



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

CARACTERIZACIÓN DE UNA PLATAFORMA ELECTROACTIVA DE HIDROGEL-MICROESFERAS PARA LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

AUTORA: MARÍA INMACULADA GARCÍA BRIEGA

TUTORA: GLORIA GALLEGO FERRER

COTUTORA: MARIA GUILLOT FERRIOLS

Curso Académico: 2019-20

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi tutora, la Dra. Gloria Gallego Ferrer y a mi cotutora la doctorando Maria Guillot Ferriols 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. Estaré eternamente agradecida por permitirme experimentar de primera mano lo que significa investigar, reforzando así mi vocación por la ciencia y por la ingeniería tisular. Asimismo, quisiera agradecerles la paciencia, confianza y empatía que me han brindado durante todo el proceso.

Quisiera dar las gracias además a todo el personal del CBIT y a todos mis compañeros estudiantes, que también realizaban allí sus proyectos, por la proximidad y por los descansos, en los que podíamos desde resolver dudas a comentar cualquier cosa trivial del día. Gracias por crear un espacio en el que pudiera crecer y disfrutar.

Hablando de compañeros, debo hacer una especial mención a Julio Rodríguez por estar apoyándome desde el principio y creer tanto en mí y a Estela Sánchez por estar siempre dispuesta a echar una mano.

Por otra parte, quisiera agradecer a Mireia Costa, Sara Pérez, María Quijada y Sofía Sorbet haber estado a mi lado durante estos cuatro años, dejando que me cuele en sus vidas, al igual que ellas tienen, desde ya, un hueco en la mía. Gracias por compartir esta aventura conmigo y motivarme a mejorar cada día un poco más.

A mis amigos más cercanos también quisiera agradecerles el haber sido tan buenos amigos y haberme ayudado a seguir. Intentaré estar a la altura de vuestra amistad.

Finalmente, nunca viviré lo suficiente para agradecer a mi familia todo el apoyo que me han dado y que me darán. Sin ellos no sería quien soy y, probablemente no estaría aquí, y es por esto por lo que jamás podré devolverles todo lo que han hecho por mí.

De hecho, mira papá, ya soy ingeniera.

RESUMEN

El hueso es un tejido muy heterogéneo, por lo que crear una plataforma de cultivo que imite su entorno es un gran desafío. El hueso es un tejido piezoeléctrico y esta propiedad la producen las fibras de colágeno que forman su matriz extracelular. Este estudio se basa en la hipótesis de que la estimulación eléctrica, como ocurre en el tejido nativo, es un factor clave en la diferenciación de las células madre mesenquimales hacia el linaje osteogénico. Además, un entorno tridimensional recreará más eficazmente las condiciones *in vivo* que uno bidimensional. Por este motivo, nuestra propuesta consiste en un entorno tridimensional, un hidrogel de gelatina en el que embeberemos microesferas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), con y sin nanopartículas magnetostrictivas (ferrita de cobalto - CFO) y células madre mesenquimales de la médula ósea humanas (hMSC). La estimulación magnética externa producirá la deformación de las nanopartículas, deformando la matriz de PVDF y produciendo una señal eléctrica, que estimulará la diferenciación de las hMSC hacia el linaje osteogénico.

El PVDF es un polímero semicristalino del que nos interesa obtener el máximo porcentaje de fase β , su fase más electroactiva. Las microesferas de PVDF se obtuvieron mediante la técnica de electropray y se caracterizaron físico-químicamente. Para obtener el porcentaje de fases α y β contenidas en las microesferas utilizamos la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Asimismo, para determinar el grado de cristalinidad del polímero sintetizado utilizamos la calorimetría diferencial de barrido (DSC). El magnetómetro de muestra vibratoria (VSM) fue elegido para medir las propiedades magnéticas obtenidas, más específicamente, el grado de CFO contenido en las microesferas de PVDF-CFO sintetizadas. Además, para comprobar la distribución de las nanopartículas de CFO dentro de las microesferas de PVDF-CFO, se empleó el cañón de iones focalizados (FIB). Finalmente, para la caracterización superficial y espacial de las microesferas, éstas se visualizaron mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

Por otro lado, para caracterizar el hidrogel empleado en este estudio, realizamos crio-secciones para confirmar la distribución homogénea de las microesferas en ellos.

Se cultivaron hMSC dentro del constructo 3D para comprobar la citotoxicidad del biomaterial. La proliferación de las hMSC se estudió a 1, 3 y 7 días mediante el ensayo MTS (4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio).

Después de probar que el constructo 3D no resulta citotóxico para las células, se cultivaron hMSC estimuladas por un campo magnético para comprobar cómo este afecta a la proliferación celular. La proliferación de las hMSC se estudió a 1 y 3 días también mediante el ensayo MTS (4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio).

RESUM

L'os és un teixit molt heterogeni, per la qual cosa crear una plataforma de cultiu que imite el seu entorn és un gran desafiament. L'os és un teixit piezoelèctric i aquesta propietat la produeixen les fibres de col·lagen que formen la seua matriu extracel·lular. Aquest estudi es basa en la hipòtesi que l'estimulació elèctrica, com ocorre en el teixit natiu, és un factor clau en la diferenciació de les cèl·lules mare mesenquimals cap al llinatge osteogènic. A més, un entorn tridimensional recrearà més eficaçment les condicions *in vivo* que un bidimensional. Per aquest motiu, la nostra proposta consisteix en un entorn tridimensional, un hidrogel de gelatina en el qual embeurem microesferes de fluorur de polivinilideno (PVDF), amb i sense nanopartícules magnetoestrictives (ferrita de cobalt - CFO) i cèl·lules mare mesenquimals de la medul·la òssia humanes (hMSC). L'estimulació magnètica externa produirà la deformació de les nanopartícules, deformant la matriu de PVDF i produint un senyal elèctric, que estimularà la diferenciació de les hMSC cap al llinatge osteogènic.

El PVDF és un polímer semicristal·lí del qual ens interessa obtindre el màxim percentatge de fase β , la seua fase més electroactiva. Les microesferes de PVDF es van obtindre mitjançant la tècnica d'electrospray i es van caracteritzar físic-químicament. Per a obtindre el percentatge de fases α i β contingudes en les microesferes utilitzarem l'espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier (FTIR). Així mateix, per a determinar el grau de cristalinitat del polímer sintetitzat utilitzarem la calorimetria diferencial d'escombratge (DSC). El magnetòmetre de mostra vibratòria (VSM) va ser triat per a mesurar les propietats magnètiques obtingudes, més específicament, el grau de CFO contingut en les microesferes de PVDF-CFO sintetitzades. A més, per comprovar la distribució de les nanopartícules de CFO dins de les microesferes de PVDF-CFO, es va emplear el canó d'ions focalitzats (FIB). Finalment, per a la caracterització superficial i espacial de les microesferes, aquestes es van visualitzar mitjançant microscòpia electrònica d'escombratge d'emissió de camp (FESEM).

D'altra banda, per a caracteritzar l'hidrogel emprat en aquest estudi, realitzarem crio-talls per a confirmar la distribució homogènia de les microesferes en ells.

Es van cultivar hMSC dins del constructe 3D per a comprovar la citotoxicitat del biomaterial. La proliferació de les hMSC es va estudiar a 1, 3 i 7 dies mitjançant l'assaig MTS (4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio).

Després de provar que el constructe 3D no resulta citotòxic per a les cèl·lules, es van cultivar hMSC estimulades per un camp magnètic per a comprovar com aquest afecta a la proliferació cel·lular. La proliferació de les hMSC es va estudiar a 1 i 3 dies també mitjançant l'assaig MTS (4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio).

ABSTRACT

Bone is a highly heterogeneous tissue, therefore creating a culture platform that mimics its environment is a great challenge. Bone is a piezoelectric tissue and this property is produced by the collagen fibres that form its extracellular matrix. This study is based on the hypothesis that electrical stimulation, as occurs in native tissue, is a key factor in mesenchymal stem cell differentiation towards the osteogenic lineage. Moreover, a three-dimensional environment will more effectively recreate *in vivo* conditions than a two-dimensional one. For this reason, our proposal consists of a three-dimensional environment, a gelatin hydrogel in which we will embed poly(vinylidene fluoride) (PVDF) microspheres, with and without magnetostrictive nanoparticles (cobalt ferrite - CFO) and human bone marrow mesenchymal stem cells (hMSCs). External magnetic stimulation will produce nanoparticles deformation, deforming the PVDF matrix and producing an electrical signal, which will stimulate hMSC differentiation towards the osteogenic lineage.

PVDF is a semi-crystalline polymer from which we are interested in obtaining the maximum percentage of β phase, its most electroactive one. PVDF microspheres were obtained using electrospray technique and were physico-chemically characterized. To obtain the percentage of α and β phases contained in the microspheres we used Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Likewise, to determine the degree of crystallinity of the synthesized polymer we used differential scanning calorimetry (DSC). The vibrating-sample magnetometer (VSM) was chosen to measure the magnetic properties obtained, more specifically, the degree of CFO contained in the synthesized PVDF-CFO microspheres. Also, the focused ion beam was used to check the distribution of the nanoparticles of CFO inside the PVDF-CFO microspheres. Finally, for the surface and spatial characterization of the microspheres, they were visualized using field emission scanning electron microscopy (FESEM)

On the other hand, to characterize the hydrogel involved in this study, cryogenic slices were performed to confirm the homogeneous distribution of the microspheres in them.

hMSC were cultured within the 3D construct, to check the cytotoxicity of the biomaterial. hMSC proliferation was studied at 1, 3 and 7 days, by MTS assay (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium).

After proving the non-cytotoxicity of the 3D construct, hMSC were cultured within it to check if the magnetic field affects cell proliferation. hMSC proliferation was studied at 1 and 3 days by MTS assay (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium).

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

1. MOTIVACIÓN	15
2. OBJETIVOS	16
3. ANTECEDENTES	18
3.1. El hueso	18
3.1.1. Estructura y función	18
3.1.2. Tejido óseo y células que lo componen	18
3.1.3. La piezoelectricidad	21
3.2. Patologías óseas y terapia celular con células madre mesenquimales	22
3.3. El fluoruro de polivinilideno (PVDF)	24
3.4. La ferrita de cobalto (CoFe ₂ O ₄ o CFO)	25
3.5. Efecto magnetoeléctrico	25
3.6. Plataformas tridimensionales para cultivo celular	26
4. JUSTIFICACIÓN	29
5. NORMATIVA	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1. Materiales	31
6.2. Preparación de microesferas PVDF	32
6.3. Síntesis de microesferas PVDF-CFO	35
6.4. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)	36
6.5. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	37
6.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	38
6.7. Magnetómetro de muestra vibrante (VSM)	39
6.8. Síntesis hidrogeles	39
6.8.1. Síntesis de gelatina con injerto de tiramina	39
6.8.2. Síntesis del hidrogel, gelatina y microesferas	40
6.9. Crio-secciones	42
6.10. Cultivos celulares	43
6.10.1. Estático	43
6.10.2. Dinámico	45
6.11. Medida de la proliferación celular y citotoxicidad mediante MTS	46
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
7.1. Caracterización morfológica de las microesferas	48
7.2. Determinación del grado de cristalinidad y fase β en las microesferas	49
7.3. Magnetización y porcentaje real de CFO en las microesferas	53
7.4. Distribución de las microesferas en el hidrogel	55
7.5. Cultivo celular: citotoxicidad y proliferación	56
7.5.1. Estático	56
7.5.2. Dinámico	58
8. CONCLUSIONES	60
9. BIBLIOGRAFÍA	61

1. MOTIVACIÓN

La principal motivación para realizar un Trabajo Final de Grado en el área de la ingeniería tisular es debido a mi interés en mejorar la vida de las personas. Desde que tengo uso de razón sabía que quería un futuro en el que mi motivación fuera mejorar la vida de los demás. Además, el cuerpo humano, su funcionamiento y estructura siempre me han causado una tremenda curiosidad. Es por estas dos razones por las que se puede deducir que la disciplina que más se podía adaptar a esto, dentro de las que se engloban en el grado, era la ingeniería tisular.

De hecho, las asignaturas que me motivaron a realizar el trabajo final de grado en el CBIT fueron las de histología y morfología celular, bioquímica y biología molecular, materiales, anatomía patológica y biomateriales.

Además de los sentimientos que te genera el poder realizar tu primer trabajo “serio” en el campo de la investigación y dentro de un laboratorio, en mi caso existía otro aliciente. Este nace de la propia idea del proyecto y es que, tal y como está diseñado, me ha sido posible realizar síntesis de biomateriales y cultivos celulares. Esta segunda parte es la primera vez que la he realizado, ya que en el grado no vemos nada relacionado con el tema, y es por esto por lo que en este trabajo hay depositados tanto esfuerzo, dedicación, tiempo e ilusión.

Relacionado con el trabajo “serio”, otra de las razones que me motivaron a realizar un trabajo de investigación era comprobar la realidad de la investigación en las universidades, es decir, cómo se trabaja y averiguar si podría dedicarme a ello toda mi vida. Se requiere una gran capacidad creativa, constancia, eficacia, sacrificio, proactividad y no tener miedo a fracasar y, aunque algunas de estas cualidades ya las poseo de serie, otras de ellas las he entrenado gracias al trabajo en el CBIT. Tras 6 meses trabajando en el proyecto he llegado a la conclusión de que la investigación es una carrera de fondo, y creo que poseo las aptitudes necesarias para poder dedicarme a ello.

Académicamente, este trabajo me permite desarrollar habilidades en los campos de conocimiento de:

- Fabricación de microesferas poliméricas.
- Síntesis química de hidrogeles.
- Caracterización de biomateriales.
- Caracterización de polímeros semicristalinos.
- Crio-secciones.
- Cultivo de células madre mesenquimales.
- Encapsulamiento celular en hidrogeles.
- Estudio de viabilidad celular.

2. OBJETIVOS

Las enfermedades óseas afectan a una parte de la población e influyen en la movilidad y funcionalidad del individuo. Hoy en día, estas enfermedades pueden ser tratadas de diversas maneras, desde barras metálicas a terapias celulares, pasando por los autoinjertos o la ingeniería tisular. Para conseguir regenerar el tejido óseo, se suelen emplear células madre mesenquimales de médula ósea (hMSCs), que pueden obtenerse del propio paciente adulto. No obstante, el uso de células madre de linaje óseo, en lugar del uso de las células madre mesenquimales sin diferenciar, podría ser de mayor utilidad para la regeneración ósea.

Por tanto, la necesidad de prediferenciar las células madre de la médula ósea es el motor de este trabajo. De hecho, el principal objetivo de este consiste en crear una plataforma tridimensional que permita la proliferación y diferenciación celular de las células madre mesenquimales de la médula ósea a células del linaje óseo.

Para lograrlo, es necesario generar un constructo tridimensional capaz de transmitir estímulos biomiméticos a las células en él encapsuladas. Para ello, en este trabajo se ha fabricado microesferas del polímero piezoeléctrico fluoruro de polivinilideno (PVDF) y microesferas de este polímero que a su vez contienen nanopartículas del material magnetostrictivo ferrita de cobalto (CFO). Para producir estas microesferas se ha empleado la técnica del electrospray, que ofrece las fases cristalinas del polímero deseadas sin necesidad de pasos intermedios. La elección de este polímero se basa en el fenómeno magnetoeléctrico, que permite convertir estímulos magnéticos en eléctricos y viceversa.

Además, para poder mantener las microesferas en un espacio delimitado y favorecer el cultivo celular, se ha sintetizado un hidrogel gelificable *in situ* basado en gelatina, en el cual se han encapsulado las células y las microesferas. La elección de la gelatina como polímero para el hidrogel está basada en su alta biocompatibilidad y su sencillez como material.

Por otro lado, para conseguir la proliferación y diferenciación celular, se probarán dos estrategias: el cultivo de las células en el constructo sin más estímulos que un medio basal, y la estimulación de estos constructos empleando un campo magnético variable. Mientras que la proliferación será medida empleando una técnica colorimétrica, la diferenciación de las células tras el tiempo de cultivo no será estudiada en el presente trabajo.

Por lo tanto, los objetivos de este trabajo también han sido poner a punto los sistemas de materiales, caracterizarlos, encapsular células en ellos para probar la no citotoxicidad y comprobar que la estimulación magnética no tiene un efecto negativo sobre la viabilidad celular.

Para ilustrar mejor la plataforma de cultivo desarrollada en este trabajo, se puede observar en la figura 1 una representación del concepto, así como los pasos clave de su síntesis.

CARACTERIZACIÓN DE UNA PLATAFORMA ELECTROACTIVA DE HIDROGEL-MICROESFERAS PARA LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

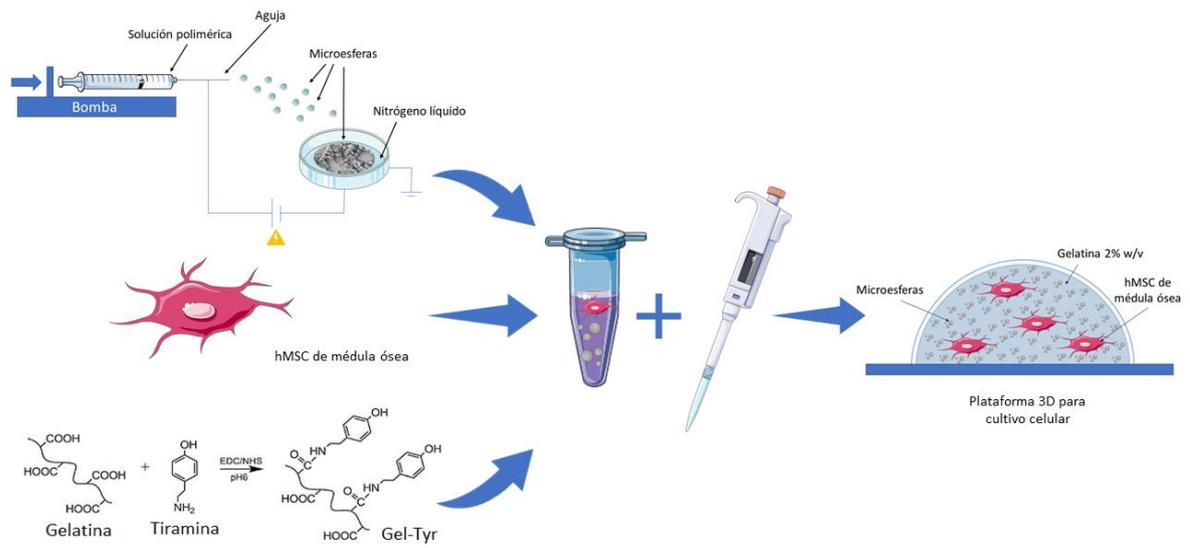


Figura 1. Esquema de la plataforma 3D y su síntesis. Esquema realizado por la autora empleando imágenes de Servier Medical ART

3. ANTECEDENTES

3.1. El hueso

3.1.1. Estructura y función

El sistema esquelético de un humano adulto está formado aproximadamente por 208 huesos, clasificables en huesos largos, cortos o planos en función de su morfología (Figura 2). Este sistema forma parte del aparato locomotor, donde se ocupa de las funciones de dar soporte y forma al cuerpo humano, a la vez que permite el movimiento. Asimismo, los huesos que lo conforman tienen también otras funciones dentro del cuerpo, como la función hematopoyética e inmunológica o la homeostasis del calcio (García-Porrero et al., 2013).

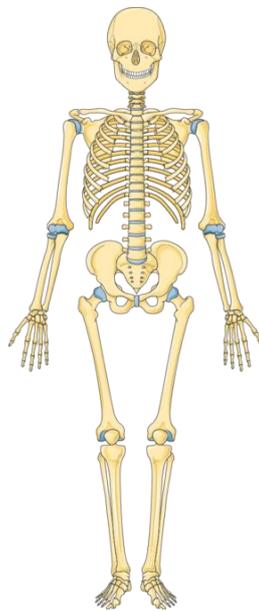


Figura 2. Ilustración del esqueleto adulto completo. Vía Servier Medical ART

El tejido óseo está en constante renovación, lo que requiere de un aporte continuo de nutrientes y otras sustancias que llegará a través del sistema sanguíneo. Pese a que la forma en la que el tejido óseo es irrigado dependerá del tipo de hueso y su tamaño, existen 3 vías generales (García-Porrero et al., 2013). La primera de las vías y la que más sangre aporta es la arteria nutricia, que penetra en el hueso e irriga el tejido óseo desde el interior. Después estarían las arterias periósticas, que son abundantes y de pequeño calibre para vascularizar la parte exterior del hueso. En último lugar, y solo presentes en los huesos largos, están las arterias epifisarias o metafisarias para irrigar los extremos óseos. Asimismo, las venas que retornarán la sangre al sistema sanguíneo tras su paso por el tejido óseo atraviesan la estructura por los orificios o canales que emplean las arterias para entrar.

3.1.2. Tejido óseo y células que lo componen

El tejido óseo es un tipo de tejido conectivo cuya diferencia más significativa con el resto de los tejidos conectivos es su dureza y rigidez. Esta propiedad se la confiere la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) mineralizada que impregna la matriz extracelular de este tejido (Jacob et al., 2018).

El tejido de los mamíferos presenta diferencias durante los distintos estadios del desarrollo. El tejido óseo inmaduro se caracteriza por unas fibras de colágeno gruesas y desordenadas en la matriz extracelular y una disposición espacial de las células también desordenada. Por contra, el tejido óseo maduro posee una estructura correctamente organizada y unas fibras de colágeno más delgadas. Todo el tejido está organizado en láminas de matriz extracelular mineralizada y células, por lo que, aunque existan dos tipos de huesos (cortical y trabecular) debido a la disposición macroscópica de estas láminas, ambos están formados por los mismos componentes (Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, 2014). Es por ello por lo que, previo a introducir las dos variantes óseas, se explicarán brevemente los componentes del tejido óseo.

Los componentes de la matriz extracelular en el tejido óseo se separan en orgánicos e inorgánicos, siendo los inorgánicos los que se encuentran en mayor abundancia (69% frente a un 30% de los orgánicos) (Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, 2014):

- Fracción orgánica. El 90% de la matriz extracelular de tipo orgánico está compuesta de colágeno, dispuesto en forma de fibras orientadas, confiriéndole así su resistencia al hueso. La mayoría del colágeno presente es del tipo I, pero también hay presentes fibras de colágeno tipo III y V. El 10% restante son proteínas no colágenas como la osteocalcina, los proteoglicanos o las proteínas de crecimiento, con amplias funciones en la actividad ósea.
- Fracción inorgánica. Prácticamente la totalidad de esta parte de la matriz extracelular ósea se basa en la hidroxiapatita. Este mineral forma cristales entre las fibras de colágeno que permiten la mineralización ósea y le confieren al hueso sus propiedades de resistencia y dureza.

Existen cuatro grupos celulares característicos de este tejido, ejemplificados en la Figura 3:

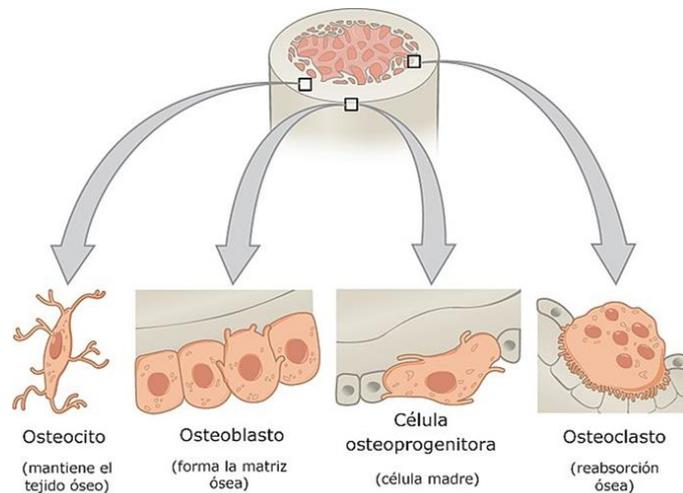


Figura 3. Tipos celulares característicos del tejido óseo. Vía Wikimedia commons

- Célula osteoprogenitora. Son las células madre de linaje óseo. Proviene tras una ligera diferenciación de las células madre mesenquimales y son capaces de dar lugar a los osteoblastos y los osteocitos (Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, 2014).
- Osteoblastos. Procedentes de la diferenciación de las células osteoprogenitoras. Son células osteoformadoras, es decir, son células capaces de formar hueso. Actúan junto a los osteoclastos en los procesos de regeneración ósea, aunque sus propósitos son opuestos. Son los responsables de la síntesis de la matriz extracelular orgánica del hueso. Esta síntesis la realizan sobre la superficie ósea formando una sustancia llamada osteoide, compuesta

principalmente por colágeno tipo I, sulfato de condroitina y osteocalcina. Tras el osteoide, los osteoblastos secretan sustancias desde sus vesículas que permiten mineralizar la matriz extracelular (Florencio-Silva et al., 2015). Tras completar su función, los osteoblastos pueden seguir dos destinos, el primero es la muerte celular programada y el segundo, la diferenciación a osteocitos. Este segundo caso suele ocurrir con menos frecuencia, dejando a la célula incluida en la matriz extracelular mineralizada en un pequeño resquicio (Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, 2014).

- Osteocitos. Procedentes de los osteoblastos diferenciados, son el grupo de células más abundantes del hueso, siendo su porcentaje respecto al total de células óseas del 90 % aproximadamente. También son células longevas, pues su vida media es de 25 años. Poseen varias funciones dentro de las dinámicas óseas, pero una de las más relevantes es la mecanotransducción de las señales mecánicas en señales bioquímicas. Para este objetivo también se valen de las señales eléctricas obtenidas gracias a la piezoelectricidad del hueso (Florencio-Silva et al., 2015). Estas características les permiten estar implicados en los procesos de remodelación ósea, coordinando la acción de los osteoblastos y los osteoclastos.
- Osteoclastos. A diferencia de los osteoblastos y los osteocitos, los osteoclastos proceden del linaje hematopoyético (Florencio-Silva et al., 2015). Son las células destructoras de hueso, es decir, la función que realizan es la reabsorción del hueso con el que entran en contacto a través de sus prolongaciones (borde en cepillo) que les permiten adherirse a éste. Los osteoclastos generan un cóctel de enzimas e iones de hidrógeno y cloro, capaces de degradar la matriz extracelular, tanto orgánica como inorgánica (Edwards & Mundy, 2011). Esta degradación genera un surco tras el paso de estas células llamado cavidad osteoclástica o laguna de Howship, que deja ver la actividad destructora de los osteoclastos (Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, 2014). Sin embargo, la capacidad de reabsorción ósea de los osteoclastos se ha demostrado que es diferente en función del hueso en el que la esté realizando, pues la matriz extracelular posee ligeras diferencias entre huesos (Florencio-Silva et al., 2015).

Una vez se conocen los componentes del tejido óseo, se debe diferenciar entre tejido óseo compacto y tejido óseo trabecular, pues cada uno posee una estructura macroscópica diferente y, con ello, también distintas propiedades. Estos dos tipos de tejidos son los que forman todos los huesos, independientemente de su forma y un ejemplo podría ser la Figura 4. En esta también se puede observar la vascularización del hueso comentada previamente (azul venas, rojo arterias) y cómo los nervios (amarillo) aprovechan los espacios para el paso de vasos sanguíneos.

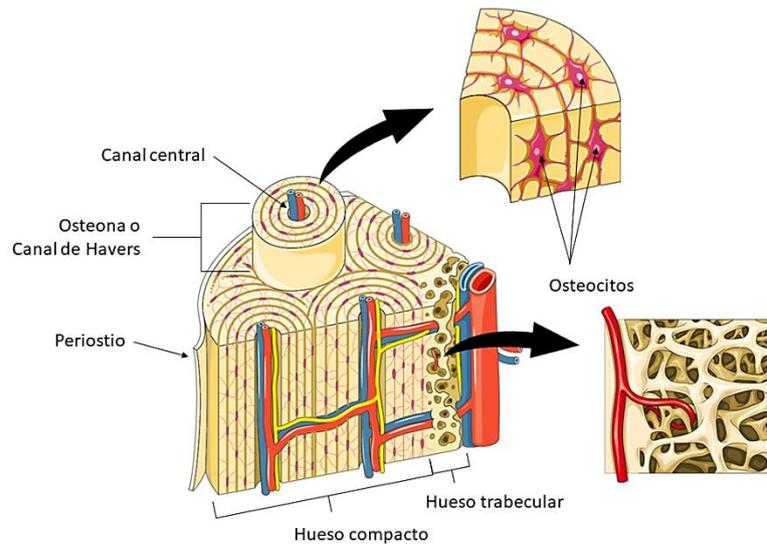


Figura 4. Esquema de una sección de hueso. Esquema realizado por la autora del documento empleando recursos gráficos de Servier Medical ART

- El tejido óseo trabecular o esponjoso es aquel que está en el interior del hueso o en las extremidades de los huesos largos y es altamente poroso. Las láminas de matriz extracelular mineralizada forman las trabéculas, y crecen de esa forma desordenada ya que emplean el riego sanguíneo de la periferia de la médula ósea roja (García-Porrero et al., 2013). Esta disposición trabecular y desordenada permite soportar las distintas cargas a las que se ven sometidas estas partes del hueso. Por otro lado, como las trabéculas están formadas por laminillas, también poseen osteocitos entre las láminas, aunque el número de estas células sea mucho menor (Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, 2014).
- El tejido óseo compacto o cortical es aquel que se sitúa en la periferia del hueso y prácticamente no posee poros. Está compuesto casi en su totalidad por estructuras llamadas canales de Havers, que se corresponden con una disposición concéntrica de las láminas alrededor de un vaso sanguíneo (García-Porrero et al., 2013). Además, cada lámina posee una orientación distinta a la anterior, confiriéndole así una alta resistencia a compresión. Relacionado con las láminas, entre ellas quedan los osteocitos, que a su vez están interconectados entre ellos a través de canales horizontales (Canaliculos de Volkman) (Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, 2014).

3.1.3. La piezoelectricidad

La presencia de colágeno tipo I en la matriz extracelular orgánica del hueso confiere a este tejido una propiedad fundamental denominada piezoelectricidad (Jacob et al., 2018).

La piezoelectricidad fue descubierta en 1880 por Jacques y Pierre Curie al observar la aparición de una carga eléctrica de voltaje proporcional a la tensión aplicada en unos cristales de cuarzo. En efecto, la piezoelectricidad es la capacidad de determinados materiales de producir una carga eléctrica en respuesta a la aplicación sobre estos de un estímulo mecánico. También se describe como piezoelectricidad al efecto inverso, que sería la deformación del material debido a la aplicación de un campo eléctrico (Ministerio de Ciencia e Innovación - Gobierno de España, 2010).

En lo referente al hueso, no es hasta 1957 cuando Fukada y Yasuda evidencian la presencia de esta propiedad. Su origen podría deberse, entre otros, a las fibras de colágeno que lo forman (Fukada & Yasuda, 1957). Como se ha comentado previamente, la matriz extracelular del hueso está principalmente formada por moléculas de colágeno tipo I e hidroxiapatita, debiendo ser estos componentes los responsables de su piezoelectricidad. La estructura cuaternaria del colágeno en forma de triple hélice dextrógira le confiere una naturaleza no centro-simétrica, lo cual genera un momento dipolar permanente. La presencia de un centro de simetría en la molécula de hidroxiapatita impide su aportación a este efecto piezoeléctrico, de hecho, estudios en hueso decalcificado confirman que la piezoelectricidad procede de las fibras de colágeno (Bassett, 1965). Esta teoría fue confirmada, entre otros, en el trabajo de Halperin y Mutchnik en 2004 (Halperin et al., 2004).

Diversos estudios evidencian que las cargas cíclicas inducen campos eléctricos en el hueso que pueden promover la remodelación ósea (Fernandez-Yague et al., 2015). Con este descubrimiento, la comunidad científica considera que las señales eléctricas generadas gracias a la piezoelectricidad ósea puedan regular, tanto procesos de regeneración y crecimiento óseo, como influenciar los ciclos celulares. La diferenciación de las células madre mesenquimales, células progenitoras de los osteoblastos, podría estar, en parte, regulada por este proceso. Los estímulos eléctricos afectan a las proteínas transmembrana dependientes de voltaje y esto tiene como consecuencia la activación de una cascada de señalización en el citoplasma celular que produce transducción de ciertas proteínas al núcleo activando la expresión de genes relacionados con la diferenciación celular (Jacob et al., 2018).

3.2. Patologías óseas y terapia celular con células madre mesenquimales

Como se ha comentado previamente, el tejido óseo posee un comportamiento dinámico que permite su constante remodelación y regeneración. Como la esperanza de vida humana ha aumentado en las últimas décadas, esto ha favorecido la aparición de enfermedades musculoesqueléticas. Algunas de estas enfermedades producen defectos que no son capaces de ser resueltos pese a la alta capacidad de regeneración del tejido óseo, incluyendo defectos de tamaño crítico debidos a traumatismos o cáncer, o desequilibrios en la resorción y formación de los huesos, que conducen a la osteoporosis (Bruder et al., 1994). Estos trastornos tienen un impacto en la calidad de vida de los pacientes y son costosos para los sistemas nacionales de salud, ya que, debido al envejecimiento globalizado de la población, afectan cada vez a más habitantes (*infogerontologia.com > patologías frecuentes*, n.d.).

Los dos tratamientos más comunes para estas patologías son los autoinjertos óseos o la terapia celular. El autoinjerto lleva más años realizándose debido a su propia naturaleza, ya que el sustituto proviene del propio paciente. De hecho, el autoinjerto es actualmente el tratamiento de referencia, aunque implique retos como la falta de tejido sano, las cirugías invasivas, infecciones debidas a las cirugías y los fracasos de los trasplantes después de cortos períodos de tiempo (Tortolini et al., 2012). El otro de los tratamientos, la terapia celular, consiste en el tratamiento de la patología a partir de la transferencia de células a la zona patológica del cuerpo. En este caso, las células se introducen sin ningún tipo de plataforma en el cuerpo empleando una inyección de forma general. Lo que busca esta terapia es que las células introducidas sean capaces de adaptarse al nuevo entorno y proliferar, de tal forma que sean capaces de corregir la patología (Sociedad Española Terapia Génica y Celular, 2020), por lo que se suelen emplear células madre mesenquimales para este propósito.

Al igual que en el autoinjerto, la terapia celular no supone un grave peligro, no obstante, siempre existen riesgos relativos del uso de células madre en la medicina. Entre estos riesgos potenciales estarían la menor viabilidad celular una vez trasplantadas, la posible diferenciación en un tejido no deseado o una reacción a la inflamación del tejido de destino que disminuya la inmunorregulación (Lukomska et al., 2019).

Por otro lado, es necesario introducir las células madre mesenquimales (MSCs) y sus características principales. Estas células son multipotentes y pueden encontrarse en el estroma de la médula ósea, entre otros tejidos. Son capaces de dar lugar a los tipos celulares característicos de su propia capa embrionaria, en este caso, los linajes de los cuales son precursoras son el óseo, el cartilaginoso, el adipocitario, el tendinoso, y el muscular. En el hueso, son las responsables de dar lugar a los osteoblastos a través de un proceso de diferenciación que se puede identificar mediante la expresión de determinadas proteínas características de cada estadio. Su localización se encuentra en algunos pequeños resquicios de la médula ósea, que van disminuyendo de población conforme la edad del individuo aumenta. Además, conforman una pequeña población celular en comparación con el total de células que forman la médula ósea (EuroStemCell, n.d.).

Su carácter de célula madre adulta y, por tanto, su capacidad para diferenciarse en diversos tipos celulares las hace especialmente interesantes para su uso en el campo de la terapia celular, sobre todo en terapias autólogas. También resultan de interés para el campo por su capacidad antiinflamatoria y de modulación de la respuesta inmune a través de secreciones de factores (Lukomska et al., 2019).

Por lo tanto, centrándose en la terapia celular empleando células madre mesenquimales como solución de la patología ósea, se ha visto que existen determinados factores de fracaso. Para mejorar los resultados de las terapias celulares en enfermedades óseas, así como mejorar los resultados de otros tipos de terapias que emplean células madre, existe la posibilidad de inducir *in vitro* un fenotipo bien caracterizado en estas células, previo a su uso. Esta técnica de prediferenciación en el tipo celular de destino es conocida como *priming* (Gorin et al., 2016). De hecho, las ventajas que ofrece el uso de células prediferenciadas en comparación a las células madre mesenquimales son (Kim et al., 2017):

- En las células prediferenciadas no existe un límite de replicaciones o proliferación en el cultivo *ex vivo* que sí existe en las células madre mesenquimales.
- Las células prediferenciadas mantienen las mismas propiedades pese a las replicaciones *ex vivo*. Las células madre mesenquimales ven afectado su fenotipo produciéndose una reducción de su potencial de diferenciación.
- Sus capacidades se mantienen pese a la edad del donante. En las células madre mesenquimales estas disminuyen conforme la edad del donante aumenta, afectando al rendimiento de la terapia celular y su efectividad.

En el caso del uso de células madre mesenquimales, es necesario conocer qué estímulos o formas existen para inducir los distintos tipos celulares a los que son capaces de dar lugar. Existen evidencias en la literatura que demuestran que el uso de estímulos mecánicos o eléctricos son capaces de inducir determinados fenotipos (Damaraju et al., 2017; Uz et al., 2020; Virjula et al., 2017; Zhang et al., 2019). También ha sido demostrado que para la diferenciación *in vitro* se puede emplear un medio de cultivo que contenga citoquinas, pues poseen un efecto en este proceso. Otro ejemplo de factores químicos que regulan la diferenciación sería que existen una relación inversa entre la diferenciación osteogénica y la presencia de factores que inducen la adipogénesis (Gimble et al., 2008).

Por todo ello, este trabajo se basa en la hipótesis de que el *priming* celular es necesario para la realización de terapias seguras, tanto en el campo de la terapia celular como en el de la ingeniería tisular, donde se pueden incluir soportes o *scaffolds* junto con las células prediferenciadas en el momento de su introducción en el lugar del defecto. Como primer paso, para su prediferenciación *in vitro* se emplearán soportes de cultivo que sean capaces de generar estímulos presentes *in vivo*, en este caso un estímulo electromecánico, procedente de la piezoelectricidad del hueso.

3.3. El fluoruro de polivinilideno (PVDF)

El fluoruro de polivinilideno o PVDF es un polímero piezoeléctrico semicristalino (Martins et al., 2014). Su fórmula molecular se corresponde con $-(C_2H_2F_2)_n-$ y en función de la conformación espacial de la cadena, se pueden diferenciar 5 tipos de cristales, α , β , γ , δ , y ϵ . Las distintas fases cristalinas se corresponden con las conformaciones zigzag plano todo trans (TTT) para la fase β , trans-gauche-trans-gauche (TGTG') para las fases α y δ y T_3GT_3G' para las fases γ y ϵ (Martins et al., 2014).

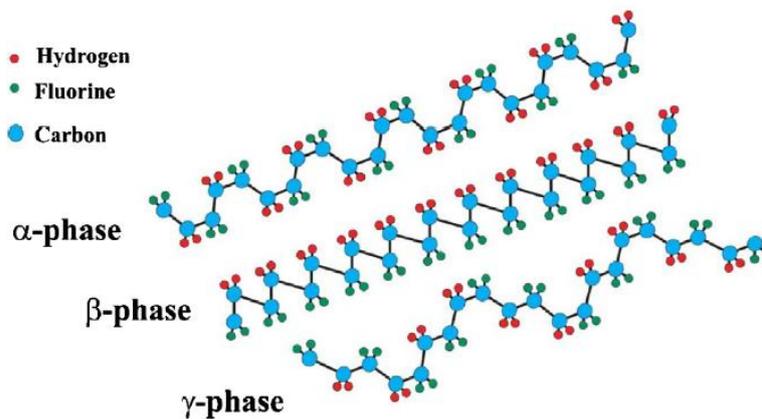


Figura 5. Conformación espacial cadenas cristalinas α , β y γ . (Martins et al., 2014)

La piezoelectricidad del PVDF proviene del fuerte momento dipolar de la unidad monomérica, que se debe a la elevada electronegatividad de los átomos de flúor respecto a los de hidrógeno y carbono. Las fases α y ϵ son apolares debido a la distribución antiparalela de los dipolos mientras que las fases β , γ y δ sí son polares. Debido a que la fase β es la que posee un mayor momento dipolar por unidad monomérica ($8 \cdot 10^{-30}$ Cm) (Martins et al., 2014), y por tanto la que tiene un mayor coeficiente piezoeléctrico, se busca maximizar el porcentaje de esta fase cristalina con tal de obtener la mayor electroactividad posible.

La obtención de las diferentes fases cristalinas está estrechamente relacionada con las condiciones de procesamiento del polímero. La cristalización desde el fundido conduce preferentemente a la fase α , que no es electroactiva (Gregorio, 2006). Si se busca obtener un porcentaje elevado de fase β , el estiramiento en frío para reorganizar la estructura de las cadenas en fase α suele ser la técnica de elección para obtener *films* (Sencadas et al., 2009). Esta técnica comprende dos pasos, pues se deben obtener primero los *films* en fase α y posteriormente esterificarlos. El uso de disolvente polares, como la dimetilformida (DMF), y la cristalización por debajo de 70 °C, favorecen la presencia de la fase más electroactiva en único paso. Diferentes técnicas son compatibles con estas características, como puede ser el *solvent-casting* (Sencadas et al., 2006), *freeze-extraction* (Morales-Román et al., 2019), precipitación por inmersión (Wang et al., 2009) o

electrospinning/electrospray (Correia et al., 2014). Estas técnicas generan soportes mayoritariamente en fase β , dando lugar a diferentes morfologías y estructuras, que permiten su uso en un gran número de aplicaciones, desde el campo de la energía o remediación de aguas hasta su aplicación en biomedicina.

El electrospay permite la obtención de microesferas de PVDF preferentemente en fase β en un proceso con único paso. Como se ha comentado en el párrafo anterior, permite la combinación del uso de un disolvente polar con la evaporación del mismo a temperatura ambiente, produciendo la cristalización del polímero en su fase más electroactiva (Martins et al., 2014).

La piezoelectricidad, junto con su biocompatibilidad, han convertido al PVDF en un candidato ideal para la estimulación electromecánica de precursores óseos, como las células madre mesenquimales. Diversos estudios, entre los que se destacan los de Ribeiro et al. y Sobreiro-Almeida et al., han demostrado que su potencial electroactivo genera un efecto sobre la adhesión, proliferación y diferenciación de células con potencial osteogénico (Costa et al., 2013; Ribeiro et al., 2012, 2015; Sobreiro-Almeida et al., 2017).

3.4. La ferrita de cobalto (CoFe_2O_4 o CFO)

La ferrita de cobalto (CFO) es un material magnetostrictivo, es decir, capaz de alterar su forma en presencia de un determinado campo magnético. Además de las propiedades magnetostrictivas, la ferrita de cobalto ofrece una alta anisotropía magnetocristalina, originada por el acoplamiento de la órbita de giro de los electrones L-S en las redes cristalinas. Otras de las cualidades magnéticas destacables de este material son su alta coercitividad a temperatura ambiente (4.3 kOe), su magnetización de saturación de alrededor de 80 emu/g y que estas propiedades magnéticas se mantienen hasta que el material supera su temperatura de Curie, que son 520 °C (Amiri et al., 2013).

De igual manera, la ferrita de cobalto ofrece grandes propiedades fisicoquímicas y mecánicas que permiten su uso en el ámbito de la ingeniería tisular, como por ejemplo su elevada estabilidad química, dureza y resistencia al desgaste (Gonçalves et al., 2015).

3.5. Efecto magnetoeléctrico

El efecto magnetoeléctrico se define como la variación de la polarización de un campo eléctrico como respuesta a la aplicación sobre este de un campo magnético o como la variación de la magnetización si se le aplica un campo eléctrico (Baji et al., 2014).

Este efecto se da en materiales monofásicos o en composites bifásicos, siendo los primeros materiales multiferróicos la gran mayoría de veces y los segundos combinaciones de un material magnetostrictivo y uno piezoeléctrico. Asimismo, se puede formar el composite bifásico empleando como material piezoeléctrico una cerámica o un polímero (Baji et al., 2014; Gonçalves et al., 2015). Los composites basados en cerámicas ofrecen un mayor efecto magnetoeléctrico comparados con los poliméricos, sin embargo, estos últimos ofrecen otras ventajas interesantes para su aplicación en el campo de la ingeniería tisular. Entre estas ventajas destacan una mayor flexibilidad en sus síntesis, la posibilidad de un mayor moldeado de la estructura, que permite obtener una amplia gama de morfologías distintas y el mejor acoplamiento entre las dos fases (Gonçalves et al., 2015).

Cuando se aplica un campo magnético en los composites poliméricos, como es el caso el del presente trabajo (PVDF-CFO), la fase magnetostrictiva (CFO) se deforma debido a este campo magnético. Esta deformación se transfiere al material polimérico (PVDF) como una tensión mecánica, que genera una diferencia de potencial eléctrico que resulta en una polarización dieléctrica de todo el compuesto (Baji et al., 2014). La combinación de ambas fases genera un impulso eléctrico mediante la aplicación de campo magnético externo que puede ser empleando para la estimulación de células madre mesenquimales *in vitro*.

3.6. Plataformas tridimensionales para cultivo celular.

Este trabajo requiere de una plataforma en la que poder sembrar y cultivar las células que se busca preferenciar, en este caso las células madre mesenquimales de la médula ósea. Dentro de la variedad de morfologías que ofrece el PVDF, se ha escogido su producción en forma de microesferas, mediante la técnica del electrospray. Como se ha mencionado anteriormente, esta técnica permite la obtención de la fase β , generando soportes de cultivo electroactivo.

Siguiendo la línea de maximizar la similitud del entorno *in vitro*, al entorno *in vivo*, es posible generar estructuras para cultivo en 2D o en 3D, en función de las necesidades del estudio. Sin embargo, en algunos casos, puede ser más relevante o esclarecedor una plataforma tridimensional, pues permite replicar las condiciones *in vivo* de forma más fehaciente que una estructura en monocapa (2D). Lo permite puesto que, para estudiar el comportamiento de un grupo de células, es necesario comprender que la matriz extracelular y el entorno en el que existe una célula afecta a sus funciones y supervivencia (Duval et al., 2017). Las microesferas son una plataforma de cultivo versátil, fácilmente moldeable por las células y que reproduce un entorno en tres dimensiones. Ya se ha demostrado previamente que las células madre mesenquimales son capaces de adaptarse y proliferar a este tipo de entornos tridimensionales (Clara-Trujillo et al., 2019).

El uso de microesferas en cultivos celulares genera algunos retos e incertidumbres. Algunos tan básicos como los cambios de medio de cultivo de forma sencilla y segura, y otros mucho más complejos como la interacción de las propias células con las microesferas. Para tratar de minimizar estos problemas y conservar una estructura en 3D, las microesferas pueden ser incluidas en el interior de un hidrogel junto con las células que se desea cultivar (Hermenegildo et al., 2019; Vikingsson et al., 2016). Las razones primordiales para realizar esta elección son que el hidrogel simularía la matriz extracelular y permitiría dispersar las microesferas, permitiendo, además, al gelificar, la vida y desarrollo celular empleando hidrogeles inyectables.

Los hidrogeles son redes tridimensionales de polímeros hidrófilos, capaces de retener una gran cantidad de agua en su estructura sin disolverse. La red no se disuelve debido a los entrecruzamientos que posee, que se cuantifican con el grado de entrecruzamiento. Este grado de entrecruzamiento es inversamente proporcional a la retención de agua por parte del hidrogel, es decir, cuanto mayor sea el grado de entrecruzamiento, menor será el volumen almacenable en el hidrogel (Li et al., 2012).

Entrecruzar un hidrogel es necesario en aquellos casos donde la temperatura basal del cuerpo (37 °C) disuelva el propio polímero en el medio acuoso. Para conseguir el entrecruzamiento existen varias técnicas, como las reacciones fotoinducidas, químicas o enzimáticas. Estas últimas pueden ser no citotóxicas y produciendo la gelificación *in situ* del constructo, permitiendo que adquiera cualquier forma o rellene cualquier espacio (Poveda-Reyes et al., 2016). Este último tipo de

hidrogeles, gelificados *in situ* mediante entrecruzamiento enzimático, son los que se emplearán, en particular, en este estudio.

Debido a su naturaleza, los hidrogeles ofrecen un alto grado de biocompatibilidad y una gran flexibilidad tanto para su síntesis como para su composición química (Duval et al., 2017). Esta libertad permite ajustar las propiedades mecánicas y fisicoquímicas del constructo, logrando así mimetizar al máximo la matriz extracelular que existe en el organismo. De hecho, en la ingeniería tisular cualquier material que se emplea debe permitir la correcta adhesión, diferenciación, proliferación y síntesis de productos de las células con las que entra en contacto, y que son diferentes para cada tipo celular (Liu et al., 2015).

En este estudio, se empleará la gelatina como material para sintetizar el hidrogel. Se selecciona ya que permite generar el entorno tridimensional necesario, embeber las microesferas y cultivar las células sin dar lugar a reacciones citotóxicas (Sanmartín-Masiá et al., 2017).

La gelatina es un polímero natural derivado del colágeno obtenido mediante procedimientos de destrucción de los entrecruzamientos y enlaces polipeptídicos (Taylor et al., 2012). Debido a su origen natural, es altamente biocompatible y biodegradable (Reyes-Ortega et al., 2012). Además, su estructura química (Figura 6) posee una alta cantidad de grupos carboxilo y amina susceptibles de reaccionar con otras sustancias, modificando así propiedades del polímero como su topografía superficial (Chato-Astrain et al., 2018). En nuestro trabajo hemos injertado moléculas de tiramina en los grupos carboxilo de la gelatina, para conseguir su posterior reticulación enzimática en condiciones no citotóxicas.

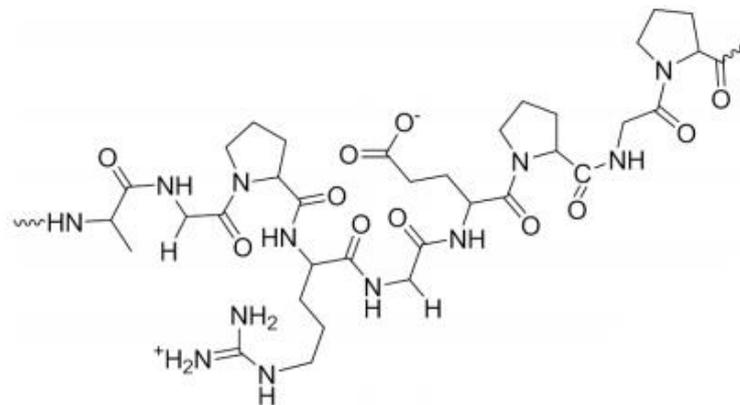


Figura 6. Estructura química de la gelatina (Reyes-Ortega et al., 2012)

Relativo a su estructura química, existen dos tipos de gelatina (A y B), en función del paso previo al proceso de obtención a partir del colágeno. Si ese proceso es un tratamiento ácido que afecte a una pequeña cantidad de los grupos amina, será gelatina tipo A, por contra, si es un tratamiento alcalino, será tipo B (Ruoslahti, 1996). Particularmente en este trabajo, la gelatina empleada será la del tipo A.

Una de las propiedades clave de la gelatina para su uso en el ámbito de la ingeniería tisular es que mantiene la secuencia de adhesión celular arginina-glicina-aspartático (RGD) que poseía el colágeno, e incluso los tiene más accesibles a los receptores celulares que su molécula predecesora (Ruoslahti, 1996). Esta característica permite que cualquier célula que posea integrinas específicas para la combinación de aminoácidos RGD sea capaz de anclarse a la gelatina por este triplete y comenzar a realizar el resto de los procesos (Ruoslahti, 1996).

Por todo ello, en este trabajo se propone la síntesis de un constructo en tres dimensiones, basando en microesferas piezoeléctricas de PVDF, con partículas magnetostrictivas de ferrita de cobalto, incluidas en un hidrogel de gelatina para el cultivo de células madre mesenquimales de la médula ósea. Como primer paso hacia el uso futuro de este sistema de cultivo en el *priming* de las hMSCs, se estudiará la citotoxicidad del constructo y el efecto sobre la proliferación celular, aplicando un campo magnético para inducir el efecto magnetoeléctrico.

4. JUSTIFICACIÓN

El avance de la medicina en las últimas décadas viene acompañado del avance tecnológico. Parte de este avance tecnológico se basa en la implantación de técnicas ingenieriles para solucionar problemas médicos. Debido al envejecimiento de la población, la demanda de soluciones a los problemas de salud derivados de la edad ha crecido, y unas de las partes del cuerpo que más se resiente con los años son los huesos. Es por esto por lo que cada vez más investigaciones ponen el foco en solucionar las patologías óseas con mayor incidencia en la población.

El propósito de este trabajo es conseguir generar un entorno tridimensional que permita diferenciar las células madre mesenquimales en células de linaje óseo. Esta prediferenciación que buscamos lograr permitirá a otros proyectos incrementar o mejorar sus resultados. Para prediferenciar las células se va a emplear un campo magnético, que se convertirá a eléctrico gracias a la magnetostricción y la piezoelectricidad. De hecho, los materiales se han escogido teniendo en cuenta que estas dos propiedades deben maximizarse sin perder la biocompatibilidad. Se busca conseguir un campo eléctrico en el constructo sintetizado para el cultivo, ya que el propio entorno óseo es capaz de generar y transmitir estímulos eléctricos, y esto influye en la diferenciación de las células madre mesenquimales.

El PVDF es el polímero piezoeléctrico que contendrá las partículas magnetostrictivas de CFO y que se sintetizará con forma de microesferas. Se hace así para poder usarlas en algún elemento 3D y maximizar el área de contacto. Para obtener las microesferas nos decantamos por la técnica del electrospray ya que es capaz de maximizar la presencia de la fase más electroactiva del PVDF sin necesidad de más tratamientos.

Para obtener el constructo 3D se generará un hidrogel de gelatina inyectable, que simulará el colágeno presente en la matriz extracelular del hueso. En este hidrogel se van a encapsular las microesferas y las células para poder cultivarlas con y sin estimulación y ver qué les sucede.

Por otro lado, es necesario conocer la forma, tamaño, y composición de las propias microesferas generadas antes de utilizarlas para el cultivo. Para el tamaño y la forma se realiza una visualización en el microscopio electrónico de barrido, mientras que para la composición se emplean la espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para comprobar el contenido de CFO en las microesferas se emplea la Magnetometría muestra vibrante (VSM).

5. NORMATIVA

Dada la naturaleza del trabajo, se requiere el cumplimiento de la normativa referente a maquinaria industrial, así como la relacionada con la manipulación y almacenamiento de sustancias y residuos biológicos y químicos. Igualmente, también es necesario seguir las indicaciones de diversas notas técnicas de prevención (NTP) del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo:

- LEY 54/2003, de 12 de diciembre, sobre prevención de riesgos laborales. Mejora de las condiciones de trabajo, aumentando la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores. Principios generales de obligaciones y responsabilidades preventivas.
- 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 (BOE nº 148 de 21 de junio).
- REAL DECRETO 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual. (BOE nº 140 12-06-1997).
- 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. Disposiciones mínimas.
- REAL DECRETO 822/1993, de 28 de mayo, por el que se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos.
- REAL DECRETO 379/2001, de 6 de abril, por el que se aprueba el Reglamento de almacenamiento de productos químicos y sus instrucciones técnicas complementarias.
- UNE EN 1127-1:2012: Atmósferas explosivas. Prevención y protección contra la explosión.
- NTP 9: Líquidos inflamables y combustibles. Almacenamiento en recipientes móviles. NTP 55: Túneles de secado de disolventes inflamables control del riesgo de explosión.
- 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 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).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

En el proceso de síntesis de microesferas de fluoruro de polivinilideno se utiliza PVDF 6010 de la empresa Solef-Solvay, N,N-Dimetilformamida (DMF) de Scharlab, tetrahidrofurano (THF) del laboratorio Sigma-Aldrich y nitrógeno líquido. Por otro lado, las microesferas de PVDF que contienen CFO se obtienen empleando los materiales previamente mencionados, además de nanopartículas de ferrita de cobalto CoFe_2O_4 (CFO) con un diámetro medio de 45 nm de la casa comercial NanoAmor y tritón X-100 del distribuidor Sigma-Aldrich.

Para obtener la gelatina empleada en el hidrogel se requiere gelatina porcina (gelatin from porcine skin, gel strength 300, Tipo A), hidrocloreto de tiramina (Tyr – 98 %), ácido 2-(N-morfino) etanosulfónico (MES – 99 %), N-hidroxisuccinimida (NHS – 98 %), N-(3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida (EDC) y membranas de diálisis para gelatina (12400 MWCO). Dentro del proceso de síntesis es necesario añadir agua miliQ (mQ) que se obtiene empleando un equipo del laboratorio (Direct-Q 3 System, Millipore) y equilibrar el pH de la disolución de gelatina con ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH). Exceptuando los compuestos empleados para ajustar el pH, que provienen de Scharlab, el resto de las sustancias proceden de la distribuidora Sigma-Aldrich.

Para gelificar la gelatina y obtener el hidrogel, se añaden a la gelatina peroxidasa de rábano (HRP) tipo IV y peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 30 % w/v), ambos de Sigma-Aldrich. La gelatina, el HRP y el peróxido de hidrógeno se disuelven en el *buffer* isotónico Calcium Free Krebs Ringer Buffer (CF-KRB), que se puede obtener de forma autónoma en el laboratorio. Para ello se necesita cloruro sódico (NaCl), cloruro de potasio (KCl), dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) y HEPES disueltos en agua miliQ. Los componentes del CF-KRB son todos distribuidos por Scharlab excepto el HEPES, que proviene del laboratorio Sigma-Aldrich.

Para poder realizar las crio-secciones se congelan los hidrogeles sintetizados. Para ello es necesario incluirlos en resina para criostato o O.C.T. (Optimal Cutting Temperature), que proviene del laboratorio Tissue Tek. Para poder almacenar los cortes realizados en el criostato, estos se depositan en unos portaobjetos especializados de la marca Leica.

Finalmente, en la parte del cultivo celular se requieren diferentes reactivos y compuestos, tanto para el acondicionamiento de las microesferas como para el cultivo. Se emplean Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Sigma-Aldrich), tripsina (Gibco), etanol 98 % (Scharlab), placas de cultivo de 48 pocillos (p48) (VWR) y flascos de cultivo de 75 cm^2 (T75). Mientras que solo se emplea el *buffer* isotónico CF-KRB para sintetizar los hidrogeles, son necesarios cuatro medios para cultivar las células madre mesenquimales de la médula ósea humana (de la casa comercial PromoCell). La composición exacta de cada medio empleado se especificará más adelante, no obstante, los materiales necesarios se especifican a continuación en función de cada uno de estos cuatro medios. El primer medio se emplea para descongelar las células y recibe el nombre de "PromoCell". Este se obtiene mezclando un medio comercial (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2, PromoCell), un suplemento comercial (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 supplement, PromoCell) y penicilina-estreptomocina (P/S) (Fisher). El segundo es el medio de cultivo basal, en el que las células madre mesenquimales de médula ósea pueden proliferar. Para fabricar este medio de cultivo de forma autónoma, se requieren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)-high glucose (4.5 g/L) (Biowest), suero fetal bovino (FBS) (Fisher), piruvato sódico (Gibco), aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich) y un mix de antibióticos compuesto a su vez por L-glutamina (Lonza), penicilina-estreptomocina y fungizona (Fisher). El tercer medio, que recibe el

nombre de “starving”, se prepara de igual modo que el segundo, solo que se disminuye el porcentaje de FBS añadido. Este medio altera el metabolismo celular para conseguir que todas las células que se van a cultivar estén en una misma fase del ciclo (G0).

Para realizar la evaluación de la proliferación celular en los cultivos realizados se sustituye en las placas el medio de cultivo basal por un medio de cultivo modificado (medio de cultivo sin rojo fenol). Este contiene el reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolio (MTS), de Promega, mezclado con medio de cultivo basal sin rojo fenol, que se compone de DMEM sin rojo fenol en polvo (Gibco), glucosa y bicarbonato, siendo estos dos de Sigma-Aldrich. También se cambian las placas para la lectura de la absorbancia, que pasan a ser placas de 96 pocillos (p96) (VWR).

6.2. Preparación de microesferas PVDF

El PVDF se emplea en forma de disolución polimérica para obtener las microesferas. Es por esta razón que la preparación de microesferas se puede dividir en tres etapas, la primera en la que se obtiene la disolución de PVDF al 9 % w/v, una segunda en la que se obtendrán las microesferas por electro spray y una tercera, que es la recogida y almacenaje de estas.

Preparación disolución PVDF

Los disolventes empleados son DMF y THF, en una proporción del 85% y 15% v/v, respectivamente. La disolución de PVDF se realizó al 9 % (w/v) en esta mezcla de solventes. Por lo que, si la disolución a preparar tenía un volumen final de 8 mL, el volumen de cada disolvente, así como la masa de PVDF añadida, se obtuvo empleando una regla de tres simple:

- DMF:

$$\frac{85mL \cdot 8mL}{100mL} = 6.8mL$$

- THF:

$$\frac{15mL \cdot 8mL}{100mL} = 1.2mL$$

- PVDF:

$$\frac{8mL \cdot 9g}{100mL} = 0.72g$$

Para obtener la masa de PVDF se empleó una balanza de precisión de la casa Mettler-Toledo, mientras que, para obtener los volúmenes de los disolventes, se emplearon vasos, pipetas y probetas. Una vez medidos todos los materiales, se mezclaron en un frasco de laboratorio de 25 mL de la marca Pyrex. Para mezclarlos, se introdujo un mezclador magnético en el frasco y se accionó mediante un agitador magnético a temperatura ambiente hasta que se produjo la completa disolución del polímero.

Electrospray

El electro spray es una técnica ampliamente utilizada en el ámbito de la ingeniería tisular que comparte sus fundamentos con la técnica del electrospinning. En ambas se hace pasar a la disolución polimérica por una aguja conectada a una jeringuilla y una bomba que controla el flujo

dispensado de disolución. Se crea una diferencia de potencial entre la aguja, conectada al polo positivo, y el colector, conectado al polo negativo al aplicar un alto voltaje.

En el caso del electrospray, y debido a la baja concentración del polímero, cuando la disolución polimérica es bombeada a través de la aguja, forma un “jet” que se rompe en pequeñas microesferas. Esto es debido a que la fuerza electrostática generada por el alto voltaje es capaz de vencer la tensión superficial del líquido. Esta acumulación de carga sobre las microesferas necesita ser disipada y se forman a su vez micro y nanoesferas que proceden de las microesferas formadas inicialmente (Bock et al., 2012)

Gracias al alto voltaje y las propiedades del disolvente, este se evapora en el trayecto desde la aguja al colector.

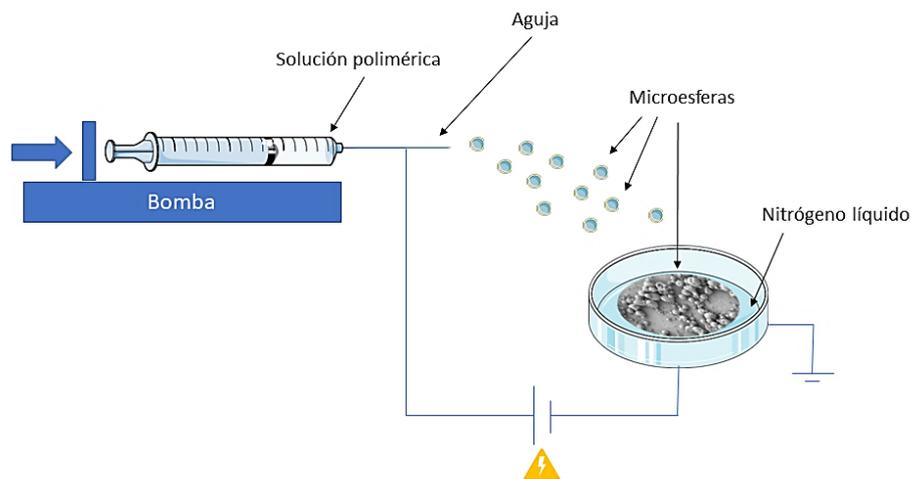


Figura 7. Esquema montaje electrospray

Sea la Figura 7 un esquema que ilustra el funcionamiento de la técnica de electrospray empleada, se pueden extraer qué parámetros son determinantes en la morfología final del material polimérico obtenido. En la siguiente lista aparecen los parámetros empleados en este estudio, ajustados a partir del trabajo de Gonçalves et al. (Gonçalves et al., 2015):

- Flujo del polímero: 2 mL/h
- Diámetro de la jeringuilla: 12.04 mm
- Diámetro de la aguja: 1.6 mm
- Voltaje aplicado: 20 kV
- Distancia de la aguja al colector: 20 cm
- Presión de la cabina: 1 Pa
- Temperatura: ambiente

Para sintetizar las microesferas se colocó parte de la disolución, que estaba en agitación magnética, en una jeringuilla. Esta jeringuilla se colocó en la bomba, logrando que el flujo de polímero durante la síntesis fuese continuo. Tras colocarla, se preparó la cabina de electrospray de fabricación autónoma (Figura 8) y la bomba con los parámetros especificados previamente y se conectaron los cables a la aguja y al colector. Antes de comenzar se rellenó el colector de nitrógeno líquido, que mantendrá separadas a las microesferas entre ellas, evitando la formación de agregados (Figura 9).



Figura 8. Cabina de electro spray para la obtención de microesferas



Figura 9. Colector del sistema de obtención de microesferas por electro spray

Se activó el campo eléctrico y comenzó la pulverización. El colector se retiró aproximadamente a los 20 minutos, cuando el nitrógeno líquido que había contenido se había evaporado.

Para continuar la síntesis de microesferas lo único que se debe hacer es cambiar el colector, rellenarlo de nitrógeno líquido, reconectar el circuito eléctrico, activarlo y esperar otros 20 minutos.

Recogida y almacenaje de microesferas

Tras la síntesis, se almacenan los colectores en bolsas herméticas que permiten mantenerlas en buen estado hasta el momento de su recogida. Para recogerlas, se sacaron los colectores de la bolsa y, empleando una espátula pequeña recubierta de etanol, se retiraron las microesferas.

Este método proporciona una suspensión de microesferas en etanol. Para almacenarlas listas para su uso, se sonicó la suspensión durante unos 10 minutos para luego poder tamizarla. Con el tamiz, cuyo tamaño de poro es de 40 μm , lo que se logró es eliminar las microesferas grandes, partículas extras o agregados que no son de interés. El último paso que se realizó es una evaporación del etanol que ha quedado tras el filtrado, que se realizó en una campana de extracción de gases a temperatura ambiente.

6.3. Síntesis de microesferas PVDF-CFO

Estas microesferas son de PVDF, pero contienen también nanopartículas de CFO en su interior. Es por esto por lo que, pese a obtenerse de forma similar a las microesferas de PVDF, hay cambios que se deben tratar. El proceso se divide en tres etapas, donde la primera permite obtener una disolución de PVDF al 4% w/v con un 20% w/w de CFO respecto al total de sólidos de la disolución (PVDF en este caso), la segunda sería el electrospray que dará lugar a las microesferas, y la tercera, que será la recogida y almacenaje de estas.

Preparación disolución PVDF-CFO

Los disolventes empleados fueron DMF y THF, en una proporción del 85% y 15% v/v, respectivamente. La disolución de PVDF se prepara al 4% (w/v) en la mezcla de disolventes. La masa de CFO corresponde al 20% en peso de la masa de PVDF. Por lo que, si la disolución a preparar tenía un volumen final de 25 mL, el volumen de cada disolvente, así como la masa de PVDF y CFO añadidas, se obtuvieron empleando una regla de tres simple:

- DMF:

$$\frac{85\text{mL} \cdot 25\text{mL}}{100\text{mL}} = 21.25\text{mL}$$

- THF:

$$\frac{15\text{mL} \cdot 25\text{mL}}{100\text{mL}} = 3.75\text{mL}$$

- PVDF:

$$\frac{25\text{mL} \cdot 4\text{g}}{100\text{mL}} = 1\text{g}$$

- CFO:

$$0,2 = \frac{x\text{g}}{x\text{g}+1\text{g}} \rightarrow x\text{g} = \frac{0,2}{0,8} = 0.25\text{g}$$

Mientras que el PVDF, el DMF y el THF se obtuvieron de forma similar a la que se ha explicado en el apartado anterior, el CFO requiere que se tomen una serie de precauciones. Debido al diámetro nanométrico de las partículas de CFO y, por tanto, su toxicidad al ser inhaladas, se debe emplear una balanza determinada que se colocó dentro de una cabina estanca para poder pesar la masa del

CFO dentro de esta. Una vez pesado el CFO, se dispersó en el volumen de DMF en un frasco de laboratorio de 50 mL con la ayuda de un agitador mecánico (Ultraturrax) a 6500 rpm. Se añadió tritón X-100 al 1% v/v, es decir, 0.25 mL, y se agitó durante 30 minutos. Pasados los 30 minutos se añadió el PVDF y el THF y se mantuvieron en el Ultraturrax al menos durante una hora antes de comenzar con el electrospray.

Electrospray

Aunque la disolución es diferente, los parámetros con los que se configuró el método son los mismos para los dos tipos de microesferas:

- Flujo del polímero: 2 mL/h
- Diámetro de la jeringuilla: 12.04 mm
- Diámetro de la aguja: 1.6 mm
- Voltaje aplicado: 20 kV
- Distancia de la aguja al colector: 20 cm
- Presión de la cabina: 1 Pa
- Temperatura: ambiente

Aunque se sacó una parte de la disolución del bote y se introdujo en la jeringuilla, la disolución restante se mantuvo en agitación en el Ultraturrax, para evitar que la ferrita dispersada precipitara. Se colocó la jeringuilla en la bomba, se configuró, se preparó la cabina de electrospray y se conectaron los cables a la aguja y al colector. Antes de activar el campo eléctrico, se rellenó el colector de nitrógeno líquido.

A diferencia del caso anterior, aquí el colector se cambiará por otro cuando se hayan pulverizado 400 μ L de disolución, aunque el nitrógeno líquido que había no se haya evaporado al completo, ya que la ferrita de cobalto precipita en el interior de la jeringuilla a medida que pasa el tiempo y se debe cambiar la jeringa.

Para continuar la síntesis de microesferas, además de cambiar el colector, rellenarlo de nitrógeno líquido, reconectar los cables y encender el campo eléctrico y la bomba, se debe vaciar la jeringuilla en el bote que está en agitación y coger de nuevo un volumen con ella. Se realiza de esta forma para conseguir una disolución homogénea de PVDF y las nanopartículas de CFO, que dará lugar a microesferas con proporción de ferrita más uniforme.

Recogida y almacenaje de microesferas

Tras la síntesis, se almacenaron los colectores en bolsas herméticas que permiten mantenerlas en buen estado hasta el momento de su recogida. Para recogerlas, se siguió el mismo procedimiento que el utilizado en las microesferas de PVDF.

6.4. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

Las siglas FESEM significan en inglés “Field Emission Scanning Electron Microscopy”, que en castellano sería “microscopía electrónica de barrido de emisión de campo”. Se emplea para obtener información topográfica y morfológica de los objetos, pues escanea con un haz de electrones toda la superficie de la muestra a grandes resoluciones. Esta superficie debe ser conductora para poder obtener información, y para asegurarse de ello, se suelen recubrir las muestras de materiales metálicos. En este caso, se usaron diferentes muestras de los dos tipos de microesferas sintetizadas

para observar su morfología, su distribución en los colectores y para obtener un valor medio del diámetro de las microesferas sintetizadas.

Para poder utilizar esta técnica, se acudió al servicio de microscopía de la UPV, donde poseen un equipo de FESEM modelo ZEISS ULTRA 55 y un equipo técnico que sirve de apoyo para usarlo correctamente.

Se llevaron las muestras que interesa analizar al servicio de microscopía, donde se colocaron en portaobjetos especializados para el FESEM. Tras colocar las muestras, se seleccionó el recubrimiento deseado, platino en este caso. Una vez la muestra está correctamente recubierta, se introdujeron las muestras en la cámara de vacío del FESEM y ajustó la configuración general. En nuestro caso, la intensidad de los electrones empleados fue de 2 kV y se observaron 10 muestras en dos visitas al servicio. Se emplearon un total de 10 muestras diferentes, 6 de microesferas de PVDF y 3 de PVDF-CFO. Para cada muestra se buscaban zonas con información relevante a lo largo de toda la superficie y se almacenaban las imágenes pertinentes.

Cuando se hubieron visualizado todas las muestras y realizado todas las fotografías pertinentes, se comprobó la morfología de las microesferas y su disposición en el colector a partir de dichas imágenes. Para poder obtener datos sobre el diámetro, se empleó el software de edición de imágenes ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), que nos permite medir diámetros y almacenarlos en un documento de Excel. Para lograrlo se miden 343 microesferas de cada uno de los dos tipos sintetizados a través de imágenes a 2000 aumentos obtenidas de diferentes partes de las 10 muestras observadas.

6.5. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier permite reconocer la composición y la organización del material que se está analizando. Para ello emite hacia la muestra radiación de infrarrojos, donde una parte se absorbe y otra se transmite. La radiación transmitida toma forma de espectro y es captada por un receptor que está bajo la muestra. Estos espectros permiten conocer la transmitancia o la absorbancia, en función del interés propio, así como las moléculas que forman el material y su organización. Mientras que la transmitancia es la relación entre la energía transmitida a través de una sustancia y la energía total incidente, la absorbancia es equivalente al logaritmo de la inversa de la transmitancia, y permite conocer la cantidad de luz absorbida por la muestra (Abril Díaz et al., n.d.). Por otro lado, la utilidad que posee para la diferenciación de sustancias se debe a que cada molécula y cada forma en la que pueda organizarse genera unos valores de transmitancia y absorbancia determinados en longitudes específicas de onda de la radiación (λ). Este mapa de picos permitirá que conozcamos la cantidad de fase α y de fase β presente en las microesferas de PVDF y las de PVDF-CFO.

Para conocer el porcentaje de las fases cristalinas de interés que conforman la muestra, se utilizó el espectrómetro ALPHA FT-IR (Bruker) para realizar una espectrofotometría de infrarrojos a las microesferas de PVDF en primer lugar y a las de PVDF-CFO en segundo lugar. Las longitudes de ondas barridas van desde los 4000 cm^{-1} a los 400 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} . Se barre en este espectro porque permite ahorrar tiempo de barrido y también, conocer el contenido de fase α y β . Para obtener la cantidad de fase α es necesario fijarse en la transmitancia en $\lambda = 760\text{ cm}^{-1}$ y para la fase β , en la transmitancia en $\lambda = 840\text{ cm}^{-1}$ (Gregorio et al., 1994). Este tipo de pruebas requieren un ambiente controlado y poca luz exterior que pueda afectar a la radiación incidente.

Una vez obtenido el espectro, se calculan los porcentajes de fase α y de fase β mediante las siguientes ecuaciones (Gregorio et al., 1994):

- Fase α :

$$F(\alpha) = \frac{\Delta_{\alpha}}{\left(\frac{K_{\alpha}}{K_{\beta}}\right)\Delta_{\beta} + \Delta_{\alpha}} \quad (\text{Ec. 1})$$

- Fase β :

$$F(\beta) = \frac{\Delta_{\beta}}{\left(\frac{K_{\beta}}{K_{\alpha}}\right)\Delta_{\alpha} + \Delta_{\beta}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Asumiendo que las medidas de FTIR siguen la ley de Lambert-Beer, Δ_{α} y Δ_{β} son las medidas de absorbancia obtenidas a 760 cm^{-1} y 840 cm^{-1} , respectivamente. K_{α} y K_{β} son los coeficientes de absorción característicos para los números de onda característicos de α y β , obtenidos a partir de muestras puras para estas fases, cuyo valor es 6.1×10^4 and $7.7 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$ (Gregorio et al., 1994).

6.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido o differential scanning calorimetry (DSC) en inglés, es una técnica que permite evaluar las propiedades térmicas de los polímeros. Esta técnica permite, entre otras cosas, identificar el porcentaje de fase cristalina que poseen los dos tipos de microesferas fabricados y su temperatura de fusión (T_m) (Correia et al., 2014). Para obtener los valores de las entalpías y las temperaturas de fusión se emplea el equipo de DSC "DSC Pyris 1" (PerkinElmer) en una atmósfera de nitrógeno seco. En los experimentos se escaneó la muestra desde $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$, con un rango de calentamiento de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Se encapsuló una masa en la celda de medida de 2.9 mg en el caso de las microesferas de PVDF y de 3.28 mg en las de PVDF-CFO.

Para obtener el porcentaje de fase cristalina (X_C), se empleará la siguiente ecuación (Gonçalves et al., 2015) :

$$X_C = \frac{\Delta H}{w_{PVDF}(x\Delta H_{\alpha} + y\Delta H_{\beta})} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde ΔH es la entalpía de fusión de las microesferas analizadas, ΔH_{α} y ΔH_{β} son las entalpías de fusión de una muestra de polímero compuesto en su totalidad por cristales en fase α y en fase β , respectivamente. Los valores también están recogidos en el trabajo de Martins et al., y estos son 93.07 J/g para la fase α y 103.4 J/g en la fase β . Los valores de x e y se corresponden con el porcentaje de las fases α y β respectivamente, obtenidos a partir del ensayo del FTIR. Por último, el término w_{PVDF} se corresponde con la fracción en peso de PVDF en las microesferas analizadas. Es necesario añadirlo a las ecuaciones ya que en el caso de las microesferas de PVDF-CFO, no toda la masa de la microesfera es masa de PVDF, y si no se aplicara este factor de corrección, la cristalinidad obtenida no sería correcta. Este valor saldrá del porcentaje de PVDF y de CFO en las microesferas que se confirme con la siguiente técnica de caracterización, el VSM.

6.7. Magnetómetro de muestra vibrante (VSM)

Esta prueba recibe el nombre de magnetómetro de muestra vibrante (VSM) y con ella se obtuvo la concentración real de materiales magnéticos en las microesferas sintetizadas. Para ello se usó el equipo de VSM Microsense 2 Tesla del instituto bilbaíno BCMaterials. Gracias a esta colaboración se realizaron bucles de magnetización hasta 18.5 kOe de una muestra pura de CFO y una muestra de las microesferas de PVDF-CFO sintetizadas aquí. Con estos valores y empleando la ecuación descrita en el trabajo de Gonçalves et al. (Gonçalves et al., 2015) se extrajo el porcentaje real de nanopartículas de CFO en las microesferas:

$$CFO \% \text{ en microesferas} = \frac{\text{Magnetización de saturación de las microesferas}}{\text{Magnetización de saturación del CFO puro}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

El valor de magnetización de saturación del CFO puro es de $60 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$.

Por otro lado, para comprobar la distribución de las nanopartículas de CFO dentro de las microesferas poliméricas, se hizo uso del servicio de microscopía de la UPV. El equipo empleado fue el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo con cañón de iones focalizados (FIB) Auriga compact de Zeiss. Esta técnica emplea un haz de iones de elementos de alto peso molecular para que, debido a esa cualidad, los iones sean capaces de destruir enlaces químicos y con ello partir las muestras, permitiendo obtener secciones y observar el interior del material (*Microscopía Electrónica de Barrido*, n.d.; Vikingsson et al., 2016).

6.8. Síntesis hidrogeles

6.8.1. Síntesis de gelatina con injerto de tiramina

Se incluye tiramina en las cadenas poliméricas de la gelatina para, en otra reacción, obtener una red reticulada de gelatina en la que podamos encapsular células mediante una reacción no citotóxica. El grupo amina ($-\text{NH}_2$) de la tiramina reacciona con el grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) de la gelatina gracias a dos sustancias (EDC y NHS) y un pH de 6 (Sakai et al., 2009).

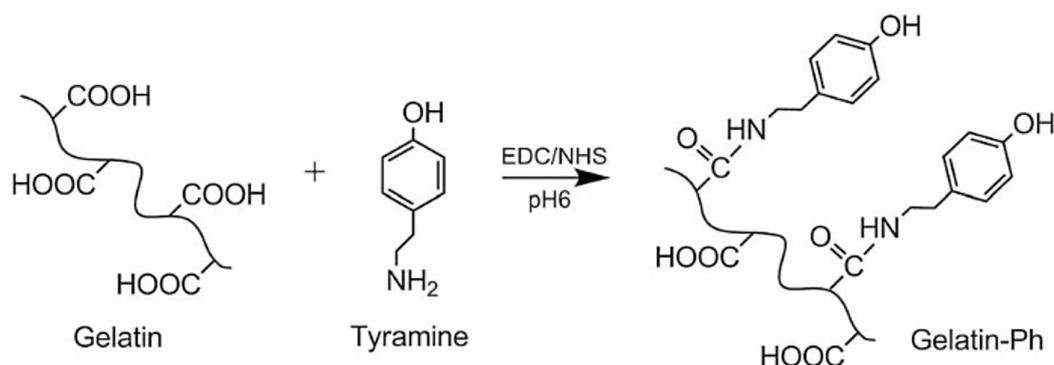


Figura 10. Injerto de tiramina (Sakai et al., 2009)

El procedimiento que se siguió para obtener el resultado mostrado en la Figura 10 ha sido el estandarizado por la doctora Poveda (Poveda-Reyes et al., 2015, 2016). De igual manera, los ratios empleados de las sustancias necesarias para el entrecruzamiento de la gelatina y la tiramina se extraen del trabajo de Esther Sanmartín-Masiá (Sanmartín-Masiá, 2016):

Tabla 1. Ratios molares empleados para la síntesis de Gel-Tyr

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

En primer lugar, se preparó una disolución de 20 mL de gelatina en agua mQ a una concentración de 20 mg/mL, es decir, que posea 0.4 g de gelatina. El siguiente paso es añadir 195.24 mg de MES (estabilizador del pH), lo que da una concentración de MES de 50 mM. Se dejó agitando la disolución preparada durante 30 minutos y a una temperatura de 60 °C.

Tras el periodo de tiempo de agitación, se añadió la masa de tiramina correspondiente, 111.13 mg y se dejó agitando a temperatura ambiente. Como la reacción que da lugar al injerto libera protones (H⁺) en la disolución, es necesario rebajar el pH hasta 6, utilizando para ello NaOH 0.1 M con la ayuda de un pHmetro. Es entonces cuando se añadieron 7.36 mg de NHS y se agitó la disolución por otros 30 min. Finalmente, se añadió EDC y se mantuvo la disolución en agitación a 37 °C durante 24 h.

Para mejorar la calidad de la gelatina injertada con tiramina obtenida, se continuó el proceso con una diálisis que dura 3 días. Para poder dializar la disolución obtenida, se contuvo en una membrana de diálisis (12400 MWCO) y se le realizaron cambios de agua 3 veces al día. El agua empleada para purificar el material es agua destilada.

Tras la diálisis, se congeló a -80 °C la disolución durante 24 horas, tras las cuales, la gelatina está preparada para liofilizarse durante 3 días. Finalizada la liofilización, se almacenó la gelatina en recipientes herméticos y sin humedad, manteniendo así la deshidratación que se había logrado con la liofilizadora.

6.8.2. Síntesis del hidrogel, gelatina y microesferas

En la parte experimental se emplearon tres tipos de hidrogeles: Gelatina 2% w/v (Gel), Gelatina 2% w/v con microesferas de PVDF (Gel-PVDF) y Gelatina 2% w/v con microesferas de PVDF y CFO (Gel-PVDF-CFO). Estos hidrogeles se reticularon empleando peroxidasa de rábano (HRP), que cataliza la reacción, y peróxido de hidrógeno, que actúa como sustrato de esta. En los tres modelos se siguen las mismas proporciones y se emplean los mismos materiales, la diferencia se da en si se añadió a la mezcla de gelatina y H₂O₂ microesferas antes de reticular las cadenas con HRP o no.

El volumen del que se realizaron los hidrogeles es variable, en función de las necesidades. Es por esta razón que, para sintetizar los hidrogeles, fue necesario mantener las siguientes proporciones entre los materiales respecto al volumen total:

- 80% v/v de la disolución de Gel al 2% w/v
- 10% v/v de H₂O₂ 20 mM
- 10% v/v de HRP 12.5 U/mL

Para lograr esas concentraciones, se diluyeron compuestos comerciales o ya fabricados en el buffer CF-KRB, del cual se obtienen 100 mL mezclando:

- 672.06 mg de NaCl (115 mM)
- 37.28 mg de KCl (5 mM)
- 13.61 mg de KH₂PO₄ (1 mM)
- 595.75 mg de HEPES (25 mM).

En el caso de la gelatina, la masa de la Gel que se diluyó fue la masa correspondiente al 2% w/v para el total de hidrogeles que se requiere preparar. Para pesar la gelatina injertada con tiramina se empleó una balanza de precisión. La disolución de gelatina en CF-KRB se mantuvo dentro de una estufa a 37°C durante 1 hora. En el caso del H₂O₂, se realizó una disolución intermedia de 100 mM, también en CF-KRB, que permitió obtener el volumen de H₂O₂ necesario para obtener el volumen del co-soluto requerido para todos los geles realizados a una concentración de 20 mM. Finalmente, para el HRP también se obtuvo una disolución intermedia en CF-KRB a una concentración de 200 U/mL que permitió obtener el volumen necesario de HRP a la concentración final 12.5 U/mL.

Para obtener los hidrogeles sin microesferas, lo primero que se hizo fue mezclar los volúmenes de Gel y HRP. Esta mezcla se depositó en el lugar donde se quieran gelificar los hidrogeles, que en este caso fue el interior de un pocillo de una placa p48. Se colocó una gota de la mezcla, con un volumen de 45 µL. Estas gotas están compuestas en un 80 % v/v por gelatina (40 µL), un 10 % v/v por HRP (5 µL) y el otro 10 % v/v por H₂O₂ (5 µL). Primero se mezclan la gelatina y el HRP y solo cuando se quiere gelificar el hidrogel, se añade el H₂O₂. Al colocar cada volumen se puede mezclar suavemente todo el conjunto con delicadeza para no romper la gota y conseguir homogeneizar mejor los volúmenes, obteniendo una gelificación más homogénea.

Sin embargo, si hubiera que introducir microesferas en los hidrogeles (CFO y PVDF), sería necesario acondicionarlas previamente al contacto con la gelatina y el resto de las sustancias.

Acondicionamiento microesferas

La elevada hidrofobicidad del PVDF hace necesario el acondicionamiento de las microesferas, con el paso de forma gradual desde etanol a agua mQ, para finalmente realizar un *coating* con FBS al 20 % v/v. Buscamos una concentración de microesferas en cada hidrogel de 6 mg/mL, o lo que es lo mismo, 0.3 mg de microesferas para un hidrogel de 50 µL. Esta masa también se corresponde con el 40 % del total de masa que hay de gelatina en el hidrogel.

Para lograr obtener la masa deseada y acondicionarlas para su uso, se pesan 10 mg de microesferas en seco en una balanza de precisión. Una vez se obtuvo la masa deseada, esta se resuspendió dentro de un eppendorf que contenía 1 mL de etanol absoluto. Para acondicionar las microesferas, se realizó un paso gradual de etanol a agua mQ tal que:

- 70/30% v/v etanol/ agua mQ
- 50/50% v/v etanol/agua mQ
- 30/70% v/v etanol/agua mQ
- 10/90% v/v etanol/agua mQ
- 100% v/v agua mQ.

En cada paso se pasó por el vortex y se sonicó el contenido del eppendorf durante 5 minutos. Tras esta homogeneización, se realizó un centrifugado a 5000 rpm durante otros 5 minutos de este contenido y se retiró el sobrenadante del eppendorf.

Una vez en agua mQ, las microesferas se centrifugaron y se incubaron durante 24 en agitación en una disolución de FBS al 20 % v/v en agua mQ. Las proteínas del suero fetal bovino se adsorben a la superficie de las microesferas, mejorando su mojabilidad y su correcta dispersión en la disolución de gelatina. Pasadas las 24 h se realizaron 3 lavados con agua mQ para eliminar los restos de FBS.

Después del acondicionamiento, se procedió a trabajar en volúmenes, es decir, la masa de microesferas que se había pesado se resuspendió en 1 mL de CF-KRB, obteniendo una disolución de 10 mg/mL. De aquí se cogió el volumen que contuviese la masa necesaria de microesferas para

la síntesis de los geles. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet de microesferas se resuspendió en la mezcla de gelatina y peróxido de hidrógeno. El resto de procedimiento se realizó de la misma manera que los geles que no contienen microesferas.

6.9. Crio-secciones

Las crio-secciones o crio-cortes permiten ver qué hay en el interior de las gotas del hidrogel. Esta información es relevante puesto que nos permite ver el tamaño de los espacios generados, así como, la distribución de las microesferas en la estructura de gelatina.

Para obtener los distintos cortes, se optó por congelar las muestras a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ incluidas en OCT y realizar los cortes en el criostato (Leica CM 1860 UV). Para su visualización, se observaron las muestras sin ninguna tinción en un microscopio óptico disponible en el laboratorio. Los principales pasos del proceso se explican a continuación.

Inclusión en OCT y congelación

Se creó una primera capa de OCT en el receptáculo piramidal, que sirvió como molde para realizar los bloques, que luego se metió en el congelador para solidificarla. Tras la solidificación, se colocó, centrado y sobre ella, uno de los hidrogeles sintetizados y se recubrió de OCT de forma homogénea y sin generar burbujas. Todo el receptáculo se volvió a almacenar en el congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se solidificó. Este proceso se repitió para todos los hidrogeles que se querían observar.

Cortes en el criostato

Se colocaron los bloques de OCT que contienen los hidrogeles en un soporte específico que permitirá realizar los cortes con el criostato. Para ello, se sacó el bloque del receptáculo y se adhirió a la superficie del soporte mediante unas gotas de OCT. Mientras se preparan el resto de las muestras que se quieren ver, se puede dejar el soporte con la muestra ya preparada dentro de un espacio de almacenaje que posee el propio criostato a $-31\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se seleccionó el grosor de los cortes realizados en la configuración del criostato, en este caso $30\text{ }\mu\text{m}$ y se colocó la cuchilla. Se eliminó el OCT de la base realizando cortes y una vez se llegó a la zona del bloque que contiene la muestra, se emplean los portaobjetos especiales para bajas temperaturas que permiten que los cortes se adhieran de forma correcta.

Se almacenaron los cortes más relevantes y se repitió el proceso para todos los bloques de muestras preparados.

Observación en el microscopio y lupa

Se emplearon dos tipos de equipos para ver los cortes realizados. En primer lugar, se observaron los crio-cortes en el microscopio óptico invertido. El modelo empleado fue el Nikon Eclipse TS100-F que tiene integrado una cámara fotográfica con la que se pueden almacenar imágenes de lo que ves en los cortes. Este equipo puede darnos imágenes en un rango de 100 a 400 aumentos. Por otro lado, el segundo equipo empleado fue una lupa, que pertenece al servicio de microscopía de la UPV. El modelo empleado fue el MZ APO de la marca Leica, que también posee una cámara fotográfica integrada y proporciona un rango de aumentos desde 6.8 a 80.

Para poder realizar una fotografía se colocaron uno a uno todos los portaobjetos que contenían las muestras obtenidas del proceso anterior. Se recorre toda la muestra y una vez se ha elegido la zona

de interés y los aumentos que se desean, se realiza la fotografía y almacena teniendo en cuenta la escala y los aumentos, así como qué tipo de hidrogel se ha observado (Gel, Gel-PVDF, Gel-PVDF-CFO). Este proceso se repite cuantas veces se desee para obtener las imágenes que se consideren necesarias.

6.10. Cultivos celulares

6.10.1. Estático

Para estudiar la respuesta celular a los distintos materiales se emplearon células madre mesenquimales de médula ósea humana (hMSCs). Se llevaron a cabo cultivos cortos, en los que se estudió la proliferación en los siguientes tiempos: 3 h, 1, 3 y 7 días. Debido a la hipótesis postulada, se realizan pruebas en estático y en dinámico, o lo que es lo mismo, sin y con la aplicación de un campo magnético externo. Los pasos que se siguen para desarrollar el cultivo son prácticamente los mismos, lo único que se ve modificado son los estímulos que reciben las células en el hidrogel mientras están en el incubador.

Preparación de medios y esterilización de materiales

Previamente a la descongelación, se ha de planificar el experimento y preparar los medios y materiales que se van a emplear durante su duración. Aunque ya se ha explicado en el apartado “síntesis de hidrogeles con microesferas” cómo se adecuan las microesferas para obtener los hidrogeles, no se han especificado los últimos pasos requeridos para poder poner estas microesferas en contacto con las hMSCs. Lo que varía con respecto al anterior protocolo es que, en este caso, en el paso gradual de etanol a agua mQ, se realizan 3 incubaciones de 5 minutos en agitación con etanol al 70% v/v, lo que permite esterilizar las microesferas de cara al cultivo celular. Además, en el momento de la incubación con FBS se añade un 1% v/v de penicilina-estreptomicina, para asegurar la esterilidad.

El buffer CF-KRB una vez preparado se esterilizó mediante calor húmedo, en autoclave. Las distintas disoluciones de gelatina, peróxido de hidrógeno y HRP se esterizaron mediante filtración empleando filtros de nylon de 0.22 μm .

Por otro lado, los cultivos y pruebas realizadas han requerido de la síntesis de cuatro medios distintos que también deben ser preparados previamente a la descongelación. Las proporciones de los ingredientes para estos han sido:

- Medio Promocell
 - 89% v/v Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2.
 - 10% v/v Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 supplement.
 - 1% v/v Penicilina-Estreptomicina.

- Medio Basal
 - 86% v/v DMEM high glucose (w/o L-glutamin, w/o sodium pyruvate).
 - 1% v/v aminoácidos no esenciales (100X).
 - 1% v/v piruvato de sodio (100 mM).
 - 2% v/v Antibiotic Mix, que, al estar compuesto por varias sustancias, estas ocupan un porcentaje respecto al total del entre 0 y 2%. Estos porcentajes son 1.2% v/v L-glutamina (200 mM), 0.7% v/v penicilina-estreptomicina y 0.1% Fungizona.

- 10% v/v FBS.
- Medio Starving
 - Medio basal con déficit de FBS: Este déficit significa que el FBS pasa de componer un 10% v/v de la disolución a solo un 1% v/v. Por tanto, su fórmula es la misma que el basal, pero en lugar de ser un 86% v/v DMEM, es un 95% v/v.
- Medio sin rojo fenol (para MTS)
 - 83,3 % v/v de DMEM sin rojo fenol (5:6). Compuesto por
 - 10 g/L DMEM sin rojo fenol
 - 4.5 g/L Glucosa
 - 3.7 g/L bicarbonato sódico
 - 16,7 % v/v del reactivo MTS (1:6)

Descongelado y expansión celular

En la gran mayoría de cultivos, las células provienen de lotes comprados u obtenidos de seres vivos que se han almacenado congelados en tanques de nitrógeno líquido (DEWAR) para evitar riesgos e inconvenientes. En este caso, las hMSCs provenían de un lote comercial, por lo que el fabricante las había separado previamente en criotubos, que son poblaciones más pequeñas de células y permiten descongelar unas pocas y no comprometer al resto para realizar cultivos pequeños.

Este procedimiento se realizará en una cabina de flujo laminar, que mantendrá la esterilidad de los materiales empleados, las placas de cultivo y las propias células durante el ensayo. Todo el trabajo que implique manipular las células se debe hacer dentro de este tipo de cabinas.

Para descongelar las células sin dañarlas, se deben seguir una serie de instrucciones. En primer lugar, se descongelaron las hMSC en un baño a 37 °C durante un tiempo prudencial ya que el medio en el que se encuentran en el criotubo (medio de congelación) posee un 10 % v/v de DMSO, que es una sustancia tóxica a esa temperatura. El siguiente paso fue retirar el volumen de medio y células del criotubo y pasarlas a un falcon con 9 mL de medio basal fresco, para diluir el DMSO hasta concentraciones inofensivas para las células. Este falcon se centrifugó a 220 g durante 3 minutos, lo que permitió obtener un pellet y retirar el sobrenadante que contenía DMSO. Tras esto, se resuspendieron las células en medio Promocell, se contaron empleando una cámara Neubauer y se sembraron en un flascón T75 a una densidad de 300000 células/flascón. Se mantuvieron en medio Promocell 24 h, para favorecer su expansión.

Tras el descongelado de las células, estas deben expandirse. Para ello se emplea el medio comercial Promocell, que permite una rápida expansión celular obteniendo un gran número de células para su uso en los ensayos. Una vez han pasado 24 h, este medio se sustituyó por medio basal para que las células se adaptaran al medio en el que se iban a realizar los ensayos. Después de este cambio de medio, las células se mantuvieron 36 horas en el incubador.

En los cultivos se busca que las células actúen de una forma sincronizada. Para ello, se realizó una sincronización de los ciclos celulares de todas las que han proliferado durante el descongelado y tras este. El día de antes del ensayo es el momento en el que se produce la sincronización de los ciclos celulares, y para ello se cambió el medio basal por medio de starving, que se dejó toda la noche previa al inicio de la siembra en los materiales. El día inicial del cultivo, antes de gelificar los hidrogeles, se cambió de nuevo a medio basal, produciéndose una reactivación celular, antes de la inclusión en el hidrogel.

Siembra en hidrogel

En estas siembras, se buscó estudiar el comportamiento de las hMSCs dentro de las plataformas 3D sintetizadas. Para ello se prepararon geles de 50 μ L, que contenían 50000 células por hidrogel (Vaca-González et al., 2020). Se prepararon hidrogeles sin microesferas (Gel), con microesferas de PVDF (Gel-PVDF) y con microesferas de PVDF-CFO (Gel-PVDF-CFO). Se añadieron 3 réplicas por cada condición y un control del material (sin células) para cada una de las duraciones previstas. Por tanto, si se realizaron pruebas a 3 h, 1, 3 y 7 días, había un total de 12 hidrogeles por placa, 48 hidrogeles en total para los 4 tiempos.

Por un lado, necesitamos obtener una suspensión celular a partir de las células que hemos expandido en los flascos T75. Para obtener esta suspensión celular se retiró el medio de cultivo de los flascos y se realizó un lavado con 8 mL de DPBS. Tras lavar, se incubaron las células 3 minutos a 37 °C en 3 mL tripsina-EDTA, proteasa que digiere las proteínas implicadas en la adhesión celular. Una vez añadida la tripsina se obtuvo una suspensión celular, que se diluyó con 6 mL de medio basal, el FBS del cual permitió inhibir la tripsina y evitar el daño celular. Se recuperó la suspensión y se centrifugó 3 minutos a 220 g, para eliminar la tripsina. El pellet celular se resuspendió en 5 mL de medio limpio, y se procedió a contar las células empleando la cámara Neubauer. Una vez obtenida la densidad celular, se recuperó el volumen que contenía el número de células deseado, 50000 células por hidrogel, y se centrifugó 3 minutos a 220 g, para obtener un pellet celular.

Por otro lado, se mezclaron la gelatina y el HRP con las microesferas necesarias (si esta muestra las contiene). Tras esto, se añadió esta mezcla al pellet de células, homogeneizando bien todo el contenido. Se comenzaron a preparar los hidrogeles dentro de los pocillos de las placas de p48. Una vez estaban los hidrogeles listos, se añadió el volumen restante (10 % del final) de H₂O₂ para gelificarlos.

Se incubaron durante 20 minutos en el incubador y una vez se completó la gelificación, se añadió el medio basal a los pocillos y se introdujo de nuevo la placa en el incubador. Si el estudio fuera dinámico, la placa iría colocada en el biorreactor, que a su vez estaría dentro del incubador. El mantenimiento del cultivo comprende un cambio de medio cada 2 días y la extracción de los hidrogeles para la prueba de viabilidad en función del paso del tiempo.

6.10.2. Dinámico

El cultivo dinámico se diferencia del estático en que mientras las células están dentro del hidrogel y proliferando en el incubador, reciben un campo magnético que se controla mediante un biorreactor (Figura 11). Este biorreactor es capaz de generar un campo magnético alterno, ya que hay una serie de 48 imanes que coinciden con el diámetro de los pocillos de la placa de cultivo. Estos imanes se desplazan por debajo de los pocillos, mediante un movimiento horizontal, acercándose y alejándose de los mismos.

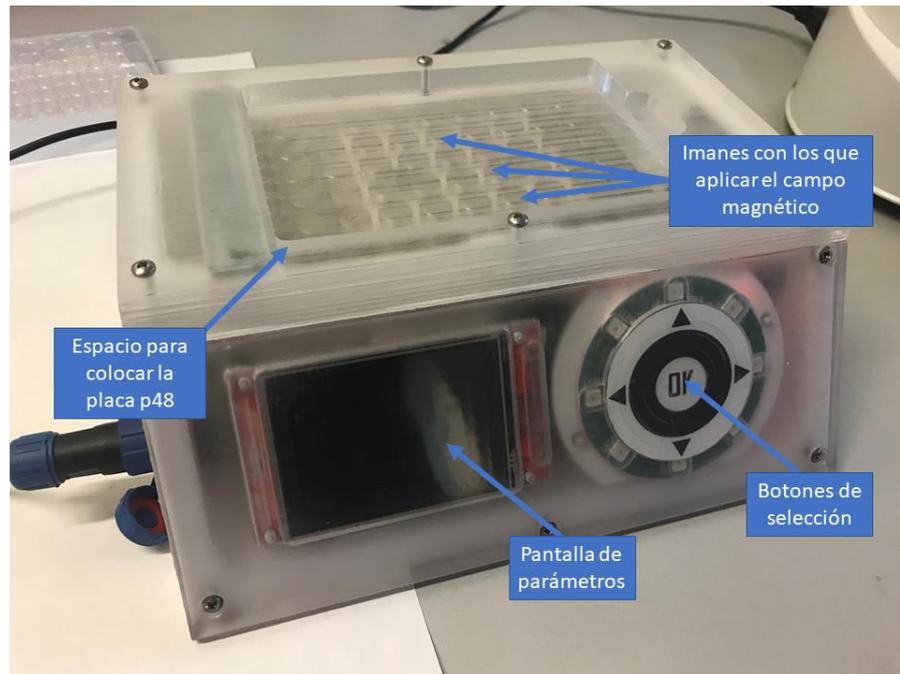


Figura 11. Biorreactor magnético empleado para el cultivo dinámico

En este caso, se emplea una única placa de cultivo p48 por biorreactor y este se coloca dentro del incubador. El biorreactor se configura con los siguientes parámetros:

- Desplazamiento de los imanes por debajo de la placa: 8 mm
- Frecuencia: 0.3 Hz
- Ciclos:
 - Ciclo corto: 5 minutos estimulación-25 minutos de reposo.
 - Ciclo largo: 16 h estimulación-8 h de reposo. Dentro de las 16 h del ciclo largo se repite el ciclo corto.

El biorreactor permite introducir ciclos cortos y largos de estimulación. Estos ciclos se han empleado para simular la estimulación a la que se ven sometidas las células en el interior de los huesos humanos, suponiendo 16 h horas de actividad diaria y 8 h de reposo. Estas condiciones permiten una variación del campo magnético en los pocillos que va desde los 230 a los 0 Oe (Fernandes et al., 2019).

Respecto al tratamiento de las células, las fases de cultivo son las mismas, así como la prueba para conocer la citotoxicidad y la proliferación celular, el MTS. Sin embargo, en este caso solo se realizaron pruebas a los tiempos 3 h, 1 y 3 días. Otra peculiaridad de este cultivo es que es necesario esperar 1 h tras la siembra para conectar el campo magnético.

6.11. Medida de la proliferación celular y citotoxicidad mediante MTS

Esta prueba se realiza con la finalidad de comprobar que las células son capaces de proliferar en la plataforma sintetizada, y, por ende, afirmar que los materiales que la componen no son citotóxicos para la población. Este método está basado en el hecho de que las células activas son capaces de reducir el MTS, mediante la actividad de las enzimas mitocondriales, y esta reducción produce un cambio de color (y absorbancia) en el medio. Si hay muchas células metabólicamente activas, la cantidad de MTS reducido será mayor. Los geles sin microesferas se utilizaron como control, ya que

se ha demostrado previamente que las células son viables una vez encapsuladas en su interior (Moulisova et al., 2017). Los geles control sin células se emplearon para detectar los niveles de absorbancia basal que produce la presencia del material.

Para poder introducir el MTS en el entorno del hidrogel, se debe preparar un nuevo medio de cultivo que lo contenga y en el que no haya rojo fenol. Se elimina este componente porque puede interferir en las medidas de absorbancia del ensayo. Previamente a su uso se filtró con un filtro de nylon de 0.22 μm para evitar contaminaciones en los hidrogeles.

Se retiró el medio basal de los hidrogeles y se realizaron dos lavados con DPBS para eliminar los restos de rojo fenol. Los geles se cambiaron a una nueva placa para evitar la presencia durante el ensayo de células que hayan podido quedar fuera del hidrogel en el momento de la encapsulación y se añadieron 350 μL de medio MTS. El motivo de añadir un volumen grande de medio es poder realizar 3 muestras técnicas, que no son más que 3 lecturas de la absorbancia del medio sin rojo fenol de cada hidrogel. Se devolvió la placa de cultivo al incubador y se dejó incubar durante 2 horas. Tras este periodo de tiempo, el metabolismo celular ha reducido el MTS y cambiado el color del medio (Figura 12). Para poder medirlo de forma cuantitativa se trasladó el medio MTS de la placa de cultivo a una placa de cultivo p96. Se midió la absorbancia a 490 y 690 nm en el espectrofotómetro de placas (Microplate reader Victor 3 PerkinElmer).

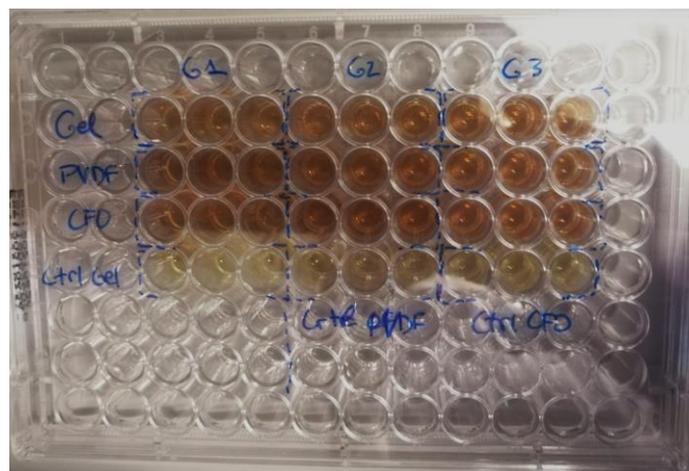


Figura 12. Placa p96 tras 2 horas incubando preparada para leer la absorbancia en el espectrofotómetro de placas

Para conocer la medida real de la absorbancia y por ende la actividad celular, se deben tratar los datos obtenidos para todas las duraciones por el espectrofotómetro de placas. En primer lugar, se debe restar a la absorbancia obtenida a 490 nm la absorbancia medida a 690 nm. Esto permite eliminar la influencia de posibles restos de hidrogel en la placa de medida. Después se realiza la media de las medidas técnicas de las muestras y la de los blancos (muestras de control, sin células) y se restan, obteniendo así el valor de absorbancia debido exclusivamente a la actividad celular. Tras esto, se emplea la muestra de la absorbancia a 3 h para normalizar el resultado del resto de duraciones respecto al tiempo 0 del ensayo y se aplica el logaritmo en base 2 de ese resultado para conocer cuántas veces ha sido capaz el cultivo de duplicar la población celular para dicho tiempo.

Con los datos correctamente tratados, se emplea el programa Excel para comprobar la normalidad de los valores muestrales obtenidos aplicando el test de Cochran de homocedasticidad para modelos equilibrados. Asimismo, se emplea GraphPad Prism 6 (Graphpad Software, United States) para realizar el test two-way ANOVA que permitan conocer si existen diferencias significativas entre grupos. Se aceptó la significancia estadística cuando el p-valor era menor que 0.05 ($p\text{-valor} < 0.05$).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez obtenidos los materiales necesarios para el cultivo (microesferas de PVDF, microesferas de PVDF-CFO y gelatina) y creada la plataforma en 3D, se procede a una caracterización de estos materiales. A su vez, a través de la encapsulación de las células en la mencionada plataforma en 3D, se realizan los ensayos de proliferación celular estáticos y dinámicos.

7.1. Caracterización morfológica de las microesferas

Una vez se han sintetizado las microesferas de PVDF y las de PVDF-CFO tal y como se explica en los apartados 6.2 y 6.3, se analizan en el FESEM siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4 para conocer datos morfológicos básicos, entre los que se encuentran el diámetro medio y la forma.

Morfología

Como se observa en la figura 12, las microesferas de PVDF y PVDF-CFO, respectivamente, obtenidas presentan una morfología esférica tras su síntesis. La técnica empleada y las concentraciones seleccionadas para sintetizar las microesferas deben proporcionar este tipo de morfologías esféricas.

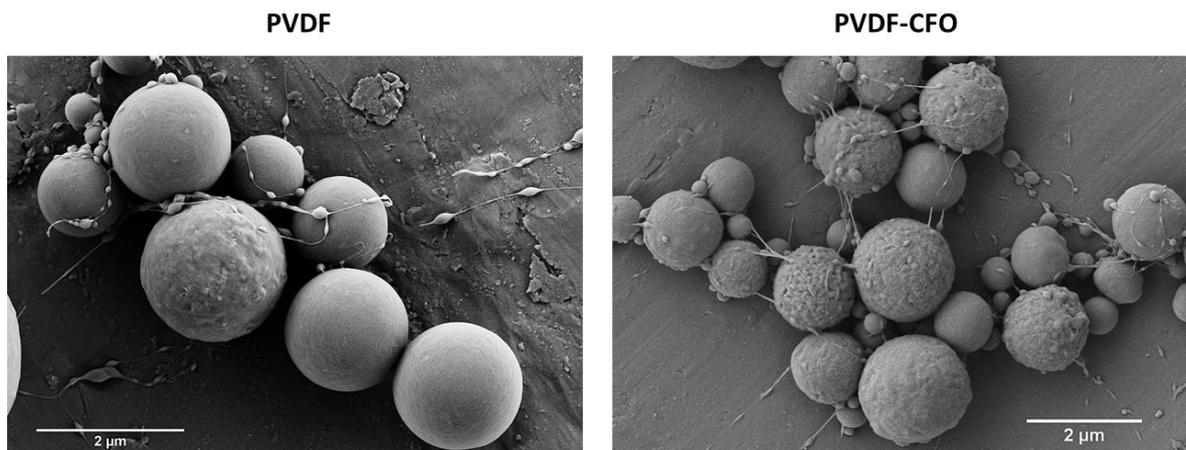


Figura 13. Imágenes representativas de los dos tipos de microesferas sintetizadas observadas en el FESEM

Esto se debe a que el porcentaje de polímero en las disoluciones empleadas para la síntesis es menor del 10 % w/v, como ya demostraron Correia et al. (Correia et al., 2014). En este trabajo se estudió la influencia de la concentración de PVDF en la disolución inicial sobre la morfología y el diámetro de las microesferas obtenidas. Concentraciones inferiores al 10% w/v son necesarias para obtener microesferas en el proceso de fabricación. En cambio, concentraciones superiores, entre el 10 y el 20 % w/v dan lugar a una mezcla de microesferas y fibras de PVDF, por encima del 20 % w/v se obtienen fibras, proceso conocido como electrospinning.

Diámetro

Siguiendo la metodología explicada en el apartado 6.4 para medir los diámetros y las desviaciones típicas de las microesferas se obtuvieron los siguientes datos:

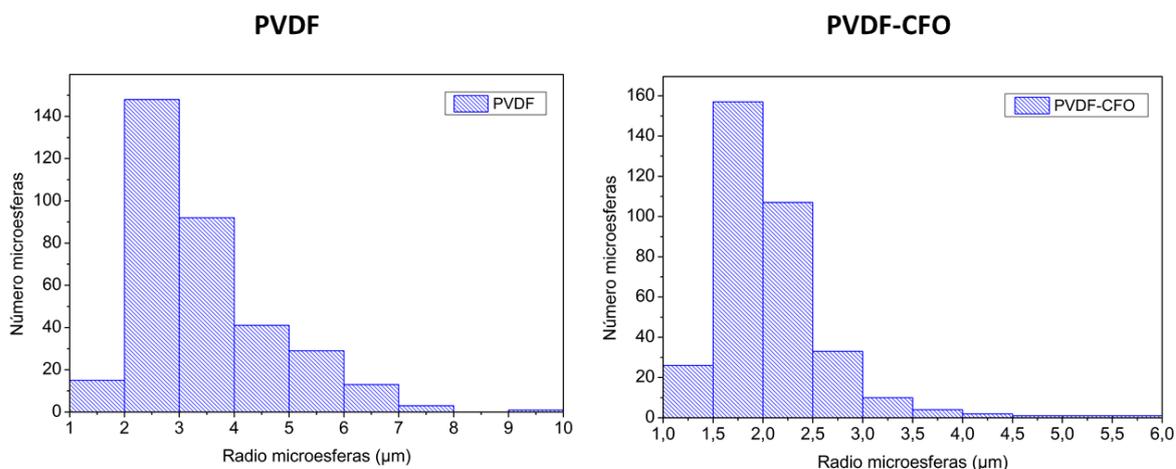


Figura 14. Distribución de los diámetros de los dos tipos de microesferas medidos

- Microesferas de PVDF: Diámetro medio de $3.2 \pm 1.3 \mu\text{m}$
- Microesferas PVDF-CFO: Diámetro medio $2.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$

Los diámetros medios obtenidos se asemejan a los resultados de otros trabajos bajo las mismas condiciones (Hermenegildo et al., 2019) donde se produjeron microesferas de $1.5 - 3 \mu\text{m}$ de diámetro, con concentraciones de PVDF del 4 % w/v (microesferas con CFO) y de $3-8 \mu\text{m}$ con concentraciones de 9 % w/v.

Comparando los diámetros, el de las microesferas de PVDF es mayor al de las microesferas de PVDF-CFO. Esto podría ser debido a que estas últimas se han producido a partir de una disolución con un menor porcentaje de polímero, así como a la influencia del CFO en la síntesis. Respecto a la primera hipótesis, la reducción en la concentración de polímero en la disolución inicial para la producción de las microesferas de PVDF-CFO es necesaria para que, al añadir un 20 % w/w de ferrita de cobalto, la disolución no quede excesivamente viscosa y no podamos emplear el electrospray por razones técnicas. Como ya demostraron Correia et al. 2014, la reducción de la concentración de polímero reduce el diámetro medio de las microesferas. Asimismo, respecto a la segunda, en el trabajo de Hermenegildo et al. (Hermenegildo et al., 2019) se encuentra una posible razón para que el diámetro medio de las microesferas disminuya en presencia del CFO en la disolución. Esto podría deberse a que, debido a la mayor densidad del CFO, hay menos polímero en la aguja para el mismo peso de material expulsado, lo que provoca esa ligera disminución del diámetro.

La combinación de ambos fenómenos puede explicar la reducción del diámetro medio de las microesferas que contienen ferrita de cobalto.

7.2. Determinación del grado de cristalinidad y fase β en las microesferas

Para conocer las propiedades de las microesferas que se han producido es necesario saber cómo se ha organizado las cadenas de PVDF en ellas, ya que en función de la organización que hayan logrado las mismas, su potencial electroactivo se verá modificado.

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se ha descrito como un método válido para determinar y cuantificar la presencia de las diferentes fases cristalinas. Martins et al. recogieron, en su artículo de revisión del 2014 (Martins et al., 2014), los picos característicos de cada una de las fases cristalinas vistas en este trabajo, más concretamente en el apartado 6.5 de este documento. No obstante, también profundizan en los parámetros de referencia del resto de fases y cómo lograr su diferenciación:

Tabla 2. Longitudes de onda características de las distintas fases cristalinas del PVDF mediante FTIR

	α	β	γ
Longitud de onda (cm^{-1})	488	510	431
	614	840*	512
	766	1279	776
	795		812
	855		833
	976		840*
			1234

Poniendo el foco sobre las fases cristalinas electroactivas β y γ , es de recibo comentar que son difíciles de diferenciar, debido a las semejanzas en sus conformaciones cristalinas. Esta semejanza de conformaciones resulta en valores de caracterización muy parecidos o incluso, coincidentes en las técnicas normalmente empleadas. Entre estos valores se encontrarían los picos de difracción de rayos X o las curvas de transmitancia del espectro infrarrojo de Fourier y sus picos (Boccaccio et al., 2002; Imamura et al., 2008).

Poniendo el foco en el espectro de FTIR, el asterisco nos marca una longitud de onda que parece que comparten las dos fases cristalinas. Sin embargo, es característico de β y para γ esta longitud de onda aparecerá desplazada hacia 835 con un codo ubicado en la longitud 833 cm^{-1} .

La fase β presenta tres picos característicos, 510, 840 y 1279 cm^{-1} . Como se ha comentado, el pico más característico es 840 cm^{-1} , que se emplea para la cuantificación de dicha fase. Sin embargo, debido a la ambigüedad de este pico, la detección del pico a 1279 cm^{-1} permite confirmar la presencia de la fase β (Martins et al., 2014).

En este caso, se puede detectar un pequeño codo en 1233 cm^{-1} , característico de la fase γ . Esto podría significar la presencia de una fracción de fase γ en las muestras. Basándose en la presencia de un pico mucho mayor en 1279 cm^{-1} , característico de fase β , y del no desplazamiento del pico de β a 833 cm^{-1} , se puede afirmar que la cantidad de fase γ es pequeña (Martins et al., 2014). Además, aunque en menor medida, su carácter electroactivo permite despreciar su contribución, asumiendo que las microesferas están únicamente compuestas por las fases α y β .

Se emplean los valores obtenidos a partir del gráfico correspondiente al FTIR siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.5 de este documento para obtener los porcentajes de fase α y β respecto al total de cristales que poseen las microesferas:

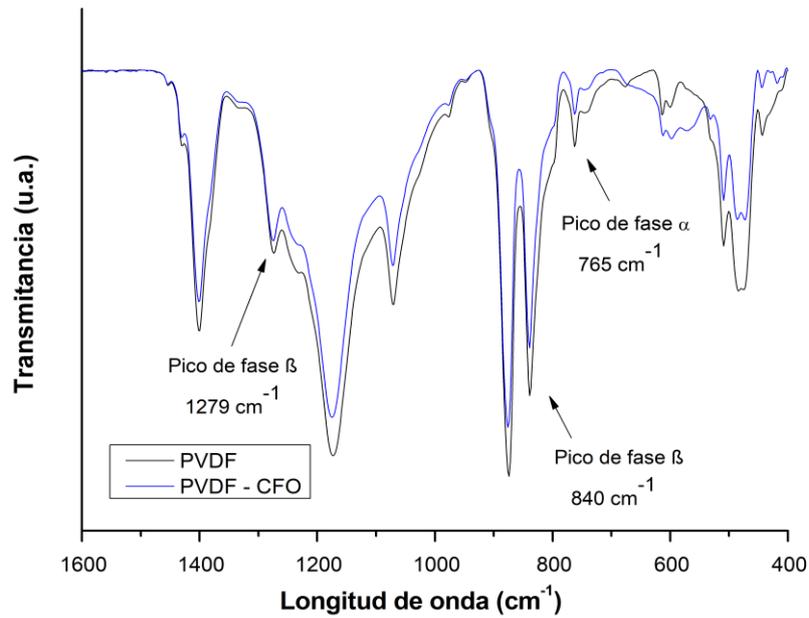


Figura 15. Espectro de FTIR de las dos clases de microsferas

Con los datos obtenidos a partir de la Figura 15 empleando las ecuaciones 1 y 2 se obtiene que los porcentajes son:

$$F(\beta)_{\text{PVDF}} = \frac{\Delta_{\beta}}{\left(\frac{K_{\beta}}{K_{\alpha}}\right)\Delta_{\alpha} + \Delta_{\beta}} = \frac{0.229}{1.26 * 0.033 + 0.229} = 0.848$$

$$F(\beta)_{\text{PVDF-CFO}} = \frac{\Delta_{\beta}}{\left(\frac{K_{\beta}}{K_{\alpha}}\right)\Delta_{\alpha} + \Delta_{\beta}} = \frac{0.261}{1.26 * 0.032 + 0.261} = 0.866$$

$$F(\alpha)_{\text{PVDF}} = \frac{\Delta_{\alpha}}{\left(\frac{K_{\alpha}}{K_{\beta}}\right)\Delta_{\beta} + \Delta_{\alpha}} = \frac{0.033}{0.794 * 0.229 + 0.033} = 0.152$$

$$F(\alpha)_{\text{PVDF-CFO}} = \frac{\Delta_{\alpha}}{\left(\frac{K_{\alpha}}{K_{\beta}}\right)\Delta_{\beta} + \Delta_{\alpha}} = \frac{0.032}{0.794 * 0.261 + 0.032} = 0.134$$

Tabla 3. Porcentajes de fases del PVDF de las 2 clases de microsferas sintetizadas

	PVDF	PVDF-CFO
Fase α	15.2 %	13.4 %
Fase β	84.8 %	86.6 %

A la vista de estos resultados, podemos considerar que se ha logrado sintetizar las microsferas con porcentajes de fase β mayores al 80 %. Esto permite aprovechar al máximo la piezoelectricidad del

material, pues esta fase es la más piezoeléctrica de todas las que presenta el PVDF (Martins et al., 2014).

Además, permite corroborar que la técnica del electrospray permite maximizar el porcentaje de fase β presente en el polímero sin necesidad de realizar más operaciones. Este fenómeno parece que se debe a varias razones, entre las que se encuentran la baja temperatura del proceso, que permite una cristalización a baja temperatura que nos da fase β . También, la rápida disolución de los solventes seleccionados para el polímero permite aumentar el efecto de la baja temperatura de cristalización. Otra de las razones parece ser el uso de altos voltajes, puesto que generan fuerzas de tracción en el jet del electrospray y dan lugar a la transición de fase α a fase β (Martins et al., 2014).

No obstante, pese a que el porcentaje de fase β sea altamente superior al de fase α , el PVDF es un polímero semicristalino que presenta una fase amorfa y otra cristalina. Para conocer cuál es el porcentaje real de cristales en las microesferas es necesario determinar el grado de cristalinidad (X_c). Esto se obtiene empleando la técnica del DSC tal y como se explica en el apartado 6.6:

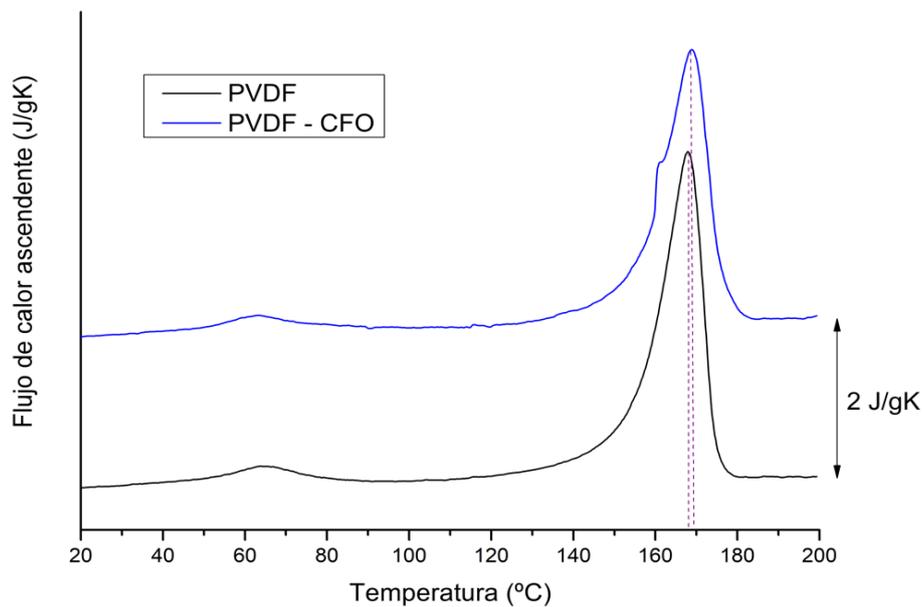


Figura 16. Termogramas de las dos clases de microesferas

$$X_{C-PVDF} = \frac{\Delta H}{x\Delta H_{\alpha} + y\Delta H_{\beta}} = \frac{59.080}{0.152 \cdot 93.7 + 0.848 \cdot 103.4} = 0.5796$$

$$X_{C-CFO} = \frac{\Delta H}{0,908(x\Delta H_{\alpha} + y\Delta H_{\beta})} = \frac{51.720}{0.908(0.134 \cdot 93.7 + 0.866 \cdot 103.4)} = 0.5579$$

Tabla 4. Resultados del DSC aplicados a las dos clases de microesferas sintetizadas

	PVDF	PVDF-CFO
Tm	167.9 °C	168.9 °C
Cristalinidad (Xc)	57.9 %	55.8 %

A la vista de los resultados obtenidos, es posible afirmar que las microesferas van a mantener sus propiedades a la temperatura basal del cuerpo, y a la que se van a realizar los cultivos (37 °C). De igual manera, se comprueba que los valores obtenidos para la temperatura de fusión están dentro de los rangos aceptables ya que tanto para la de fase α como para la β , el pico debe estar por debajo de 172 °C (Martins et al., 2014).

Respecto a la cristalinidad, es posible afirmar que el porcentaje de cristales es mayor a la mitad del total de material presente en las microesferas, logrando mejorar los resultados que han obtenido en otros grupos de investigación para los mismos materiales (Martins et al., 2011; Merlini et al., 2014). Asimismo, es visible que, en este caso, las microesferas de PVDF poseen un porcentaje de cristalinidad mayor que las de PVDF-CFO. Esto se le atribuye a que la presencia de la ferrita interfiere con la cristalización puesto que estas nanopartículas actúan de centro de nucleación e impiden el crecimiento de los cristales ya formados. Esto produce cristales más pequeños y con más defectos, lo que disminuye el porcentaje de cristalinidad total (Gonçalves et al., 2015).

7.3. Magnetización y porcentaje real de CFO en las microesferas

El estudio de la magnetización se realiza conforme a lo dispuesto en el apartado 6.7 con el objetivo de observar y valorar la respuesta de las microesferas de PVDF-CFO ante estímulos magnéticos y calcular el porcentaje real en masa de CFO que hay dentro de las microesferas.

En primer lugar, se obtiene el bucle de magnetización que genera la muestra de microesferas con PVDF-CFO ante un campo magnético que va desde los -18.5 KOe a los 18.5 KOe:

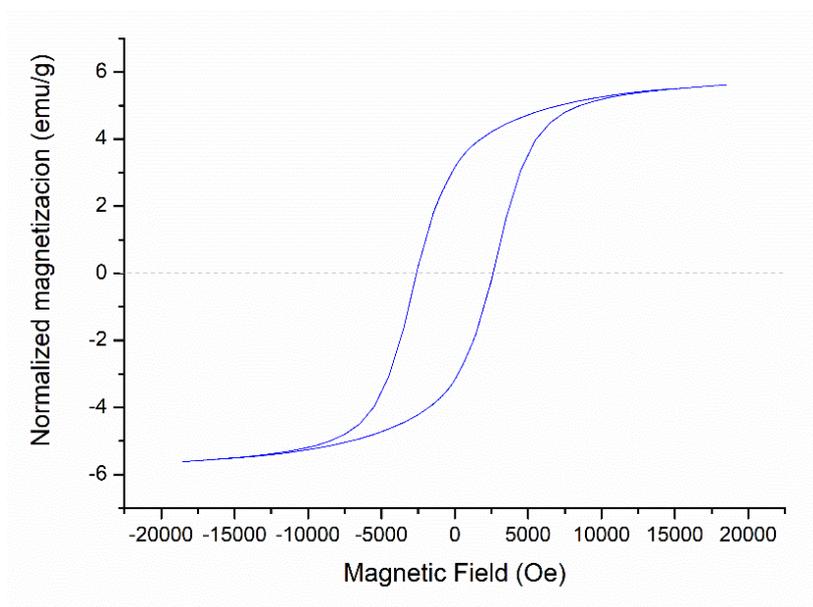


Figura 17. Curva de histéresis de las microesferas de PVDF-CFO

En segundo lugar, empleando el valor máximo de la magnetización observado en la muestra, el valor máximo de magnetización observado en una muestra de CFO puro y la ecuación 4 se obtiene el valor real de CFO en las microesferas:

$$CFO \% \text{ en microesferas} = \frac{5.52 \text{ emu/g}}{60 \text{ emu/g}} \times 100 = 9.2\%$$

Estos resultados indican que, durante el proceso de síntesis, se ha llegado a perder más de la mitad del CFO presente en la disolución inicial. Sin embargo, el material no se ha perdido como tal, sino que se ha concentrado en la zona inferior de la jeringuilla que se emplea para el electrospray debido a su mayor densidad, lo que ha propiciado que en el jet del electrospray la concentración de CFO disminuyera. Este fenómeno también se ha observado en otros trabajos con los mismos materiales, como el de Gonçalves et al. (Gonçalves et al., 2015).

Considerando el rendimiento del electrospray de la disolución PVDF-CFO y que los valores de CFO para que el efecto magnetoeléctrico sea máximo deben estar alrededor del 7 % en masa respecto al polímero, tal y como demuestran Martins y Gonçalves (Gonçalves et al., 2015), se añade de inicio el doble de la CFO que se busca (20 % en masa de CFO respecto a la masa de PVDF en la disolución).

Una vez se conoce el porcentaje real de CFO que hay presente en las microesferas, es necesario comprobar que las nanopartículas magnetostrictivas están distribuidas homogéneamente por la microesfera polimérica. Con esta finalidad se parten algunas microesferas empleando el FIB, y se complementa la información aportada anteriormente por el FESEM de las esferas enteras, observando las esferas por dentro. En este caso se realiza un procedimiento similar que en el trabajo de Vikingsson et al, pues se emplea un haz de iones de galio poco acelerados y el FESEM de 2 a 5 kV (Vikingsson et al., 2016). Así podemos ver el interior de las muestras (Figura 18).

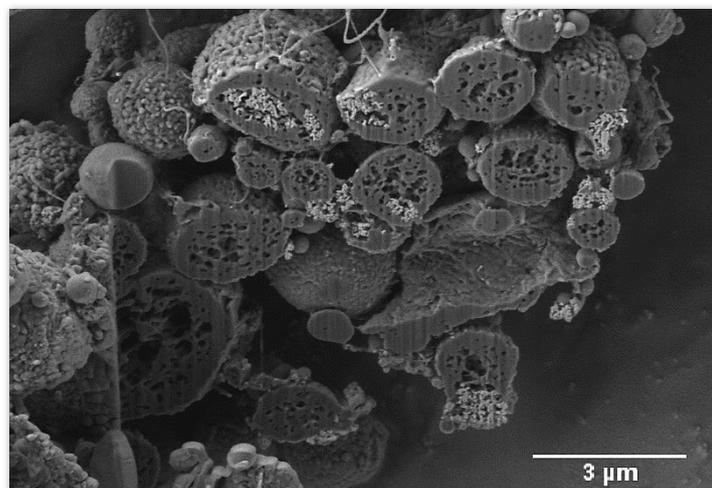


Figura 18. Imagen de un corte transversal de las microesferas de PVDF-CFO mediante FIB obtenida empleando el FESEM

Como se puede observar en la Figura 18, en algunas microesferas sí podría afirmarse que las nanopartículas están distribuidas por todo el interior de la esfera, no obstante, en otras, la aglomeración de nanopartículas está en el borde o incluso fuera de la matriz polimérica. Sin embargo, al comprobar que en su mayoría las microesferas presentan zonas de contacto entre la matriz polimérica y el CFO podemos esperar que sean capaces de transducir la deformación generada por el campo magnético a un estímulo eléctrico generado por el polímero piezoeléctrico a través del efecto magnetoeléctrico.

7.4. Distribución de las microesferas en el hidrogel

Para comprobar que las microesferas son capaces de distribuirse a través de todo el hidrogel una vez este gelifica, se obtienen unas crio-secciones a partir de unas muestras obtenidas conforme a lo dispuesto en los apartados 6.8 y 6.9. Los cortes se observaron tanto a través de una lupa a 12.5, 16 y 32 aumentos, como a través de un microscopio óptico sencillo que proporcionaba 100, 200 y 400 aumentos:

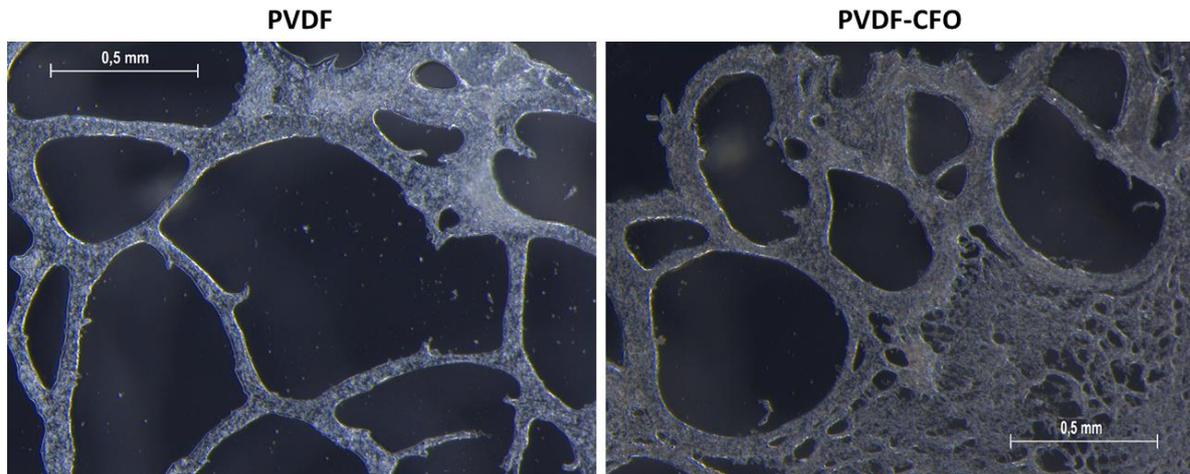


Figura 19. Imagen representativa de una crio-sección a dos hidrogel distintos con una lupa a 32 aumentos.

A tan pocos aumentos se pueden apreciar los grandes espacios y, por tanto, trabéculas estrechas, debido al bajo porcentaje de gelatina que se ha añadido respecto al volumen total de la disolución (2% w/v). En una situación de cultivo estos espacios estarían ocupados por medio de cultivo, ya que los hidrogel son redes poliméricas capaces de retener grandes cantidades de agua, u sustancias acuosas como el medio de cultivo, en su estructura sin disolverse.

También se puede apreciar cómo la red contiene las microesferas, que son de un color más cobrizo, repartidas por todas las trabéculas formando mayores o menores agregados.

Si se observan a más aumentos, las imágenes que se obtiene son las siguientes:

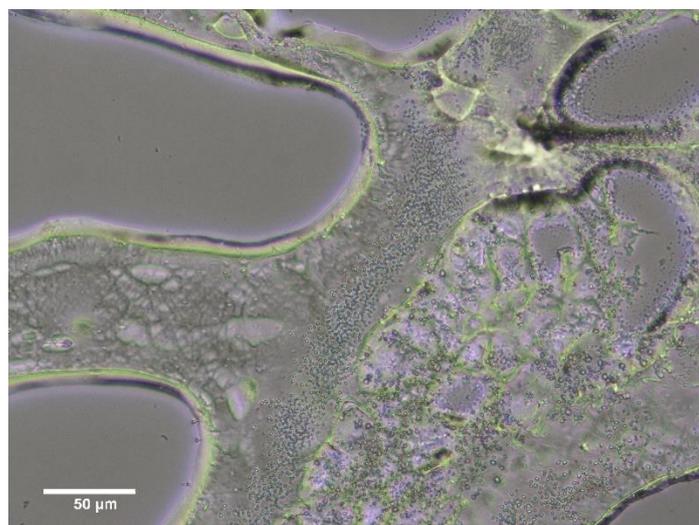


Figura 20. Imagen representativa de un crio-corte a un hidrogel de Gel sin microesferas tomada con un microscopio óptico

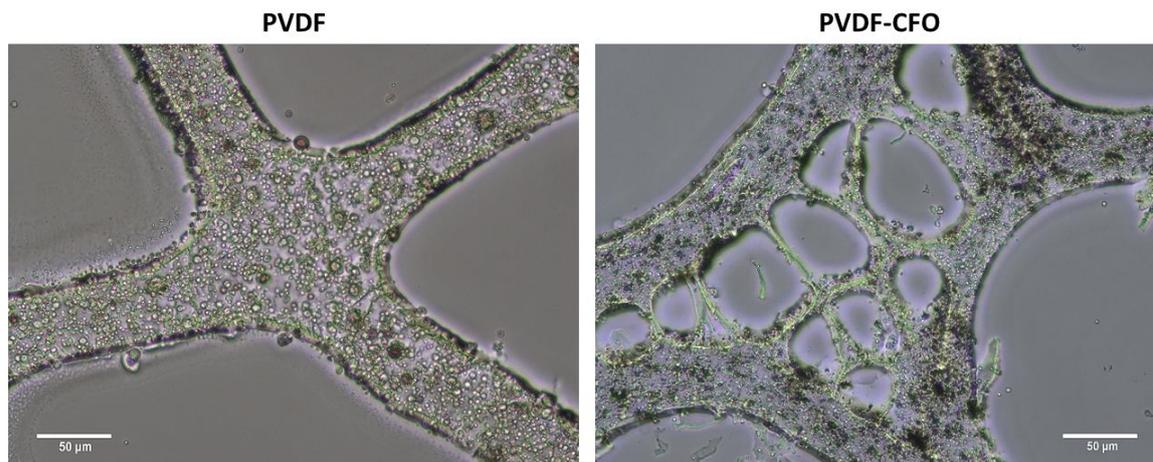


Figura 21. Imagen representativa de un crio-corte a un hidrogel con microesferas de PVDF y a otro de PVDF-CFO con un microscopio óptico.

Estas imágenes nos revelan que, efectivamente las microesferas son capaces de distribuirse homogéneamente en la matriz de gelatina y que esta gelifica de forma totalmente arbitraria en cada gel. También se puede observar que no solo hay una cantidad razonable de microesferas en los cúmulos visibles en la lupa, sino que en cada trabécula hay una gran cantidad de microesferas. En el momento del cultivo, las células se introducirán en las trabéculas del hidrogel junto con las microesferas, quedando retenidas después de la gelificación. Este elevado porcentaje de microesferas (40% w/v) permite generar un entorno en 3D en el cual las células se encuentran rodeadas y en contacto con las mismas, facilitando la aplicación de la estimulación electromecánica.

Otra de las cosas que se observa en estas imágenes es que, a tantos aumentos las microesferas de CFO, que a simple vista son más oscuras que las de PVDF, son del mismo color a nivel microscópico que las de PVDF. Se debe tener en cuenta que las partes negras que se ven en los cortes con microesferas se deben a pequeños cúmulos de estas que impiden el paso de la luz y provocan ese fenómeno óptico. Esto dificulta su diferenciación una vez embebidas en el gel, lo que remarca la importancia de identificar todas las muestras obtenidas y empleadas en el trabajo de laboratorio.

7.5. Cultivo celular: citotoxicidad y proliferación

Realizados los dos tipos de cultivos explicados en detalle en el apartado de materiales y métodos, se realiza la prueba de citotoxicidad y proliferación empleando la técnica del MTS. Se emplea esta técnica y no otras, como el Live-dead, que sí ofrece información directa sobre la viabilidad celular, ya que esta técnica se basa en el uso de la fluorescencia para determinar el número de células viables. El PVDF es un polímero altamente autofluorescente, y la presencia de las microesferas en el interior del gel hace imposible distinguir las células presentes en él. Por tanto, se emplea el MTS para determinar de forma indirecta la proliferación celular y con ella, si los materiales empleados son citotóxicos, puesto que si con el paso del tiempo, la población continúa aumentando, significa que los materiales no son tóxicos para las células cultivadas.

7.5.1. Estático

Como se ha explicado anteriormente, se definieron dos tipos de ensayo. Un primer ensayo en condiciones estáticas, es decir, sin estimulación magnética, y un segundo ensayo aplicando un

campo magnético mediante un biorreactor. Antes de tratar los datos se ha comprobado la normalidad de estos mediante el test de Cochran de homocedasticidad para modelos equilibrados, y una vez comprobada se han estudiado las diferencias significativas entre las varianzas mediante un two-way ANOVA. Los resultados obtenidos en el primer ensayo se muestran en la Figura 22:

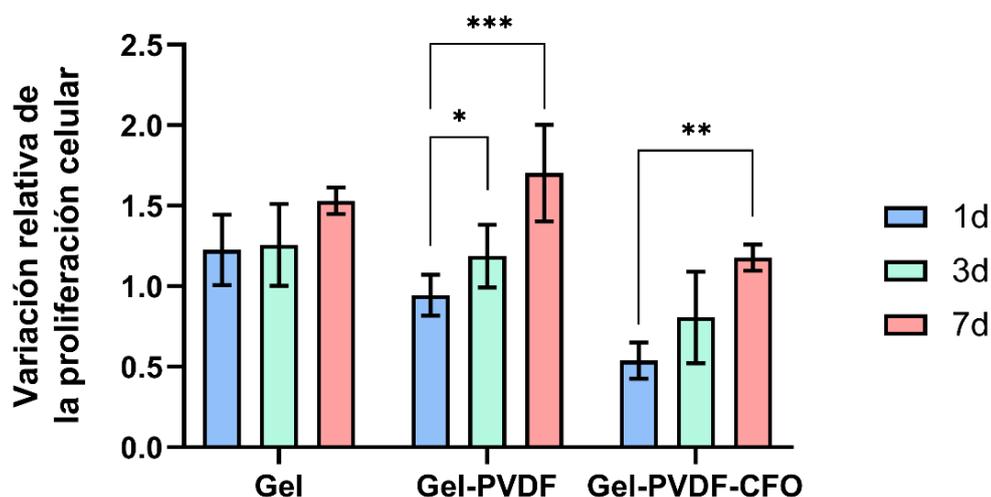


Figura 22. Gráfico de proliferación celular en función de los materiales empleados para sintetizar la plataforma 3D en cultivo estático. * p-valor < 0.05, ** p-valor < 0.01, *** p-valor < 0.001

Como se puede observar en la figura 22, durante las primeras 24 h de cultivo las células proliferan en todas las condiciones, alcanzando una duplicación poblacional en la condición que únicamente contiene gelatina (Gel). A pesar de que la duplicación poblacional que se produce en los geles que contiene microesferas es menor, observamos como las células también son capaces de proliferar en este tipo de constructos, indicando su no citotoxicidad.

Profundizando en el análisis de los datos, pasadas 24 h, se puede comprobar que el hidrogel de gelatina no influye en la proliferación celular y que, respecto a los otros materiales, no aporta grandes cambios en términos de proliferación. Estos resultados fueron previamente reportados por Mouslisova et al. 2017, donde no se observó proliferación de las hMSC en geles de gelatina cultivadas en medio basal durante 14 días (Mouslisova et al., 2017).

Por otro lado, respecto al hidrogel de gelatina y microesferas de PVDF (Gel-PVDF), sí se observa un incremento en la proliferación celular, pues se aprecian diferencias significativas entre los distintos tiempo estudiados (1, 3 y 7 días). En este caso, la proliferación aumenta entre los diferentes tiempos, ya que, en la primera duración (1 día) el valor de proliferación es mucho menor que el obtenido a 3 y aún más pequeña que la obtenida a 7 días. Esto permite afirmar que las microesferas de PVDF no generan interacciones perjudiciales con las células y que pueden estar en contacto con ellas, o lo que sería lo mismo, que son biocompatibles (Hermenegildo et al., 2019).

Finalmente, respecto al hidrogel de gelatina y microesferas de PVDF y nanopartículas de CFO (Gel-PVDF-CFO), se ve que solo existen diferencias significativas entre la proliferación en el primer tiempo y el último, donde ha aumentado la población celular. Esto parece indicar que, aunque la proliferación celular en esta condición a 24 h sea más reducida en comparación con los geles de gelatina, las células son capaces de proliferar. De hecho, no se observan diferencias significativas en términos de proliferación a 7 días entre las diferentes condiciones. En otras palabras, la presencia de microesferas reduce la proliferación inicial en los geles que las contienen, quizá por una muerte inicial más elevada, pero las células son capaces de proliferar y alcanzar los mismos

niveles de proliferación a 7 días que en los geles control. Con ello se puede descartar que la introducción de ferrita de cobalto en las microesferas genere efectos nocivos o citotóxicos en las hMSCs (Hermenegildo et al., 2019).

7.5.2. Dinámico

Tras comprobar que la presencia de las microesferas en el interior de los geles no resultaba citotóxica para las células madre mesenquimales, se decidió aplicar un campo magnético externo mediante un biorreactor. Se busca conocer cómo influye el campo magnético y las microesferas electroactivas al cultivo en términos de proliferación, en comparación con los cultivos estáticos. Además, se pueden extraer conclusiones sobre la influencia del campo magnético sobre las células, independientemente del constructo 3D en el que se encuentren.

De igual manera que en el cultivo estático, se ha comprobado la normalidad de los datos empleando el test de Cochran de homocedasticidad para modelos equilibrados y una vez comprobada se han estudiado las diferencias significativas entre las varianzas mediante un two-way ANOVA. Los resultados obtenidos empleando estímulos magnéticos se ven reflejados en la Figura 23:

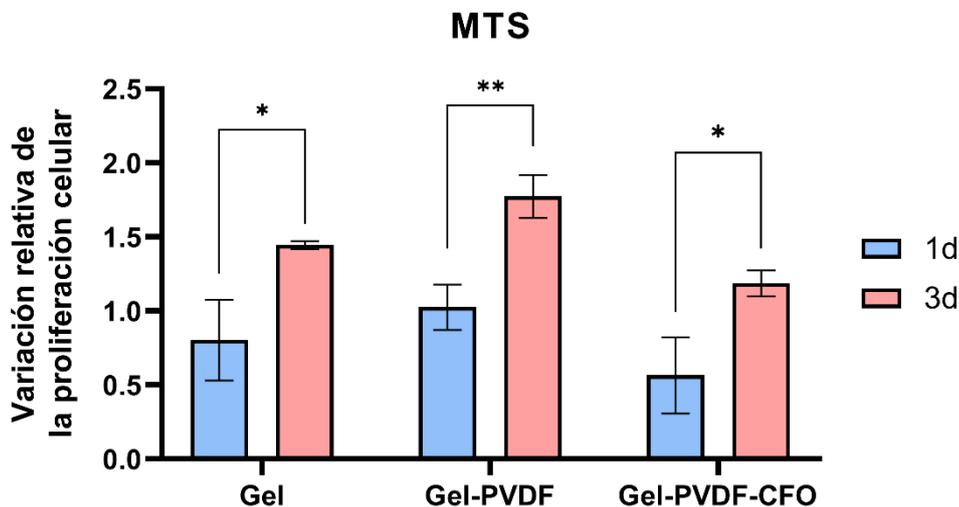


Figura 23. Gráfico de la proliferación celular en función de los materiales empleados para sintetizar la plataforma 3D en cultivo dinámico. * p-valor < 0.05, ** p-valor < 0.01

Viendo que las células han proliferado en todos los geles y duraciones, y teniendo en cuenta que en el estudio estático se comprueba que los materiales no son citotóxicos, se podría asumir que el campo magnético no es letal para las células. No obstante, es necesario analizar cómo ha afectado este campo magnético a las células en función del hidrogel en el que se sembraron.

Como se puede observar, existen diferencias estadísticamente significativas (p -valor < 0.05) entre los diferentes tiempos estudiados en todos los materiales. Esto indicaría que la población aumenta de una forma considerable entre 1 y 3 días, y como esto no sucedía en todos los materiales sin el campo magnético, puede que éste sea determinante en los resultados.

Asimismo, si se comparan los hidrogeles con microesferas respecto al que no las posee, se comprueba que no hay diferencias estadísticamente significativas entre esta plataforma y las demás, lo que podría indicar que la presencia de microesferas no altera los resultados pese a la estimulación, en términos de proliferación.

Este primer estudio en condiciones dinámicas permite observar que el propio campo tiene un efecto sobre la proliferación, sin embargo, no se observan diferencias significativas debidas a la estimulación producida por las microesferas que contienen ferrita de cobalto.

Por el momento, estos resultados permiten afirmar que la presencia de microesferas con y sin CFO en el interior de los geles no resulta citotóxica para las hMSC, tanto en condiciones estáticas como dinámicas.

Sin embargo, para poder afirmar algo más al respecto al efecto del propio campo magnético y la estimulación generada por las microesferas, sería necesario observar las células a duraciones mayores, como 14 o 21 días. Asimismo, teniendo en cuenta que la plataforma busca comprobar que un estímulo magnético en las plataformas diseñadas es capaz de diferenciar las hMSCs en linaje óseo con los mecanismos físico-químicos explicados en el presente documento, sería necesario comprobar en trabajos futuros, el linaje mediante identificadores o marcadores celulares específicos.

8. CONCLUSIONES

Las microesferas e hidrogeles han sido evaluados bajo el marco del presente Trabajo Fin de Grado. Una vez realizada la caracterización y el cultivo en los hidrogeles, y de acuerdo con los resultados obtenidos, las conclusiones que se extraen son las siguientes:

- Mediante el método del electrospray es posible sintetizar microesferas de PVDF con un alto porcentaje de fase β . Asimismo, esta técnica de síntesis de biomateriales permite la introducción de nanopartículas de CFO en las microesferas relativamente bien distribuidas por todo su volumen y en una proporción razonable para poder desarrollar su función, a pesar de que la mitad de la masa dispersada se retiene en la jeringa.
- Las microesferas se distribuyen homogéneamente dentro del hidrogel de gelatina, lo que permite que las células perciban una estimulación similar independientemente de su posición en el hidrogel.
- Los constructos en 3D con microesferas de PVDF y PVDF-CFO no afectan negativamente a la proliferación celular de las hMSC, es decir, no son citotóxicos. De igual forma, si a las microesferas les sumamos una estimulación externa basada en un campo magnético, el constructo tampoco perjudica al cultivo celular.
- El campo magnético parece tener un efecto en sí mismo sobre la proliferación celular, independientemente de la plataforma 3D empleada (Gel, Gel-PVDF, Gel-PVDF-CFO)

No obstante, el siguiente paso del trabajo sería estimular la plataforma con un campo magnético externo y comprobar mediante técnicas de biología molecular si se ha realizado la diferenciación de las hMSC al linaje óseo tras el estímulo.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abril Díaz, N., Antonio Bárcena Ruiz, J., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado Peinado, J., Toribio Meléndez-Valdés, F., & Túnez Fiñana, I. (n.d.). 8. *Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*.
- Amiri, S., & Shokrollahi, H. (2013). The role of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in medical science. *Materials Science and Engineering C*, 33(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.003>
- Baji, A., Mai, Y.-W., Yimnirun, R., & Unruan, S. (2014). *Electrospun barium titanate/cobalt ferrite composite fibers with improved magnetoelectric performance*. <https://doi.org/10.1039/c4ra09449b>
- Bassett, C. A. (1965). Electrical effects in bone. *Scientific American*, 213(4), 18–25. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1065-18>
- Boccaccio, T., Bottino, A., Capannelli, G., & Piaggio, P. (2002). Characterization of PVDF membranes by vibrational spectroscopy. *Journal of Membrane Science*, 210(2), 315–329. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(02\)00407-6](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(02)00407-6)
- Bock, N., Dargaville, T. R., & Woodruff, M. A. (2012). Electro spraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art. In *Progress in Polymer Science* (Vol. 37, Issue 11, pp. 1510–1551). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.03.002>
- Bruder, S. P., Fink, D. J., & Caplan, A. I. (1994). Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 56(3), 283–294. <https://doi.org/10.1002/jcb.240560303>
- Chato-Astrain, J., Carriel, V., Durand-Herrera, D., García-García, O., Sanchez-Porras, D., Diaz-Ramos, M., Albaladejo-Garcia, V., Irastorza-Lorenzo, A., Campos, F., & Garzon, I. (2018). Gelatin-crosslinked hydrogels for Tissue Engineering applications. A preliminar Study. *Actualidad Medica*, 103(803), 15–18. <https://doi.org/10.15568/am.2018.803.or02>
- Clara-Trujillo, S., Marín-Payá, J. C., Cordón, L., Sempere, A., Gallego-Ferrer, G., & Gómez-Ribelles, J. L. (2019). Biomimetic microspheres for 3D mesenchymal stem cell culture and characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.050>
- Correia, D. M., Gonçalves, R., Ribeiro, C., Sencadas, V., Botelho, G., Gómez-Ribelles, J. L., & Lanceros-Méndez, S. (2014). Electro sprayed poly(vinylidene fluoride) microparticles for tissue engineering applications. *RSC Advances*, 4(62), 33013–33021. <https://doi.org/10.1039/c4ra04581e>
- Costa, R., Ribeiro, C., Lopes, A. C., Martins, P., Sencadas, V., Soares, R., & Lanceros-Méndez, S. (2013). Osteoblast, fibroblast and in vivo biological response to poly(vinylidene fluoride) based composite materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(2), 395–403. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4808-y>
- Damaraju, S. M., Shen, Y., Elele, E., Khusid, B., Eshghinejad, A., Li, J., Jaffe, M., & Arinzeh, T. L. (2017). Three-dimensional piezoelectric fibrous scaffolds selectively promote mesenchymal

- stem cell differentiation. *Biomaterials*, 149, 51–62.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.024>
- Duval, K., Grover, H., Han, L. H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. In *Physiology* (Vol. 32, Issue 4, pp. 266–277). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
- Edwards, J. R., & Mundy, G. R. (2011). Advances in osteoclast biology: Old findings and new insights from mouse models. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(4), 235–243.
<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.23>
- EuroStemCell. (n.d.). *Células madre mesenquimales: las «otras» células madre de la médula ósea / Eurostemcell*. Retrieved April 29, 2020, from <https://www.eurostemcell.org/es/celulas-madre-mesenquimales-las-otras-celulas-madre-de-la-medula-osea>
- Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. (2014). *TEMA 2. FISIOPATOLOGÍA ÓSEA: CONCEPTO Y FUNCIONES* (p. 17).
https://www.edu.xunta.gal/centros/iesbeade/aulavirtual2/pluginfile.php/2758/mod_resource/content/0/TEJIDO_OSEO_PARA_COLGAR.pdf%0Ahttps://www.ucm.es/data/cont/docs/420-2014-02-18-01_fisiopatologia_osea.pdf
- Fernandes, M. M., Correia, D. M., Ribeiro, C., Castro, N., Correia, V., & Lanceros-Mendez, S. (2019). Bioinspired Three-Dimensional Magnetoactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(48), 45265–45275.
<https://doi.org/10.1021/acsami.9b14001>
- Fernandez-Yague, M. A., Abbah, S. A., McNamara, L. M., Zeugolis, D. I., Pandit, A., & Biggs, M. J. (2015). Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomaterial strategies ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, 1–29.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.005>
- Florencio-Silva, R., Rodrigues da Silva Sasso, G., & Sasso-Cerri, E. (2015). Biology of bone tissue. *BioMed Research International*, 17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Fukada, E., & Yasuda, I. (1957). On the Piezoelectric Effect of Bone. *Journal of the Physical Society of Japan*, 12(10), 1158–1162. <https://doi.org/10.1143/JPSJ.12.1158>
- García-Porrero, J. A., & Hurlé, J. M. (2013). Sección III: Aparato locomotor. In *Anatomía humana*. McGraw-hill Interamericana.
- Gimble, J. M., Guilak, F., Nuttall, M. E., Sathishkumar, S., Vidal, M., & Bunnell, B. A. (2008). In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells. In *Transfusion Medicine and Hemotherapy* (Vol. 35, Issue 3, pp. 228–238). Karger Publishers.
<https://doi.org/10.1159/000124281>
- Gonçalves, R., Martins, P., Correia, D. M., Sencadas, V., Vilas, J. L., León, L. M., Botelho, G., & Lanceros-Méndez, S. (2015). Development of magnetolectric CoFe₂O₄ /poly(vinylidene fluoride) microspheres. *RSC Advances*, 5(45), 35852–35857.
<https://doi.org/10.1039/c5ra04409j>
- Gorin, C., Rochefort, G. Y., Bascetin, R., Ying, H., Lesieur, J., Sadoine, J., Beckouche, N., Berndt, S., Novais, A., Lesage, M., Hosten, B., Vercellino, L., Merlet, P., Le-Denmat, D., Marchiol, C., Letourneur, D., Nicoletti, A., Vital, S. O., Poliard, A., ... Germain, S. (2016). Priming Dental

- Pulp Stem Cells With Fibroblast Growth Factor-2 Increases Angiogenesis of Implanted Tissue-Engineered Constructs Through Hepatocyte Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Secretion. *STEM CELLS Translational Medicine*, 5(3), 392–404. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0166>
- Gregorio, R. (2006). Determination of the α , β , and γ crystalline phases of poly(vinylidene fluoride) films prepared at different conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, 100(4), 3272–3279. <https://doi.org/10.1002/app.23137>
- Gregorio, R., & Cestari, M. (1994). Effect of crystallization temperature on the crystalline phase content and morphology of poly(vinylidene fluoride). *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 32(5), 859–870. <https://doi.org/10.1002/polb.1994.090320509>
- Halperin, C., Mutchnik, S., Agronin, A., Molotskii, M., Urenski, P., Salai, M., & Rosenman, G. (2004). Piezoelectric effect in human bones studied in nanometer scale. *Nano Letters*, 4(7), 1253–1256. <https://doi.org/10.1021/nl049453i>
- Hermenegildo, B., Ribeiro, C., Pérez-Álvarez, L., Vilas, J. L., Learmonth, D. A., Sousa, R. A., Martins, P., & Lanceros-Méndez, S. (2019). Hydrogel-based magnetoelectric microenvironments for tissue stimulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181(June), 1041–1047. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.023>
- Imamura, R., Silva, A. B., & Gregorio, R. (2008). $\gamma \rightarrow \beta$ Phase transformation induced in poly(vinylidene fluoride) by stretching. *Journal of Applied Polymer Science*, 110(5), 3242–3246. <https://doi.org/10.1002/app.28851>
- infogerontologia.com > patologías frecuentes*. (n.d.). Retrieved May 29, 2020, from https://www.infogerontologia.com/patologias/index_sist_oseo.html
- Jacob, J., More, N., Kalia, K., & Kapusetti, G. (2018). Piezoelectric smart biomaterials for bone and cartilage tissue engineering. *Inflammation and Regeneration*, 38(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0059-8>
- Kim, H. J., & Park, J.-S. (2017). Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. *Development & Reproduction*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.12717/dr.2017.21.1.001>
- Li, Y., Rodrigues, J., & Tomás, H. (2012). Injectable and biodegradable hydrogels: Gelation, biodegradation and biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2193–2221. <https://doi.org/10.1039/c1cs15203c>
- Liu, D., Nikoo, M., Okhan Boran, G. ", Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2015). Collagen and Gelatin. *The Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 527–557. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>
- Lukomska, B., Stanaszek, L., Zuba-Surma, E., Legosz, P., Sarzynska, S., & Drela, K. (2019). Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9628536>
- Martins, P., Lasheras, A., Gutierrez, J., Barandiaran, J. M., Orue, I., & Lanceros-Méndez, S. (2011). Optimizing piezoelectric and magnetoelectric responses on CoFe 2O₄/P(VDF-TrFE) nanocomposites. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(49). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/49/495303>

- Martins, P., Lopes, A. C., & Lanceros-Méndez, S. (2014). Electroactive phases of poly(vinylidene fluoride): Determination, processing and applications. *Progress in Polymer Science*, 39(4), 683–706. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.07.006>
- Merlini, C., Barra, G. M. O., Medeiros Araujo, T., & Pegoretti, A. (2014). Electrically pressure sensitive poly(vinylidene fluoride)/polypyrrole electrospun mats. *RSC Advances*, 4(30), 15749–15758. <https://doi.org/10.1039/c4ra01058b>
- Microscopía Electrónica de Barrido*. (n.d.). Retrieved May 30, 2020, from <http://www.scai.uma.es/areas/micr/sem/sem.html>
- Ministerio de Ciencia e Innovación - Gobierno de España. (2010). Materiales piezoeléctricos. *Vigilancia Tecnológica*. https://icono.fecyt.es/informespublicaciones/Documents/BVT_MAT_N3.pdf
- Morales-Román, R. M., Guillot-Ferriols, M., Roig-Pérez, L., Lanceros-Méndez, S., Gallego-Ferrer, G., & Gómez-Ribelles, J. L. (2019). Freeze-extraction microporous electroactive supports for cell culture. *European Polymer Journal*, 119, 531–540. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.07.011>
- Moulisova, 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>
- Poveda-Reyes, S., Moulisova, V., Sanmartín-Masiá, E., Quintanilla-Sierra, L., Salmerón-Sánchez, M., & Gallego-Ferrer, 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>
- Poveda-Reyes, S., Rodrigo-Navarro, A., Gamboa-Martínez, T. C., Rodríguez-Cabello, J. C., Quintanilla-Sierra, L., Edlund, U., & Gallego-Ferrer, G. (2015). Injectable composites of loose microfibers and gelatin with improved interfacial interaction for soft tissue engineering. *Polymer*, 74, 224–234. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.08.018>
- Reyes-Ortega, F., Rodríguez, G., Aguilar, M. R., García-Sanmartín, J., Martínez, A., & San Román, J. (2012). Comportamiento reológico de geles biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa. In *Biomecánica, volumen 20* (Vol. 20, pp. 7–19). Universidad Politécnica de Catalunya.
- Ribeiro, C., Correia, D. M., Ribeiro, S., Sencadas, V., Botelho, G., & Lanceros-Méndez, S. (2015). Piezoelectric poly(vinylidene fluoride) microstructure and poling state in active tissue engineering. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 15, Issue 4, pp. 351–356). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400144>
- Ribeiro, C., Moreira, S., Correia, V., Sencadas, V., Rocha, J. G., Gama, F. M., Gómez-Ribelles, J. L., & Lanceros-Méndez, S. (2012). Enhanced proliferation of pre-osteoblastic cells by dynamic piezoelectric stimulation. *RSC Advances*, 2(30), 11504–11509. <https://doi.org/10.1039/c2ra21841k>
- Ruoslahti, E. (1996). Rgd and Other Recognition Sequences for Integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12(1), 697–715. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.697>

- 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. (2016). *SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES INYECTABLES INSPIRADOS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS BLANDO*.
- 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>
- Sencadas, V., Gregorio Filho, R., & Lanceros-Méndez, S. (2006). Processing and characterization of a novel nonporous poly(vinylidene fluoride) films in the β phase. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 352(21–22), 2226–2229. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2006.02.052>
- Sencadas, V., Gregorio, R., & Lanceros-Méndez, S. (2009). α to β phase transformation and microstructural changes of PVDF films induced by uniaxial stretch. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 48(3), 514–525. <https://doi.org/10.1080/00222340902837527>
- Sobreiro-Almeida, R., Tamaño-Machiavello, M. N., Carvalho, E. O., Córdón, L., Doria, S., Senent, L., Correia, D. M., Ribeiro, C., Lanceros-Méndez, S., Sabater I Serra, R., Gómez-Ribelles, J. L., & Sempere, A. (2017). Human mesenchymal stem cells growth and osteogenic differentiation on piezoelectric poly(Vinylidene fluoride) microsphere substrates. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2391. <https://doi.org/10.3390/ijms18112391>
- Sociedad Española Terapia Génica y Celular. (2020). *Introducción a la Terapia Génica y la Terapia Celular*. <https://www.setgyc.es/información-de-interés/introducción-a-la-terapia-génica-y-la-terapia-celular.aspx>
- Taylor, P., Zhou, Z., Yang, Z., Kong, L., & Liu, L. (2012). *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics Preparation and Characterization of Hyaluronic Acid Hydrogel Blends with Gelatin Preparation and Characterization of Hyaluronic Acid Hydrogel Blends with Gelatin*. June 2013, 37–41. <https://doi.org/10.1080/00222348.2012.676355>
- Tortolini, P., & Rubio, S. (2012, December). Diferentes alternativas de rellenos óseos. *Avances En Periodoncia*, Vol.24, No.3, p.133-138. ISSN 1699-6585. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852012000300003
- Uz, M., Hondred, J. A., Donta, M., Jung, J., Kozik, E., Green, J., Sandquist, E. J., Sakaguchi, D. S., Claussen, J. C., & Mallapragada, S. (2020). Determination of Electrical Stimuli Parameters To Transdifferentiate Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells into Neuronal or Glial Lineages. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 6(1), 18–28. <https://doi.org/10.1007/s40883-019-00126-1>
- Vaca-González, J. J., Clara-Trujillo, S., Guillot-Ferriols, M., Ródenas-Rochina, J., Sanchis, M. J., Ribelles, J. L. G., Garzón-Alvarado, D. A., & Ferrer, G. G. (2020). Effect of electrical stimulation on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured in hyaluronic acid – Gelatin injectable hydrogels. *Bioelectrochemistry*, 134, 107536. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107536>
- Vikingsson, L., Vinals-Guitart, A., Valera-Martínez, A., Riera, J., Vidaurre, A., Gallego-Ferrer, G., & Gómez-Ribelles, J. L. (2016). Local deformation in a hydrogel induced by an external

magnetic field. *Journal of Materials Science*, 51(22), 9979–9990.

<https://doi.org/10.1007/s10853-016-0226-8>

Virjula, S., Zhao, F., Leivo, J., Vanhatupa, S., Kreutzer, J., Vaughan, T. J., Honkala, A. M., Viehrig, M., Mullen, C. A., Kallio, P., McNamara, L. M., & Miettinen, S. (2017). The effect of equiaxial stretching on the osteogenic differentiation and mechanical properties of human adipose stem cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 72, 38–48.

<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.04.016>

Wang, X., Zhang, L., Sun, D., An, Q., & Chen, H. (2009). Formation mechanism and crystallization of poly(vinylidene fluoride) membrane via immersion precipitation method. *Desalination*, 236(1–3), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.10.064>

Zhang, J., Yang, H., Abali, B. E., Li, M., Xia, Y., & Haag, R. (2019). Dynamic Mechanics-Modulated Hydrogels to Regulate the Differentiation of Stem-Cell Spheroids in Soft Microniches and Modeling of the Nonlinear Behavior. *Small*, 15(30). <https://doi.org/10.1002/sml.201901920>

DOCUMENTO II:
PRESUPUESTO

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN	71
2. CUADRO 1: MANO DE OBRA	71
3. CUADRO 2: MATERIALES	72
4. CUADRO 3: MAQUINARIA	74
5. CUADRO 4: PRECIOS DESCOMPUESTOS.....	76
6. PRESUPUESTOS PARCIALES	88
7. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL.....	90

1. INTRODUCCIÓN

En el presente documento se muestran los diferentes cálculos realizados para obtener el presupuesto del proyecto con tal de estudiar la viabilidad económica de este. Los capítulos que compondrán el presupuesto se corresponden con los apartados planteados en el punto de “materiales y métodos” del primer documento del presente trabajo. Los recursos se han clasificado en función de cuatro conceptos básicos: maquinaria, mano de obra, equipos de protección individual (EPIs) y la maquinaria empleada. De acuerdo con esta cuantificación económica, se han redactado los cuadros correspondientes a cada grupo, y tras estos, el cuadro de precios descompuestos y el presupuesto parcial.

Posteriormente, se calcula el presupuesto de ejecución material, por contrata y por último el presupuesto general.

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

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

Tabla 5. Clasificación de recursos

2. CUADRO 1: MANO DE OBRA

En la siguiente tabla se exponen los costes de los diferentes profesionales que han trabajado en el presente proyecto. Pese a que se ha considerado a la autora del documento como ingeniera biomédica, no ha recibido ninguna retribución económica por su trabajo.

Tabla 6. Cuadro de mano de obra

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio (€)	Cantidad	Precio total (€)
1	MO.1	Horas	Graduado en ingeniería biomédica	12,00	278,25	3.339,00
2	MO.2	Horas	Tutora responsable del proyecto	45,00	45,00	2.025,00
3	MO.3	Horas	Cotutora responsable del proyecto	20,00	84,50	1.690,00
Precio total de la mano de obra						7.054,00

3. CUADRO 2: MATERIALES

En la siguiente tabla se exponen los costes de los diferentes materiales empleados para obtener los productos del presente proyecto.

Tabla 7. Cuadro de materiales

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio (€)	Cantidad	Precio total (€)
1	EPI.01	ud	Bata de laboratorio	22,50	2,00	45,00
2	EPI.02	ud	Caja de guantes de latex (100 uds)	5,85	2,00	11,70
3	EPI.03	ud	Caja de guantes de nitrilo (100 uds)	7,95	1,00	7,95
4	EPI.04	ud	Par de guantes criogénicos	160,96	1,00	160,96
5	EPI.05	ud	Máscara para partículas	7,35	1,00	7,35
6	EPI.06	ud	Máscara para gases	30,60	1,00	30,60
7	EPI.07	ud	Visera de protección facial	8,50	1,00	8,50
8	MAT.01	g	Fluoruro de polivinilideno (PVDF) 6010	-	3,44	-
9	MAT.02	mL	N,N-Dimetilformamida (DMF)	0,06	56,10	3,48
10	MAT.03	mL	Tetrahidrofurano (THF)	0,07	9,90	0,64
11	MAT.04	g	Nanoparticulas de ferrita de cobalto (CFO)	1,00	0,50	0,50
12	MAT.05	mL	Tritón X-100	1,05	0,50	0,53
13	MAT.06	L	Nitrógeno líquido	43,50	12,50	543,75
14	MAT.07	g	Gelatina porcina tipo A	0,43	0,93	0,40
15	MAT.08	g	Hidrocloreuro de Tiramina	15,10	0,22	3,32
16	MAT.09	g	Ácido 2-(Nmorfino) etanosulfónico (MES)	2,85	0,04	0,11
17	MAT.10	g	N-hidroxisuccinimida (NHS)	3,85	0,04	0,15
18	MAT.11	g	N-(3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida) (EDC)	52,55	0,25	12,93
19	MAT.12	m	Membranas diálisis (12400 MWCO)	5,34	0,40	2,14
20	MAT.13	mL	Ácido clorhídrico (HCl)	0,42	2,00	0,84
21	MAT.14	g	Hidróxido de sodio (NaOH)	0,40	0,40	0,16
22	MAT.15	mL	Peroxidasa de rábano tipo IV (HRP)	0,40	0,02	0,01
23	MAT.16	mL	Peróxido de hidrógeno (H2O2)	7,25	0,02	0,11
24	MAT.17	g	Cloruro de sodio (NaCl)	0,16	0,67	0,11
25	MAT.18	g	Cloruro potásico (KCl)	0,17	0,04	0,01
26	MAT.19	g	Dihidrógeno fosfato de potasio (KH2PO4)	0,26	0,01	0,00
27	MAT.20	g	HEPES	0,85	0,60	0,51
28	MAT.21	L	Agua miliQ	0,20	0,17	0,03

CARACTERIZACIÓN DE UNA PLATAFORMA ELECTROACTIVA DE HIDROGEL-MICROESFERAS PARA LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

29	MAT.22	L	Agua destilada	0,20	44,00	8,80
30	MAT.23	mL	Tissue-tek OCT	0,24	15,00	3,60
31	MAT.24	ud	Portaobjetos especiales para baja temperatura	1,44	12,00	17,28
32	MAT.25	ud	Cuchilla criostato	2,00	1,00	2,00
33	MAT.26	mL	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	0,11	127,00	13,97
34	MAT.27	mL	Tripsina	0,15	8,00	1,20
35	MAT.28	L	Etanol 98%	3,95	0,41	1,62
36	MAT.29	mL	Suero fetal bovino (FBS)	0,38	21,95	8,34
37	MAT.30	ud	Placa cultivo p48- estéril	1,20	4,00	4,80
38	MAT.31	ud	Flascón cultivo T75	1,45	6,00	8,70
39	MAT.32	vial	Células madre mesenquimales de médula ósea (hMSCs)	738,50	2,00	1.477,00
40	MAT.33	mL	Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (PromoCell)	0,47	90,00	42,30
41	MAT.34	mL	Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 supplement (PromoCell)	0,40	9,00	3,60
42	MAT.35	mL	Penicilina-estreptomicina	0,27	3,58	0,97
43	MAT.36	L	Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) -high glucose (4.5 g/L) (Biowest)	40,00	0,33	13,20
44	MAT.37	g	Piruvato sódico	1,37	2,00	2,74
45	MAT.38	mL	Aminoácidos no esenciales	0,16	3,60	0,58
46	MAT.39	mL	L-glutamina	0,21	4,32	0,91
47	MAT.40	mL	Fungizona	0,57	0,36	0,21
48	MAT.41	mL	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS)	16,85	5,68	95,71
49	MAT.42	L	Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)- sin rojo fenol	83,20	0,03	2,50
50	MAT.43	g	Glucosa	0,04	0,12	0,00
51	MAT.44	g	Bicarbonato	0,04	0,10	0,00
52	MAT.45	ud	Placa cultivo p96-estéril	1,39	8,00	11,12
53	MAT.46	ud	Micropipeta 1000 µL (Themo)	215,00	1,00	215,00
54	MAT.47	ud	Micropipeta 200 µL (Themo)	215,00	1,00	215,00
55	MAT.48	ud	Micropipeta 20 µL (Themo)	215,00	1,00	215,00
56	MAT.49	ud	Pipeta electrónica "easypet3" (Eppendorf)	466,00	1,00	466,00
57	MAT.50	ud	Punta pipeta 25 mL	0,47	40,00	18,80
58	MAT.51	ud	Puntas micropipeta 100-1000 µL	0,03	350,00	10,50
59	MAT.52	ud	Puntas micropipeta 2-200 µL	0,04	290,00	11,60
60	MAT.53	ud	Eppendorf 1,5 mL	0,07	100,00	7,00
61	MAT.54	ud	Eppendorf 0,5 mL	0,06	50,00	3,00
62	MAT.55	ud	Tubos falcon 50 mL	0,12	25,00	3,00

63	MAT.56	ud	Tubos falcon 15 mL	0,10	6,00	0,60
64	MAT.57	ud	Pinzas laboratorio	8,99	1,00	8,99
65	MAT.58	ud	Espátula metálica laboratorio	3,99	2,00	7,98
66	MAT.59	ud	Espátula teflon laboratorio	1,99	1,00	1,99
67	MAT.60	ud	Frasco 50 mL	3,65	2,00	7,30
68	MAT.61	ud	Vaso precipitados 3 L	5,83	1,00	5,83
69	MAT.62	ud	Placa petri	1,95	2,00	3,90
70	MAT.63	m	Papel de aluminio	0,11	6,00	0,66
71	MAT.64	ud	Jeringuilla 6 mL	0,74	10,00	7,40
72	MAT.65	ud	Aguja para electrospray	0,40	2,00	0,80
73	MAT.66	m	Tubo elástico para electrospray	0,75	0,40	0,30
74	MAT.67	ud	Tamiz con tamaño de poro de 40 μ m	0,57	2,00	1,14
75	MAT.68	ud	Bolsas zip	0,12	10,00	1,20
Total precio materiales (€)						3.775,92

4. CUADRO 3: MAQUINARIA

Para conocer el coste de la maquinaria utilizada se emplea la amortización. Esta permite relativizar el coste de una máquina al comprarla en función de su vida útil y del uso dado. Debido a la naturaleza electrónica de la mayoría de los aparatos empleados, se selecciona como periodo de amortización (P_a) los 10 años que establece la Agencia Tributaria española para equipos electrónicos (*Tabla de coeficientes de amortización lineal. - Agencia Tributaria, n.d.*).

En la siguiente tabla se ha estimado el coste de cada equipo mediante la amortización de los equipos (A) siguiendo la ecuación (I). La ecuación consta del coste del equipo (C), periodo amortizado (P_a) y el tiempo que se ha utilizado el equipo (T_{uso}).

$$A = \frac{C \cdot T_{uso}}{P_a} \quad (\text{Ec. I})$$

Tabla 8. Cuadro de maquinaria

nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio (€)	Cantidad	Precio total (€)
1	MAQ.01	Horas	Balanza de precisión con pantalla de la marca Mettler Toledo, modelo XS104	0,29	10,00	2,91
2	MAQ.02	Horas	Agitador magnético OVAN miniMix	0,20	155,00	31,00

CARACTERIZACIÓN DE UNA PLATAFORMA ELECTROACTIVA DE HIDROGEL-MICROESFERAS PARA LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

3	MAQ.03	Horas	Ultraturrax marca IKA modelo T18	0,37	33,00	12,09
4	MAQ.04	Horas	NE 1000 higher pressure programmable single syringe pump	0,19	48,00	9,12
5	MAQ.05	Horas	FR Series 300 Watt regulated high voltage DC power supplies	0,76	48,00	36,48
6	MAQ.06	Horas	Vortex marca IKA, modelo MS 3 basic	0,09	1,50	0,14
7	MAQ.07	Horas	Baño de ultrasonidos	0,05	5,50	0,29
8	MAQ.08	Horas	Servicio de microscopia FESEM UPV	25,00	2,00	50,00
9	MAQ.09	Horas	Espectrofotómetro ALPHA FT-IR (Bruker)	4,28	0,50	2,14
10	MAQ.10	Horas	Calorímetro diferencial de barrido modelo DSC 1, marca Mettler Toledo	6,00	0,50	3,00
11	MAQ.11	Horas	Centrifugadora marca Eppendorf, modelo 5804R	3,63	5,40	19,58
12	MAQ.12	Horas	Incubadora CO2 Thermo Fisher Scientific VIOS 160i	2,12	425,00	899,97
13	MAQ.13	Horas	Liofilizadora (-80°C)	2,95	144,00	424,80
14	MAQ.14	Horas	Criostato manual marca Leica	2,88	6,50	18,70
15	MAQ.15	Horas	Microscopio óptico invertido Eclipse TS100 con cámara Nikon integrada	3,44	2,50	8,59
16	MAQ.16	Horas	Servicio de microscopía Lupa UPV	0,00	1,00	0,00
17	MAQ.17	Horas	PH-metro de sobremesa PH50 marca Violab	0,23	1,00	0,23
18	MAQ.18	Horas	Neubauer	0,01	1,00	0,01
19	MAQ.19	Horas	Campana de flujo laminar Faster TWO30	0,17	27,50	4,68
20	MAQ.20	Horas	Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector	2,49	7,00	17,46
21	MAQ.21	Horas	VSM Microsense 2 Tesla	0,00	0,50	1,88
22	MAQ.22	Horas	Congelador	0,63	2,50	1,58
23	MAQ.23	Horas	Biorreactor de estimulación magnética cedido por la Universitat de València	0,00	72,00	0,00
24	MAQ.24	Horas	Estufa WTC Binder	0,10	50,00	5,00
25	MAQ.25	Horas	Servicio microscopía FIB + FESEM UPV	35,00	1,00	35,00
Total precio maquinaria (€)						1.584,65

5. CUADRO 4: PRECIOS DESCOMPUESTOS

La siguiente tabla muestra el cuadro de precios. Para la simplificación de tabla y el posterior presupuesto parcial, se separa la tabla en capítulos y subcapítulos donde estos están estructurados de acuerdo con los procesos más importantes del procedimiento experimental del Trabajo Final de Grado.

Tabla 9. Cuadro de precios descompuestos

nº código	Descripción capítulo					
1. Síntesis microesferas PVDF						
1.1	Obtención de la disolución polimérica de PVDF (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Balanza de precisión	0,50	Horas	0,29	0,15	
	Agitador magnético	2,00	Horas	0,20	0,40	
	PVDF	0,72	g	0,00	0,00	
	DMF	6,80	mL	0,06	0,41	
	THF	1,20	mL	0,07	0,08	
	Graduada en ing. Biomédica	2,25	Horas	12,00	27,00	
	Costes indirectos	3,00	%	28,04	0,84	
	Recursos auxiliares	3,00	%	28,88	0,87	
Total del capítulo 1.1						
1.2	Electrospray microesferas PVDF (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Bomba flujo	12,00	Horas	0,19	2,28	
	Generador eléctrico	12,00	Horas	0,76	9,12	
	Nitrógeno líquido	3,25	L	43,50	141,38	
	Graduada en ing. Biomédica	13,00	Horas	12,00	156,00	
	Costes indirectos	3,00	%	308,78	9,26	
	Recursos auxiliares	3,00	%	318,04	9,54	
Total del capítulo 1.2						
1.3	Recogida y almacenamiento microesferas PVDF (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Etanol	0,10	L	3,95	0,40	
	Baño de ultrasonidos	0,25	Horas	0,05	0,01	
	Graduada en ing. Biomédica	2,50	Horas	12,00	30,00	
	Costes indirectos	3,00	%	30,41	0,91	

	Recursos auxiliares	3,00	%	31,32	0,94	
Total del capítulo 1.3						32,26
2. Síntesis microesferas PVDF-CFO						
2.1	Obtención de la disolución polimérica de PVDF-CFO (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Balanza de precisión	1,00	Horas	0,29	0,29	
	Ultraturrax	2,50	Horas	0,37	0,93	
	PVDF	1,00	g	0,00	0,00	
	Ferrita de cobalto	0,25	g	1,00	0,25	
	DMF	21,25	mL	0,06	1,28	
	THF	3,75	mL	0,07	0,26	
	Tritón x100	0,25	mL	1,05	0,26	
	Graduada en ing. Biomédica	2,25	Horas	12,00	27,00	
	Costes indirectos	3,00	%	30,27	0,91	
	Recursos auxiliares	3,00	%	31,17	0,94	
Total del capítulo 2.1						32,11
2.2	Electrospray microesferas PVDF-CFO (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Bomba flujo	12,00	Horas	0,19	2,28	
	Generador eléctrico	12,00	Horas	0,76	9,12	
	Ultraturrax	14,00	Horas	0,37	5,18	
	Nitrógeno líquido	3,00	L	43,50	130,50	
	Graduada en ing. Biomédica	13,00	Horas	12,00	156,00	
	Costes indirectos	3,00	%	303,08	9,09	
	Recursos auxiliares	3,00	%	313,11	9,39	
Total del capítulo 2.2						321,57
2.3	Recogida y almacenamiento microesferas PVDF-CFO (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Etanol	0,09	L	3,95	0,36	
	Bañera de ultrasonidos	0,25	Horas	0,05	0,01	
	Graduada en ing. Biomédica	3,00	Horas	12,00	36,00	
	Costes indirectos	3,00	%	36,37	1,09	
	Recursos auxiliares	3,00	%	37,46	1,12	
Total del capítulo 2.3						38,58
3. Caracterización de las microesferas						
3.1	Tamaño y morfología de las microesferas en el FESEM	Cantidad	Unidad	Precio por	Precio parcial (€)	Precio total (€)

				unidad (€/ud)		
	Servicio microscopía FESEM UPV	2,00	Horas	25,00	50,00	
	Software Image J	4,00	Horas	0,00	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	6,00	Horas	12,00	72,00	
	Cotutora responsable del proyecto	2,00	Horas	20,00	40,00	
	Costes indirectos	3,00	%	162,00	4,86	
	Recursos auxiliares	3,00	%	166,86	5,01	
Total del capítulo 3.1						171,87
3.2	Tipos de fases cristalinas en las microesferas empleando el FT-IR	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Espectrofotómetro de infrarrojos	0,50	Horas	4,28	2,14	
	Software Excel	1,75	Horas	0,00	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	2,25	Horas	12,00	27,00	
	Cotutora responsable del proyecto	1,00	Horas	20,00	20,00	
	Costes indirectos	3,00	%	49,14	1,47	
	Recursos auxiliares	3,00	%	50,61	1,52	
Total del capítulo 3.2						52,13
3.3	Cuantificación de fase cristalina en las microesferas empleando el DSC	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Calorímetro diferencial de barrido	0,50	Horas	6,00	3,00	
	Balanza de precisión	0,50	Horas	0,29	0,15	
	Software Excel	2,00	Horas	0,00	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	1,50	Horas	12,00	18,00	
	Cotutora responsable del proyecto	0,50	Horas	20,00	10,00	
	Costes indirectos	3,00	%	31,15	0,93	
	Recursos auxiliares	3,00	%	32,08	0,96	
Total del capítulo 3.3						33,04
3.4	Porcentaje real masa CFO en las microesferas con VSM	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	VSM Microsense 2 Tesla	0,50	Horas	0,00	0,00	

	Envío materiales al instituto BCMaterials (Bilbao)	1,00	Paquete	20,00	20,00	
	Software Excel	1,00	Horas	0,00	0,00	
	Servicio Microscopía FIB + FESEM UPV	1,00	Horas	35,00	35,00	
	Graduada en ing. Biomédica	0,50	Horas	12,00	6,00	
	Costes indirectos	3,00	%	61,00	1,83	
	Recursos auxiliares	3,00	%	62,83	1,88	
Total del capítulo 3.4						64,71
4. Síntesis de Gel-Tyr						
4.1	Injerto de tiramina en gelatina (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Balanza de precisión	1,00	Horas	0,29	0,29	
	Agitador magnético	2,00	Horas	0,20	0,40	
	Estufa 37°C	24,00	Horas	0,10	2,40	
	PH-metro	0,50	Horas	0,23	0,12	
	Hidrocloreuro de Tiramina	0,11	g	15,10	1,66	
	Gelatina	0,40	g	0,43	0,17	
	EDC	123,00	mg	0,05	6,15	
	Ácido clorhídrico	1	mL	0,42	0,42	
	Hidróxido de sodio	0,2	g	0,4	0,08	
	NHS	0,02	g	3,85	0,08	
	MES	0,20	g	2,85	0,57	
	Agua miliQ	0,02	L	0,20	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	3,50	Horas	12,00	42,00	
	Costes indirectos	3,00	%	54,34	1,63	
	Recursos auxiliares	3,00	%	55,97	1,68	
Total del capítulo 4.1						57,65
4.2	Purificación de la gelatina con injerto de tiramina (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Membrana diálisis (12400 MWCO)	0,20	m	5,34	1,07	
	Agua destilada	22,00	L	0,20	4,40	
	Agitador magnético	72,00	Horas	0,20	14,40	
	Graduada en ing. Biomédica	2,75	Horas	12,00	33,00	
	Costes indirectos	3,00	%	52,87	1,59	
	Recursos auxiliares	3,00	%	54,45	1,63	
Total del capítulo 4.2						56,09

4.3	Liofilización de la gelatina con injerto de tiramina (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Liofilizadora (-80°C)	72,00	Horas	2,95	212,40	
	Graduada en ing. Biomédica	0,50	Horas	12,00	6,00	
	Costes indirectos	3,00	%	218,40	6,55	
	Recursos auxiliares	3,00	%	224,95	6,75	
Total del capítulo 4.3						231,70
5. Síntesis del hidrogel con microesferas						
5.1	Preparación del buffer CF-KRB (100mL)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Agua miliQ	0,10	L	0,20	0,02	
	Cloruro de sodio	0,67	g	0,16	0,11	
	Cloruro potásico	0,04	g	0,17	0,01	
	HEPES	0,60	g	0,85	0,51	
	Fosfato monopotásico	0,01	g	0,26	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	1,00	Horas	12,00	12,00	
	Costes indirectos	3,00	%	12,65	0,38	
	Recursos auxiliares	3,00	%	13,03	0,39	
Total del capítulo 5.1						13,42
5.2	Acondicionamiento microesferas	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Balanza de precisión	0,50	Horas	0,29	0,15	
	Centrífuga	1,50	Horas	3,63	5,45	
	Vortex MS 3 Basic	0,50	Horas	0,09	0,05	
	Bañera de ultrasonidos	1,50	Horas	0,05	0,08	
	Etanol	0,01	L	3,95	0,04	
	Agua miliQ	0,01	L	0,20	0,00	
	DPBS	16,00	mL	0,11	1,76	
	Microesferas	4,00	mg	0,00	0,00	
	Penicilina-streptomina	0,02	mL	0,27	0,01	
	FBS	0,05	mL	0,38	0,02	
	Graduada en ing. Biomédica	4,50	Horas	12,00	54,00	
	Costes indirectos	3,00	%	61,54	1,85	
	Recursos auxiliares	3,00	%	63,38	1,90	
Total del capítulo 5.2						65,28
5.3	Gelificación del hidrogel (9 uds)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)

	Estufa 37°C	2,00	Horas	0,10	0,20	
	Balanza de precisión	1,00	Horas	0,29	0,29	
	Agitador magnético	2,00	Horas	0,20	0,40	
	CF-KRB	1,30	mL	0,00	0,00	
	Gelatina	9,00	mg	0,01	0,09	
	HRP	0,003	mL	0,04	0,00	
	Peróxido de hidrógeno	0,003	mL	0,01	0,00	
	Microesferas	1,95	mg	0,00	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	2,00	Horas	12,00	24,00	
	Costes indirectos	3,00	%	24,98	0,75	
	Recursos auxiliares	3,00	%	25,73	0,77	
Total del capítulo 5.3						26,50
6. Obtención de cortes histológicos del hidrogel						
6.1	Inclusión en OCT	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Congelador	2,50	Horas	0,63	1,58	
	Tissue-Tek OCT	15,00	mL	0,24	3,60	
	Graduada en ing. Biomédica	1,00	Horas	12,00	12,00	
	Costes indirectos	3,00	%	17,18	0,52	
	Recursos auxiliares	3,00	%	17,69	0,53	
Total del capítulo 6.1						18,22
6.2	Cortes en el criostato	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Criostato	6,50	Horas	2,88	18,72	
	Portaobjetos especiales	12,00	ud	1,44	17,28	
	Graduada en ing. Biomédica	6,50	Horas	12,00	78,00	
	Costes indirectos	3,00	%	114,00	3,42	
	Recursos auxiliares	3,00	%	117,42	3,52	
Total del capítulo 6.2						120,94
6.3	Observación de los cortes	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Servicio de microscopía UPV (Lupa)	1,00	Horas	13,00	13,00	
	Microscopio óptico invertido con cámara fotográfica	2,50	Horas	3,44	8,60	
	Graduada en ing. Biomédica	3,50	Horas	12,00	42,00	

	Cotutora responsable del proyecto	1,50	Horas	20,00	30,00	
	Costes indirectos	3,00	%	93,60	2,81	
	Recursos auxiliares	3,00	%	96,41	2,89	
Total del capítulo 6.3						99,30
7. Preparación medios de cultivo						
7.1	Medio Promocell (100 mL)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Campana de flujo laminar	0,50	Horas	0,17	0,09	
	Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2	90,00	mL	0,47	42,30	
	Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 supplement	9,00	mL	0,40	3,60	
	Penicilina-streptomicina	1,00	mL	0,27	0,27	
	Graduada en ing. Biomédica	0,50	Horas	12,00	6,00	
	Cotutora responsable del proyecto	0,50	Horas	20,00	10,00	
	Costes indirectos	3,00	%	62,17	1,87	
	Recursos auxiliares	3,00	%	64,04	1,92	
Total del capítulo 7.1						65,96
7.2	Medio Basal (90 mL)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Campana de flujo laminar	0,50	Horas	0,17	0,09	
	DMEM high glucose	77,40	mL	0,04	3,10	
	Aminoácidos no esenciales	0,90	mL	0,16	0,14	
	Piruvato de sodio	0,50	g	1,37	0,69	
	FBS	9,00	mL	0,38	3,42	
	L-Glutamina	1,08	mL	0,21	0,23	
	Fungizona	0,09	mL	0,57	0,05	
	Penicilina-streptomicina	0,63	mL	0,27	0,17	
	Graduada en ing. Biomédica	0,50	Horas	12,00	6,00	
	Cotutora responsable del proyecto	0,50	Horas	20,00	10,00	
	Costes indirectos	3,00	%	23,79	0,71	
	Recursos auxiliares	3,00	%	24,51	0,74	
Total del capítulo 7.2						25,24

7.3	Medio Starving (90 mL)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Campana de flujo laminar	0,50	Horas	0,17	0,09	
	DMEM high glucose	85,50	mL	0,04	3,42	
	Aminoácidos no esenciales	0,90	mL	0,16	0,14	
	Piruvato de sodio	0,50	g	1,37	0,69	
	FBS	0,90	mL	0,38	0,34	
	L-Glutamina	1,08	mL	0,21	0,23	
	Fungizona	0,09	mL	0,57	0,05	
	Penicilina-streptomina	0,63	mL	0,27	0,17	
	Graduada en ing. Biomédica	0,50	Horas	12,00	6,00	
	Cotutora responsable del proyecto	0,50	Horas	20,00	10,00	
	Costes indirectos	3,00	%	21,12	0,63	
	Recursos auxiliares	3,00	%	21,76	0,65	
Total del capítulo 7.3						22,33
7.4	Medio MTS (17 mL)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Campana de flujo laminar	1,00	Horas	0,17	0,17	
	DMEM sin rojo fenol	0,014	L	83,20	1,16	
	Glucosa	0,06	g	0,04	0,00	
	Bicarbonato	0,05	g	0,04	0,00	
	Reactivo MTS	2,84	mL	16,85	47,85	
	Graduada en ing. Biomédica	0,50	Horas	12,00	6,00	
	Cotutora responsable del proyecto	0,50	Horas	20,00	10,00	
	Costes indirectos	3,00	%	65,19	1,96	
	Recursos auxiliares	3,00	%	67,15	2,01	
Total del capítulo 7.4						68,99
8. Cultivo celular y análisis de resultados						
8.1	Descongelado y expansión celular (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Células madre mesenquimales	0,05	Criotubo	738,50	36,93	
	Incubadora	84,00	Horas	2,12	178,08	
	Neubauer	0,25	Horas	0,01	0,00	

CARACTERIZACIÓN DE UNA PLATAFORMA ELECTROACTIVA DE HIDROGEL-MICROESFERAS PARA LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

	Campana de flujo laminar	3,00	Horas	0,17	0,51	
	Centrífuga	0,20	Horas	3,63	0,73	
	Medio Promocell	9,00	mL	0,00	0,00	
	Medio Basal	18,00	mL	0,00	0,00	
	Medio Starving	9,00	mL	0,00	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	3,00	Horas	12,00	36,00	
	Cotutora responsable del proyecto	3,00	Horas	20,00	60,00	
	Costes indirectos	3,00	%	312,24	9,37	
	Recursos auxiliares	3,00	%	321,61	9,65	331,26
8.2	Siembra en hidrogel y cultivo estático (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Incubadora	168,00	Horas	2,12	356,16	
	Balanza de precisión	1,00	Horas	0,29	0,29	
	Centrífuga	0,25	Horas	3,63	0,91	
	Campana de flujo laminar	6,00	Horas	0,17	1,02	
	Neubauer	0,50	Horas	0,01	0,01	
	FBS	1,00	mL	0,38	0,38	
	Agitador magnético	0,50	Horas	0,20	0,10	
	CF-KRB	6,70	mL	0,00	0,00	
	Gelatina	0,06	g	0,00	0,00	
	HRP	0,03	mL	0,04	0,00	
	Peróxido de hidrógeno	0,03	mL	0,01	0,00	
	Microesferas	0,03	g	0,00	0,00	
	Células madre mesenquimales descongeladas en el capítulo 8.1	0,05	Criotubo	0,00	0,00	
	DPBS	8,00	mL	0,11	0,88	
	Tripsina	4,00	mL	0,15	0,60	
	Medio Basal	90,00	mL	0,00	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	4,50	Horas	12,00	54,00	
	Cotutora responsable del proyecto	4,50	Horas	20,00	90,00	
	Costes indirectos	3,00	%	504,34	15,13	
	Recursos auxiliares	3,00	%	519,47	15,58	
Total del capítulo 8.2						535,06
8.3	Siembra en hidrogel y cultivo dinámico (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)

CARACTERIZACIÓN DE UNA PLATAFORMA ELECTROACTIVA DE HIDROGEL-MICROESFERAS PARA LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

	Incubadora	75,00	Horas	2,12	159,00	
	Balanza de precisión	1,00	Horas	0,29	0,29	
	Centrífuga	0,25	Horas	3,63	0,91	
	Campana de flujo laminar	4,00	Horas	0,17	0,68	
	Neubauer	0,25	Horas	0,01	0,00	
	Biorreactor de estimulación magnética cedido por la Universitat de València	1,00	Horas	0,00	0,00	
	FBS	1,00	mL	0,38	0,38	
	Agitador magnético	0,50	Horas	0,20	0,10	
	CF-KRB	6,70	mL	0,00	0,00	
	Gelatina	0,06	g	0,00	0,00	
	HRP	0,03	mL	0,04	0,00	
	Peróxido de hidrógeno	0,03	mL	0,01	0,00	
	Microesferas	0,03	g	0,00	0,00	
	Células madre mesenquimales descongeladas en el capítulo 8.1	0,05	Criotubo	0,00	0,00	
	DPBS	8,00	mL	0,11	0,88	
	Tripsina	4,00	mL	0,15	0,60	
	Medio Basal	90,00	mL	0,00	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	3,50	Horas	12,00	42,00	
	Cotutora responsable del proyecto	3,50	Horas	20,00	70,00	
	Costes indirectos	3,00	%	274,84	8,25	
	Recursos auxiliares	3,00	%	283,09	8,49	
Total del capítulo 8.3						291,58
8.4	Medida de la proliferación celular y citotoxicidad mediante MTS (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector	1,00	Horas	2,49	2,49	
	Incubadora	2,00	Horas	2,12	4,24	
	Campana de flujo laminar	1,00	Horas	0,17	0,17	
	Medio MTS	4,50	mL	0,00	0,00	
	DPBS	9,00	mL	0,11	0,99	
	Hidrogeles generados y cultivados en 8.2 y 8.3	84,00	ud	0,00	0,00	
	Excel	1,50	Horas	0,00	0,00	

	Graduada en ing. Biomédica	1,00	Horas	12,00	12,00	
	Cotutora responsable del proyecto	1,00	Horas	20,00	20,00	
	Costes indirectos	3,00	%	170,11	5,10	
	Recursos auxiliares	3,00	%	175,21	5,26	
Total del capítulo 8.4						50,25
9. Equipos de protección individual y seguridad						
9.1	EPIs (ud)	Cantidad	Unidad	precio por ud (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Bata de laboratorio	2,00	ud	22,50	45,00	
	Máscara de gases	1,00	ud	30,60	30,60	
	Máscara de partículas	1,00	ud	7,35	7,35	
	Caja de guantes de látex (100 uds)	2,00	ud	5,85	11,70	
	Caja de guantes de nitrilo (100 uds)	1,00	ud	7,95	7,95	
	Par de guantes criogénicos	1,00	ud	160,96	160,96	
	Visera de protección facial	1,00	ud	8,50	8,50	
	Costes indirectos	3,00	%	272,06	8,16	
Total del capítulo 9.1						280,22
10. Material inventariable/fungible						
10.1	Material inventariable/fungible (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Vaso precipitados 3L	1,00	ud	5,83	5,83	
	Micropipeta 1000 ul	1,00	ud	215,00	215,00	
	Micropipeta 200uL	1,00	ud	215,00	215,00	
	Micropipeta 20 uL	1,00	ud	215,00	215,00	
	Puntas micropipeta 100-1000 uL	350,00	ud	0,03	10,50	
	Puntas micropipeta 20-200 uL	290,00	ud	0,04	11,60	
	Pipeta electrónica "easypet3" (Eppendorf)	1,00	ud	466,00	466,00	
	Punta pipeta 25 mL	40,00	ud	0,47	18,80	
	Pinzas	1,00	ud	8,99	8,99	
	Espátula metálica	2,00	ud	3,99	7,98	
	Espátula de plástico	1,00	ud	1,99	1,99	
	Tubo falcon 50 mL	25,00	ud	0,12	3,00	
	Tubo falcon 15 mL	6,00	ud	0,10	0,60	
	Eppendorf 1,5 mL	100,00	ud	0,07	7,00	
	Eppendorf 0,5 mL	50,00	ud	0,06	3,00	

	Frasco 50 mL	2,00	ud	3,65	7,30	
	Placa petri	2,00	ud	1,95	3,90	
	Papel de aluminio	6,00	m	0,11	0,66	
	Jeringuilla 6 mL	10,00	ud	0,74	7,40	
	Aguja para electrospray	2,00	ud	0,40	0,80	
	Tubo elástico para electrospray	0,40	m	0,75	0,30	
	Tamiz con tamaño de poro de 40 um	2,00	ud	0,57	1,14	
	Bolsas zip	10,00	ud	0,12	1,20	
	Placa cultivo p48-estéril	4,00	ud	1,20	4,80	
	Placa cultivo p96-estéril	8,00	ud	1,39	11,12	
	Flascon cultivo T75	6,00	ud	1,45	8,70	
	Cuchilla criostato	1,00	ud	2,00	2,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1.237,61	37,13	
Total del capítulo 10.1						1.276,74
11. Reuniones del proyecto						
11.1	Reuniones de planificación (horas)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Graduada en ing. Biomédica	25,00	Horas	12,00	300,00	
	Tutora responsable del proyecto	30,00	Horas	45,00	1.350,00	
	Cotutora responsable del proyecto	35,00	Horas	20,00	700,00	
	Costes indirectos	3,00	%	2.350,00	70,50	
	Recursos auxiliares	3,00	%	2.420,50	72,62	
Total del capítulo 11.1						2.493,12
11.2	Reuniones de resultados (Horas)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Graduada en ing. Biomédica	20,00	Horas	12,00	240,00	
	Tutora responsable del proyecto	15,00	Horas	45,00	675,00	
	Cotutora responsable del proyecto	20,00	Horas	20,00	400,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1.315,00	39,45	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1.354,45	40,63	
Total del capítulo 11.2						1.395,08
11.3	Redacción y correcciones (horas)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)

	Graduada en ing. Biomédica	90,00	Horas	12,00	1.080,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1.080,00	32,40	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1.112,40	33,37	
Total del capítulo 11.3						1.145,77

6. PRESUPUESTOS PARCIALES

En la siguiente tabla se muestra el presupuesto agrupado por capítulos, así como se indica la cantidad de veces que se ha realizado cada subcapítulo. Nos permite obtener el coste total del proyecto desglosado por capítulos.

Tabla 10. Cuadro de presupuestos parciales

nº código	Descripción capítulo				
1	1. Síntesis microesferas PVDF				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
1.1	Obtención de la disolución polimérica de PVDF (ud)	ud	2	29,74	59,48
1.2	Electrospray microesferas PVDF (ud)	ud	2	327,58	655,16
1.3	Recogida y almacenamiento microesferas PVDF (ud)	ud	2	32,26	64,52
Presupuesto parcial del Capítulo 1					779,16
2	2. Síntesis microesferas PVDF-CFO				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
2.1	Obtención de la disolución polimérica de PVDF con CFO (ud)	ud	2	32,11	64,22
2.2	Electrospray microesferas PVDF-CFO (ud)	ud	2	321,57	643,13
2.3	Recogida y almacenamiento microesferas PVDF-CFO (ud)	ud	2	38,58	77,17
Presupuesto parcial del Capítulo 2					784,51
3	3. Caracterización de las microesferas				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
3.1	Tamaño y morfología de las microesferas en el FESEM	ud	1	171,87	171,87

3.2	Tipos de fases cristalinas en las microesferas empleando el FT-IR	ud	1	52,13	52,13
3.3	Cuantificación de fase cristalina en las microesferas empleando el DSC	ud	1	33,04	33,04
3.4	Porcentaje real masa CFO en las microesferas con VSM	ud	1	64,71	64,71
Presupuesto parcial del Capítulo 3					321,76
4	4. Síntesis Gel-Tyr				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
4.1	Injerto de tiramina en gelatina (ud)	ud	2	57,65	115,30
4.2	Purificación de la gelatina con injerto de tiramina (ud)	ud	2	56,09	112,18
4.3	Liofilización de la gelatina con injerto de tiramina (ud)	ud	2	231,70	463,40
Presupuesto parcial del Capítulo 4					690,87
5	5. Síntesis del hidrogel con microesferas				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
5.1	Preparación del buffer CF-KRB	mL	1	13,42	13,42
5.2	Acondicionamiento microesferas	ud	3	65,28	195,85
5.3	Gelificación del hidrogel (9 ud)	pack	1	26,50	26,50
Presupuesto parcial del Capítulo 5					235,76
6	6. Obtención de cortes histológicos del hidrogel				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
6.1	Inclusión en OCT	ud	1	18,22	18,22
6.2	Cortes en el criostato	ud	1	120,94	120,94
6.3	Observación de los cortes	ud	1	99,30	99,30
Presupuesto parcial del Capítulo 6					238,46
7	7. Preparación medios de cultivo				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
7.1	Medio Promocell	mL	1	65,96	76,57
7.2	Medio Basal	mL	2	25,24	50,48
7.3	Medio Starving	mL	2	22,33	44,65
7.4	Medio MTS	mL	2	68,99	137,99
Presupuesto parcial del Capítulo 7					309,69
8	8. Cultivo celular y análisis de resultados				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
8.1	Descongelado y expansión celular	ud	2	331,26	662,52

8.2	Siembra en hidrogel y cultivo estático	ud	1	535,06	535,06
8.3	Siembra en hidrogel y cultivo dinámico	ud	1	291,58	291,58
8.4	Medida de la proliferación celular y citotoxicidad mediante MTS	ud	7	50,25	351,75
Presupuesto parcial del Capítulo 8					1.840,90
9	9. Equipos de protección individual y seguridad				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
9.1	EPIs	ud	1	280,22	280,22
Presupuesto parcial del Capítulo 9					280,22
10	10. Material inventariable/fungible				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
10.1	Material inventariable/fungible (ud)	ud	1	1276,74	1.276,74
Presupuesto parcial del Capítulo 10					1.276,74
11	11. Reuniones del proyecto				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
11.1	Reuniones de planificación	ud	1	2.493,12	2.493,12
11.2	Reuniones de resultados	ud	1	1.395,08	1.395,08
11.3	Redacción y correcciones	ud	1	1.145,77	1.145,77
Presupuesto parcial del Capítulo 11					5.033,97

7. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL

Presupuesto de ejecución material, por contrata y base de licitación

1.	Síntesis microesferas PVDF	779,16 €
2.	Síntesis microesferas PVDF-CFO	784,51 €
3.	Caracterización de las microesferas	321,76 €
4.	Síntesis Gel-Tyr	690,87 €
5.	Síntesis del hidrogel con microesferas	235,76 €
6.	Obtención de cortes histológicos del hidrogel	238,46 €
7.	Preparación medios de cultivo	309,69 €
8.	Cultivo celular y análisis de resultados	1.840,90 €
9.	Equipos de protección individual y seguridad	280,22 €
10.	Material inventariable/fungible	1.276,74 €

11. Reuniones del proyecto 5.033,97 €

Total: 11.792,05 €

El presupuesto de ejecución material asciende a la cantidad de **ONCE MIL SETECIENTOS NOVENTA Y DOS EUROS CON CINCO CÉNTIMOS**

Presupuesto de ejecución material	11.792,05 €
Gastos generales (13 %)	1.532,97 €
Beneficio industrial (0%)	13.325,02 €

El presupuesto de ejecución material asciende a la cantidad de **TRECE MIL TRESCIENTOS VEINTICINCO EUROS CON DOS CÉNTIMOS**

Presupuesto de ejecución por contrata	13.325,01 €
IVA (21%)	2.798,25 €
Presupuesto base de licitación	16.123,26 €

El presupuesto de base de licitación asciende a la cantidad de **DIECISÉIS MIL CIENTO VEINTITRÉS EUROS CON VEINTISÉIS CÉNTIMOS.**