi.org/10.1080/00222348.2012.676355>



# DOCUMENTO II: PRESUPUESTO



## ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

<b>1. INTRODUCCIÓN DEL PRESUPUESTO.....</b>	<b>81</b>
<b>2. CUADRO MANO DE OBRA.....</b>	<b>81</b>
<b>3. CUADRO MATERIALES.....</b>	<b>82</b>
<b>4. CUADRO MAQUINARIA.....</b>	<b>84</b>
<b>5. CUADRO PRECIOS DESCOMPUESTOS.....</b>	<b>85</b>
<b>6. PRESUPUESTOS PARCIALES.....</b>	<b>92</b>
<b>7. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL, CONTRATA Y BASE DE LICITACIÓN.....</b>	<b>94</b>

## 1. INTRODUCCIÓN DEL PRESUPUESTO

En el presente documento se muestra el cálculo realizado para obtener el presupuesto del proyecto, con el fin de estudiar la viabilidad económica de este. Los capítulos que conforman el presupuesto son los planteados de acuerdo con el punto 6 del índice “Materiales y métodos”. La cuantificación económica se ha realizado sobre los conceptos de maquinaria, mano de obra y la maquinaria empleada, así pues a partir de esta información se obtuvo el cuadro de precios descompuestos y para finalizar el presupuesto parcial.

Así pues posteriormente se calcula el presupuesto de ejecución material, por contrata y por último el presupuesto general.

A continuación en la siguiente tabla (Tabla 5) se clasifican los recursos empleados según su categoría.

TABLA 5. TABLA DE CÓDIGOS DE LOS RECURSOS EMPLEADOS EN EL PROYECTO

Código	Descripción
M.O	Mano de obra
M.Q	Maquinaria
MAT	Materiales
E.P	Equipos de protección individual

## 2. CUADRO MANO DE OBRA

En la siguiente tabla (Tabla 6) se expone el cuadro de mano de obra, considerando como tal al autor del presente TFG en calidad de ingeniero biomédico. No obstante, no se ha recibido ningún tipo de retribución al respecto.

TABLA 6. CUADRO MANO DE OBRA

N.º	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio (€)	Cantidad	Precio Total (€)
1	MO.1	h	Graduado en ingeniería biomédica	12,00	204,50	<b>2.454,00</b>
2	MO.2	h	Tutor/a responsable del proyecto	45,00	45,00	<b>2.025,00</b>
3	MO.3	h	Cotutor/a responsable del proyecto	45,00	45,00	<b>2025,00</b>
4	MO.4	h	Técnico de laboratorio	5,00	12,00	<b>60,00</b>
<b>Precio total "mano de obra" (€)</b>						<b>6.564,00</b>

### 3. CUADRO MATERIALES

En la siguiente figura (Tabla 7) se recoge el presupuesto del material requerido para la realización del proyecto.

TABLA 7. CUADRO DE MAQUINARIA

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio (€)	Cantidad	Precio Total (€)
1	E.01	ud	Bata de laboratorio	22,50	1,00	<b>22,50</b>
2	E.02	ud	Caja de guantes de látex	5,95	4,00	<b>23,80</b>
3	E.04	ud	Gafas de protección	8,95	1,00	<b>8,95</b>
4	E.05	ud	Máscara para gases	30,50	1,00	<b>30,50</b>
5	E.06	ud	Máscara para partículas	7,25	1,00	<b>7,25</b>
6	MAT.1	L	Agua mQ	0,20	0,50	<b>0,10</b>
7	MAT.2	L	Agua destilada	0,20	63,00	<b>12,60</b>
8	MAT.3	g	Ácido Hialurónico	27,63	0,10	<b>2,76</b>
13	MAT.8	g	EDC (C.3B)	62,30	0,17	<b>10,59</b>
15	MAT.10	g	Gelatina (prot-43)	0,43	0,40	<b>0,17</b>
19	MAT.14	L	medio de cultivo L15	61,68	0,20	<b>12,34</b>
20	MAT.15	L	medio de cultivo F12	50,90	0,21	<b>10,69</b>
21	MAT.16	g	MES (RS-07)	2,82	1,28	<b>3,61</b>
22	MAT.17	m	Membrana diálisis (12.400 MWCO)	3,20	0,01	<b>0,03</b>
23	MAT.18	m	Membrana diálisis (3.500 MWCO)	3,00	0,02	<b>0,06</b>
24	MAT.19	g	NHS (S.03)	3,84	0,01	<b>0,05</b>
25	MAT.20	ud	Caja puntas micropipeta 1000 µL	65,25	3,00	<b>195,75</b>
26	MAT.21	ud	Caja puntas micropipeta 200 µL	39,16	2,00	<b>78,32</b>
27	MAT.22	ud	Caja puntas micropipeta 20 µL	60,20	3,00	<b>180,60</b>
28	MAT.23	ud	Pinzas de laboratorio	8,73	1,00	<b>8,73</b>
29	MAT.24	ud	Placa de cultivo p48	2,81	6,00	<b>16,86</b>
30	MAT.25	ud	Espátula metálica	3,66	1,00	<b>3,66</b>
31	MAT.26	g	Paracetamol	0,18	0,40	<b>0,07</b>
32	MAT.27	g	Hepes	0,80	1,01	<b>0,81</b>
33	MAT.28	g	Fosfato monopotásico	0,08	0,06	<b>0,005</b>
34	MAT.29	g	Cloruro potásico	0,16	0,12	<b>0,02</b>
35	MAT.30	g	Cloruro sódico	0,15	87,14	<b>13,07</b>
36	MAT.31	g	Hidrocloreuro de Tiramina (Tyr)	15,10	0,20	<b>3,02</b>
37	MAT.32	ud	Tubos falcon 50 mL	0,12	2,00	<b>0,24</b>
38	MAT.33	ud	Tubos falcon 15 mL	0,10	6,00	<b>0,60</b>
39	MAT.34	L	Hematoxilina (Panreac)	122,20	0,02	<b>2,44</b>
40	MAT.35	L	Eosina alcohólica (Merck)	115,00	0,02	<b>2,30</b>

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE HEPATOCITOS EN HIDROGELES DE ORIGEN NATURAL PARA TERAPIA CELULAR HEPÁTICA.

41	MAT.36	L	Xilol	60,40	0,02	<b>1,21</b>
42	MAT.37	L	Etanol absoluto (Merck)	3,93	0,50	<b>1,97</b>
43	MAT.38	L	Tripsina	71,80	0,01	<b>0,86</b>
44	MAT.39	L	Medio comercial F12 (Gibco)	50,90	0,10	<b>5,09</b>
45	MAT.40	L	Medio comercial L15 (Gibco)	61,68	0,12	<b>7,40</b>
46	MAT.41	L	L-Glutamina	160,59	0,002	<b>0,32</b>
47	MAT.42	L	Glucosa	40,20	0,002	<b>0,08</b>
48	MAT.43	L	Bicarbonato comercial	125,10	0,002	<b>0,25</b>
49	MAT.44	L	Penicilina-estreptomina	151,70	0,002	<b>0,30</b>
50	MAT.45	L	BSA	125,00	0,001	<b>0,13</b>
51	MAT.46	L	Peroxidasa	38,60	0,01	<b>0,46</b>
52	MAT.47	L	Peróxido de hidrógeno	7,17	0,01	<b>0,09</b>
53	MAT.48	L	Sonda hoescht 33442	1580,0	0,001	<b>0,95</b>
54	MAT.49	L	Sonda propidium	991,00	0,001	<b>0,59</b>
55	MAT.50	L	CaCl <sub>2</sub>	67,80	0,0001	<b>0,01</b>
56	MAT.51	L	NH <sub>4</sub> Cl	122,00	0,0001	<b>0,01</b>
57	MAT.52	ud	Tubo centrífuga	0,10	3,00	<b>0,30</b>
58	MAT.53	ud	Micropipeta 1000 µL (Thermo)	215,00	1,00	<b>215,00</b>
59	MAT.54	ud	Micropipeta 200 µL (Thermo)	215,00	1,00	<b>215,00</b>
60	MAT.55	ud	Micropipeta 20 µL (Thermo)	215,00	1,00	<b>215,00</b>
61	MAT.56	ud	Ratón SCID	140,00	1,00	<b>140,00</b>
62	MAT.57	ud	Vaso de precipitados (Pírex) 3L	5,83	5,00	<b>29,15</b>
63	MAT.58	ud	Vaso de precipitados (Pírex) 1L	4,62	2,00	<b>9,24</b>
64	MAT.59	ud	Vaso de precipitados (Pírex) 25 mL	3,56	2,00	<b>7,12</b>
65	MAT.60	ud	Kit valoración urea (QuantiChrom)	362,00	1,00	<b>362,00</b>
66	MAT.61	ud	Kit valoración transaminasas AST (Sigma)	354,00	1,00	<b>354,00</b>
67	MAT.62	ud	Kit valoración transaminasas ALT (Sigma)	362,00	1,00	<b>362,00</b>
68	MAT.63	ud	Eppendorf 2 mL	0,08	210,00	<b>16,80</b>
69	MAT.64	ud	Eppendorf 1,5 mL	0,07	284,00	<b>19,88</b>
70	MAT.65	ud	Eppendorf 0,5 mL	0,06	342,00	<b>20,52</b>
<b>Precio total "materiales" (€)</b>						<b>2.638,23</b>

#### 4. CUADRO MAQUINARIA

En la estimación de los costes de la maquinaria (Tabla 8) se ha estimado mediante la amortización de los equipos tal y como muestra la siguiente ecuación (II), con una amortización a 12 años. La ecuación consta del coste del equipo (Ceq), el tiempo que se ha utilizado el equipo (Teq) y el periodo amortizado (Pam).

$$A = \frac{C_{eq} * T_{eq}}{P_{am}} \quad (II)$$

TABLA 8. CUADRO DE MAQUINARIA

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio (€)	Cantidad	Precio Total (€)
1	MQ.1	h	PH-metro de la marca XS instruments, modelo pH510	0,30	1,00	<b>0,30</b>
2	MQ.2	h	Agitador multisonda VELP SCIENTIFICA AM4	0,20	70,00	<b>14,00</b>
3	MQ.3	h	Agitador con sonda de la marca Heidolph, modelo MR Hei-standard (Con control de temperatura)	0,40	27,00	<b>10,80</b>
4	MQ.4	h	Liofilizadora (-80º)	9,46	264,00	<b>2.497,44</b>
5	MQ.5	h	Balanza de precisión con pantalla de la marca Mettler Toledo, modelo XS105 dualrange	0,15	2,00	<b>0,30</b>
6	MQ.6	h	Agitador OVAN minimx (sin control de temperatura)	0,20	55,00	<b>11,00</b>
7	MQ.7	h	Espectrofotómetro Technologies cary 60 Uv-vis	0,80	2,00	<b>1,60</b>
8	MQ.8	h	Reómetro Discovery HR-2 Hybrid	10,00	9,00	<b>90,00</b>
9	MQ.9	h	Campana de flujo laminar Faster TWO30	0,15	20,50	<b>3,08</b>
10	MQ.10	h	In-cell analyzer 6000	120,00	6,00	<b>720,00</b>
11	MQ.11	h	Centrifugadora Thermo Scientific Megafuge402	0,40	0,15	<b>0,06</b>
12	MQ.12	h	Estufa WTC Binder	0,10	8,71	<b>0,87</b>
14	MQ.14	h	Centrifugadora Orto Arlesa Biocen20	0,20	0,20	<b>0,04</b>
<b>Precio total "maquinaria" (€)</b>						<b>3.349,49</b>

## 5. CUADRO PRECIOS DESCOMPUESTOS

El cuadro de precios descompuestos recoge en capítulos y subcapítulos los procedimientos de mayor importancia en la consecución del proyecto. En la siguiente figura (Tabla 9) se muestra el coste presupuestado.

TABLA 9. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS

Nº Código	Descripción capítulo					
	<b>1. Síntesis Gel-Tyr</b>					
<b>1.1</b>	Injerto de tiramina en gelatina (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Balanza de precisión	0,50	h	0,15	0,08	
	Agitador magnético	25,00	h	0,20	5,00	
	pH - metro	0,50	h	0,30	0,15	
	Hidrocloreuro de tiramina	0,11	g	15,10	1,66	
	Gelatina	0,40	g	0,43	0,17	
	MES	0,20	g	2,82	0,56	
	NHS	0,01	g	3,84	0,03	
	EDC	0,12	g	62,30	7,48	
	Agua mQ	0,02	L	0,20	0,00	
	Graduado en ing. biomédica	5,00	h	12,00	60,00	
	Costes indirectos	3,00	%	75,13	2,25	
	Recursos auxiliares	3,00	%	77,38	2,32	
<b>1.2</b>	Purificación de la gelatina con injerto de tiramina (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Membrana de diálisis (12.400 MWCO)	0,01	m	3,20	0,03	
	Agua destilada	18,00	L	0,20	3,60	
	Agitador magnético	48,00	h	0,20	9,60	
	Graduado en ing. biomédica	1,00	h	12,00	12,00	
	Costes indirectos	3,00	%	25,23	0,76	
	Recursos auxiliares	3,00	%	25,99	0,78	
						<b>26,77</b>
<b>1.3</b>	Liofilización de gelatina con injerto de tiramina (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Liofilizadora	72,00	h	9,46	681,12	
	Graduado en ing. biomédica	0,50	h	12,00	6,00	

	Costes indirectos	3,00	%	687,12	20,61	
	Recursos auxiliares	3,00	%	707,73	21,23	
						<b>728,97</b>
<b>2. Síntesis HA-Tyr</b>						
<b>2.1</b>	injerto de tiramina en ácido hialurónico (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Balanza de precisión	1,50	h	0,15	0,23	
	Agitador magnético	27,00	h	0,40	10,80	
	Ácido hialurónico	0,10	g	27,63	2,76	
	Hidrocloruro de tiramina	0,09	g	15,10	1,30	
	pH - metro	0,50	h	0,40	0,20	
	MES	1,08	g	2,82	3,05	
	NHS	0,003	g	3,84	0,01	
	EDC	0,05	g	62,30	2,93	
	Agua mQ	0,10	L	0,20	0,02	
	Graduado en ing. biomédica	12,00	h	12,00	144,00	
	Costes indirectos	3,00	%	165,29	4,96	
	Recursos auxiliares	3,00	%	170,25	5,11	
						<b>175,36</b>
<b>2.2</b>	Purificación de la ácido hialurónico con injerto de tiramina (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Membrana de diálisis (3.500 MWCO)	0,02	m	3,00	0,05	
	Membrana de diálisis (12.400 MWCO)	0,02	m	3,20	0,05	
	Agua desionizada	45,00	L	0,20	9,00	
	Cloruro sódico	86,00	g	0,15	12,90	
	Agitador magnético	120,00	h	0,20	24,00	
	Graduado en ing. biomédica	4,00	h	12,00	48,00	
	Costes indirectos	3,00	%	93,99	2,82	
	Recursos auxiliares	3,00	%	96,81	2,90	
						<b>99,72</b>
<b>2.3</b>	Liofilización de ácido hialurónico con injerto de tiramina (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Liofilizadora	192,00	h	9,46	1816,32	
	Graduado en ing. biomédica	1,00	h	12,00	12,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1828,32	54,85	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1883,17	56,50	
						<b>1939,66</b>

3. Caracterización de propiedades mecánicas						
3.1	Cuantificación grado de sustitución (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Espectrofotómetro	2,50	h	0,80	2,00	
	Hidrocloruro de tiramina	0,001	g	15,10	0,02	
	Agua mQ	0,10	L	0,20	0,02	
	Graduado en ing. biomédica	3,00	h	12,00	36,00	
	Costes indirectos	3,00	%	38,04	1,14	
	Recursos auxiliares	3,00	%	39,18	1,18	
3.2	Medición de propiedades mecánicas mediante reometría (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Reómetro	0,50	h	9,46	4,73	
	Módulo 5,1	1,00	ud	6,89	6,89	
	Graduado en ing. biomédica	0,75	h	12,00	9,00	
	Costes indirectos	3,00	%	58,94	1,77	
	Recursos auxiliares	3,00	%	60,70	1,82	
4. Preparación buffer y medio de cultivo						
4.1	Preparación CF-KRB (80 mL)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Cloruro sódico	1,07	g	0,15	0,16	
	Cloruro potásico	0,06	g	0,16	0,01	
	Hepes	0,47	g	0,80	0,38	
	Fosfato monopotásico	0,03	g	0,08	0,00	
	Agua mQ	0,08	L	0,20	0,02	
	Graduado en ing. biomédica	0,50	h	12,00	6,00	
	Costes indirectos	3,00	%	6,56	0,20	
	Recursos auxiliares	3,00	%	6,76	0,20	
4.2	Preparación medio de cultivo HepG2 (100 mL)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Medio comercial F12	0,05	L	50,90	2,55	
	Medio comercial L15	0,05	L	61,68	3,08	
	L-glutamina	0,001	L	160,59	0,16	
	Glucosa	0,001	L	40,20	0,02	
	Bicarbonato comercial	0,001	L	125,10	0,15	
	Penicilina-estreptomicina	0,001	L	151,70	0,15	

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE HEPATOCITOS EN HIDROGELES DE ORIGEN NATURAL PARA TERAPIA CELULAR HEPÁTICA.

	BSA	0,002	L	125,00	0,25	
	Graduado en ing. biomédica	0,75	h	12,00	9,00	
	Costes indirectos	3,00	%	15,36	0,46	
	Recursos auxiliares	3,00	%	15,82	0,47	
						<b>16,30</b>
<b>5. Encapsulación celular</b>						
<b>5.1</b>	Preparación alícuotas de entrecruzamiento (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Módulo 4.1	0,002	L	86,88	0,17	
	Medio de cultivo F12	0,002	L	50,90	0,10	
	Peroxidasa (HRP)	0,001	L	38,60	0,04	
	Peróxido de hidrógeno	0,001	L	7,17	0,01	
	Campana de flujo laminar	0,50	h	0,15	0,08	
	Graduado en ing. biomédica	0,50	h	12,00	6,00	
	Costes indirectos	3,00	%	6,40	0,19	
	Recursos auxiliares	3,00	%	6,59	0,20	
						<b>6,79</b>
<b>5.2</b>	Preparación células HepG2 para encapsulación (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Centrifugadora Thermo	0,05	h	0,40	0,02	
	Centrifugadora Orto Arlesa	0,05	h	0,20	0,01	
	Campana de flujo laminar	1,00	h	0,15	0,15	
	Estufa (37 °C)	0,07	h	0,10	0,01	
	Módulo 4.2	0,05	L	163,00	8,15	
	tripsina	0,004	L	71,80	0,29	
	Graduado en ing. biomédica	1,00	h	12,00	12,00	
	Costes indirectos	3,00	%	20,62	0,62	
	Recursos auxiliares	3,00	%	21,24	0,64	
						<b>21,88</b>
<b>5.3</b>	Encapsulación células HepG2 en hidrogel (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Campana de flujo laminar	1,00	h	0,15	0,15	
	Estufa (37 °C)	0,50	h	0,10	0,05	
	Placa cultivos p48	2,00	ud	2,81	5,62	
	Graduado en ing. biomédica	1,00	h	12,00	12,00	
	Costes indirectos	3,00	%	19,08	0,57	
	Recursos auxiliares	3,00	%	19,65	0,59	
						<b>20,24</b>

6. Caracterización del cultivo celular						
6.1	Valoración de la viabilidad mediante técnica Live-Dead (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	In-cell analyzer 6000	0,25	h	120,00	30,00	
	Estufa (37 °C)	0,50	h	0,15	0,08	
	Sonda Hoescht	0,0001	L	1580,00	0,16	
	Sonda Propidium	0,0001	L	991,00	0,10	
	Campana de flujo laminar	0,50	h	0,15	0,08	
	Graduado en ing. biomédica	0,50	h	12,00	6,00	
	Costes indirectos	3,00	%	36,41	1,09	
	Recursos auxiliares	3,00	%	37,50	1,12	
6.2	Valoración funcional mediante ureogénesis (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Centrifugadora Orto Arlesa	0,05	h	0,20	0,01	
	Campana de flujo laminar	0,50	h	0,15	0,08	
	Estufa (37 °C)	4,00	h	0,10	0,40	
	CaCl <sub>2</sub>	0,0001	L	67,80	0,01	
	Hepes	0,001	L	0,80	0,00	
	NH <sub>4</sub> Cl	0,0001	L	122,00	0,01	
	Kit valoración urea	1,00	ud	362,00	362,00	
	Graduado en ing. biomédica	3,00	h	12,00	36,00	
	Costes indirectos	3,00	%	398,50	11,96	
	Recursos auxiliares	3,00	%	410,46	12,31	
						<b>422,77</b>
7. Modelo animal						
7.1	Preparación modelo animal (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Ratón SCID	1,00	ud	140,00	140,00	
	Paracetamol	0,40	g	0,18	0,07	
	Técnico de laboratorio	4,00	h	25,50	102,00	
	Costes indirectos	3,00	%	242,07	7,26	
	Recursos auxiliares	3,00	%	249,33	7,48	
						<b>256,81</b>
7.2	Valoración histológica mediante tinción (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Hematoxilina	0,02	L	122,20	2,44	

	Eosina	0,02	L	115,00	2,30	
	Xilol	0,02	L	60,40	1,21	
	Etanol (100 %)	0,50	L	3,93	1,97	
	Campana de flujo laminar	3,00	h	0,15	0,45	
	Graduado en ing. biomédica	3,00	h	12,00	36,00	
	Técnico de laboratorio	4,00	h	25,50	102,00	
	Costes indirectos	3,00	%	146,37	4,39	
	Recursos auxiliares	3,00	%	150,76	4,52	
						<b>155,28</b>
<b>7.3</b>	Valoración daño hepático mediante medición de transaminasas (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Kit valoración AST	1,00	ud	354,00	354,00	
	Kit valoración ALT	1,00	ud	362,00	362,00	
	Campana de flujo laminar	2,00	h	0,15	0,30	
	Graduado en ing. biomédica	2,00	h	12,00	24,00	
	Técnico de laboratorio	4,00	h	25,50	102,00	
	Costes indirectos	3,00	%	842,30	25,27	
	Recursos auxiliares	3,00	%	867,57	26,03	
						<b>893,60</b>
<b>8. Equipos de protección individual y seguridad</b>						
<b>8.1</b>	EPI'S (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Máscara de gases	1,00	ud	30,50	30,50	
	Máscara de partículas	1,00	ud	7,25	7,25	
	Bata de laboratorio	1,00	ud	22,50	22,50	
	Caja de guantes látex	4,00	ud	5,95	23,80	
	Gafas de protección	1,00	ud	8,95	8,95	
	Costes indirectos	3,00	%	93,00	2,79	
						<b>95,79</b>
<b>9. Material inventariable/Fungible</b>						
<b>9.1</b>	Material inventariable/Fungible (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Frasco Pírex 3L	1,00	ud	5,83	5,83	
	Frasco Pírex 1L	3,00	ud	4,62	13,86	
	Frasco Pírex 25 mL	5,00	ud	3,56	17,80	
	Micropipeta 1000 µL	1,00	ud	215,00	215,00	
	Micropipeta 200 µL	1,00	ud	215,00	215,00	
	Micropipeta 20 µL	1,00	ud	215,00	215,00	
	Pinzas	1,00	ud	8,73	8,73	

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE HEPATOCITOS EN HIDROGELES DE ORIGEN NATURAL PARA TERAPIA CELULAR HEPÁTICA.

	Tubo Falcon 50 mL	2,00	ud	0,12	0,24	
	Tubo Falcon 15 mL	6,00	ud	0,10	0,60	
	Tubo centrífuga	3,00	ud	0,10	0,30	
	Espátula metálica	1,00	ud	3,66	3,66	
	Caja puntas micropipeta 1000 µL	3,00	ud	65,25	195,75	
	Caja puntas micropipeta 200 µL	2,00	ud	39,16	78,32	
	Caja puntas micropipeta 20 µL	3,00	ud	60,20	180,60	
	Eppendorf 2 mL	210,00	ud	0,08	16,80	
	Eppendorf 1,5 mL	284,00	ud	0,07	19,88	
	Eppendorf 0,5 mL	342,00	ud	0,05	17,10	
	Costes indirectos	3,00	%	1204,47	36,13	
						<b>1240,60</b>
<b>10. Reuniones de proyecto</b>						
<b>10.1</b>	Reuniones de planificación (h)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ing. biomédica	20,00	h	12,00	240,00	
	Tutor/a responsable del proyecto	30,00	h	40,00	1200,00	
	Cotutor/a responsable del proyecto	30,00	h	40,00	1200,00	
	Costes indirectos	3,00	%	2640,00	79,20	
	Recursos auxiliares	3,00	%	2719,20	81,58	
						<b>2800,78</b>
<b>10.2</b>	Reuniones resultados (h)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ing. biomédica	15,00	h	12,00	180,00	
	Tutor/a responsable del proyecto	15,00	h	40,00	600,00	
	Cotutor/a responsable del proyecto	15,00	h	40,00	600,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1380,00	41,40	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1421,40	42,64	
						<b>1464,04</b>
<b>10.2</b>	Redacción y correcciones (h)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ing. biomédica	90,00	h	12,00	1080,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1080,00	32,40	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1112,40	33,37	
						<b>1145,77</b>

## 6. CUADRO PRESUPUESTOS PARCIALES

En la siguiente figura (Tabla 10) se recogen el presupuesto agrupado por capítulos.

TABLA 10. CUADRO DE PRESUPUESTOS PARCIALES

Nº Código	Descripción capítulo				
<b>1</b>	<b>1. Síntesis Gel-Tyr (ud)</b>				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
<b>1.1</b>	Injerto de tiramina en gelatina	ud	1	79,70	79,70
<b>1.2</b>	Purificación de la gelatina con injerto de tiramina	ud	1	26,77	26,77
<b>1.3</b>	Liofilización de gelatina con injerto de tiramina	ud	1	728,97	728,97
<b>Presupuesto parcial "Capítulo 1"</b>					<b>835,44</b>
<b>2</b>	<b>2. Síntesis HA-Tyr (ud)</b>				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
<b>2.1</b>	Injerto de tiramina en gelatina	ud	1	175,36	175,36
<b>2.2</b>	Purificación de la gelatina con injerto de tiramina	ud	1	99,72	99,72
<b>2.3</b>	Liofilización de gelatina con injerto de tiramina	ud	1	1939,66	1939,66
<b>Presupuesto parcial "Capítulo 2"</b>					<b>2214,74</b>
<b>3</b>	<b>3. Caracterización de propiedades mecánicas (ud)</b>				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
<b>3.1</b>	Cuantificación grado de sustitución	ud	2	40,35	80,70
<b>3.2</b>	Medición de propiedades mecánicas mediante reometría	ud	9	62,53	562,77
<b>Presupuesto parcial "Capítulo 3"</b>					<b>643,47</b>
<b>4</b>	<b>4. Preparación buffer y medio de cultivo (ud)</b>				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
<b>4.1</b>	Preparación CF-KRB	mL	2	6,96	13,92
<b>4.2</b>	Preparación medio de cultivo HepG2	mL	2	16,30	32,60
<b>Presupuesto parcial "Capítulo 4"</b>					<b>46,52</b>
<b>5</b>	<b>5. Encapsulación celular (ud)</b>				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)

<b>5.1</b>	Preparación alícuotas de entrecruzamiento	ud	12	6,79	81,48
<b>5.2</b>	Preparación células HepG2 para encapsulación	ud	3	21,88	65,64
<b>5.3</b>	Encapsulación células HepG2 en hidrogel	ud	3	20,24	60,72
<b>Presupuesto parcial "Capítulo 5"</b>					<b>207,84</b>
<b>6</b>	<b>6. Caracterización del cultivo celular (ud)</b>				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
<b>6.1</b>	Valoración de viabilidad mediante técnica Live-Dead	mL	6	38,62	231,72
<b>6.2</b>	Valoración funcional mediante ureogénesis	mL	1	422,77	422,77
<b>Presupuesto parcial "Capítulo 6"</b>					<b>654,49</b>
<b>7</b>	<b>7. Modelo animal (ud)</b>				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
<b>7.1</b>	Preparación modelo animal	ud	1	256,81	256,81
<b>7.2</b>	Valoración histológica mediante tinción	ud	1	155,28	155,28
<b>7.3</b>	Valoración daño hepático mediante medición de transaminasas	ud	1	893,60	893,60
<b>Presupuesto parcial "Capítulo 7"</b>					<b>1305,69</b>
<b>8</b>	<b>8. Equipos de protección individual y seguridad (ud)</b>				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
<b>8.1</b>	EPI'S	ud	1	95,79	95,79
<b>Presupuesto parcial "Capítulo 8"</b>					<b>95,79</b>
<b>9</b>	<b>9. Material inventariable/fungible (ud)</b>				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
<b>9.1</b>	Material inventariable/fungible	ud	1	1240,60	1240,60
<b>Presupuesto parcial "Capítulo 9"</b>					<b>1240,60</b>
<b>10</b>	<b>10. Reuniones de proyecto (ud)</b>				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
<b>10.1</b>	Reuniones de planificación	ud	1	2800,78	2800,78
<b>10.2</b>	Reuniones resultados	ud	1	1464,04	1464,04
<b>10.3</b>	Redacción y correcciones	ud	1	1145,77	1145,77
<b>Presupuesto parcial "Capítulo 10"</b>					<b>5410,59</b>

## 7. PRESUPUESTO EJECUCIÓN MATERIAL, POR CONTRATA Y BASE DE LICITACIÓN

### Presupuesto de ejecución material, por contrata y base de licitación

---

1. Síntesis gelatina (Gel) con injerto de tiramina	835,44 €
2. Síntesis ácido hialurónico (HA) con injerto de tiramina	2.214,74 €
3. Caracterización de propiedades mecánicas	643,47 €
4. Preparación buffer y medio de cultivo	46,52 €
5. Encapsulación celular	207,84 €
6. Caracterización del cultivo celular	654,49 €
7. Modelo animal	1.305,69 €
8. Equipos de protección individual y seguridad	95,79 €
9. Material inventariable/fungible	1.240,60 €
10. Reuniones de proyecto	5.410,59 €
	<hr/>
Total:	<b>12,655,17 €</b>

El presupuesto de ejecución material asciende a la cantidad de **DOCE MIL SEISCIENTOS CICUENTA Y CINCO EUROS CON DIECISIETE CÉNTIMOS**

Presupuesto de ejecución material	12.655,17 €
Gastos generales (13 %)	1.645,17 €
Beneficio industrial (0%)	0,00 €
Presupuesto de ejecución por contrata	14,300,34 €

El presupuesto de ejecución material asciende a la cantidad de **CATORCE MIL TRESCIENTOS EUROS CON TRENTA Y CUATRO CÉNTIMOS**

---

Presupuesto de ejecución por contrata	14.300,34 €
IVA (21%)	3.003,07 €
Presupuesto base de licitación	17.303,41 €

El presupuesto de base de licitación asciende a la cantidad de **DIECISIETE MIL TRESCIENTOS TRES EUROS CON CUARENTA Y UN CÉNTIMOS**