



# **CAPÍTULO 3: EL COMPUESTO**

---



## 3.1 INTRODUCCIÓN

---

Una vez desarrollado un biomaterial elastomérico poroso para regeneración cardiaca o de tejidos elásticos, surge la necesidad de un nuevo biomaterial para fracturas de hueso que supongan una pérdida masiva de tejido óseo, ocasionadas por problemas osteoporóticos o por problemas derivados de tumores.

La respuesta normal a una fractura de hueso es una secuencia espontánea de los siguientes eventos; inflamación inicial, seguido de la formación de un callo blando; formación del callo duro y, por último, la remodelación del hueso [1]. Cuando este proceso natural no ocurre, hay que realizar una intervención quirúrgica. En la actualidad dichas operaciones incluyen el uso de fijaciones rígidas e internas con las que se usan platos o rodillos intermedulares, injertos de hueso y otros sintéticos [2, 3]. Sin embargo, esto no resulta en la reparación completa del hueso y en su remodelación, debido, entre otras cosas, a que estos materiales utilizados no son reabsorbibles por el propio cuerpo, sino que permanecen en el sistema, pudiendo, por tanto, sufrir fatiga y fractura a lo largo del tiempo [4, 5]. Tratando de solventar estos problemas, los investigadores en ingeniería de tejidos han desarrollado diferentes materiales sintéticos. Estos compuestos están formados por una gran variedad de materiales biocompatibles (polímeros naturales y sintéticos, cerámicos, y composites) [3, 6] diseñados para la proliferación celular, mediante la incorporación de factores de crecimiento que ayuden a tal efecto, para soportar cargas físicas y siendo biodegradables, lo que ayuda a que el tejido dañado pueda ser sustituido lentamente por uno completamente nuevo [7, 8].

En ingeniería tisular se han desarrollado diversos biomateriales que promueven la proliferación celular, soportan cargas fisiológicas y son fáciles de manipular y sintetizar [7, 8]. Entre estos materiales existen diversos tipos de polímeros biocompatibles, que a menudo, son además biodegradables [9-12]. Algunos materiales presentan baja viscosidad en condiciones de síntesis, pero son capaces de polimerizar y formar geles en condiciones fisiológicas, lo que permite que sean inyectables y evitan así la necesidad de cirugía [13, 14]. La bibliografía científica es prolífica en ejemplos y combinaciones. A modo de muestra, Byeongmoon et al. [15] describen la síntesis de un biopolímero en bloque que es biodegradable porque contiene ácidos orgánicos, tales como el ácido láctico y el ácido glicólico y, biopolímeros como el

polietilenglicol capaces de gelificar en condiciones fisiológicas sin producir irritación del tejido y que, además, son biodegradables y reabsorbibles por el organismo. Sin embargo, los materiales de este tipo no pueden soportar cargas fisiológicas pues carecen de dureza, por lo que resultan ineficaces mecánicamente cuando se utilizan en estructuras de carga como huesos en animales o ramas en vegetales. Además, algunos polímeros experimentan deformaciones cuando son expuestos a altas temperaturas o a estrés por un período de tiempo prolongado, sufriendo un deterioro tan rápido que a veces no permite la completa reparación de la estructura antes de la degradación del polímero. Para solucionar este problema se han ingeniado una serie de materiales compuestos utilizando biocerámicas, para simular el comportamiento del hueso natural [16]. En ocasiones, algunos implantes médicos de elementos estructurales del cuerpo, como por ejemplo los huesos, están fabricados con un material compuesto polímero/cerámica [17].

La empresa Abbott cardiovascular Systems Inc. desarrolló un composite<sup>1</sup> implantable compuesto de partículas biocerámicas dentro de una matriz de L-Lactide y glicolide, lo cual facilita la resistencia y reduce el desgaste del implante. A diferencia de los polímeros inyectables, estos implantes se forman normalmente fuera del cuerpo y se colocan mediante cirugía. Lamentablemente, tales implantes presentan problemas de adaptación a las superficies de destino, que son normalmente irregulares, presentan grietas o una morfología no estándar. En cierto tipo de lesiones, es posible una estrategia de tratamiento donde el implante constituye una plataforma para la reconstrucción del tejido. Se conocen en el estado de la técnica diversas solicitudes de patentes que describen la preparación de plataformas con características muy diversas. Un problema crítico para el correcto funcionamiento de estas plataformas es que se ajusten correctamente a las diversas irregularidades de la estructura a tratar. Sin embargo, una vez moldeados, estos compuestos tampoco pueden volver a remodelarse para ajustarse con precisión a la superficie a reparar. En el año 2007 Guillermo Ameer desarrolló un material compuesto<sup>2</sup> formado por una biocerámica (Hidroxiapatita) y un biopolímero biodegradable (Poly (diol-co-citrate)), desarrollados para ingeniería de tejidos y fijación de dispositivos ortopédicos. La composición del material compuesto descrito

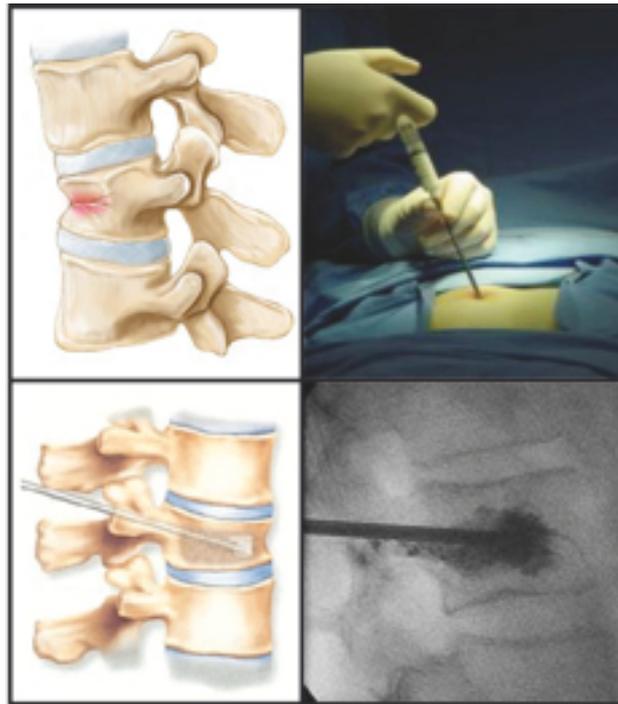
---

<sup>1</sup> solicitud de patente internacional WO-2008036206-A1

<sup>2</sup> solicitud de patente internacional WO-2007092559-A1.

en ella le otorga una rigidez apropiada para cargas fisiológicas pero que impide la correcta adaptación a la superficie a reparar.

Muchas son las aplicaciones que cubren estos materiales, como ya se ha visto en la introducción, pero un campo en el que se están realizando muchos esfuerzos es en la columna vertebral, concretamente en la regeneración de vertebras fracturadas y discos intervertebrales [18-21]. Dentro del campo de la regeneración ósea en vertebras una de necesidad no cubierta por este tipo de biomateriales es la vertebroplastia, una intervención cuyo objetivo es fijar vértebras rotas que producen dolor a un paciente [22]. En la actualidad, en esta intervención, un radiólogo se encarga de inyectar el medicamento, un biomaterial compuesto por un cemento óseo, en la vértebra dañada con un doble objetivo: fijar la vértebra y anular el dolor, aprovechando que la temperatura del implante elimina las terminaciones nerviosas responsables de transmitir señales de dolor en esa zona [23-25]. La necesidad en este mercado radica en que los cementos óseos que se utilizan tienen una elevada dureza que a corto-medio plazo provoca roturas en las vértebras colindantes a la vértebra fijada, ya que el hueso de estas vértebras suele ser un hueso osteoporótico con una densidad ósea baja cuyas propiedades de resistencia mecánica son mucho menores que un hueso sano. Así las vértebras colindantes no aguantan la dureza producida por el cemento óseo [22]. (Figura 1).



**Figura 1: La vertebroplastia. a) las vertebrae, ya sea por una enfermedad osteoporótica o una debilidad ósea, sufren una rotura, lo que provoca que los nervios se pinzen, originando en el paciente un gran dolor. b) para solucionar esto se realiza una inyección en la zona dorsal, del biomaterial (c), ayudados por sistemas de resonancia y TAC (d).**

Entre los cementos utilizados, el estándar es el polimetilmetacrilato (PMMA) [22, 26-28], que lleva casi 60 años de trayectoria en la cirugía ortopédica. Los cementos óseos se han usado por mimetismo en muchas aplicaciones ortopédicas, pero existen aplicaciones específicas en las que los cementos usados ahora tienen deficiencias tecnológicas Tabla 3.1.

Todos los competidores en la aplicación de cementos en fractura vertebral compresiva basan sus productos en formulaciones de PMMA o en fosfatos cálcicos. El entorno competitivo es complejo ya que todos los productos basados en PMMA tienen más de 25 años de antigüedad como tratamientos para aliviar la fractura vertebral compresiva.

**Tabla 3.1: Cementos óseos utilizados en la actualidad con sus propiedades.**

PRODUCTO	Fractura postoperación	Dureza	Eliminación dolor	Regeneración
PMMA [26]	Alta	Alta	Alta	Ninguna
Fosfato calcio [29]	Alta	Alta	Alta	Alta
Cortoss[30]	Media	Alta	Alta	Ninguna

Aproximadamente un 30-50% de las mujeres y un 20-30% de los hombres desarrollan fractura vertebral compresiva y la mitad de todos ellos sufren múltiples fracturas a lo largo de la vida [31].

Se producen alrededor de 1,5 millones de fracturas vertebrales compresivas en el mundo de las cuales una tercera parte causan dolor agudo [32]. De estas fracturas con dolor, 250.000 son intervenidas mediante vertebroplastia.

Los pacientes intervenidos se pueden dividir en dos grupos principales, que se diferencian por la causa de la fractura:

- Pacientes que tienen rotura vertebral por una pérdida de densidad en el hueso debida a un cuadro de osteoporosis. Este grupo de pacientes acostumbran a tener una edad superior a los 50 años y hay más incidencia en las mujeres.
- Pacientes que tienen rotura vertebral por una pérdida de densidad ósea provocada por un cáncer en el tejido óseo.

También se pueden clasificar los pacientes en función de la edad:

- menores de 50 años.
- mayores de 50 años.

Ambas clasificaciones de los pacientes se tienen en cuenta a la hora de escoger el tratamiento a utilizar. Los pacientes menores de 50 años que sufren fractura vertebral compresiva, son tratados con cementos óseos con mayor capacidad de osteointegración (cementos de calcio), aunque el tratamiento sea mucho más caro.

El origen de la fractura también influye a la hora de escoger el tipo de tratamiento.

- En el caso de pacientes que tienen cáncer, el único objetivo del tratamiento es mitigar el dolor que provoca la fractura vertebral compresiva.
- En cambio, los pacientes que tienen osteoporosis, pueden buscar también ser tratados con medicamentos que frenen o incluso mejoren la degeneración del tejido óseo, además del objetivo principal del tratamiento, que es eliminar el dolor en la vértebra colapsada.

Dentro de todos estos materiales utilizados en vertebroplastia, existe una necesidad no cubierta que es la adaptabilidad, la biodegradación y la regeneración, en donde surgen nuevas oportunidades para el desarrollo de biomateriales con capacidad osteoinductora que sea capaz de aguantar los requerimientos mecánicos de las vértebras dañadas [21].

En el presente capítulo se ha desarrollado un material compuesto por una biocerámica y un polímero en bloque, formado por bloques rígidos alternados con bloques flexibles, como por ejemplo, los polímeros de polietilenglicol, que permiten la remodelación tras el endurecimiento de la plataforma. De esta manera, se puede crear una plataforma con una morfología inicial que podrá ser remodelada mediante fuerzas mecánicas a la hora de implantarla para su perfecta adaptación a la superficie a reparar. Este material puede aplicarse además en campos diferentes de la biomedicina, por ejemplo, en ingeniería tisular de plantas, como plataforma para injertos o como inductor de enraizamiento.

## 3.2 OBJETIVOS

---

El objetivo de este capítulo, centrado en la composición de un biomateriales, es el desarrollo de un material biodegradable con capacidad regeneradora. Este compuesto deberá cumplir con los requerimientos mecánicos de las zonas donde será implantado. Además, también será un material que servirá como sistema de liberación controlada de fármacos que ayude en la regeneración de la zona dañada

### *Plan de trabajo*

Para conseguir estos objetivos se propone el desarrollo de un material formado por dos componentes, una biocerámica y un material polimérico que consta de dos bloques, una parte dura y otra parte blanda. La parte dura es la que asume la componente cristalina y la que da dureza al material gracias al efecto de las fuerzas de atracción por puentes de hidrógeno. Por otro lado, la componente blanda es la que asume la parte elástica. Aprovechando los métodos desarrollados en el capítulo anterior para el desarrollo de polímeros mediante síntesis por microondas, este polímero de bloque se realizará según este método de síntesis.

## 3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.3.1 Síntesis del composite

El composite se desarrolló utilizando la tecnología de las microondas, anteriormente analizada. La síntesis tiene lugar en dos etapas. En una primera etapa se sintetizó el segmento duro (denominado prepolímero) que consta de los monómeros 1,8-octanediol y ácido glutámico. Se añadió un exceso de ácido glutámico, en una proporción 1:1,2 para que las cadenas tengan como terminación el ácido y así puedan reaccionar con el polietilenglicol que se añadirá en la segunda etapa. Todos los reactivos se añadieron en un matraz esférico de 250 ml. La reacción se realizó en un microondas CEM discovery monomodal con una potencia de 100W a una temperatura de 120°C con dos tandas de 30 minutos cada una, aplicando aire comprimido para aumentar el efecto de las microondas. Además, al sistema se le conectó un refrigerador a la salida para eliminar el agua evaporada en la reacción (Figura 3.2).

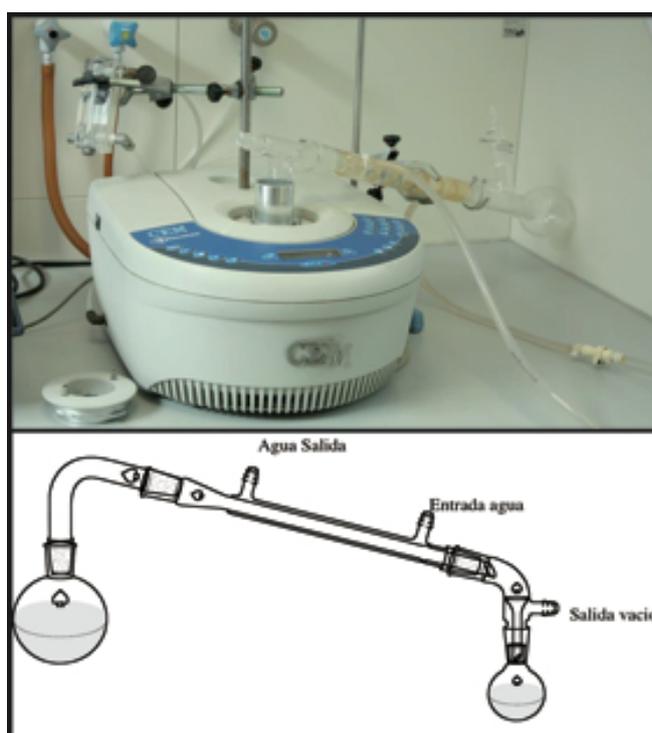
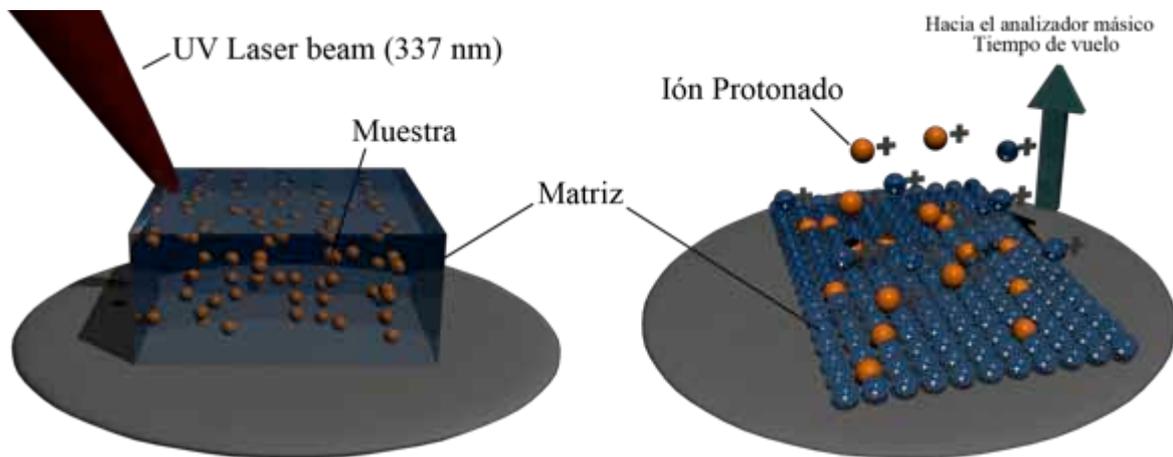


Figura 3.2: Montaje del horno microondas con el sistema de refrigeración y extracción de agua.



(desorción/ionización láser asistida por matriz), y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y, cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés, *Time-Of-Flight* [41, 42].

La macromolécula se implanta en primer lugar en una matriz sólida que a menudo, consta de un material orgánico, como ácido trans-3-indoleacrílico, y sales inorgánicas como cloruro de sodio o trifluoroacetato de plata. Esta matriz se utiliza para proteger a la biomolécula de ser destruida y para facilitar la vaporización y la ionización. La muestra es entonces irradiada con un láser pulsado, como un láser de nitrógeno. La energía del láser expulsa iones de la matriz, electrónicamente excitados, cationes y macromoléculas neutras, que crean una densa nube de gas por encima de la superficie de la muestra. La macromolécula es ionizada por las colisiones y complejación con pequeños cationes (Figura 3.4).



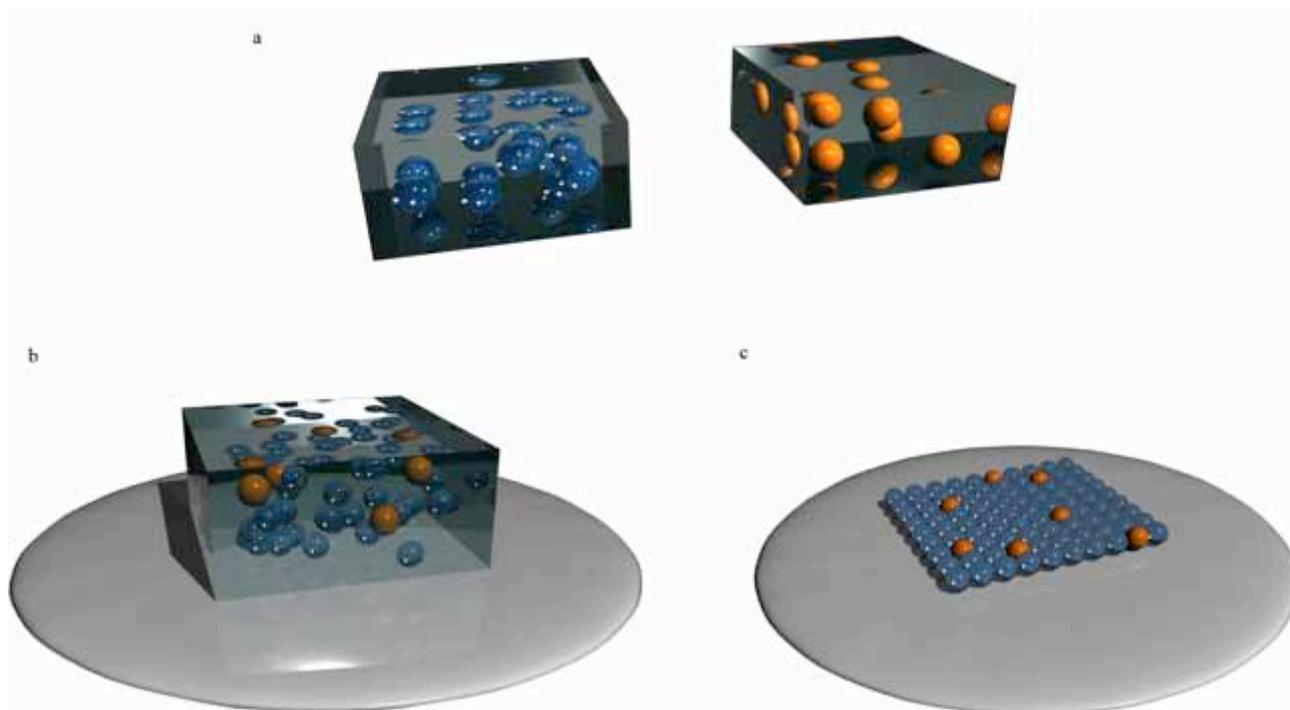
**Figura 3.4** Funcionamiento del MALDI-TOF. A) la muestras situada en una matriz, es ionizada mediante un laser creando iones de la matriz y del compuesto a analizar B) posteriormente se mide con un analizador el tiempo de vuelo de estos iones caracterizando del material

En el análisis de los polímeros sintéticos por MALDI-TOF, una elección muy importante es elegir la matriz apropiada para obtener un buen espectro másico. Nielen resumió una serie de matrices para polímeros sintéticos teniendo una gran variedad de estructuras moleculares y polaridades diferentes. Por ejemplo, 2,5- dihydroxybenzoic acid (DHB) y dithranol son las recomendadas como matrices para PEG y poliestireno respectivamente (Figura 3.5) [43].

Matrices		Polímeros
<b>Hidrofílicos</b>		
<b>Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico (DHB)</b>	↑	PoliPropilen Glicol
<b>ácido α-Ciano-Hidroxicinámico</b>		Polivinil acetato
<b>Ácido Ferulico</b>		Politratmetilene glicol
<b>Ácido Indoleacrilico</b>	↓	polimetilmetacrilato
<b>Ditranol</b>		Poli estireno
<b>Ácido Trans-Retinocio</b>		Poli Butadieno
<b>Difenilbutadieno</b>		Poli Dimetilsiloxano
<b>Hidrofóbico</b>		

Figura 3.5 Matrices utilizadas para el análisis del MALDI-TOF

Después de la selección de la matriz apropiada, es importante la preparación de la cocrystalización homogénea de la matriz y de la muestra [43]. El método del goteo seco es uno de los más usados. En este método, las dos soluciones se mezclan por volumen, después 1-2 microlitros de la mezcla se aplica en el “*target plate*” y se seca a temperatura ambiente. Para la cocrystalización homogénea y minimizar la secreción a través de la matriz y la muestras durante la evaporación del disolvente, es preferible usar el mismo disolvente para las dos soluciones. El composite matriz/muestra se distribuye en un ratio molar aproximado de 100 a 1000 [43] (Figura 3.6)



**Figura 3.6** Método de la gota seca para la preparación de muestras en el Maldi Tof. a) Se disuelve la muestra y la matriz en dos disolventes, a ser posible el mismo, para evitar tiempos de evaporación diferentes y así obtener una muestra más homogénea. b) se mezclan y se depositan en una superficie. c) se deja evaporar el disolvente consiguiendo una muestra homogénea entre la matriz y el compuesto que se va a analizar.

Todos los polímeros fueron analizados usando un MALDI-TOF Microflex. Bruker Daltonics Spectrometer en el departamento de bioingeniería del IQS (instituto Químico de Sarria). Las muestras se prepararon usando el método del goteo seco. Se disolvieron 5 mg de prepolímero en 500  $\mu\text{l}$  de acetona y 4  $\mu\text{l}$  de esta disolución se mezclaron con 80  $\mu\text{l}$  de la solución matriz, que fue preparada mediante la disolución de 5 mg de DHB en 500  $\mu\text{l}$  de acetona. Un  $\mu\text{l}$  de la solución matriz/muestra se aplicó sobre plato correspondiente (MSP 96 ground steel) y se dejó secar a temperatura ambiente. La calibración se realizó aplicando 1  $\mu\text{l}$  del standard péptido calibrador (cuya masa está entre 1000 y 3500 Da, Bruker Daltonics) y después dejándolo secar al aire, aplicando 1  $\mu\text{l}$  de la solución matriz. El método usado en el programa Flex control y los *settings* correspondientes del espectrómetro se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Datos utilizados en el espectrómetro.

Nombre	Fuente Ion 1	Fuente Ion 2	Lens	Reflector	Intensidad del laser
RP_PepMix	19	16	9,6	19,2	80%

### 3.3.3 Análisis Dinamo Mecánico y reometría.

El Análisis Dinamo Mecánico conocido por sus siglas en inglés como DMA, es un análisis utilizado en estudios de procesos de relajación y en reología para estudiar y caracterizar el comportamiento de materiales viscoelásticos, como polímeros, y sus respuestas ante impulsos, estrés, deformación en tiempo y frecuencia [44].

Este estudio es importante para la comprensión de la mecánica de los materiales poliméricos utilizados como hules, fibras textiles, empaques, plásticos, espumas y diferentes compuestos.

El DMA utiliza el principio de estímulo-respuesta. Para ello se aplica una fuerza oscilante a la muestra y se mide desplazamiento resultante, se determina la rigidez de la muestra y se calcula el módulo de la muestra. Por medio de la medición del lapso entre el desplazamiento y la fuerza aplicada, es posible determinar las propiedades de deformación del material.

Los materiales viscoelásticos como los polímeros existen típicamente "en dos estados", es decir, muestran propiedades vítreas con un módulo considerablemente alto a bajas temperaturas y, un estado ahulado, con un módulo relativamente bajo a temperaturas altas. Por medio de un barrido de temperaturas durante un estudio de DMA, se obtiene este cambio de estado entre vítreo y ahulado, es decir, se obtiene la transición vítrea dinámica y transición  $\alpha$ . La temperatura de transición vítrea, o  $T_g$ , es obtenida, por medio de estudios de DSC. La transición vítrea dinámica, análoga a la transición vítrea térmica ( $T_g$ ), provee de datos más útiles para el estudio de los polímeros y puede ser utilizada para investigar la frecuencia (y con las transformaciones matemáticas adecuadas, también el tiempo) en dependencia de la transición.

Otro de los análisis realizados se llevó a cabo mediante un reómetro. Los principios básicos de un reómetro oscilatorio inducen una deformación sinusoidal en la muestra y miden el

resultado de la respuesta a este estrés. En un experimento típico, la muestra se sitúa entre dos platos, y mientras uno permanece en estado estacionario, un motor rota en el otro plato [45].

El comportamiento viscoelástico se analizó mediante el *módulo de almacenamiento* ( $G'$ ) y módulo de pérdida ( $G''$ ). La  $\tan \delta$  entre la deformación y la resistencia, determina un índice de la proporción de componente elástica que tiene el sistema.

$$\tan \delta = G'/G''$$

En un experimento típico de reología, se mide  $G'$  y  $G''$ , cuando  $G'' > G'$  el sistema puede ser caracterizado como viscoso mientras que si es al revés el sistema exhibe un comportamiento elástico.

Los experimentos reológicos de todos los polímeros fueron realizados en el reómetro AR 550 (TA instruments). Los experimentos de flujo en estado estacionario fueron realizados empleando un gap de 100  $\mu\text{m}$ . El esfuerzo cortante, que fue tomado como una función de la velocidad de corte, se incrementó de 500 a 2000 Pa.

Los ciclos de frecuencia (1 a 25 hz) se tomaron a 35°C usando un plato de acero de 20 mm. Los experimentos de frecuencia de barrido se llevaron a cabo utilizando un gap de 100 micras. El estrés oscilatorio se mantuvo constante a 500 Pa. Se tomó el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y el módulo de pérdida ( $G''$ ) como función de la frecuencia.

La curva de temperatura tuvo lugar en un rango de entre 45°C y -5°C con un ratio de enfriamiento de 5°C con una constante de estrés oscilatorio de 500 Pa, elegidos de la región viscoelástica lineal de la muestra a 1 Hz. Los experimentos de curvas de temperatura se hicieron usando un plato de acero (20 mm de diámetro) con un gap de 20  $\mu\text{m}$ .  $G'$  y  $G''$  se reportaron en función de la temperatura.

### 3.3.4 Adhesión

En las pruebas de adhesión, la idea principal es ver como el material tiene propiedades de adhesión y, en caso afirmativo, ver que influencia tiene la biocerámica sobre ello.

Para ello se utilizó un ElectroPuls E1000 All-Electric Test Instrument (Instron). El material se aplicó sobre unos platos de aluminio mini pin Stub de 6 mm de diámetro (Ted Pella, Inc). (Figura 3.7).



**Figura 3.7 Forma y dimensiones de los platos utilizados para la prueba de adhesión (Mini pin Stub)**

Los materiales que se utilizaron tenían una cantidad de biocerámica de 0, 15 y 35%, con respecto al polímero matriz.

Para realizar el test de propiedades mecánicas en el estudio de adhesión, se fijó una cantidad en un pin situado en los grips de tensión del equipo electrodinámico. Otro pin se situó a una distancia de 2 mm del primer pin y se utilizó como cero esta distancia a lo largo de todo el experimento. Se aplicó un gradiente de carga en el adhesivo hasta que el material se rasgó. Este proceso se repitió 10 veces para cada muestra. Se determinó la carga máxima, el módulo, carga a tracción y el límite elástico.

Para el test de adhesión con tejidos, se tomaron unos pequeños trozos de la región media del intestino de ratones, que se guardaron en PBS y se usaron en el experimento dentro de las 3-4 horas siguientes a la cosecha. Se pegaron secciones de 5 mm de diámetro del intestino al pin metálico y se aplicó una cantidad de material sobre cada uno de los tejidos. Posteriormente, un segundo pin, también con tejido sobre él, se situó a una distancia dada sobre el primer pin, como se explica en el método anteriormente mencionado. Se aplicó un gradiente de carga hasta que el material se rasgó. El proceso se repitió 5 veces para cada muestra. El número de repeticiones es más bajo que el método anterior debido a que los resultados del experimento tienen una menor variabilidad, lo que indica que este método es muy apropiado para la medición de las propiedades adhesivas.

### **3.3.5 Pruebas *in Vivo*.**

Las pruebas *in vivo* del composite se realizaron en el Karolinska Institute, de la mano del Dr. Ion Tcacencu del grupo del Dr. Mikael Wenden del Centre for Oral Biology (COB).

Se operaron 3 ratas macho Sprague-Dawley con las pasta termoplástica sin carga. Las ratas fueron anestesiadas usando un inhalador de isoflurano (4% induction, 2-3% maintenance). Se afeitó la cabeza de las ratas y se lavaron con una solución de iodo. Se separaron la piel y las capas subcutáneas incluido el músculo temporal para exponer el hueso calvario. Se creó un defecto circular de 8 mm transóseo en el lado izquierdo de la región parietal usando un

taladro trépano y con un enfriamiento con medio salino. El defecto se cubrió con un disco estéril del composite ( ~40 mg, ~8 mm de diámetro). El disco se mantuvo en una solución salina al 0.9% antes de la implantación.

Tras la operación la incisión fue cerradas con una sutura simple de dos capas. Las ratas fueron sacrificadas por inhalación de CO<sub>2</sub> 12 semanas tras la operación. Para el análisis histológico se recolecto el hueso calvario.

## 3.4 RESULTADOS

---

En el presente capítulo se ha desarrollado un material compuesto cuya reología es característicamente tixotrópica, por lo que tras endurecerse es capaz de recuperar cierta viscosidad en función de las fuerzas mecánicas y fuerzas calóricas que se apliquen. Los elementos constituyentes del material compuesto, consisten principalmente en un polímero de bloque y una biocerámica y, opcionalmente, otros componentes minoritarios. La composición del polímero en bloque es de particular importancia para la adaptabilidad de la pasta termoplástica, ya que es la alternancia de bloques rígidos con bloques flexibles lo que permite la reología tixotrópica. Así, inicialmente, los bloques flexibles establecen asociaciones por medio de fuerzas débiles con la biocerámica, gracias a los grupos éster de la cadena polimérica y a la estructura de la biocerámica. En la pasta en reposo, al enfriarse suficientemente, se desacopla esta asociación quedando la pasta cohesionada principalmente por asociaciones internas en el bloque rígido y, además, con la interacción con la biocerámica. Al aplicar fuerzas mecánicas y una pequeña cantidad de calor sobre la pasta rígida, cuya dureza proviene de la biocerámica, el bloque flexible vuelve a establecer las fuerzas débiles, gracias a la presencia de grupos hidroxilo libres en el bloque flexible, lo que lleva a un aumento de la viscosidad, teniendo como consecuencia la reología tixotrópica descrita (Figura 3.8).

El polímero es un poliéster con tres monómeros diferentes, ácido glutárico, 1,8 octanodiol y polietilenglicol (PEG). La biocerámica utilizada fue hidroxiapatita, debido a su liberación de calcio en el sistema. El polímero principal tiene una estructura [A-B]<sub>n</sub>-C donde A es el ácido glutárico, B es el 1,8 octanediol y C el PEG (figura 3.8).

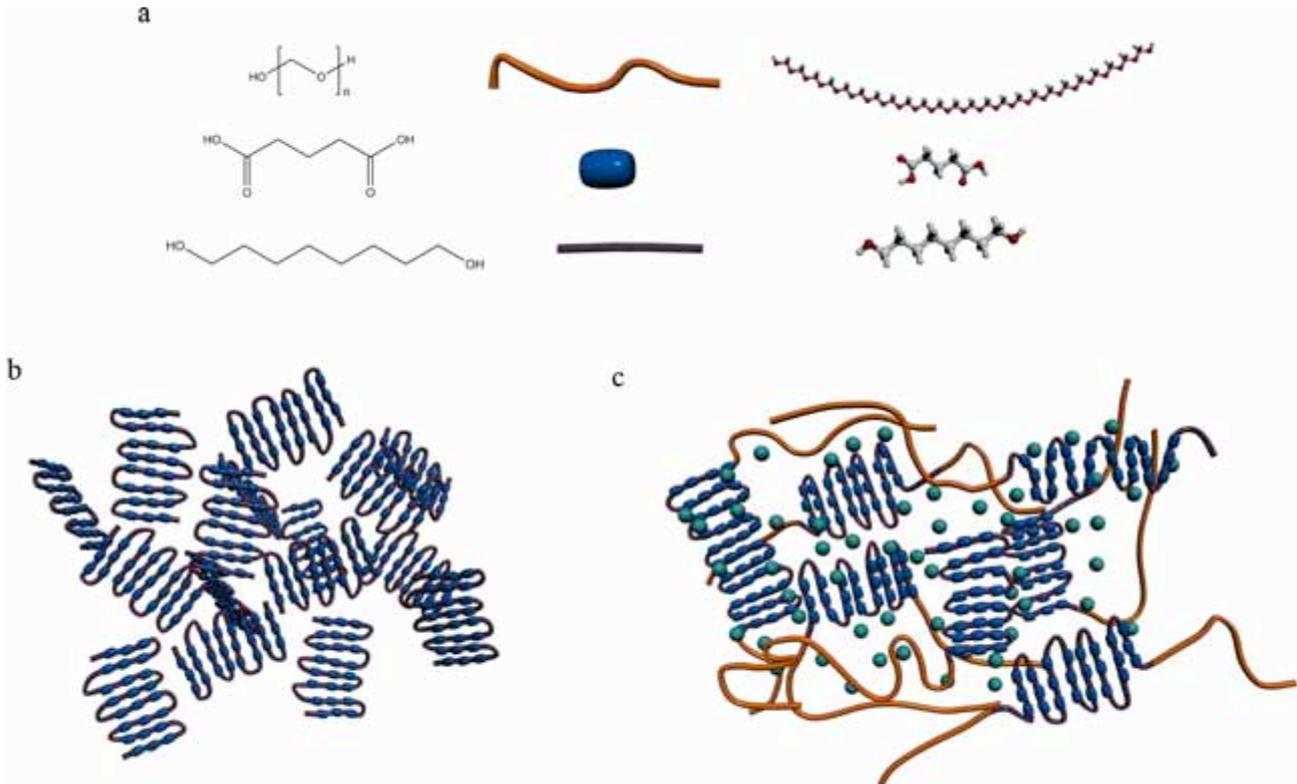


Figura 3.8 Estructura interna del composite, a) monómeros utilizados en la síntesis, donde se ve la configuración de cada uno de ellos. b) estructura del pre-polímero formado por el ácido glutárico y el 1,8-octanodiol. Este segmento no posee la componente flexible por lo que la estructura es quebradiza y rígida, como la mayoría de los polilácticos y policaprolactonas c) Estructura completa del composite donde se aprecia el segmento duro formado por los pliegues y un segmento blando o flexible formado por el PEG. Entre medias del sistema se aprecian unas esferas de Hidroxiapatita que evita el deslizamiento de las cadenas, lo que le confiere mayor dureza.

Se podrían incluir en la pasta termoplástica elementos variados en porcentajes, tales que sin afectar significativamente a la reología del material, le otorguen propiedades específicas para su aplicación en diferentes usos prácticos.

Como se ha comentado anteriormente, las propiedades del composite fueron testeadas por reología. El composite muestra un comportamiento reológico muy interesante con una alta tixotropía. En ausencia de velocidad de flujo la pasta es dura, con una textura y dureza que se aproxima a la del hueso natural [46]. Sin embargo, cuando se le aplicó un esfuerzo cortante el composite actúa como un material blando que puede ser fácilmente procesado y manipulado.

La pasta termoplástica se ha caracterizado por NMR, HPSEC y MALDI-TOF. Estos resultados demuestran que el polímero es un poliéster con bajo peso molecular y con una baja

polidispersividad. El peso molecular depende del tiempo de reacción y del monómero utilizado en la reacción.

En el espectro obtenido de la resonancia magnética nuclear (figura 3.9) se muestran los principales grupos característicos: el enlace éster del ácido glutárico, con el 1,8 octanodiol (pico 4.07-4,04), que demuestra que el primer bloque, que será el segmento duro, se ha sintetizado correctamente; el grupo éter (pico 3,59), perteneciente al PEG y el grupo éster, unido al polietilenglicol (pico 4,19), como seña de la formación del segmento blando con el segmento duro (Figura 3.9).

Si comparamos con el espectro obtenido con el prepolímero, se puede ver como ya en este existe la formación de un grupo poliéster, que sería el bloque duro, mediante el enlace entre el ácido glutárico y el 1,8 octanodiol. Mientras que en el del polímero completo, se muestra el enlace con el polietilenglicol.

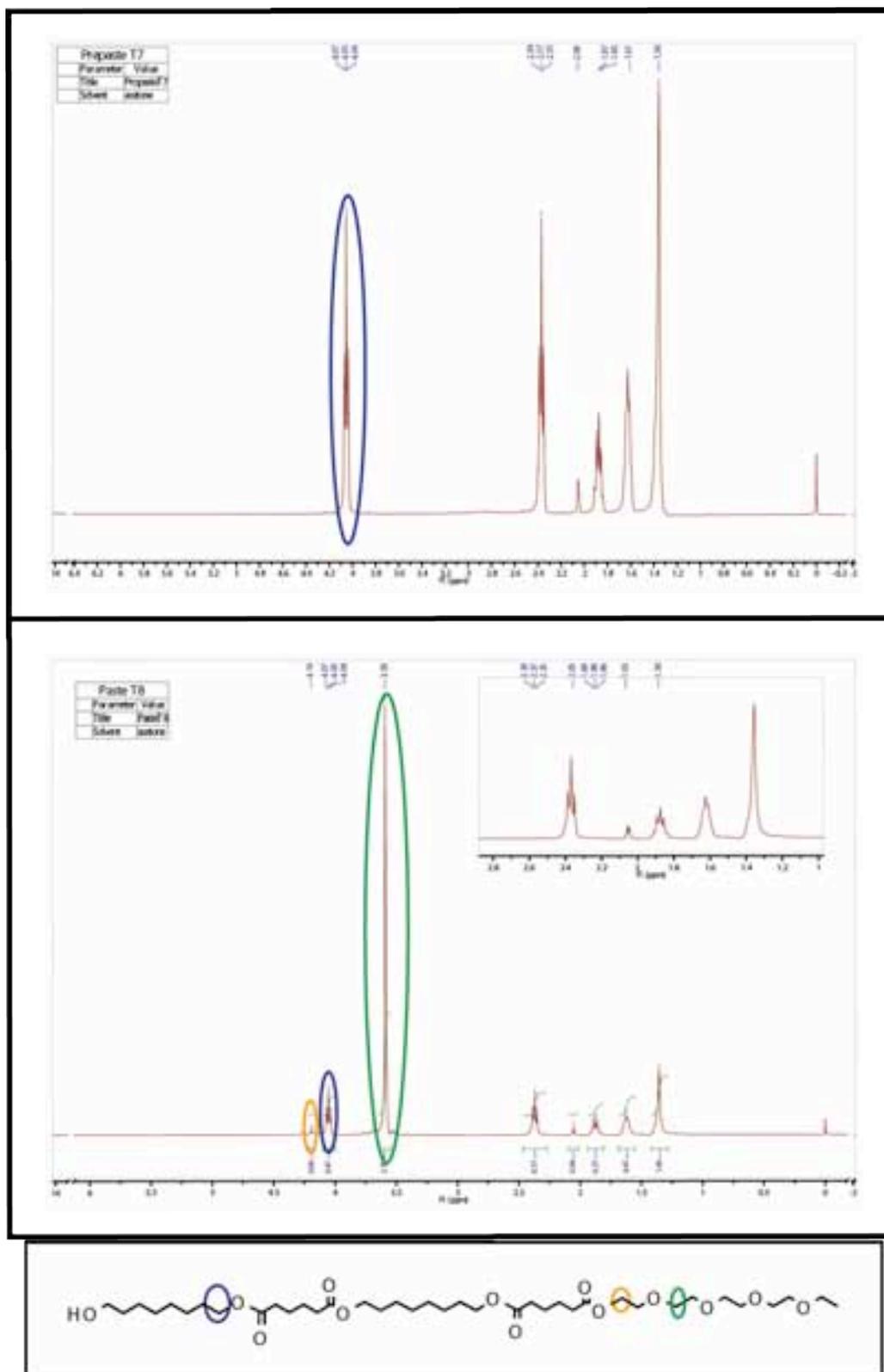


Figura 3.9 Espectro de RMN del prepolímero (a) y del polímero final (b)

En el análisis por HPSEC (High Pressure Size Exclusion Chromatography) se analizó la evolución de los pesos moleculares, teniendo en cuenta los diferentes tiempos de reacción (Tabla 3.3 ) Además, la comparación entre el prepolímero y el polímero completo con el Polietilenglicol (Figura 3.10)

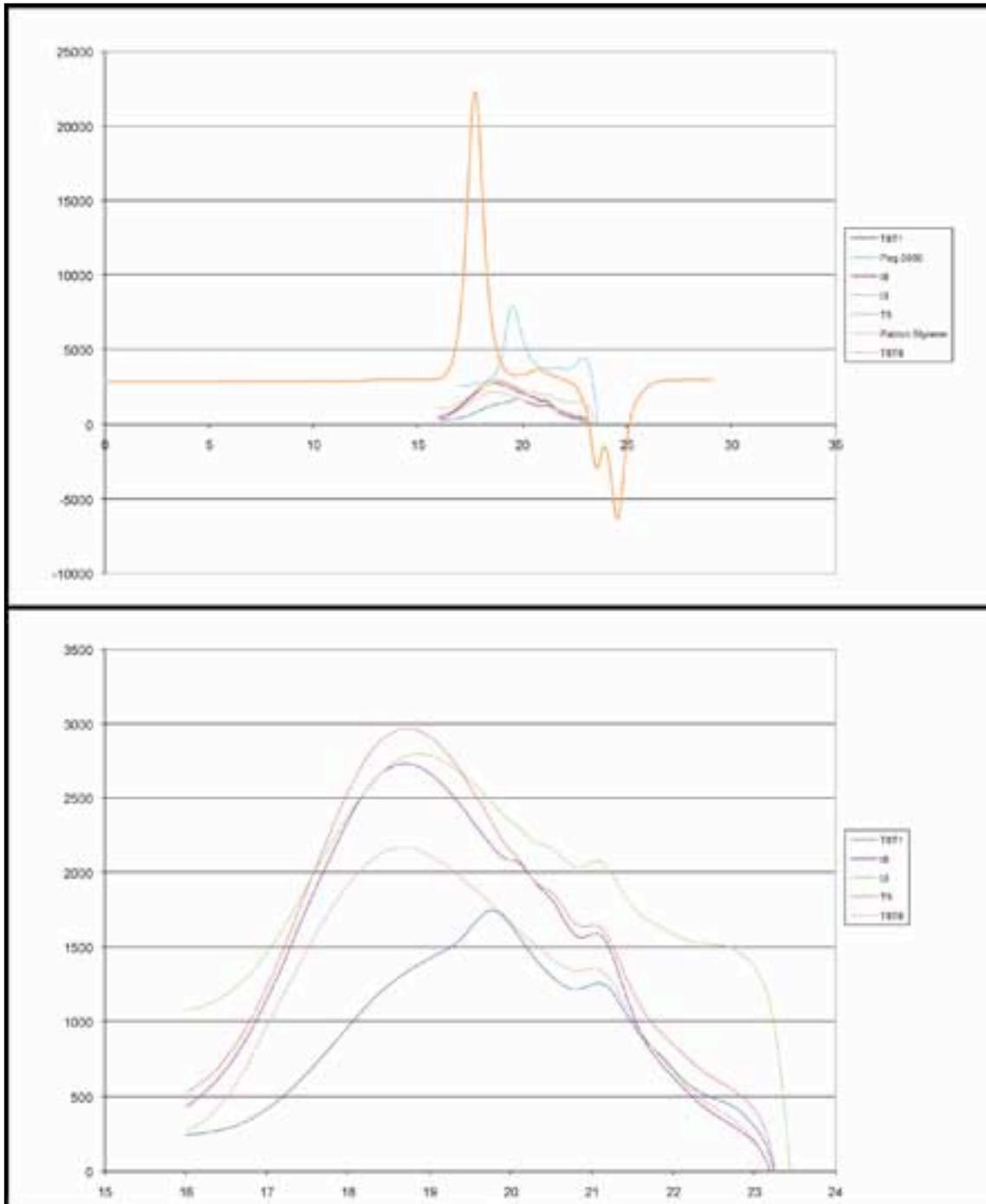


Figura 3.10 Resultados del GPC realizado a los polímeros de la primera sección y al polímero final en comparación con los patrones que se utilizaron (poliestireno monodisperso de PM 6000 y PEG 2000).

**Tabla 3.3: Resultados de los pesos moleculares Mn y Mw y la polidispersidad de los prepolímeros (ácido glutárico más 1,8 octanodiol) y los polímeros finales (prepolímero más polietilenglicol)**

	<b>Mn</b>	<b>Mw</b>	<b>Polidispersidad</b>
<b>T3</b>	3644	8397	2,304
<b>T4</b>	3716	7624	2,051
<b>T5</b>	3796	7422	1,955
<b>T6</b>	3875	7462	1,926
<b>T7</b>	4032	7510	1,863
<b>T8</b>	3841	7353	1,914
<b>T8T1</b>	2938	6666	2,269
<b>T8T2</b>	3396	6660	1,961
<b>T8T5</b>	3142	6849	2,180
<b>T8T8</b>	3700	7111	1,922

En la Tabla 3.3 se resumen los principales pesos moleculares obtenidos mediante HPSEC (High Pressure Size Exclusion Chromatography) en los diferentes tiempos de reacción, tanto para la primera etapa como para la segunda etapa de reacción. La polidispersidad indica el grado de variación o amplitud de una campana gaussiana que representa los pesos moleculares de un polímero. Se representa por la división del peso molecular promedio en masa, con respecto al peso molecular promedio en número:

$$PDI = M_w/M_n$$

$$M_n = \frac{\sum M_i \cdot N_i}{\sum N_i} \cdot M_w = \frac{\sum M_i^2 \cdot N_i}{\sum M_i N_i} = \frac{\sum M_i^3 N_i}{\sum M_i^2 N_i}, M_v = \left[ \frac{\sum M_i^{1+n} N_i}{\sum M_i N_i} \right]^{\frac{1}{n}}$$

Los polímeros, a diferencia de los compuestos de bajo peso molecular, no tienen un peso molecular único, sino que poseen una distribución de pesos moleculares. Este hecho complica el estudio de la física de los polímeros, que tiene que ser estadística. Por ello, se utiliza el peso molecular promedio. Sin embargo, el promedio de pesos moleculares puede representar o incluir pesos muy distintos.

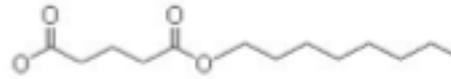
Cabe destacar que los resultados obtenidos para los prepolímeros poseen, según este análisis, un mayor peso molecular que los polímeros completos y, dentro de cada una de las etapas a mayor tiempo de reacción, mayor peso molecular, excepto en los últimos, sugiriendo que llegados a un punto, las cadenas poliméricas en lugar de crecer se comienzan a destruir por efecto de las microondas.

Para realizar un análisis de la evolución de los pesos moleculares, se llevó a cabo a un análisis mediante MALDI-TOF, con que se puede obtener un estudio de los pesos moleculares mucho más preciso. El análisis de los polímeros se realizó a diferentes relaciones entre el ácido glutárico y el octanodiol (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4: Relación molar entre el ácido glutárico y el 1,8 octanodiol en cada uno de los prepolímeros utilizados en los análisis con respecto al PEG.**

Polímero	Relación molar del ácido glutárico y el 1,8-Octanodiol con el PEG
1	1,2
2	1,4
3	1,4 (Peg 1500)
4	1,1
5	1,0

En los espectros de masa del MALDI-TOF obtenidos de los compuestos, se puede ver un pico principal de intensidad en todos ellos, en la repetición de unidades másicas del ácido glutárico y del 1,8 octanodiol menos dos moléculas de agua ( $m/z$ )= 242.35) (Figura 3.11).



**Figura 3.11 Segmento Duro, ácido glutárico con el 1,8-Octanodiol.**

La Figura 3.12 muestran la presencia de una gran cantidad de picos, lo cual puede ser atribuido al PEG. Los picos principales de intensidad se observan en la repetición de la unidad másica del intervalo  $C_2H_4O$  ( $m/z = 44$ ). El espectro másico del MALDI-TOF de los polímeros 1, 2, 4 y 5 tienen una distribución molecular con el centro alrededor del  $m/z = 2000$ , correspondiente con el valor del PEG usado ( $M_w=2000$ ). El espectro del MALDI-TOF del polímero 3 tiene una distribución del peso molecular con el centro alrededor de los 15000, correspondiente al PEG utilizado (Figura 3.12, Figura 3.13).

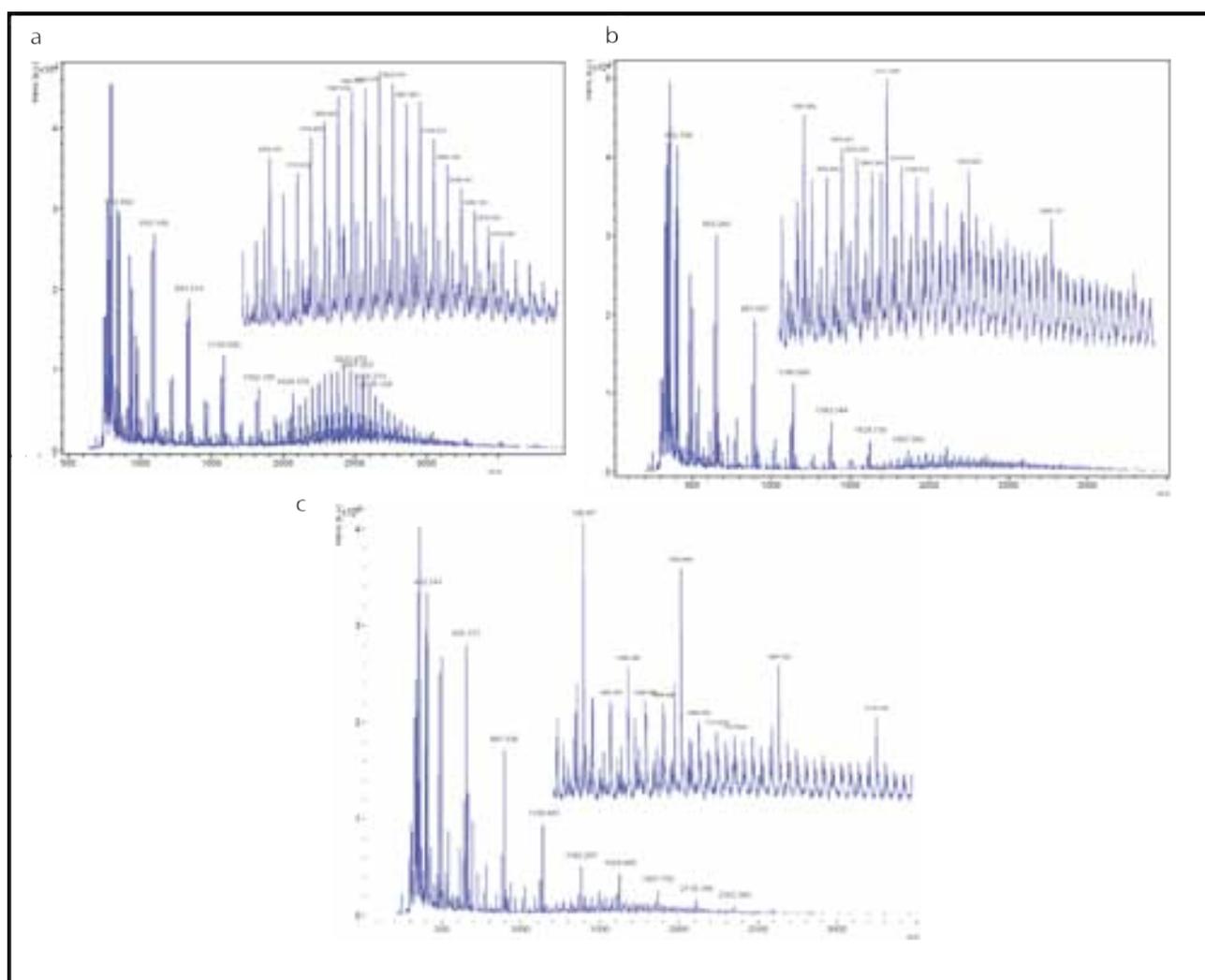


Figura 3.12 Espectro másico de los polímeros 1, 2 y 3

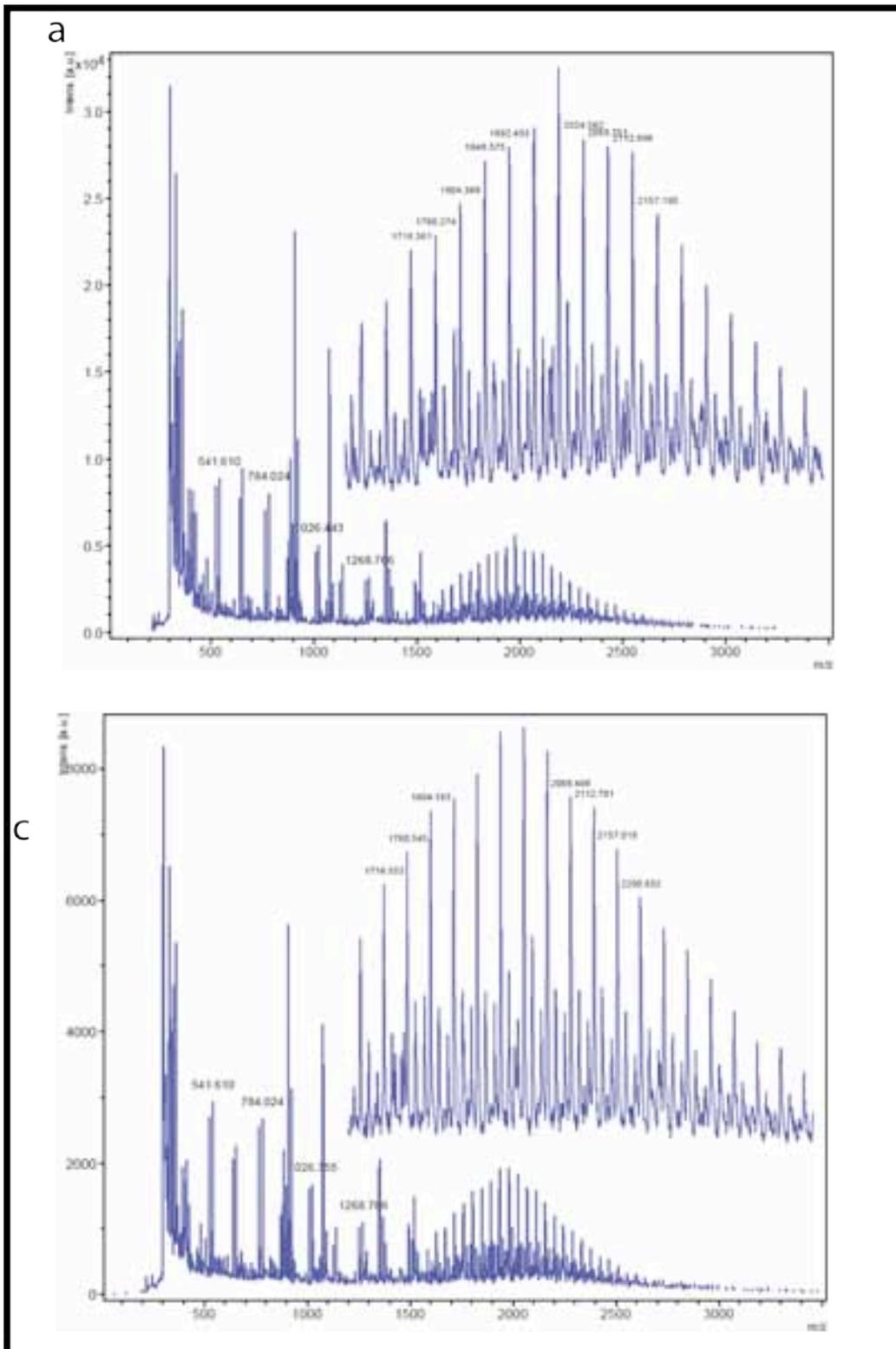


Figura 3.13 espectro másico de los polímeros 4 y 5

Con estos resultados se puede ver que tenemos un polímero de cadena corta de un peso molecular de entre 3000 y 4000, cuya masa principal reside entorno al PEG. Esta composición

permite al material una ordenación de las cadenas, como se ha visto anteriormente en la Figura 3.8 , cuando se aplica un esfuerzo superior a las fuerzas débiles ejercidas en sus bloque duro.

Una vez caracterizado químicamente el material, se realizó al análisis mecánico del mismo. Para ello, se realizaron diferentes experimentos de reometría, intentando caracterizar el comportamiento del composite. El primer análisis que se realizó fue un estudio de la reología de una pasta compuesta por el polímero y la biocerámica en relación 1:0.75. La curva que muestra el material es de un polímero tixotrópico, ya que, a medida que se le aplica un esfuerzo la velocidad de flujo aumenta. Además, ante un esfuerzo constante, la velocidad de flujo también asciende. Cuando se disminuye este esfuerzo, el material vuelve a su estado original, confirmando de esta forma que el material del que disponemos tiene una estructura apropiada para el fin que se busca (Figura 3.14)

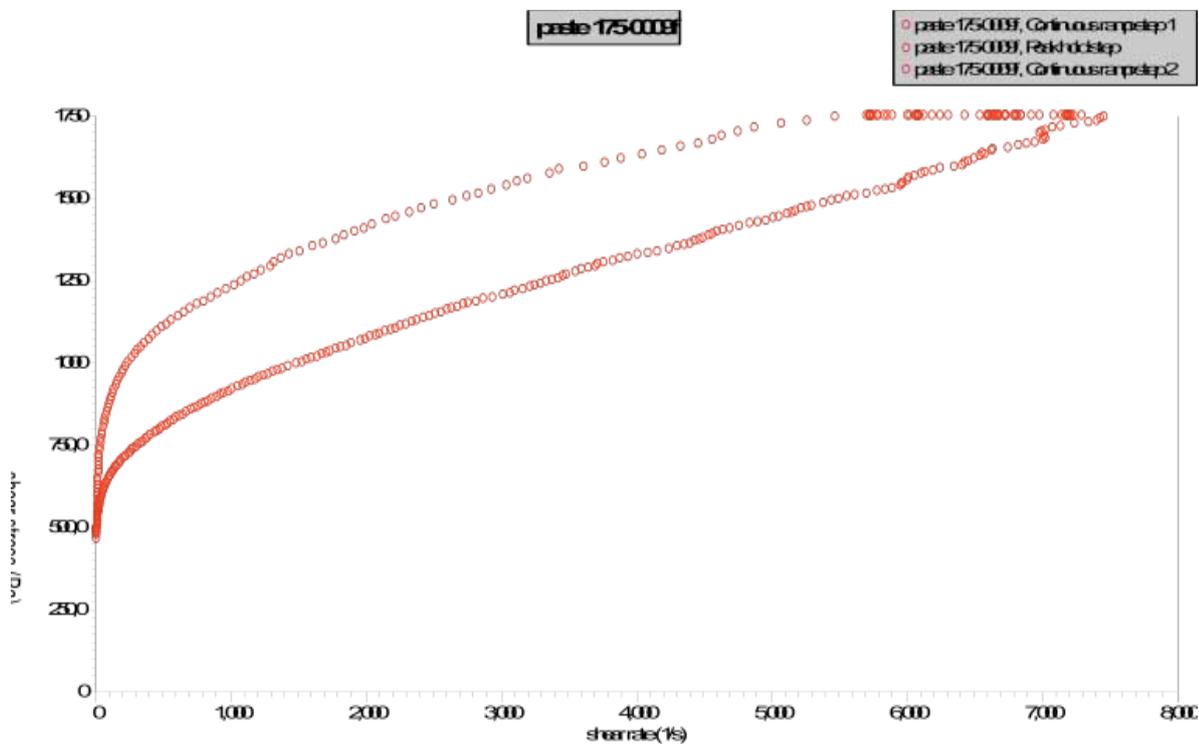
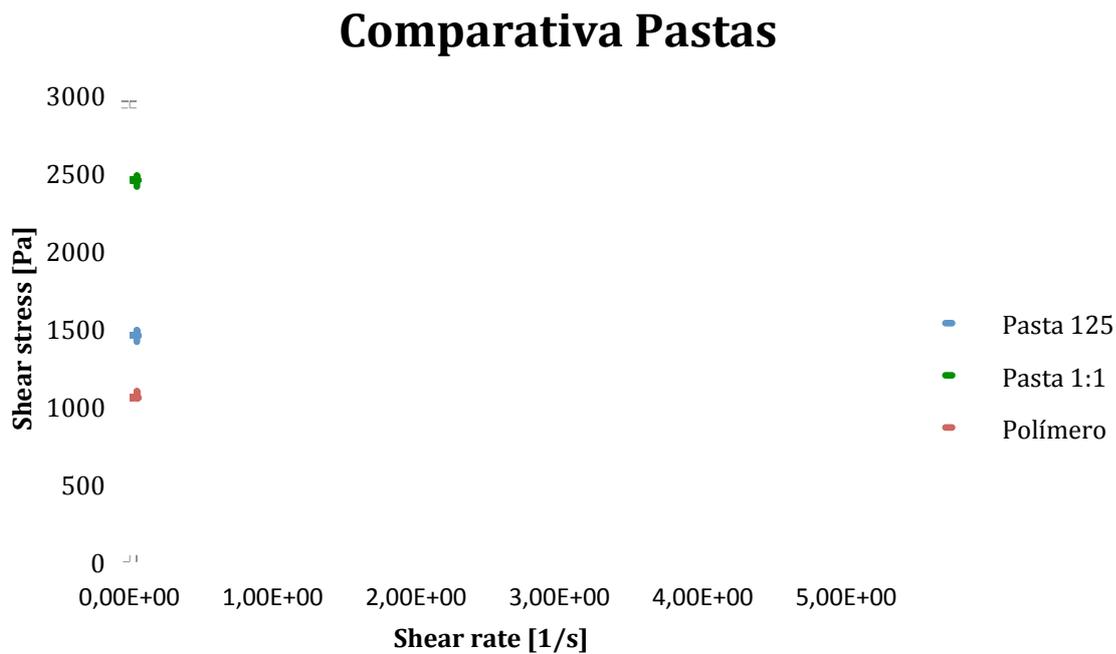


Figura 3.14 Gráfico de Shear Stress Vs Shear Rate del Composite 1:0.75

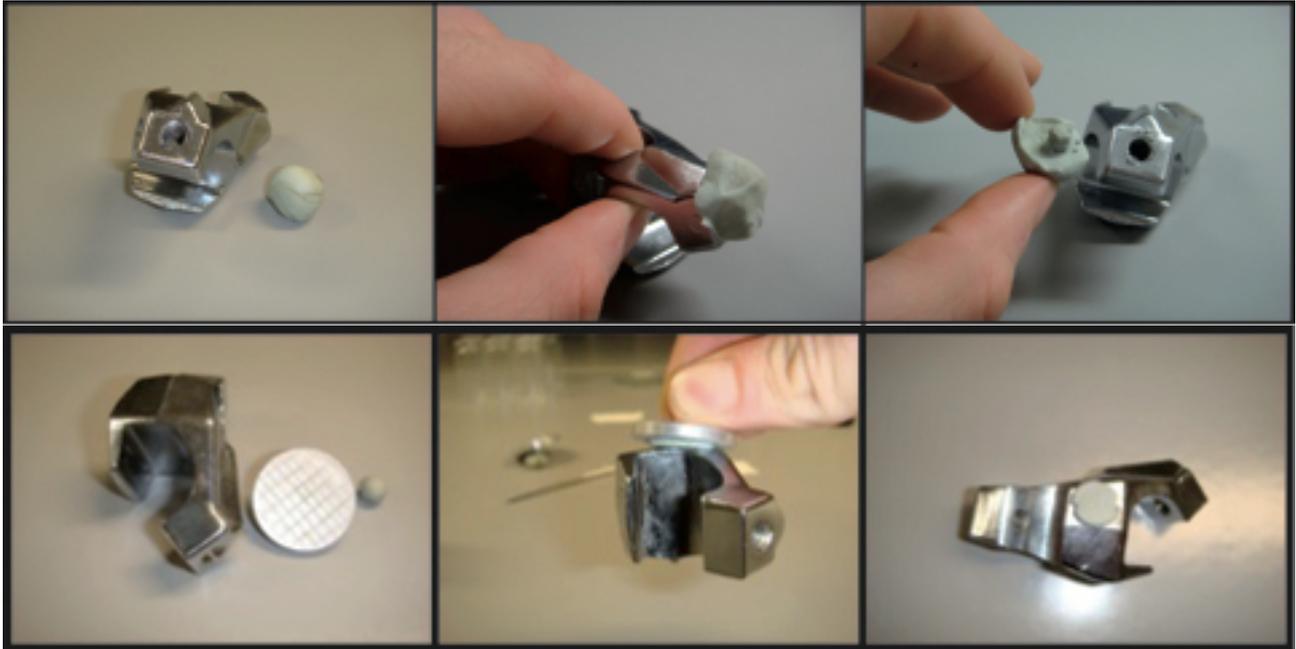
El composite está formado, como se ha comentado con anterioridad, por dos componentes, un polímero biodegradable y un material biocerámico. La relación de cada uno de ellos influye en la regulación de las propiedades mecánicas del material. Así, al aumentar la cantidad de hidroxiapatita en relación con el polímero, la resistencia al esfuerzo cortante aumenta a medida que aumentamos la cantidad de biocerámica, de tal forma que cuando la pasta está

compuesta por una relación polímero-biocerámica de 1:0.25 el esfuerzo que hay que aplicar para que comience a fluir es de aproximadamente 0,6 MPa. Mientras que cuando la relación aumenta a 1:1 la resistencia será de 1,6 MPa (Figura 3.15). Todos los gráficos han sido obtenidos a 37°C, lo cual nos da idea de las características del material una vez ha sido implantado.



**Figura 3.15** Comparación entre tres composites diferentes, en función de la cantidad de hidroxiapatita que posee cada uno.

Conforme a los resultados obtenidos de reometría, se puede ver en la Figura 3.16 como el biomaterial es perfectamente adaptable a las diferentes superficies que se pudieran encontrar al ser implantado.



**Figura 3.16: Adaptación del composite a diferentes zonas**

La caracterización mecánica del composite se realizó en función de la relación entre el ácido glutárico y el 1,8 octanodiol. En primer lugar, se realizó un análisis de velocidad de flujo vs esfuerzo aplicado, que mostró el comportamiento del material (Figura 3.17 y Figura 3.18). La reducción de la viscosidad es una consecuencia del peso molecular del polímero, debido a que se desenmaraña y se orienta durante el proceso de flujo. En el caso del polímero 3, el límite de fluencia que muestra es mucho más bajo que es del resto de polímeros, lo cual es debido a que se utilizó PEG 1500 durante la síntesis en lugar del PEG 2000. A medida que aumenta el ratio molar entre el ácido glutárico y el 1,8-octanodiol, el esfuerzo de cizalla al cual comienza a fluir (límite de fluencia) también aumenta Tabla 3.5.

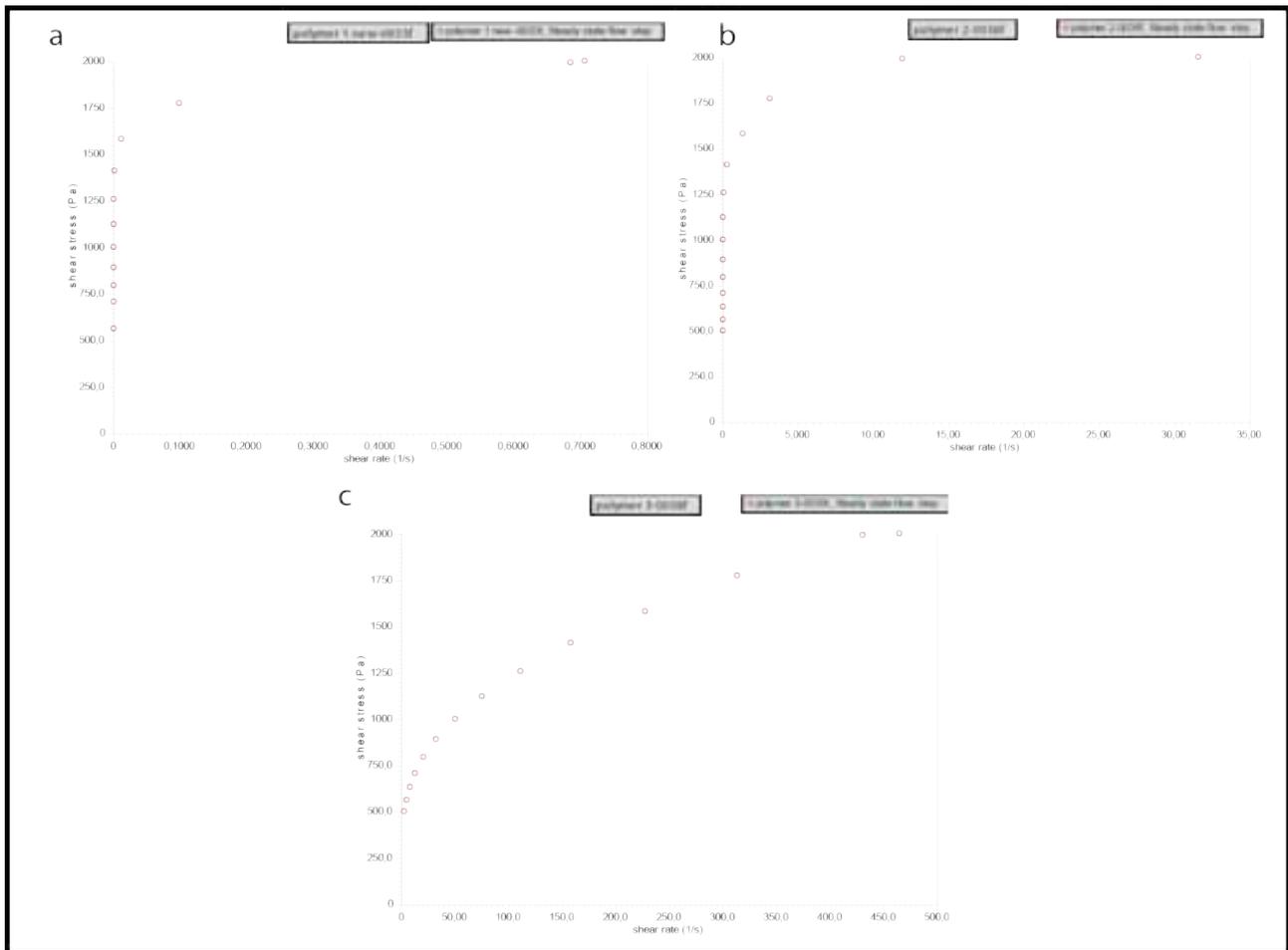


Figura 3.17 Gráficos de Esfuerzo vs Velocidad de flujo para diferentes polímeros.

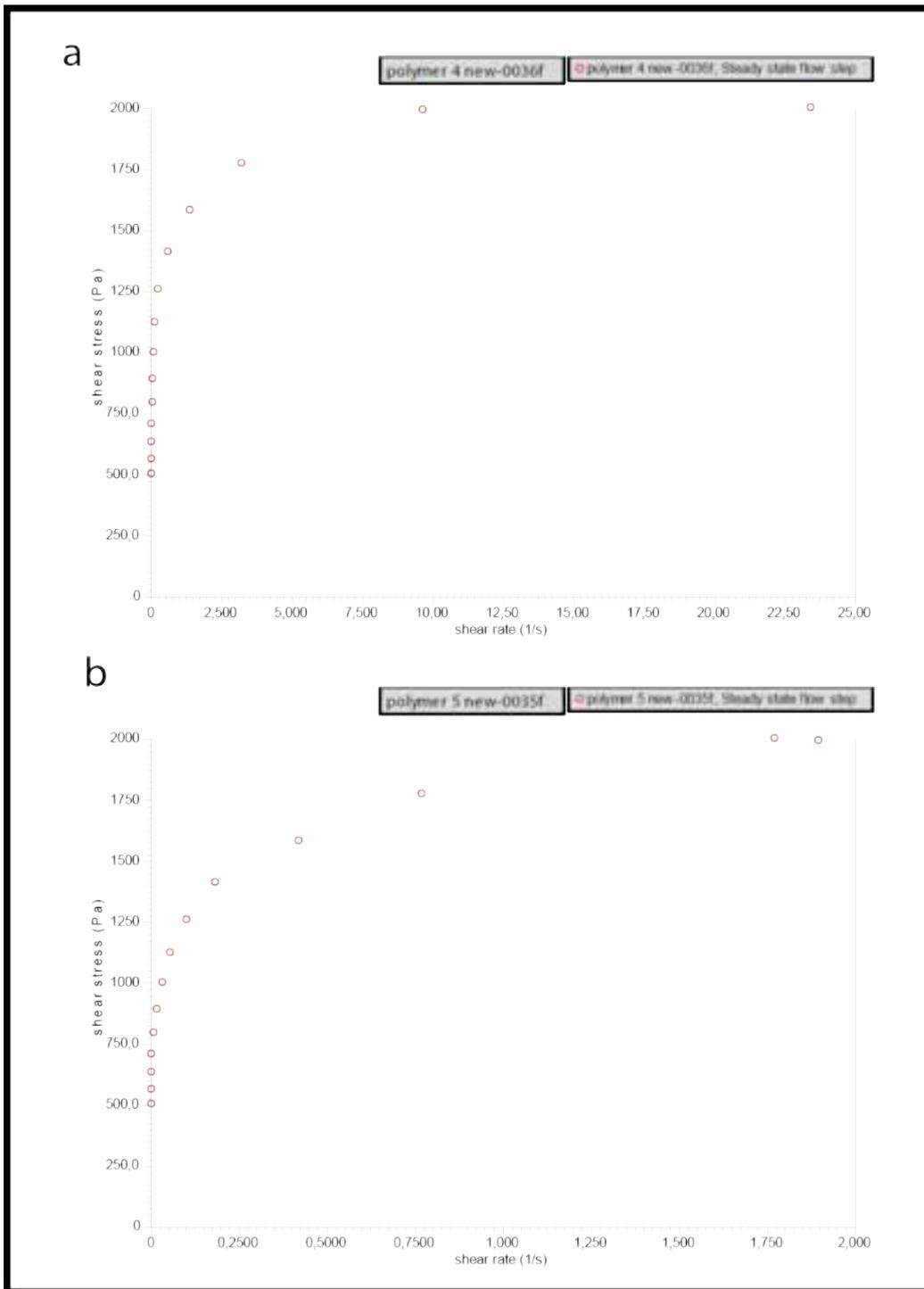


Figura 3.18 Gráficos de Esfuerzo vs Velocidad de flujo para diferentes polímeros

**Tabla 3.5: Resultados para los diferentes polímeros de los esfuerzos cortantes.**

Polímero	Esfuerzo Cortante (Pa)
<b>1</b>	1500
<b>2</b>	1300
<b>3</b>	600
<b>4</b>	1200
<b>5</b>	800

Alrededor de una cierta temperatura todos los sistemas poliméricos sufren un cambio de un estado sólido a un estado fluido (Figura 3.19, Figura 3.20) (componente viscosa vs componente elástica). La temperatura alrededor de la cual este cambio ocurre se resume en la Tabla 3.6

**Tabla 3.6: Resultados de la temperatura de cambio de componente viscosa a componente elástica para los diferentes polímeros.**

Polímero	Temperatura (°C)
<b>1</b>	40
<b>2</b>	35
<b>3</b>	30
<b>4</b>	25
<b>5</b>	30

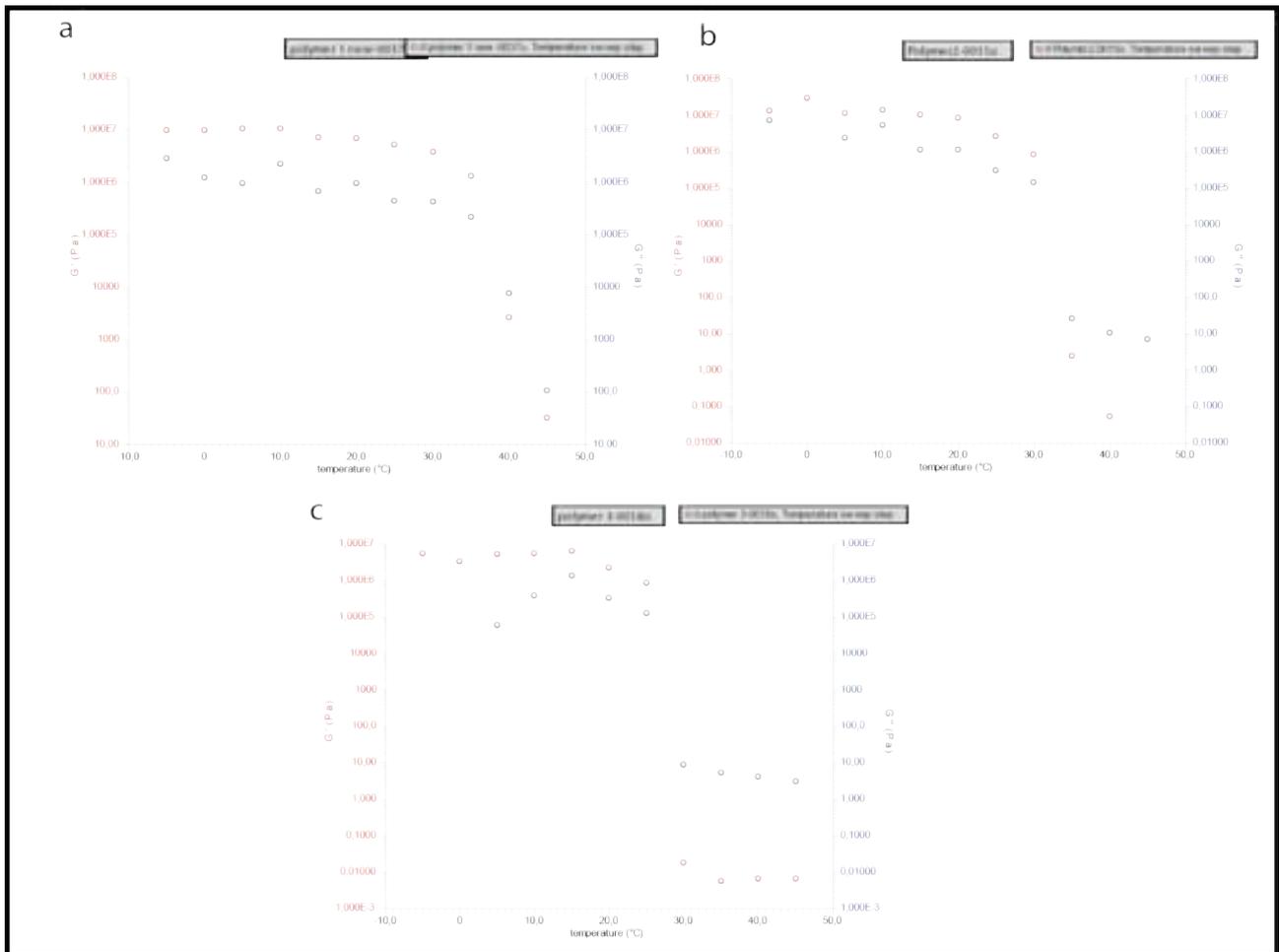
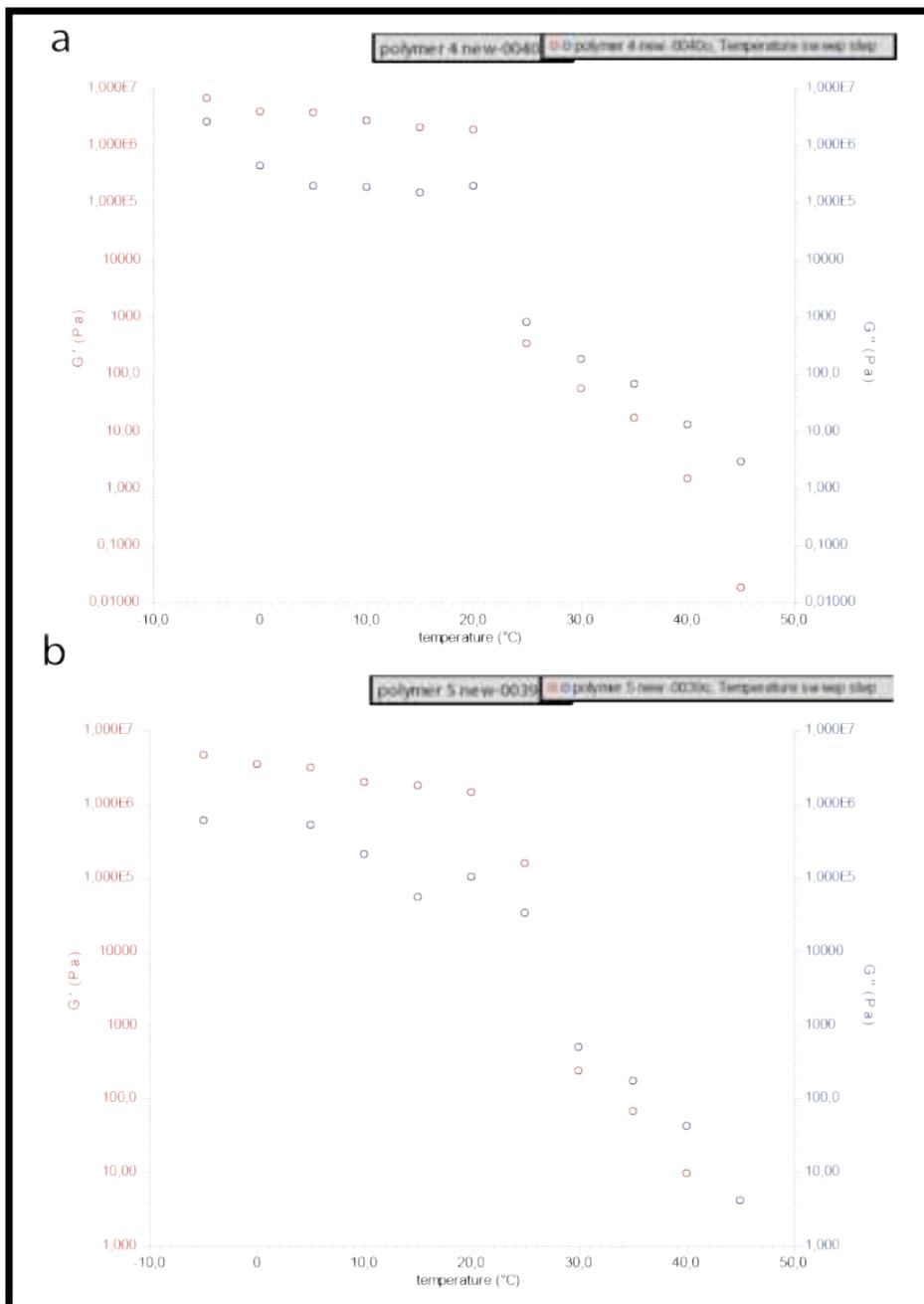


Figura 3.19 Resultado  $G'$  y  $G''$  Vs Temperatura de los polímeros 1 2 y 3



**Figura 3.20 Resultados de  $G'$  y  $G''$  Vs Temperatura de los polímeros 4 y 5.**

En los valores de los polímeros 1, 2, 3, 4 y 5, cuando la relación molar entre el ácido glutárico y el 1,8-octanodiol se incrementa, la temperatura a la cual el cambio ocurre también se incrementa (Polímero 1, 2 muestran un valor más alto que los polímeros 4 y 5). Esto puede ser debido al efecto de la relación molar existente entre los monómeros, ya que, al haber más cantidad de ácido glutárico, será más fácil que las cadenas se unan y así tener cadenas poliméricas más largas. La longitud de la cadena en este caso es directamente proporcional a la temperatura del cambio a componente viscosa que presentan los composites.

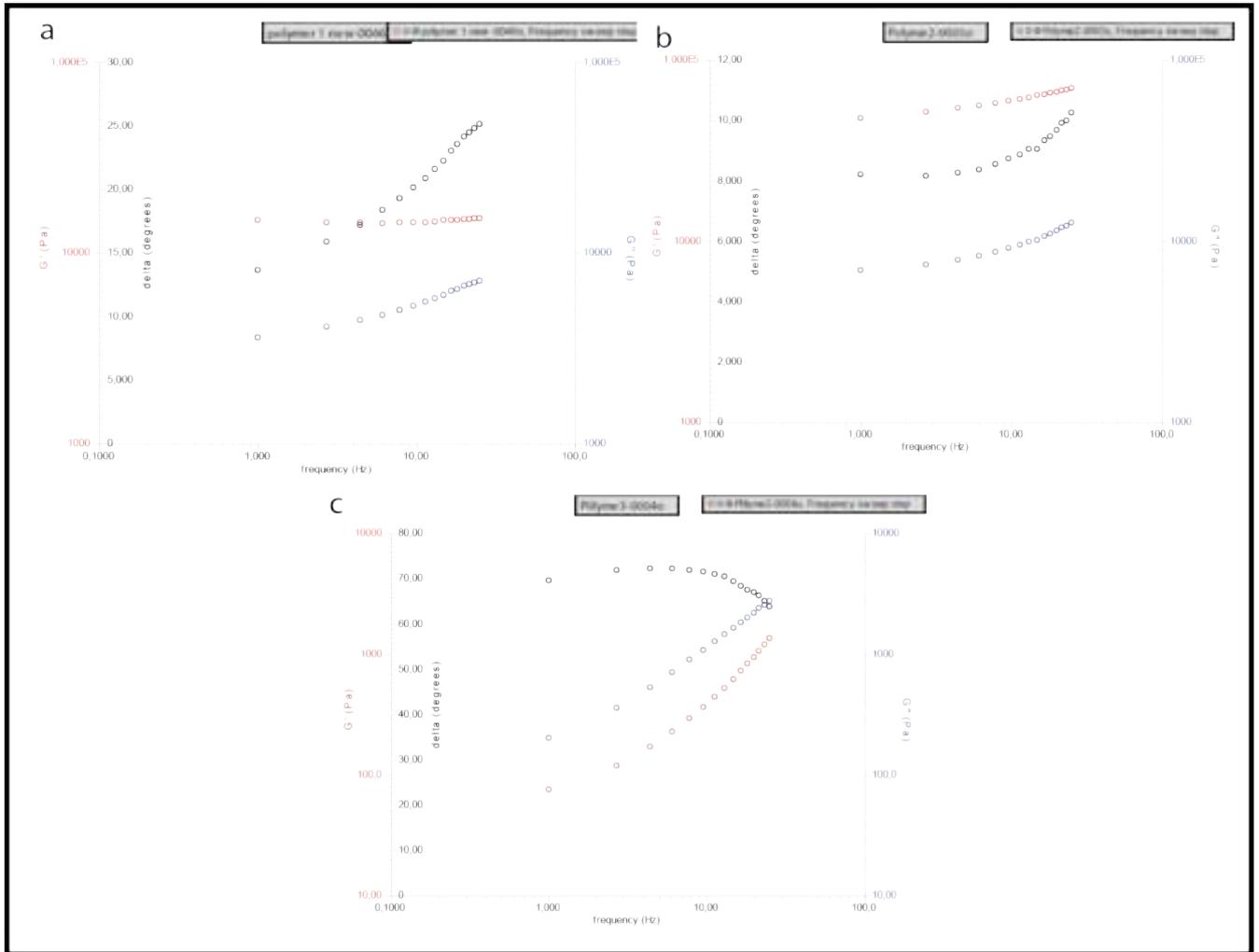


Figura 3.21  $G'$  y  $G''$  Vs Frecuencia para los polímeros 1,2 y 3. La componente elástica  $G'$  domina sobre  $G''$ , excepto en el polímero 3 donde se utilizó un PEG de peso molecular 1500, donde  $G''$  domina sobre  $G'$ .

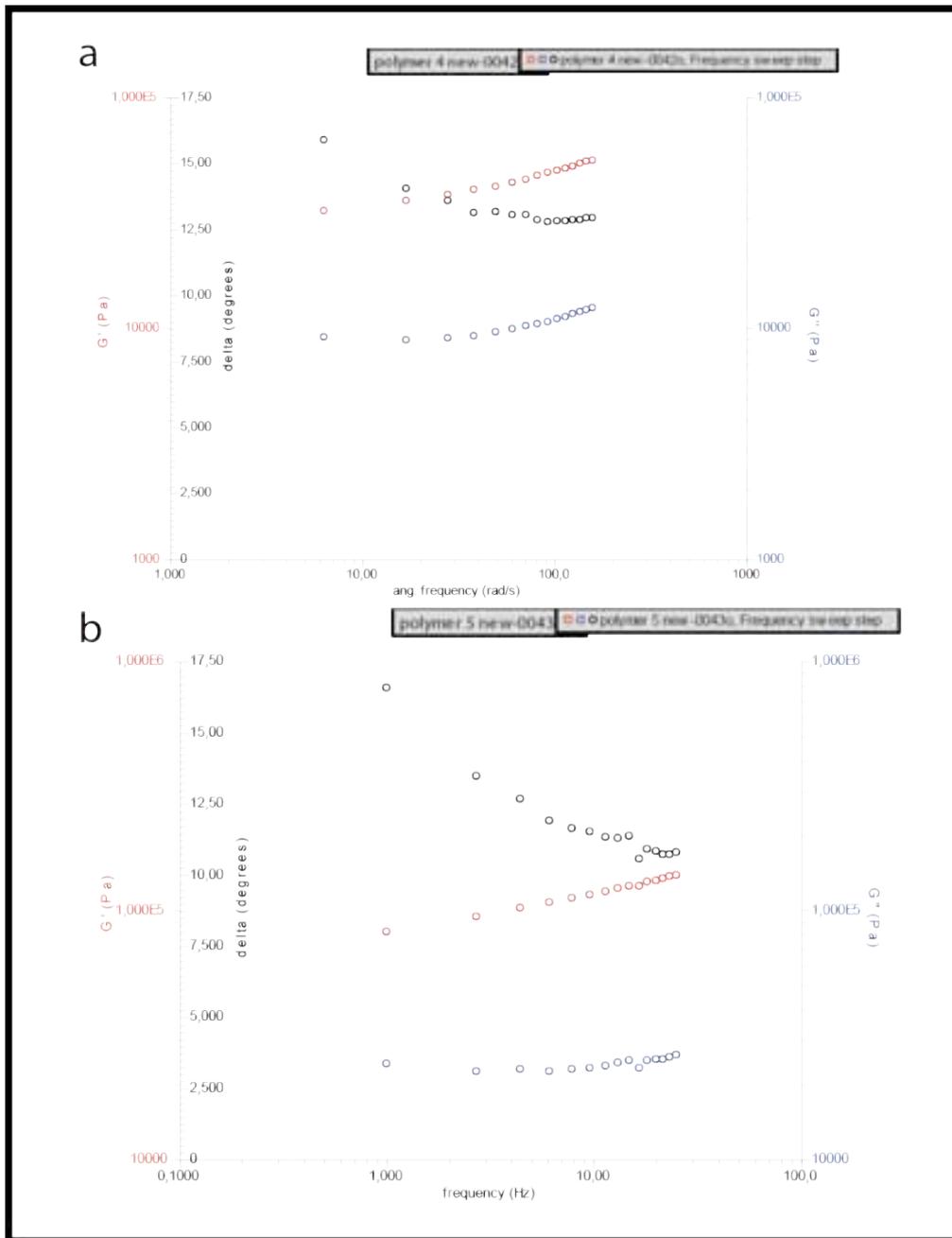
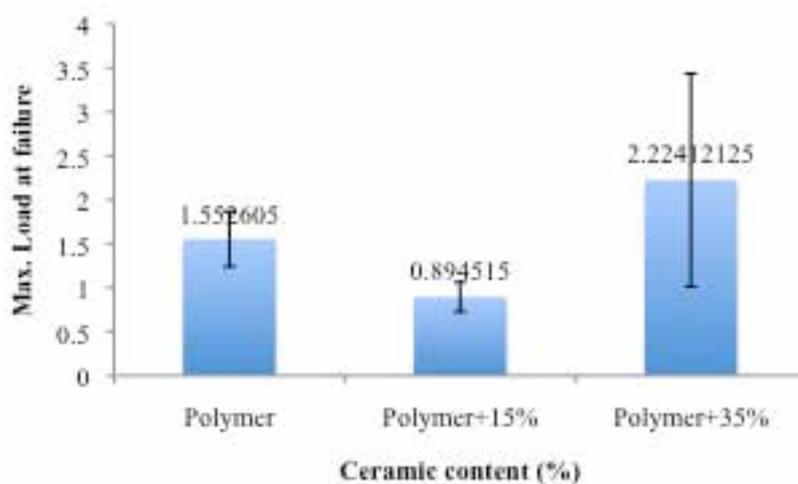


Figura 3.22  $G'$  y  $G''$  Vs Frecuencia para los polímeros 4 y 5

En la Figura 3.21 y en la Figura 3.22  $G'$  domina sobre  $G''$ : El polímero no puede relajar tan rápidamente y tiene una alta elasticidad. El comportamiento es típico de polímeros elásticos. Solo en la caso del polímero 3, con PEG 1500,  $G''$  domina sobre  $G'$ , lo que indica una mayor componente viscosa para este composite, por efecto del menor peso molecular o de las cadenas más cortas.

El material ha sido caracterizado mecánicamente y se ha visto su comportamiento en función de las diferentes variables que se introduzcan en el sistema. Existen varias aplicaciones para este composite, una de las cuales podría ser la de bioadhesivo. Para ello, se analizará su comportamiento en la unión intestinal.

Los resultados para la carga máxima se muestran en la figura 3.23. El polímero por sí solo tiene una carga máxima de  $1,55 \pm 0,31$  N, el polímero con una carga de 15% de biocerámica, tiene una carga máxima de  $0,89 \pm 0,17$  N y, el polímero con un 35% de componente cerámico, tiene una carga máxima de  $2,22 \pm 1,21$  N.



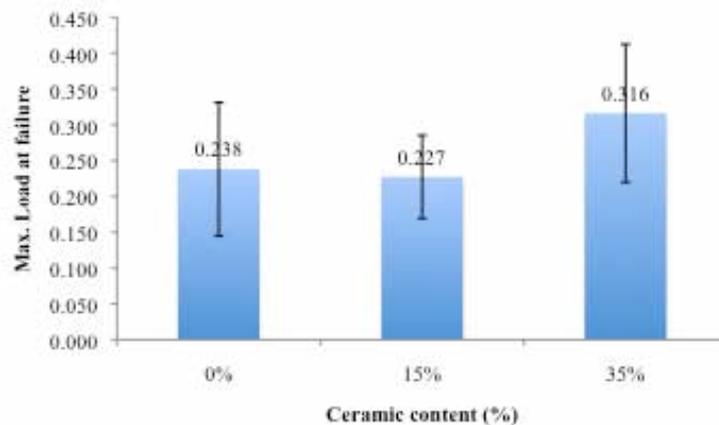
**Figura 3.23** Comportamiento de los composites en función de la cantidad de carga que tienen al ser adheridos a los spines.

Los resultados no muestran una tendencia en función de la cantidad de cerámica utilizada, lo cual implica que el método utilizado podría no ser el óptimo para el objetivo del mismo. También, los resultados obtenidos presentan mucha variabilidad.

Para determinar si el pin metálico está afectando a los resultados, se realizó un segundo experimento en el que se utilizó un trozo de intestino de rata que se pegó sobre los pines. Sobre estos tejidos se añadieron 3 tipos diferentes de composite con cantidades diferentes de biocerámica. Los resultados se muestran en la Figura 3.24.

El intento muestra para los tres diferentes materiales que, cuando aplicamos el material sobre el tejido, es similar a los resultados cuando se aplica directamente sobre el spin. Sin embargo,

cuando aplicamos el material sobre el tejido, la adhesión desciende un 80%. También, el hecho de que los resultados son más bajos en valor, estrecha la ventana de resultados, haciendo que no sean estadísticamente diferentes, cuando se considera la desviación standard. Sin embargo, este tipo de resultados, junto con una alta desviación estándar, es típica de este tipo de experimentos, debido entre otras cosas a la diferencia entre los diferentes trozos de intestino animal.



**Figura 3.24:** Comportamiento de los tres polímeros en función del porcentaje de carga que tienen. El experimento se realizó adheriendo el composite a muestras de intestino.

Por último, y tras ver la aplicación *in vitro* del material, tanto como adhesivo como composite, estructural inyectable, se llevaron a cabo pruebas *in vivo* para validar la tecnología y la biocompatibilidad del composite, realizando de esta forma testeos de biodegradación *in vivo* mediante biodegradación enzimática. Las pruebas *in vivo* se realizaron en el Karolinska Institute de la mano del Dr. Ion.Tcaneau del grupo del Dr. Mikael Wendel del Centre for Oral Biology (COB). Se realizaron unos implantes en unos defectos calvarios originados en ratas. La importancia del estudio radica en ver la toxicidad del material al ser implantado *in vivo* y su correspondiente biodegradación. El material se dejó durante 12 semanas viendo la evolución que iba sufriendo el animal. Transcurrido el tiempo, se realizaron los cortes histológicos y se realizaron las tinciones con hematoxilín-eosina. Lo que se pudo ver fue que el material había sido eliminado en su totalidad, siendo reabsorbido por el animal, sin mostrar ningún tipo de reacción negativa (Figura 3.25)



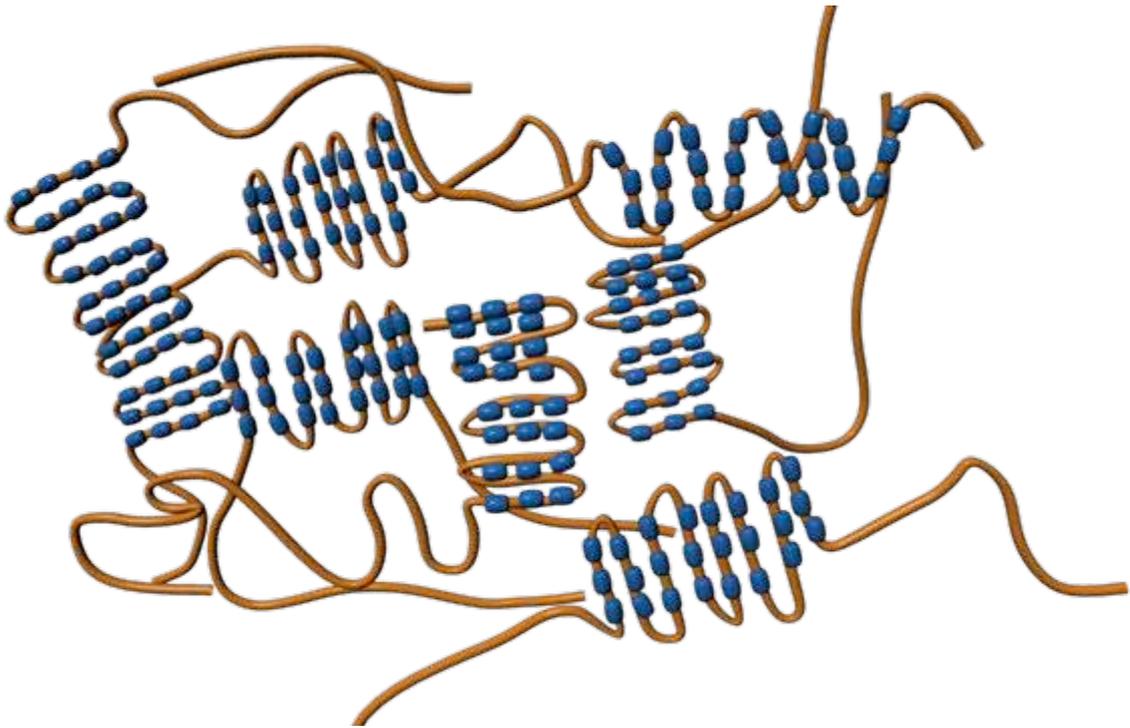
**Figura 3.25** Imagen de la tinción con Hematoxilín-Eosina del defecto calvario con el compuesto, transcurridos las 12 semanas

## 3.5 DISCUSIÓN.

---

Tras realizar todas las pruebas de caracterización del composite se puede ver que la reología tixotrópica es la principal característica del mismo. Esta característica confiere la ventaja de permitir una perfecta adaptación a la superficie a tratar. Los elementos que confieren esta ventaja le dan al material el aspecto y la consistencia de una pasta moldeable por acción de fuerzas mecánicas y calóricas. Otra ventaja característica del composite es su biocompatibilidad, demostrada mediante los implantes *in vivo*, donde no se observó ninguna complicación toxicológica y una perfecta integración en el animal. La pasta termoplástica es biocompatible porque es bien tolerada por el organismo al cual se incorpora. Esta ventaja viene dada por la naturaleza de sus componentes: el polímero en bloque está compuesto por dos tipos de biopolímeros, rígido y flexible, ambos degradables, reabsorbibles y asimilables por los organismos vivos. Así mismo, la biocerámica es también reabsorbible, asimilable y biodegradable.

El biopolímero que constituye el bloque rígido es un heteropolímero compuesto por ácido glutárico y 1,8-octanodiol, aunque se pueden utilizar otros ácidos o dioles como por ejemplo caprolactona, ácido láctico, ácido glicólico, ácido fumárico y sus mezclas (Figura 3.26). También es posible añadir grupos amino, para enlazar con el glutárico, lo cual daría una mayor dureza gracias a los enlaces amídicos producidos a través de los puentes de hidrógeno formados (Figura 3.27)

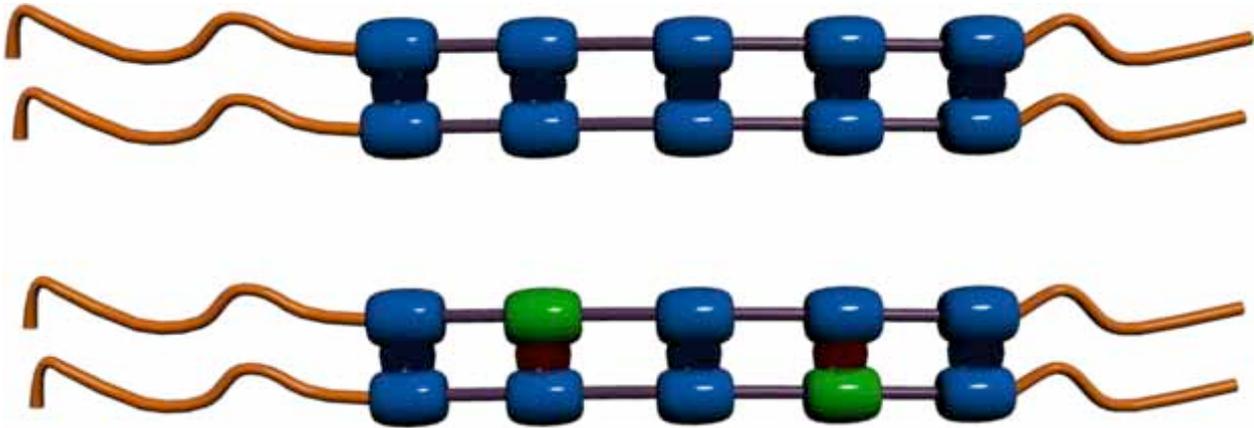


**Figura 3.26** Esquema de la composición de los segmentos duros y blandos en el composite.

El bloque flexible está formado por polímeros de óxido de etileno, concretamente polietilenglicol (PEG). Aunque la pasta termoplástica puede albergar cualquier biopolímero con un número suficiente de radicales hidroxilo libres de manera que éstos sean capaces de formar puentes de hidrógeno con la cerámica. En ingeniería tisular este composite sería de mucha utilidad al añadir constituyentes minoritarios para conseguir efectos terapéuticos o cosméticos apropiados para cada caso. Entre ellos, se pueden encontrar compuestos citotóxicos; factores de crecimiento o diferenciación celular; compuestos antivirales, antibióticos y antifúngicos; partículas portadoras de ácidos nucleicos destinados a modificar la expresión celular de elementos genéticos intrínsecos o extrínsecos al tejido, elementos nutritivos y acondicionadores, como aceites cosméticos, y combinaciones de todos ellos. Por ejemplo, el composite puede ser cargado con diferentes compuestos, como puede ser el ácido hialurónico, el cual resulta altamente compatible con el tejido nervioso, epitelial y conectivo y es un promotor de la proliferación y la migración celular [47, 48]. El composite resultante tendría efectos citotóxicos para el tratamiento de lesiones producidas por un crecimiento celular desproporcionado, como por ejemplo tumores.

El composite está dominado por el efecto de las fuerzas de atracción que se producen en el segmento duro, que, al aplicar un esfuerzo cortante, van desapareciendo y perdiendo la componente elástica del polímero. Al añadir otros monómeros en la segmento duro, como

pueden ser los grupos amino, que forma enlaces amídicos, se varían las propiedades mecánicas del material gracias a la aparición de nuevas fuerzas de atracción con mayor intensidad (Figura 3.27).



**Figura 3.27** Efecto de las fuerzas de atracción que se producen en el segmento duro del composite. Se puede ver que el cambio de un monómero permite el endurecimiento gracias a las fuerzas de atracción mayores que provocan por ejemplo los grupos amino.

La biocerámica se encuentra particulada y está distribuída de manera homogénea en la ultraestructura de la pasta. Cuanto más uniforme sea la distribución de las partículas de biocerámica, más uniforme serán las propiedades del material y más predecible su comportamiento en cada aplicación práctica. Dentro de la gran cantidad de biocerámicas se escogió la hidroxiapatita (HA) como componente particulado del composite. La HA es el componente mineral del hueso natural y es ampliamente utilizado en la regeneración ósea. Otra biocerámica que también puede ser utilizada es el bioglass [49]. El bioglass es una cerámica no cristalina altamente biocompatible.

Viendo las amplias características del material y, por tanto, sus variadas aplicaciones el composite fue patentado en la Oficina Española de patentes y Marcas y también se ha presentado la solicitud PCT, que a la hora de realizar este escrito está concedida y en fases regionales de Europa, EEUU, Canada y Japón. El composite recibió el nombre comercial de Biotack simulando un blue-tack biodegradable.

El Biotack tiene propiedades adhesivas, aunque no parezca que depende en gran medida de la cantidad de biocerámica que contiene a bajas concentraciones. Sin embargo, parece que con una alta cantidad de componente cerámico (35%) la adhesión del material mejora

notablemente. Por lo que se estima que, a mayores concentraciones de éste, las capacidades adhesivas mejorará notablemente.

El resultado del material utilizado sobre tejido tiene valores entre 0.227 y 0.317N. Los valores típicos de carga máxima al fallo de adhesivos para propuestos médicos son de entre 0.2 N para la fibrina y de 0.7 N para el cianoacrilato. Mientras que la fibrina es un adhesivo altamente biocompatible, sus propiedades de adhesión son extremadamente pobres. Por contrapartida, el cianoacrilato, tiene tal fuerza de adhesión, que daña los tejidos donde es aplicado. En la Tabla 3.7 se resumen los principales adhesivos utilizados en medicina. Todos ellos para ser perfectamente adaptables a las zonas donde se implantarán han de estar en estado líquido antes de la implantación y posteriormente, por diferentes métodos, ha de realizarse el curado y así solidificar para obtener la acción sellante. En la tabla Tabla 3.7 también se pueden ver los principales métodos de curado de cada uno de los productos. El gran problema que reside en todos ellos es que son materiales que requieren una manipulación para poder ser utilizados, lo que complica la forma de uso. Por ello, la necesidad de buscar un adhesivo intermedio que además sea fácil de utilizar como biosellante tiene una alta importancia. El biotack tiene una fuerza de adhesión en el rango anteriormente escrito, lo cual lo convierte en un material apropiado para fines médicos. El material que posee una cantidad de 15% de cerámica, está muy cerca del “fibrin glue”, por lo que su adhesión no es especialmente fuerte. Sin embargo, el polímero con una cantidad de cerámica del 35% tiene mejores propiedades, mostrando una mayor fuerza de adhesión que los otros dos materiales.

**Tabla 3.7: Resultados de la temperatura de cambio de componente viscosa a componente elástica para los diferentes polímeros.**

Type	Components	Setting mechanism
<b>Soft-tissue adhesives</b>		
Cyanoacrylate	Butyl or isobutyl cyanoacrylate	Addition polymerization
Fibrin sealants	A. Fibrinogen, B. Thrombin, CaCl <sub>2</sub>	Fibrin clot formation
Factor XIII		
GRF glue	Gelatin, resorcinol, formaldehyde	Condensation Polymerization
Hydrogel	Block copolymers of PEG, poly(lactic acid) and acrylate esters	Photoinitiated addition polymerization
<b>Hard-tissue adhesives</b>		
<i>Bone</i>		
Acrylic bone cement	Methyl methacrylate and poly (methyl methacrylate)	Peroxide-amine initiated addition polymerization
<i>Teeth</i>		
Dental cements	Zinc oxide powder, phosphoric acid liquid	Acid-base reaction, Zn complexation
Zinc phosphate		
Zinc polycarboxylate	Zinc oxide powder, aqueous poly (acrylic acid)	Acid-base reaction, Zn complexation
Glass ionomer (polyalkenoate)	Ca, Sr, Al silicate glass powder aqueous poly (acrylic-itaconic acid) or (acrylic-maleic acid)	Acid-base reaction, metal ion complexation
Resin-based	Aromatic or urethane dimethacrylate monomers, silicate or other glass fillers aqueous poly(acrylic acid-itaconic acid-methacrylate) comonomers	Peroxide-amine or photoinitiated polymerization Photoinitiated addition polymerization
Resin-modified glass ionomer	Hydroxyethyl methacrylate aromatic or urethane dimethacrylates, Ca, Sr, Al glass powder	
Dentin adhesive	Etchant: phosphoric acid primer: carboxylate or phosphate Monomers hydroxyethyl methacrylate/water/solvent Bonding agent: urethane or aromatic dimethacrylate monomers	Photoinitiated addition polymerization



que podrá ser utilizado en todos los rango que sean necesarios y para cada uno de los tejidos, añadiendo, además, las capacidad regeneradora del propio material incluyendo en el mismo diferentes factores de crecimiento que puedan ser de interese en función el tejido a reparar.

## 3.6 BIBLIOGRAFÍA

1. Khan, Y., et al., *Tissue engineering of bone: material and matrix considerations*. J Bone Joint Surg Am, 2008. **90 Suppl 1**: p. 36-42.
2. Matter, P. and H.B. Burch, *Clinical experience with titanium implants, especially with the limited contact dynamic compression plate system*. Arch Orthop Trauma Surg, 1990. **109**(6): p. 311-3.
3. Kutz, M., *Standard handbook of biomedical engineering and design* 2003, New York: McGraw-Hill. 1 v. ([pg. multiple]).
4. Lorei, M.P., et al., *Failed total wrist arthroplasty. Analysis of failures and results of operative management*. Clin Orthop Relat Res, 1997(342): p. 84-93.
5. Lampman, S., et al., *Fatigue life behavior*, in *ASM handbook, Fatigue and Fracture* 1996, ASM international. p. 837-853.
6. Illi, O.E., H. Weigum, and F. Misteli, *Biodegradable implant materials in fracture fixation*. Clin Mater, 1992. **10**(1-2): p. 69-73.
7. Yang, J., et al., *Synthesis and evaluation of poly(diols citrate) biodegradable elastomers*. Biomaterials, 2006. **27**(9): p. 1889-98.
8. Hedberg, E.L., et al., *In vitro degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds*. Biomaterials, 2005. **26**(16): p. 3215-25.
9. Wang, Y., et al., *A tough biodegradable elastomer*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(6): p. 602-6.
10. Kylmä, J. and J.V. Seppälä, *Synthesis and Characterization of a Biodegradable Thermoplastic Poly(ester-urethane) Elastomer*. Macromolecules, 1997. **30**(10): p. 2876-2882.
11. Saad, G.R., Y.J. Lee, and H. Seliger, *Synthesis and Thermal Properties of Biodegradable Poly(ester-urethane)s Based on Chemo-Synthetic Poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate]*. Macromol Biosci, 2001. **1**(3): p. 91-99.
12. Ding, T., et al., *Synthesis, characterization and in vitro degradation study of a novel and rapidly degradable elastomer*. Polymer Degradation and Stability, 2006. **91**(4): p. 733-739.
13. Shikanov, A. and A.J. Domb, *Poly(sebacic acid-co-ricinoleic acid) biodegradable injectable in situ gelling polymer*. Biomacromolecules, 2006. **7**(1): p. 288-96.
14. Balakrishnan, B. and A. Jayakrishnan, *Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds*. Biomaterials, 2005. **26**(18): p. 3941-51.
15. Jeong, B., et al., *Thermogelling Biodegradable Polymers with Hydrophilic Backbones: PEG-g-PLGA*. Macromolecules, 2000. **33**(22): p. 8317-8322.
16. Dauner, M., et al., *Resorbable continuous-fibre reinforced polymers for osteosynthesis*. J Mater Sci Mater Med, 1998. **9**(3): p. 173-9.
17. Zheng, X., et al., *Shape memory properties of poly(D,L-lactide)/hydroxyapatite composites*. Biomaterials, 2006. **27**(24): p. 4288-95.
18. Nagae, M., et al., *Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres*. Tissue Eng, 2007. **13**(1): p. 147-58.
19. Mauth, C., et al., *Cell-seeded polyurethane-fibrin structures--a possible system for intervertebral disc regeneration*. Eur Cell Mater, 2009. **18**: p. 27-38; discussion 38-9.
20. Zhang, Q.H., S.H. Tan, and S.M. Chou, *Effects of bone materials on the screw pull-out strength in human spine*. Med Eng Phys, 2006. **28**(8): p. 795-801.
21. Lieberman, I.H., D. Togawa, and M.M. Kayanja, *Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials*. Spine J, 2005. **5**(6 Suppl): p. 305S-316S.
22. Boger, A., et al., *Adjacent vertebral failure after vertebroplasty: a biomechanical study of low-modulus PMMA cement*. Eur Spine J, 2007. **16**(12): p. 2118-25.
23. Chiras, J., et al., *[Percutaneous vertebroplasty]*. La Revue de medecine interne / fondee ... par la Societe nationale francaise de medecine interne, 1995. **16**(11): p. 854-9.
24. Deramond, H., C. Depriester, and P. Toussaint, *[Vertebroplasty and percutaneous interventional radiology in bone metastases: techniques, indications, contra-indications]*. Bulletin du cancer.

- Radiotherapie : journal de la Societe francaise du cancer : organe de la societe francaise de radiotherapie oncologique, 1996. **83**(4): p. 277-82.
25. Cotten, A. and B. Duquesnoy, *Vertebroplasty: current data and future potential*. Revue du rhumatisme, 1997. **64**(11): p. 645-9.
  26. Heini, P.F., B. Walchli, and U. Berlemann, *Percutaneous transpedicular vertebroplasty with PMMA: operative technique and early results. A prospective study for the treatment of osteoporotic compression fractures*. Eur Spine J, 2000. **9**(5): p. 445-50.
  27. Winking, M., et al., *PMMA vertebroplasty in patients with malignant vertebral destruction of the thoracic and lumbar spine*. Ger Med Sci, 2003. **1**: p. Doc08.
  28. Winking, M., et al., *Treatment of pain from osteoporotic vertebral collapse by percutaneous PMMA vertebroplasty*. Acta Neurochir (Wien), 2004. **146**(5): p. 469-76.
  29. Hong, S.J., et al., *The biomechanical evaluation of calcium phosphate cements for use in vertebroplasty*. J Neurosurg Spine, 2006. **4**(2): p. 154-9.
  30. Heini, P.F. and U. Berlemann, *Bone substitutes in vertebroplasty*. Eur Spine J, 2001. **10 Suppl 2**: p. S205-13.
  31. Suzuki, N., O. Ogikubo, and T. Hansson, *The course of the acute vertebral body fragility fracture: its effect on pain, disability and quality of life during 12-7months*. European Spine Journal, 2008. **17**(10): p. 1380-1390.
  32. Alphatec, *Results 2008*. 2008.
  33. Jaradat, Z.W., et al., *Characterization of surface proteins of Cronobacter muytjensii using monoclonal antibodies and MALDI-TOF Mass spectrometry*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 148.
  34. Holland, R.D., et al., *Identification of bacterial proteins observed in MALDI TOF mass spectra from whole cells*. Anal Chem, 1999. **71**(15): p. 3226-30.
  35. Hung, K.C., H. Ding, and B. Guo, *Use of poly(tetrafluoroethylene)s as a sample support for the MALDI-TOF analysis of DNA and proteins*. Anal Chem, 1999. **71**(2): p. 518-21.
  36. Caprioli, R.M., T.B. Farmer, and J. Gile, *Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS*. Anal Chem, 1997. **69**(23): p. 4751-60.
  37. Li, Y., et al., *MALDI-TOF Mass Spectral Characterization of Polymers Containing an Azide Group: Evidence of Metastable Ions*. Macromolecules, 2010. **43**(14): p. 6225-6228.
  38. Walterova, Z. and J. Horsky, *Quantification in MALDI-TOF mass spectrometry of modified polymers*. Anal Chim Acta, 2011. **693**(1-2): p. 82-8.
  39. Wetzal, S.J., et al., *Significant parameters in the optimization of MALDI-TOF-MS for synthetic polymers*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**(2): p. 246-52.
  40. Marie, A., F. Fournier, and J.C. Tabet, *Characterization of synthetic polymers by MALDI-TOF/MS: investigation into new methods of sample target preparation and consequence on mass spectrum finger print*. Anal Chem, 2000. **72**(20): p. 5106-14.
  41. Li, L., *Overview of MS and MALDI MS for Polymer Analysis*, in *Maldi Mass Spectrometry for Synthetic Polymer Analysis* 2009, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-8.
  42. Zenobi, R., *Ionization Processes and Detection in MALDI-MS of Polymers*, in *Maldi Mass Spectrometry for Synthetic Polymer Analysis* 2009, John Wiley & Sons, Inc. p. 9-26.
  43. Owens, K.G. and S.D. Hanton, *Conventional MALDI Sample Preparation*, in *Maldi Mass Spectrometry for Synthetic Polymer Analysis* 2009, John Wiley & Sons, Inc. p. 129-158.
  44. Menard, K.P., *Dynamic mechanical analysis : a practical introduction* 1999, Boca Raton, Florida [etc.]: CRC Press. 208 p.
  45. Barnes, H.A., J.F. Hutton, and K. Walters, *An introduction to rheology*. 1st. ed. Rheology series 1989, Amsterdam: Elsevier. IX, 199p.
  46. B.D. R., *Biomaterials Science: An introduction to materials in Medicine* 1996, San Diego: Academic Press.
  47. Schwartz, Z., et al., *Hyaluronic acid and chondrogenesis of murine bone marrow mesenchymal stem cells in chitosan sponges*. Am J Vet Res, 2011. **72**(1): p. 42-50.
  48. Raines, A.L., et al., *Hyaluronic acid stimulates neovascularization during the regeneration of bone marrow after ablation*. J Biomed Mater Res A, 2011. **96**(3): p. 575-83.
  49. Hench, L.L., *The story of Bioglass*. J Mater Sci Mater Med, 2006. **17**(11): p. 967-78





# **Capítulo 4: La superficie**



## 4.2 INTRODUCCIÓN

---

Desde hace más de 10 años se sabe que las células de mamíferos diferenciadas pueden ser reprogramadas a un estado pluripotente mediante la transferencia de contenido de núcleos de oocitos fertilizados o por fusión con células embrionarias. Sin embargo, el avance decisivo en el campo de la reprogramación celular lo constituyó la obtención de células pluripotentes a partir de células diferenciadas de ratón, mediante la adición de factores químicos definidos (en concreto los genes Oct-4, Sox2, Klf4 y c-Myc), logrado por primera vez por el grupo del Dr. Shinya Yamanaka en el año 2006 [1]. Dichas células pluripotentes, denominadas iPSC (*Induced Pluripotent Stem Cells*), fueron posteriormente obtenidas de forma independiente por numerosos grupos mediante procedimientos derivados del método de Yamanaka, y todos los estudios demuestran que presentan un cariotipo normal, con un estado transcripcional y epigenético similar a las células madre embrionarias (células ES) y que mantienen el potencial de diferenciación en los derivados de todas las capas germinales [2]. Este tipo de células ofrecen la promesa de ser una fuente inagotable para la obtención de células diferenciadas de origen autólogo que podrán ser utilizadas para el tratamiento de enfermedades traumáticas o degenerativas, actualmente incurables, como el Parkinson, las lesiones medulares o la diabetes. Un paso muy importante que se deberá dar para su aplicación en clínica será identificar métodos seguros y eficientes para la obtención de iPSC [2]. Para ello, muchos son todavía los obstáculos técnicos que hay que superar.

Con los recientes avances biológicos de “transdiferenciación” directa (reprogramación de un tipo celular diferenciado obtenido sin necesidad de un estadio intermedio de pluripotencia), como la recientemente descrita conversión de fibroblastos a neuronas funcionales, a cardiomiocitos [3] o células sanguíneas se abre un nuevo campo en la reprogramación celular. En posibles aplicaciones clínicas, una opción sería poder inmovilizar los factores genéticos responsables de la reprogramación celular en una matriz sólida que pueda ser implantada *in vivo* y que cumpla las condiciones necesarias en cuanto a propiedades mecánicas se refiere. En este aspecto será de gran ayuda la modificación superficial [4], mediante la cual se podrá desarrollar nuevas superficies con capacidad de transferencia génica. Estas matrices modificadas podrían, teóricamente, ser utilizadas para reprogramar células somáticas del propio paciente a los linajes que sean de interés sin necesidad de obtener células

embrionarias, haciéndolo de forma controlada y con una mayor seguridad, eficacia y reproducibilidad.

De estos supuestos nace este trabajo, en el cual se desarrolla, evalúa y valida una tecnología para inmovilizar partículas transfectivas en superficies que estarán en contacto con células humanas.

La modificación superficial es una tecnología ampliamente conocida y desarrollada, durante los últimos años, en el campo de los biomateriales para obtener materiales biocompatibles y bioactivos, conteniendo células específicas [4, 5]. Materiales modificados con ligandos específicos para células pueden estimular la adhesión celular, el crecimiento y la diferenciación, mientras se mantienen las propiedades mecánicas del material de soporte [6]. Uno de los métodos empleados para inmovilizar ligandos en biomateriales consiste en la creación de enlaces covalentes en el lado reactivo de la cadena polimérica [4].

Una tecnología atractiva para lograr dichos enlaces es la polimerización por plasma para crear superficies activas y obtener las cadenas reactivas, permitiendo la deposición de capas con grupos funcionales. Para establecer este enlace químico existen una gran variedad de monómeros que permiten el enlace. Uno de los más prometedores es el pentafluorofenil metacrilato (PFM) [7, 8], que ofrece un grupo éster con una alta reactividad que puede ser utilizado para reaccionar con los grupos amino de las proteínas, según se representa en la Figura 4.1 [4].

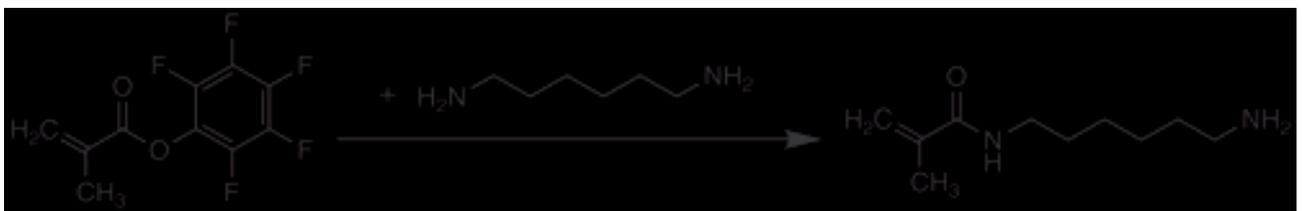


Figura 4.1: Reacción entre el pentafluorofenil metacrilato y los grupos aminos presentes

En nuestro grupo de investigación se desarrolló esta tecnología de modificación de superficies, mediante la cual se obtuvieron biomateriales con las propiedades superficiales necesarias para la diferenciación celular o para favorecer la proliferación [9]. Las placas fueron tratadas con plasma frío (Figura 4.2) para introducir mediante “*grafting*” pentafluorofenil metacrilato (PFM) (Figura 4.3), molécula encargada de reaccionar con las

proteínas de membrana a través del grupo amino (NH). Esto permitirá tener las partículas transfectivas unidas covalentemente a la superficie.

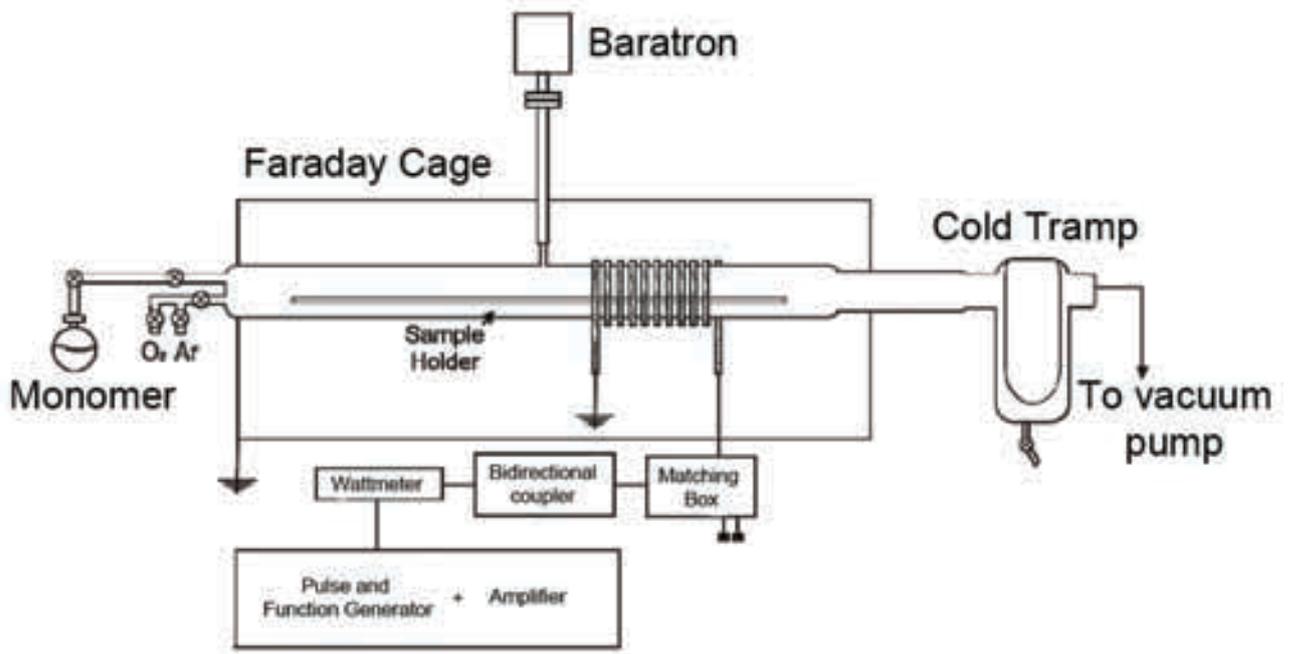


Figura 4.2 Esquema del reactor de plasma utilizado

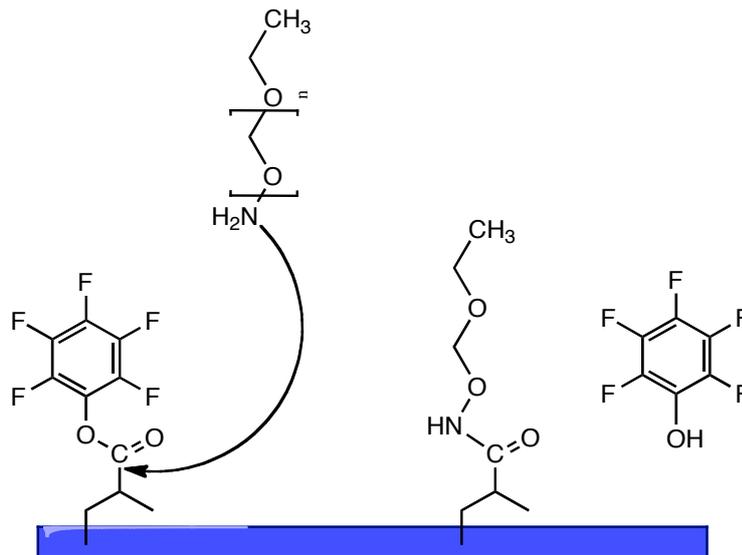
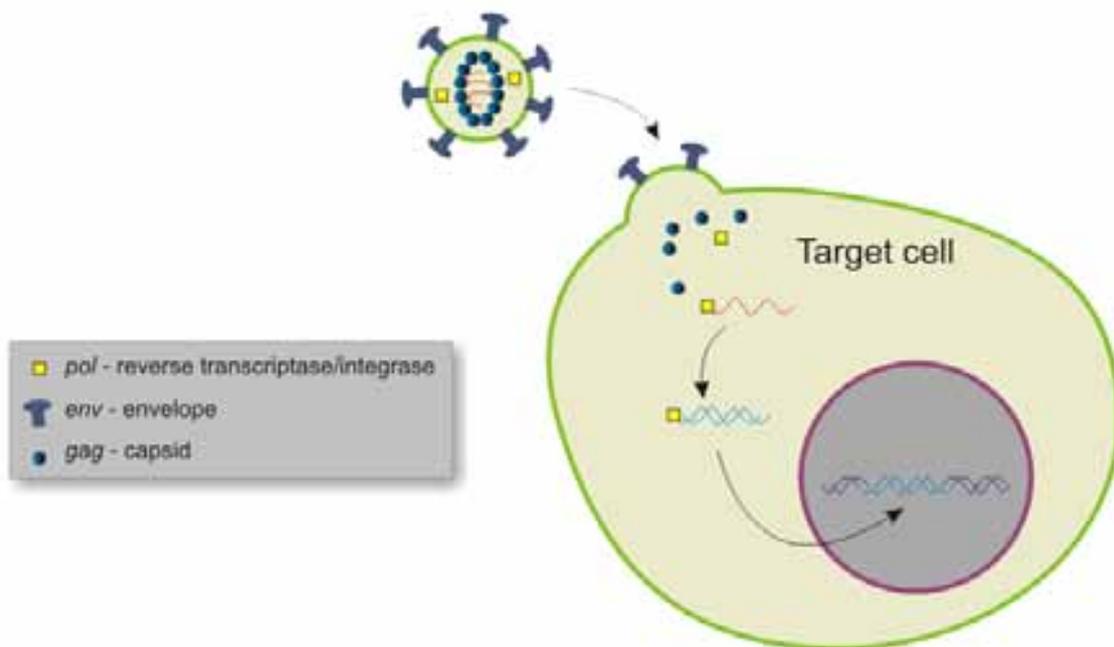


Figura 4.3 Reacción de los grupos amino presentes en las proteínas con el PFM que ha sido anclado en la superficie que se desea tratar

Para realizar la modificación genética de las células se deberá introducir el material genético de forma eficiente en la misma. Dicho proceso se denomina transfección, cuando se realiza por procedimientos químicos o físicos, o transducción, cuando se emplea un vector viral (Figura 4.4).



**Figura 4.4** Secuencia de introducción de un fragmento de ADN mediante una partícula lentiviral

Los vectores virales son virus modificados que hacen de vehículo para introducir material genético exógeno en de una célula. El uso de virus como vectores requiere la eliminación de los genes que dotan al virus de su capacidad patogénica y de multiplicación, dejando únicamente aquellos que participan en la infección e inserción del material genético (en el caso de que sean integrativos) y su sustitución por el gen o genes de interés.

Los vectores virales más utilizados derivan de las familias de los adenovirus y los retrovirus. Los adenovirus tienen como material genético DNA bicatenario y se caracterizan, además, por una cápsida icosaédrica y por una gran estabilidad ante agentes físicos o químicos, así como condiciones adversas de pH. Entre las características que los hacen buenos vectores destacan su capacidad para infectar todo tipo de células de mamífero y porque permiten insertos de hasta 8 kb. No se integran en el genoma, por lo que se evita el riesgo de mutagénesis por inserción pero, como contrapartida, dan lugar a una expresión a corto plazo. Además, otra gran desventaja es que son altamente inmunogénicos.

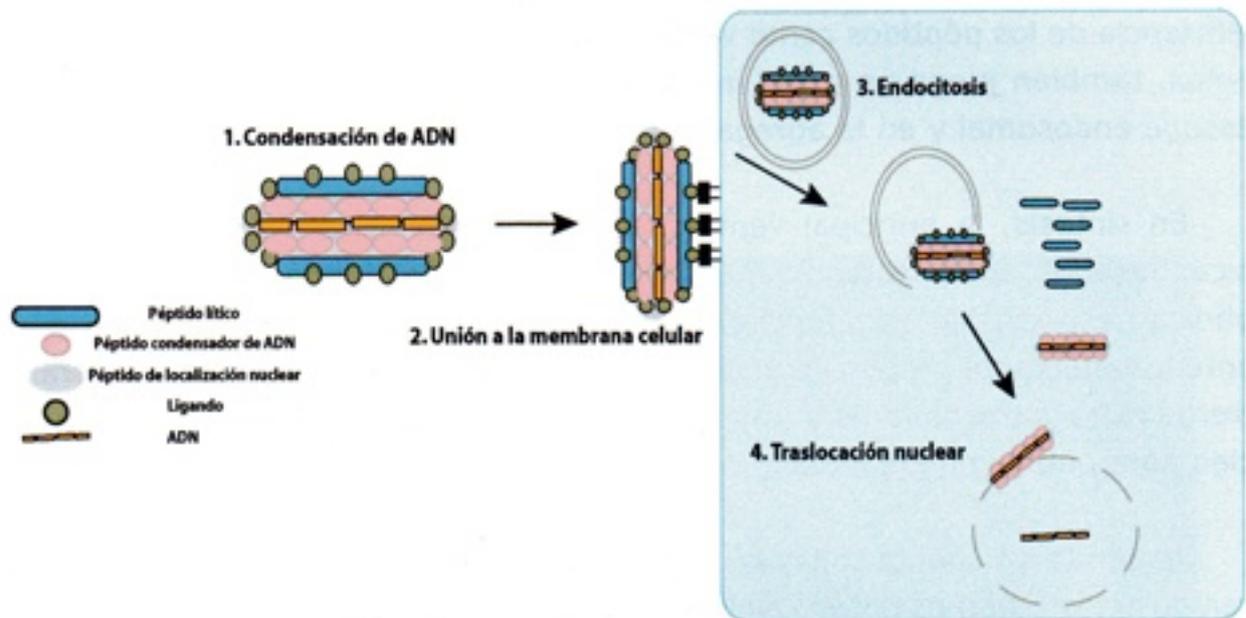
Los retrovirus se caracterizan porque su material genético es RNA, en lugar de DNA. Para replicarse requieren de la acción de una enzima llamada retrotranscriptasa o transcriptasa inversa, la cual es una polimerasa de DNA dependiente de RNA, que convierte la información genética del virus codificada en forma de RNA a cDNA. Además, codifican otra enzima, la integrasa, que inserta el cDNA viral en el genoma de la célula huésped (al azar, con preferencia de secuencia y en las regiones 5' de los genes). Esta capacidad de integración da lugar a una expresión a largo plazo del gen(es) introducido(s). Como desventajas están 1) el silenciamiento progresivo en algunos tipos celulares de la expresión de los vectores mediante modificación epigenética y 2) la posibilidad de ocasionar mutaciones debido a que dicha integración altere la regulación de algunos genes celulares. Este potencial efecto adverso, que durante décadas fue más bien considerado como un asunto teórico, lamentablemente se hizo evidente en un exitoso ensayo clínico para el tratamiento de pacientes inmunodeficientes por alteraciones de ADA [10, 11]. Son, además, virus patógenos, por lo que existe el riesgo de infección por recombinación con elementos endógenos.

Un tipo especial de retrovirus son los lentivirus, que producen trastornos multiorgánicos caracterizados por largos tiempos de incubación e infección persistente, tales como el SIDA. Al contrario que los demás retrovirus, que sólo pueden infectar a las células durante la división celular, los lentivirus son capaces de infectar tanto a células quiescentes como en división. Los vectores lentivirales permiten insertos de tamaño medio y se integran en el genoma de la célula huésped, dando lugar a una expresión a largo plazo. Son, además, como todos los retrovirus, reducidamente inmunogénicos. El principal inconveniente de estos virus es que, la mayoría de los vectores lentivirales que se emplean hoy día proceden del VIH, existiendo el riesgo teórico (en la práctica las probabilidades son despreciables) de que puedan producirse infecciones por recombinación. Además, como su integración es azarosa, también pueden ocasionar mutaciones insercionales, aunque se ha confirmado que su integración no se concentra en la región 5' de los genes [12], suponiendo una ventaja adicional sobre los vectores retrovirales convencionales, al igual que el hecho de presentar una menor sensibilidad al silenciamiento epigenético [12].

El desarrollo de técnicas capaces de transportar e introducir ácidos nucleicos en células eucarióticas ha significado un impresionante progreso en la biología molecular y celular, y en biotecnología en general. Gracias a este potencial, se han realizado rápidos avances en el conocimiento de los mecanismos que intervienen en el control del transporte de construcciones génicas, en muy diversos formatos, y de aquellos que influyen en la expresión

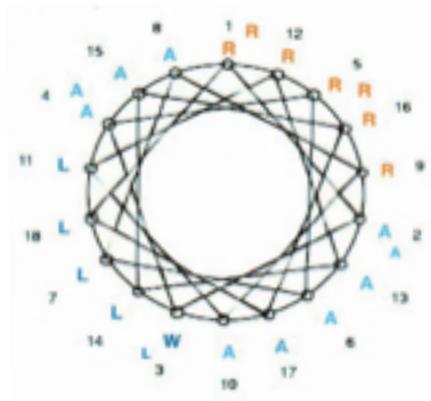
estable de dichas contrucciones en el entorno celular; de manera especial los mecanismos de transporte no virales (transfección), se han convertido en una poderosa herramienta para el estudio de la estructura, regulación y función de un número muy significativo de genes [13].

Recientemente, se han desarrollado nuevas estrategias en vectores de transferencia génica no virales que involucran péptidos que se estructuran en  $\alpha$ -hélices anfipáticas y ricas en aminoácidos catiónicos [14, 15]. Wayman y colaboradores desarrollaron y valoraron un péptido llamado KALA (WEAK-LAKA-LAKA-LAKH-LAKA-LAKA-LKAC-EA), que se deriva de la secuencia amino-terminal de la subunidad HA-2 del virus de la influenza y que está involucrado en la fusión de la cápsula viral con la membrana de los endosomas [14]. Este péptido mostró algunas cualidades como agente transfectante como la condensación del ADN, además de causar disrupción de la membrana endosomal, lo que le permitía transportar material genético [16] En general, los péptidos catiónicos empleados en transferencia génica son péptidos anfipáticos que pueden mostrar cambios conformacionales en ambientes ácidos y, de esta forma, escapar de las rutas de degradación endosomal. Como todos los vectores no virales, los péptidos deben cumplir unas funciones básicas para poder actuar como agente transfectante de células: primero se deben unir de forma reversible al DNA y compactarlo; segundo, presentar alguna especificidad celular esencial para transfectar in vitro e in vivo; tercero, debe poseer actividad fusogénica o disruptiva de membranas y finalmente, promover la translocación del DNA hacia el núcleo (Figura 4.5)[17].



**Figura 4.5 Pasos principales en el proceso de transferencia génica mediada por vectores peptídicos. Unión al ADN y condensación (1). Reconocimiento y unión a la membrana plasmática de la célula blanco (2). Liberación del compartimento endosomal (3) y unión a la membrana nuclear (4)**

Entre los agentes de transferencia génica no virales, la utilización de modelos de naturaleza peptídica posee una serie de ventajas como su definición química, fácil producción (GLP y GMP) y caracterización, así como su posterior funcionalización adicional. Estos agentes pueden incluir en una estructura molecular bien definida, dominios topológicos en los que se residan las actividades esenciales para la introducción de material genético en células, como son unión a DNA, reconocimiento celular, translocación en la membrana celular, tropismo nuclear, etc [18, 19].



**Figura 4.6 Diagrama del eje axial mostrando el carácter anfipático de la alfa-hélice introducida en el diseño del péptido RAWA.**

RAWA (RAWARALARALARALAR) es un péptido (23mer) de bajo peso molecular de naturaleza  $\alpha$ -hélice anfipática (Figura 4.6) desarrollado por el laboratorio del Dr. A. Bernad [20] y su diseño intentó concentrar y optimizar, en el menor tamaño posible, las actividades de condensación de ácidos nucleicos y desestabilización de membranas. Posteriormente, en la Tesis Doctoral de Rocío Barajas Rojo (2006, CNB-CSIC), se desarrolló una nueva variante, RAWA-H8, en la que se añadió a RAWA un módulo de 8 histidinas, tanto en el extremo amino, como en el extremo carboxiloterminial, lo cual genera nuevas entidades peptídicas que mantienen su potencial como agente de transfección, pero siendo mucho menos dependientes de la utilización de agentes acidotrópicos como co-adyuvantes (resultados no publicados) Este sistema péptidico es especialmente eficaz como agente de transfección de ribonucleótidos con actividad biológica (p.ej. siRNA).

Por todo ello, con la tecnología CRS (*Cell Reprograming Surface*), desarrollada en este trabajo, se presenta un sistema sencillo de usar, mediante el cual células que entren en contacto con esta superficies, pueden ser susceptibles de ser modificadas genéticamente. Como prueba de concepto del valor práctico de esta nueva tecnología, se emplearán CRS para reprogramar fibroblastos embrionarios murinos (*Mouse Embryonic Fibroblasts*, MEFs) a iPSCs.

## 4.2 OBJETIVOS

---

El principal objetivo del proyecto es obtener superficies bioactivas que sean capaces de inducir la modificación genética, de forma transitoria o permanente, de las células que entren en contacto con ellas. Es decir, se quiere producir superficies bioactivas capaces, por simple contacto físico, de transferir de manera eficiente secuencias genéticas a células de mamífero, preferentemente humanas. A estas superficies las denominamos *Cell Reprogramming Surfaces*, o CRS.

Como objetivos derivados se incluyen:

1. Obtención y evaluación de CRS a partir de diferentes tipos de partículas con capacidad de transfectar (partículas lentivirales, partículas adenovirales, complejos nucleoproteicos sintéticos, etc.).
2. Utilización de CRS para la generación de distintos tipos celulares (iPS, cardiomiocitos, etc.) mediante reprogramación celular de células somáticas (fibroblastos, queratinocitos, etc) modelizado sobre células de ratón
3. Evaluación de CRS para modificación genética de tejidos *in vivo* (implantes 3D).

### 4.2.1 Plan de trabajo

Las placas tratadas con PFM se prepararon en los laboratorios del grupo de ingeniería de materiales del Dr. Salvador Borrós, en el IQS (Instituto Químico de Sarria), mediante la activación superficial con plasma frío de Ar. Una vez obtenidas se hicieron reaccionar con las partículas con actividad de transfección, a través de los grupos amino en el laboratorio del Dr. Antonio Bernad, en el CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares). Dada la naturaleza proteica de las partículas empleadas (partículas lentivirales o adenovirales, entre otras), éstas tienen un alto contenido de grupos  $-NH_2$ , lo que se espera que permita que reaccionen con la superficie tratada, sin afectar significativamente a su competencia transfectiva.

La adhesión de las partículas lentivirales (Figura 4.7a) a la superficie se realizó a través de la proteína de la envuelta, que concretamente en nuestro caso es la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-g, Figura 4.7b), la cual posee una gran cantidad de grupos amino libres por los que puede reaccionar [21].

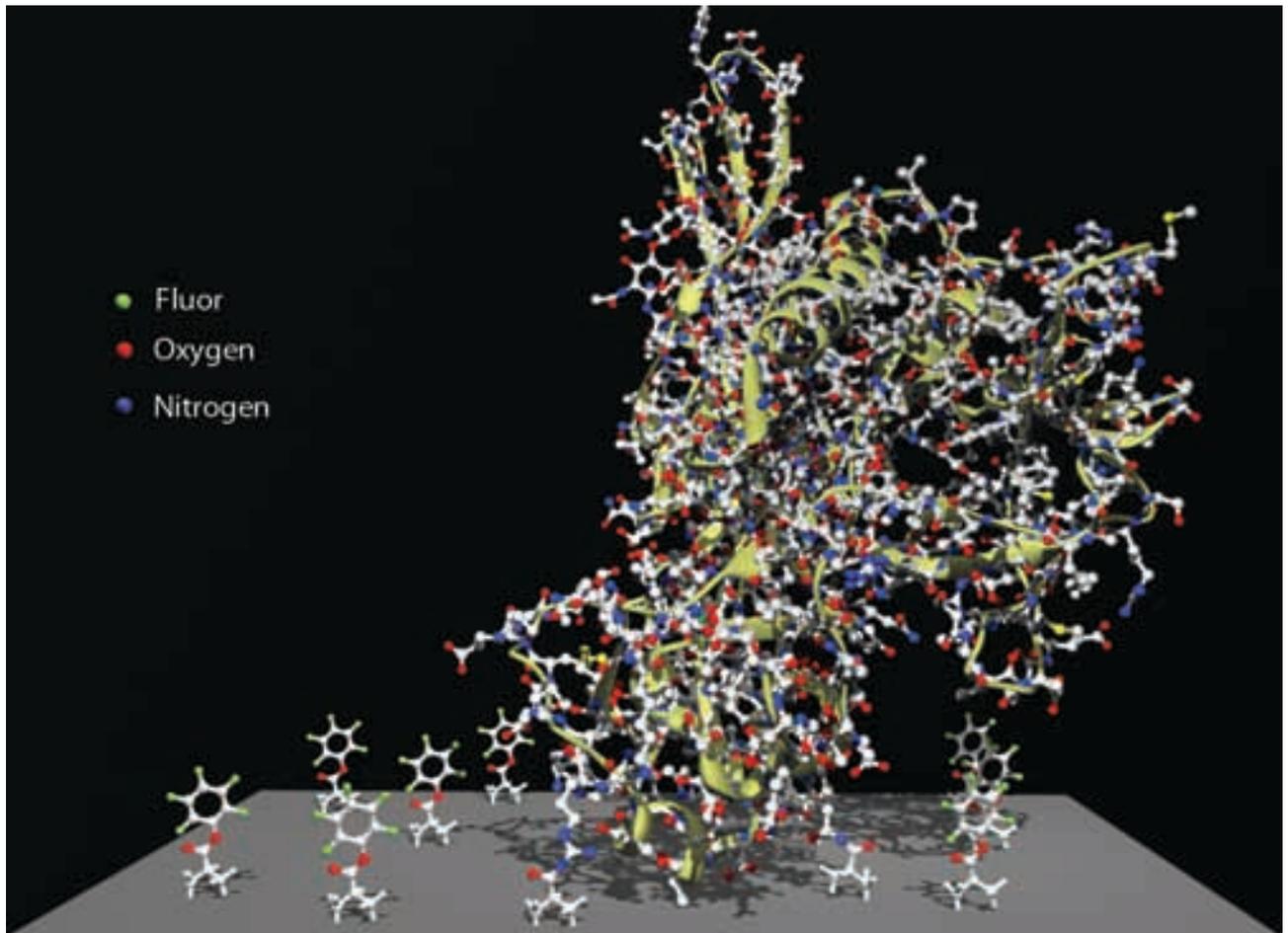


Figura 4.7 Esquema de reacción de la proteína vsv-g de los lentivirus con el PFM a través de los grupos amino.

En el caso del agente de transfección RAWA-H8, debido a su naturaleza peptídica, tienen un alto contenido de grupos  $\text{NH}_2$  lo cual se aprovechó para que reaccionen con la superficie recubierta de PFM y queden unidas covalentemente.

Para visualizar las partículas sobre la superficie se utilizó el microscopio de fuerzas atómicas (*Atomic Force Microscope*, AFM) y la microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electronic Microscope*, SEM) mediante los cuales se puede observar la diferencia de las partículas adheridas en superficies tratadas con PFM y superficies sin tratar. En el caso de la eficiencia de la transducción, se evaluó mediante la introducción de un gen reportero que codifica la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* ó GFP) cuya expresión puede detectarse mediante microscopía de fluorescencia y citometría. La citometría, además, permite cuantificar la eficiencia de la transducción.

A continuación se intentaron obtener iPSC murinas mediante reprogramación celular utilizando esta nueva tecnología de modificación genética de células.

Para finalizar, se realizaron pruebas *in vivo* mediante la modificación de láminas no biodegradables, para desarrollar una aproximación de la transducción *in vivo*.

## 4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.3.1 Recubrimiento con PFM.

Las placas fueron tratadas mediante plasma frío de Ar en los laboratorios de Gemat en el IQS de Barcelona. El procedimiento empleado fue el siguiente:

1. Se introdujeron en el reactor de plasma las placas de cultivo TC (*Tissue Culture*) ó PD (*petri dish*).
2. Se aplicó vacío en el reactor, hasta una presión aproximada de  $6 \cdot 10^{-3}$  mBar. Una vez alcanzado, se aplicó un plasma de Ar con una potencia de 40w durante 5 minutos.
3. Una vez transcurrido el tiempo, la superficie estaba activa y se pudo hacer pasar el PFM, para introducirlo en la superficie. La corriente se dejó pasar durante 15 minutos.

### 4.3.2 Inmunofluorescencia

Se preparó una disolución de Fluorescein-5-Thiosemicarbazide (FTSC) 0,5 mM en agua milliQ y se hizo reaccionar con las placas previamente modificadas con PFM, mediante un ensayo de *micro-contact printing*. Para realizar los microtampones de polidimetil siloxano (PDMS) se utilizaron microplantillas generadas en colaboración con el Centro Nacional de Microelectrónica en Barcelona (figura 4). Con el fin de tener una mayor absorción el tampón se sometió a un tratamiento con plasma. Los tampones se impregnaron en la disolución del fluoróforo y se depositaron en la superficie de las placas con PFM y sin PFM, durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se lavaron con agua durante 30 minutos, para eliminar el exceso de fluorescencia. Posteriormente, se visualizaron en un microscopio Zeiss invertido de fluorescencia.

También se realizaron ensayos de recubrimiento de PFM utilizando microrrejillas de *Transmission Electronic Microscope* (TEM). Para ello se colocaron rejillas de TEM en la superficie de las placas, antes de modificarlas con plasma y con PFM (Figura 4.8).

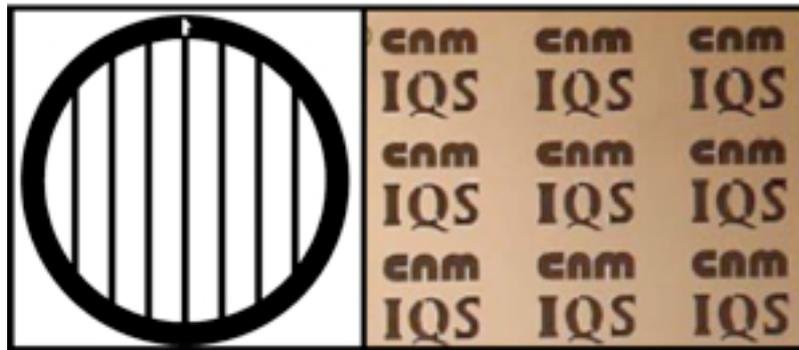


Figura 4.8 a) Rejilla de TEM utilizada para enmascarar la superficie de poliestireno, b) plantilla utilizada para la fabricación del tampón de microcontac-printing

### 4.3.3 Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

Para la preparación de las placas con lentivirus se empleó el siguiente procedimiento.

Se utilizaron placas TC y PD, con los siguientes tratamientos:

- Placas mitad PFM/mitad no PFM.
- Placas enteras con PFM.
- Placas enteras sin PFM.

Todas las placas se trataron de la misma forma, variando el tiempo de exposición a las partículas virales. El procedimiento fue el siguiente:

- Se preparó, por cada placa, una dilución de 15 $\mu$ l del stock de partículas lentivirales ( $10^7$  UT/ml) en 1ml de PBS.
- Se añadió la disolución de partículas sobre las placas y se incubó a temperatura ambiente durante diferentes tiempos, con agitación orbital.
- Se retiró el medio y se lava 5 veces con PBS ó 3 veces con agua miliQ.
- Se cortaron los bordes de las placas para poder introducir las en el AFM.
- Por último, se pasó Ar por la superficie para eliminar los restos de polvo y partículas no adheridas.

Para realizar los estudios de AFM se utilizó un equipo modelo XE70 AF microscope (Park Systems, Suwon, South Korea).

#### 4.3.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para el análisis de las superficies mediante SEM se empleó el siguiente procedimiento:

- Se cortaron fragmentos de la superficie de las placas de 1 cm x 1 cm aproximadamente.
- Se añadieron 1,5 ml de cada una de las disoluciones a las superficies.
- Se centrifugaron a 3.000 g durante 1 hora a 37°C
- Se lavaron las placas con medio de cultivo (5x10 ml/placa).
- Se dejaron las muestras en PBS durante 12-16 h.
- Se deshidrataron las muestras sumergiéndolas en disoluciones de etanol de concentración creciente:
  - 2x30% 10 min.
  - 2x50% 10 min
  - 2x70% 10 min
  - 2x90% 10 min
  - 2x100% 10 min.

Para realizar los estudios de SEM se utilizó un equipo modelo SEM 6335 F SE microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

#### 4.3.5 Tapizado con lentivirus e incubación con células de mamífero.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Se añadieron a la placa las partículas lentivirales (500 µl de una dilución 1:3 del stock;  $10^7$  UT/ml), y se incubaron durante 30 minutos a 37°C (incubador de cultivos celulares; 95% humedad y 5% CO<sub>2</sub>) ó 60 minutos en la centrifuga a 3.000g (37°C.), según corresponda.
- Se lavaron con DMEM/10% FBS X5 veces.

- Se lavaron con 400 ml de DMEM/10% FBS durante 10 minutos con agitación orbital.
- Se sembraron 500.000 células diluidas en DMEM y se introdujo la placa en el incubador.
- Tras 48 h, se observaron las células al microscopio de fluorescencia y se analizaron mediante citometría de flujo para detectar la expresión de GFP.

Previo al tapizado con los lentivirus, se realizó el bloqueo de las placas que se utilizaron como controles negativos. Para ello, se añadió 1 ml de una disolución de amino-polietilenglicol (amino-PEG) 10mM sobre una placa PD recubierta con PFM, y se incubó toda la noche con agitación orbital. A la mañana siguiente, se lavó con agua miliQ.

Para realizar los controles de transducción, se sembraron células HEK-293T el día anterior a la infección ( $5 \times 10^5$  células por pocillo). El día de la infección se añadieron 1,5 ml de la disolución anteriormente preparada y se incubó durante 5-6 horas. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio y se añadió medio de cultivo fresco.

#### **4.3.6 Almacenaje de placas tapizadas**

Las placas que se utilizaron para este experimento fueron placas petri de 30 mm de diámetro con y sin PFM. Para el tapizado de las superficies con PFM se siguió el protocolo anteriormente descrito. Se prepararon las disoluciones de partículas lentivirales, utilizando 1,5 ml de lentivirus congelados (título  $10^8$  UT/ml) añadiéndolo directamente sin diluir sobre las placas. Se centrifugaron durante 1 hora a 3.000g y 37°C, y posteriormente se lavaron 5 x 50 ml de DMEM con 10% de FBS. Se añadieron 100 µl de medio DMEM con suero para evitar el secado de las partículas. Posteriormente se introducen en un congelador de -80°C. Para comprobar si existe pérdida de eficacia de las partículas, se realizó la cuantificación de la eficacia de transducción en placas no sometidas a la congelación. Para ello, se utilizó un citómetro modelo BD FACSCanto II. Transcurrido el tiempo necesario (30 días) las placas se sacaron del congelador y se dejan al aire para su descongelación. Cuando alcanzaron la temperatura ambiente, se lavaron con medio de cultivo para eliminar el medio de congelación utilizado y se añadieron las células para su infección. En este caso las células utilizadas fueron 293T ( $5 \times 10^5$  células/placa).

### 4.3.7 Infección con RAWA-h8

Los materiales empleados fueron:

- Placas petri de 30 mm tratadas con PFM (PD).
- Células: HEK -293T ( $4 \times 10^5$  células/placa)
- Péptido RAWA-H8
- siRNA marcado con AlexaFluor555

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Se preparó una mezcla(1) conteniendo 50 pmol de siRNA en DMEM con HEPES 10 mM, en un volumen total de 200  $\mu$ l por placa (mezcla 1).
2. Se preparó una mezcla(2) conteniendo 4.7  $\mu$ g de péptido RAWA-H8 en DMEM con HEPES 10 mM, en un volumen total de 100  $\mu$ l por placa (mezcla 2).
3. Se añadió la mezcla 2 sobre la 1.
4. Se incubó durante 15 min a 50°C.
5. La muestra resultante contiene los complejos de transfección siRNA:RAWA-H8. Como control positivo del experimento, se añadió (1.5 ml/placa) una dilución 1:2,3 (complejo:medio) de estos complejos en medio de cultivo a placas con células HEK-293 sembradas el día anterior ( $5 \times 10^5$  células/placa).
6. Con las PD ya preparadas según el protocolo descrito en anteriores ejemplos, se añadieron distintas diluciones de los complejos de transfección en medio de cultivo (1,5 ml/placa), y se centrifugaron las placas durante una hora a 3.000 g y 37°C.
7. Se retiró el medio y se lavaron las placas con medio de cultivo (5x50ml).

Se sembraron  $5 \times 10^5$  células HEK-293T en cada una de las placas.

8. Transcurridas 6 horas de la adición del control positivo sobre las células (paso 5), se cambió el medio.
9. Las células se recogieron (24 horas después) y se analizaron mediante citometría de flujo para detectar marcaje con AlexaFluor555.

### 4.3.8 Obtención de iPSC

Las placas (PD, 30 mm) fueron modificadas con PFM según el protocolo descrito en anteriores ejemplos. El procedimiento de reprogramación celular fue el siguiente:

1. El día anterior al inicio del experimento se sembraron placas de cultivo (30 mm) con MEF ( $1.5 \times 10^5$  células/placa). Estas células fueron empleadas como control positivo (ver paso 7).
2. Se añadieron en las placas tratadas con PFM 1.5 ml/placa de un sobrenadante lentiviral (X UT/ml) codificando los genes necesarios para la reprogramación celular (en este caso: Oct-4, Sox2, Klf4 y c-Myc).
3. Se centrifugaron las placas durante 1 hora a 3000 g y 37°C.
4. Se lavaron las placas con medio de cultivo (5x50 ml).
5. Se incubaron las placas con 1 ml de gelatina 0.1% durante 20 minutos a 37°C.
6. Se lavaron de nuevo las placas con medio de cultivo (5x50 ml).
7. Se sembraron las células (MEF) a una densidad de  $1.5 \times 10^5$  células/placa, y se añadió el sobrenadante lentiviral (1.5 ml/placa) a las células control positivo (ver paso 1). En estas últimas, a las 5 h se sustituyó el sobrenadante por medio de cultivo.
8. En función del protocolo seguido (Figura 4.9) se trataron las células. En el método 1 las células continuaron en la misma placa y se cambiaron los medios según el esquema de la figura. En el método 2, cuatro días después del hit, se tripsinizaron las células y se sembraron sobre MEF inactivados con mitomicina previamente sembrados en placas de 100 mm.

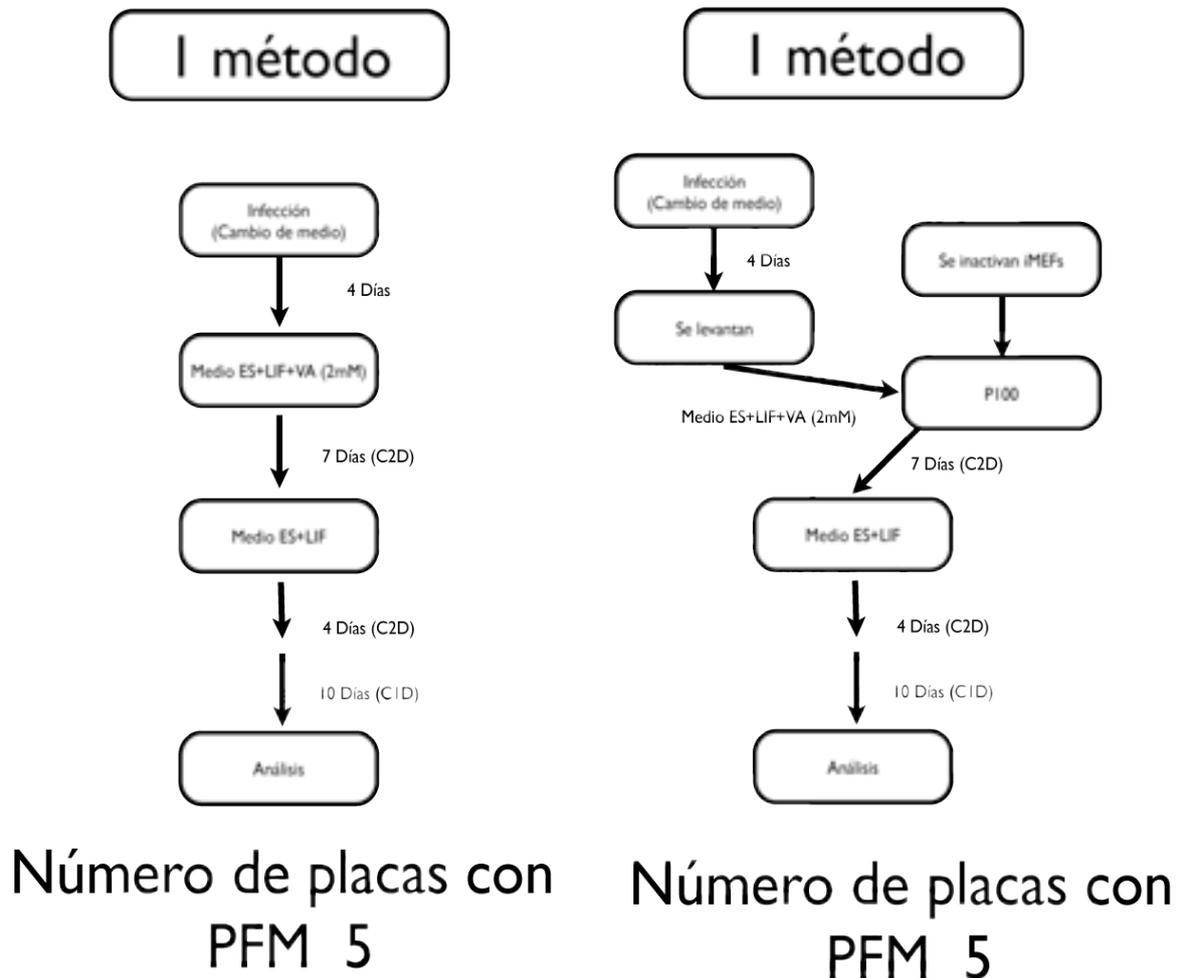


Figura 4.9: Métodos utilizados en este trabajo para la obtención de iPSC

El medio de cultivo utilizado en todos los casos fue DMEM de alta concentración de glucosa (4.5 g/l) con glutamax y piruvato sódico (GIBCO), 15% FBS, aminoácidos no esenciales (1 mM), beta-mercaptoetanol 0,1 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) 1.000 u/ml y ácido valpróico 2 mM (el ácido valpróico se utilizó sólo los 7 primeros días de cultivo).

Para la preparación de los iMEF se empleó el siguiente procedimiento:

1. Se preparó en un tubo de 50 ml (Falcon), 10 ml de medio de cultivo de MEFs + 100 µl de solución de mitomicina (1 mg/ml en PBS) por placa.
2. Se retiró el medio de las placas y se añadieron 10 ml de la solución anterior
3. Se incubaron durante 3 horas a 37°C.
4. Se lavaron con PBS(3 x 20 ml).

5. Se añadió medio de cultivo y se mantuvieron en el incubador el tiempo deseado.

Una vez obtenidas las colonias, se procedió a picarlas y pasarlas a pocillos de placas P96. A partir de este momento, las colonias pueden expandirse indefinidamente mediante pases cada 1-2 días en placas con *feeder layer* de iMEF ( $\times$  iMEF/cm<sup>2</sup>).

### 4.3.9 Diferenciación a cardiomiocitos

Para la obtención de cardiomiocitos se partió de las iPSC obtenidas en las CRS. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

1. Se añadieron  $4,8 \cdot 10^4$  células en 960 ul (50 células/ul) de medio de cultivo.
2. Se añadieron 48 gotas (20 ul por gota) sobre la tapa de una placa petri.
3. Se incubó una placa P48 con 1 ml de gelatina 0.1% durante 20 minutos a 37°C.
4. Transcurridas 48 horas, se añadieron las gotas a los pocillos de una P48.
5. El medio se cambió cada dos días, durante los primeros 8 días.
6. Transcurrido este tiempo el medio se cambió diariamente

El medio de cultivo utilizado fue DMEM con glutamax, beta-mercapto, NEEA Pen/strp, y 15% de suero FBS (hyclone)

### 4.3.10 Uso de las superficies modificadas *in vivo*

Se obtuvieron láminas de polidimetilsiloxano (PDMS) de unas 200 micras de espesor, en las cuales, mediante la modificación superficial con plasma frío, se introdujeron en la superficie partículas lentivirales codificando GFP. Para ello se empleó el siguiente protocolo:

1. Obtención de las láminas:
  - a. Se pre-curó el PDMS.
  - b. Se extrajeron las burbujas del mismo, en un desecador de vacío.
  - c. Con la silicona todavía fluída, se añadió una gota sobre una superficie antiadherente (por ejemplo un vidrio recubierto con spray-teflón) en el *spin*

*coater*, para conseguir una lamina fi p. También se puede aplicar mediante un aplicador de pinturas.

d. Esta lámina se post-curó en el desecador durante 1 hora a 100°C.

2. Una vez terminada la lámina, se recubrió con PFM en el plasma y se tapizó con partículas lentivirales empleando el siguiente procedimiento:

a. Se cortó una lámina aproximada de 2 cm de lado, la cual se puso en el fondo de una placa petri de 30 mm.

b. Se añadieron los medios para tapizar las láminas:

i. Por un lado el virus con un título aproximado de  $10^8$  UT/ml (1,5 ml/placa).

ii. Por otro lado medios de cultivo con FBS 10% (1,5 ml/placa).

c. Una vez añadidas todas las suspensiones se centrifugaron durante 1 hora a 3.000 g y 37°C.

d. Se lavaron con medio de cultivo (5x50 ml).

e. Se procedió a la implantación inmediata.

El procedimiento usado para la implantación fue el siguiente:

1. Se emplearon ratas Wistar de 12 semanas, a las cuales, bajo anestesia de 1,5 litros de Forane y 1,5 de oxígeno. Se aplicó una analgesia postoperatoria con 0,1ml de tramadol. Y se realizó la desinfección de las heridas con Betadine. Se le implantaron las láminas modificadas de forma subcutánea.

2. Transcurridas 48 horas los implantes se extrajeron y se observó el tejido circundante bajo una lupa binocular con luz UV para intentar detectar expresión de GFP.

3. Posteriormente se extrajo el tejido circundante a los implantes para realizar un estudio anatomopatológico de los mismos.

La colocación de los implantes se realizó como se indica en la Tabla 4.1

Tabla 4.1 Resumen de los experimentos realizados en las pruebas preliminares in vivo

	Lado Izquierdo	Lado Derecho
<b>Ratón 1</b>	PFM + Medio FBS 1	PFM 1+ lenti-eGFP
<b>Ratón 2</b>	Control + Medio FBS 2	PFM 2 + lenti-eGFP
<b>Ratón 3</b>	Control + Medio FBS 3	PFM 3 + lenti-eGFP

Como resumen, en la Figura 4.10 se muestra el flujo seguido para la obtención de las láminas modificadas.

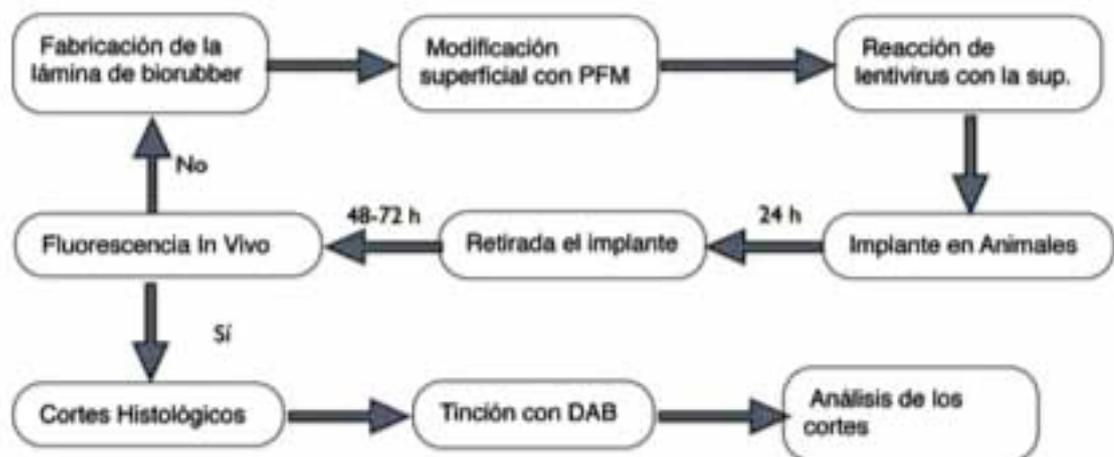


Figura 4.10 Secuencia seguida en el experimento de la láminas de PDMS para transfectar in vivo

### 4.3.11 Estudios anatomopatológicos.

- Los fragmentos de tejido a analizar se introdujeron, inmediatamente tras la necropsia, en la solución de fijación (10% formaldehído 37%, 10%PBS 10x, 80% H<sub>2</sub>O ) y se dejaron entre 8-24h, en ausencia de luz.
- Transcurrido este tiempo, se colocaron los tejidos durante 10-15 minutos en PBS 1X, para eliminar la solución de fijación. (2x40ml).
- Se transfirieron los tejidos en una disolución de sacarosa (18%-20% en PBS 1X).
- Se incubaron durante 48h a 4°C.

- Una vez que dejaron de flotar los tejidos se eliminó la sacarosa y se lavó con PBS 1X.
- Se situaron los fragmentos sobre bloques estándar de OCT en el criostato.
- Se almacenaron durante 24h a -80°C.
- Se cortaron los bloques en el criostato con un grosor de sección entre 4-10  $\mu\text{m}$ .

Se montaron los portas, con DAPI (vectasheild) e inmediatamente se visualizaron con un microscopio de fluorescencia utilizando el filtro correspondiente.

### **4.3.12 Cultivo celular**

En el cultivo celular, además de los procedimientos anteriormente descritos, para la producción de iPS, se utilizaron las siguientes líneas celulares:

MEFs, (Mouse embryonic Fibroblas) expandidos en flask de 75  $\text{cm}^2$  con medio DMEM suplementado con 15% (v/v) de FBS (Suero Fetal Bovino), 4 mM L-Glutamina, 100 U/ml penicilina, 0.1 mg/ml streptomycin.

HEK 293-T. Expandidos en platos de 100  $\text{cm}^2$ . Fueron cultivadas con medio de cultivo DMEM suplementado con 15% (v/v) de FBS (Suero Fetal Bovino), 4 mM L-Glutamina, 100 U/ml penicilina, 0.1 mg/ml streptomycin.

Las células se sembraron en falcons de 75  $\text{cm}^2$  y se tripsinizaron cambiando el medio de cultivo cada 2 o tres días en función del requerimiento del tipo celular. Todos ellos fueron cultivados en incubador a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$

### **4.3.13 Transfección**

Las células se transfectaron con Lipofectamina 2000 (invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante:

El medio utilizado para la formación del complejo lipofectamina 2000- DNA fue Opti-MEM

1. Un día antes de la transfección se sembraron  $5 \cdot 10^5$  células HEK-293T en 2 ml de medio de cultivo, para obtener una confluencia de cerca del 90-95% el día de la transfección.
2. El día de la transfección, se preparó el complejo Lipofectamine 2000-DNA
3. se diluyeron 4  $\mu\text{g}$  DNA en 250  $\mu\text{l}$  de Opti-MEM. Y se mezcló enérgicamente.
4. Se agitó la lipofectamina 2000, antes de usarla, posteriormente se añadieron 10  $\mu\text{l}$  en aproximadamente 250  $\mu\text{l}$  de Opti-MEM. y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Después de estos 5 minutos de incubación, se mezcló la dilución de DNA con la dilución de lipofectamina 2000 (volumen total 500  $\mu\text{l}$ ). y se mezcló enérgicamente, incubándose durante 20 minutos a temperatura ambiente. El complejo se usó en las siguientes 6 horas.

5. Se añadieron los 500  $\mu\text{l}$  a las placas para realizar la infección que corresponda.
6. Se incubaron durante 18 a 48 horas. Por último se cambió el medio a las 5 horas de la transfección.

#### **4.3.14 Producción de vectores virales.**

Se produjeron sobrenadantes lentivirales codificando GFP mediante cotransfección transitoria de células HEK-293T con el vector lentiviral pRRLsin18.PPT.CMV.GFP.Wpre y los vectores helper según el procedimiento anteriormente descrito [22].

Los vectores adenovirales recombinantes codificando GFP se obtuvieron a partir del virus Ad5 E1a $\Delta$ E3 [23]. Las partículas adenovirales se produjeron en células HEK293A según el método descrito anteriormente en la bibliografía [24]

## 4.4 RESULTADOS.

---

### 4.4.1 Modificación con PFM

El primer paso para obtener la superficie modificada era disponer de una superficie primaria, que se modificó químicamente para obtener la superficie bioactiva deseada. En el presente trabajo se empleó principalmente como superficie primaria poliestireno, concretamente dos tipos de placas de cultivo de 30 mm fácilmente disponibles: placas Petri sin ninguna modificación (*Petri Dishes*, PD) y placas comerciales de cultivo celular (superficies modificadas para el cultivo de células eucariotas)(*Tissue Culture*, TC).

Las placas de cultivo fueron modificadas mediante un reactor de plasma con Argón para evitar la creación de grupos hidrofílicos. De esta forma se consiguió la activación superficial del poliestireno, lo cual se aprovechó para posteriormente hacer pasar la corriente de PFM, que se ancló en la superficie mediante el doble enlace de la molécula. Para comprobar que este proceso tuvo lugar, se utilizó la técnica del *microcontact printing*, la cual consiste en fabricar un microtampón de polidimetil siloxano (PDMS) que se le aplica un golpe de plasma para activar la superficie y conseguir que sea más hidrofílica. El tampón se puso entonces en contacto con una solución acuosa de FTSC, que será absorbido por la superficie del tampón. Los microtampones tratados de esta manera se situaron sobre dos muestras diferentes, por un lado placas de poliestireno virgen sin ninguna modificación y por otro lado, placas modificadas con PFM. Las placas tratadas con PFM mostraron claramente el dibujo IQS/CNM formado por las moléculas de FTSC (Figura 4.11 a, b). Por otra parte, otras placas se modificaron con plantillas, concretamente a la hora de tratar con el plasma se taparon con una rejilla o con papel de aluminio. En las Figuras 4.11 c y d puede verse con claridad que, bajo el microscopio de fluorescencia, en ellas aparecen dos zonas bien diferenciadas: una brillante (con FTSC), que es la zona expuesta al plasma y que por lo tanto fue modificada con el pentafluorofenil metacrilato, y una zona oscura carente de dicha molécula (sin FTSC). Al hacer reaccionar estas moléculas con fluoresceína se vió cómo la zona con presencia de PFM quedó perfectamente delimitada.

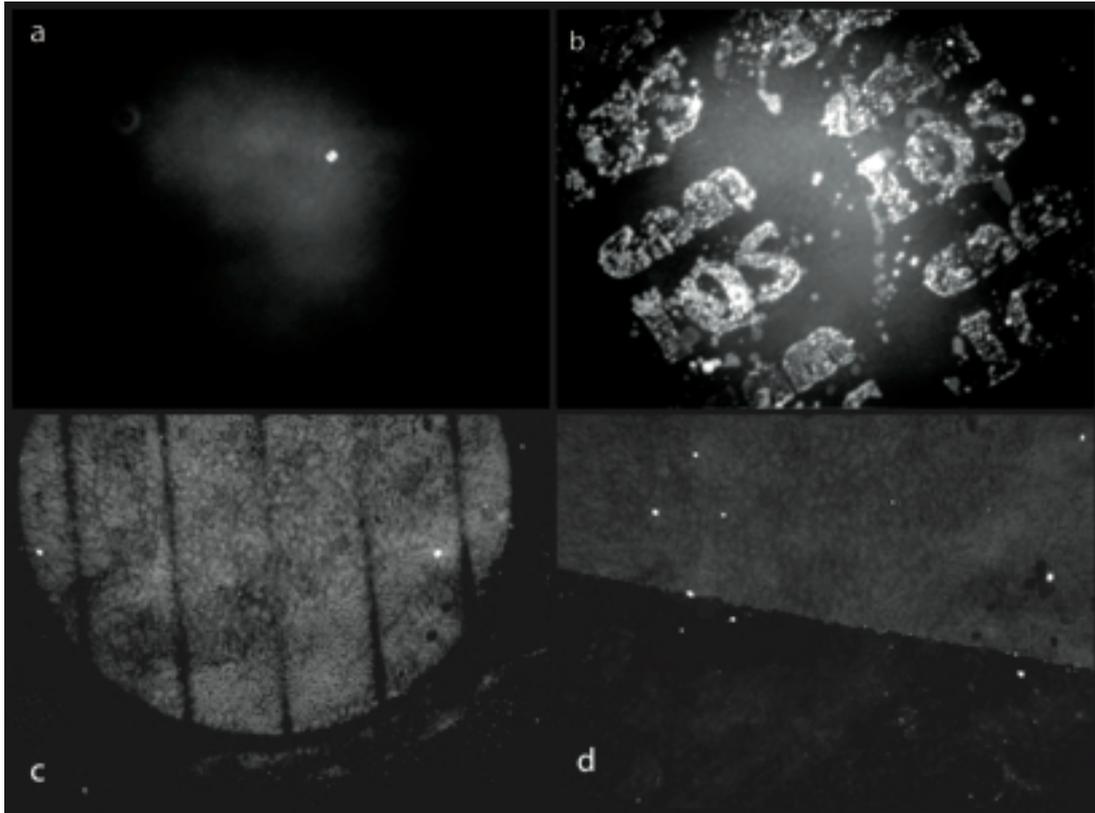
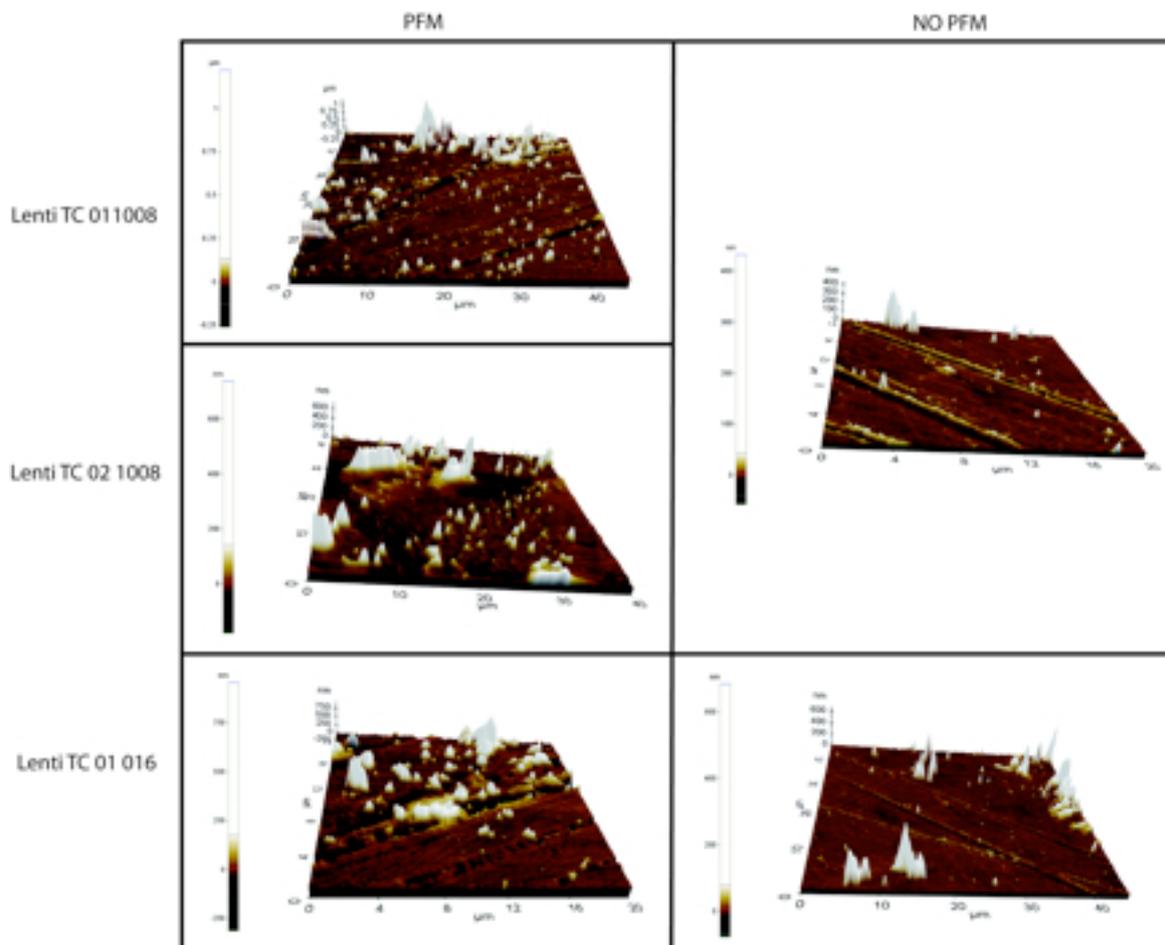


Figura 4.11 Microfotografía de fluorescencia de placas de cultivo no tratadas (a), tratadas con PFM (b), tratadas con PFM utilizando un grip (c) y tratada con PFM modificando solo la mitad de la placa (d)

#### 4.4.2 Anclaje de partículas lentivirales

Los resultados descritos en el apartado anterior indican que, mediante el procedimiento utilizado, las placas fueron eficientemente modificadas con el PFM y por lo tanto se pudo proceder a anclar en ellas moléculas mayores o complejos macromoleculares. En primer lugar se procedió a anclar partículas lentivirales (las cuales en su membrana contienen una gran cantidad de grupos amino libres). Para detectar la presencia de estas partículas en las superficies anteriormente modificadas con PFM, se analizaron mediante un microscopio de fuerzas atómicas (AFM). En todos los casos (figura 12), se vió que la superficie con PFM contenía lo que, por su tamaño (150-200 nm), parecían ser partículas lentivirales (las partículas lentivirales pseudotipadas con VSV-G tienen unos 100-200 nm de diámetro[25]). Si se observa detenidamente, se puede ver que en algunas zonas aparecen picos de una altura de hasta 400 nm, lo cual podría indicar la agregación de las partículas en estas zonas. Por el contrario, en la sección no tratada con PFM, prácticamente no aparecieron partículas mayores de 30 nm. Un punto muy importante a considerar es que en el medio que se utiliza para

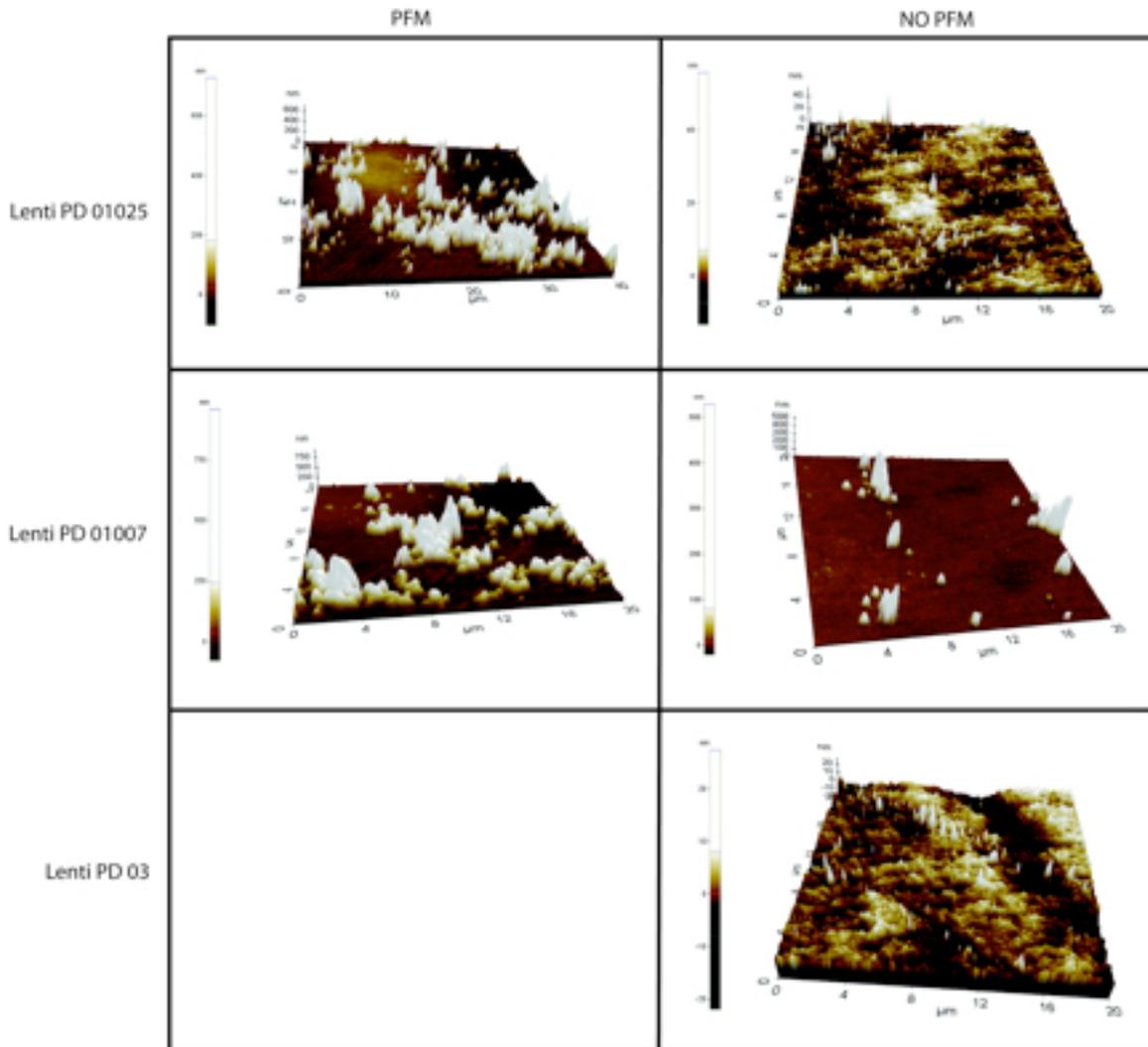
recoger las partículas lentivirales existe gran cantidad de proteínas, algunas de ellas de gran tamaño (el medio de cultivo celular contiene un 10% de suero fetal bovino). Por ello, lo único que se confirmó es que existen partículas del tamaño esperado, ya sean protéicas o lentivirales, en la superficie con presencia de PFM. Para analizar las superficies con el menor número de variable posibles, se obtuvo una muestra en la que la mitad de la placa fue tratada con PFM y la otra mitad no. De esta forma se puede estar totalmente seguro de que las diferencias observadas se deben a la presencia o no de PFM, ya que la manipulación que recibieron ambas superficies fue exactamente la misma.



**Figura 4.12** Partículas lentivirales depositadas en placas TC tras una incubación de 30 minutos. El lavado se hizo con agua destilada, en la columna derecha las placas fueron tratadas con PFM mientras que las placas de la izquierda no fueron tratadas.

En el experimento de la Figura 4.12 se utilizaron placas de cultivo celular (TC), cuya superficie tiene bastante hidrofiliidad. Cuando se utilizaron placas PD (poliestireno sin tratamiento) se apreció una gran diferencia entre las superficies modificadas y las no modificadas (Figura 4.13). Al igual que en los experimentos anteriores, parece que existe una agregación significativa de las partículas pero se observan diferencias muy claras entre las placas con

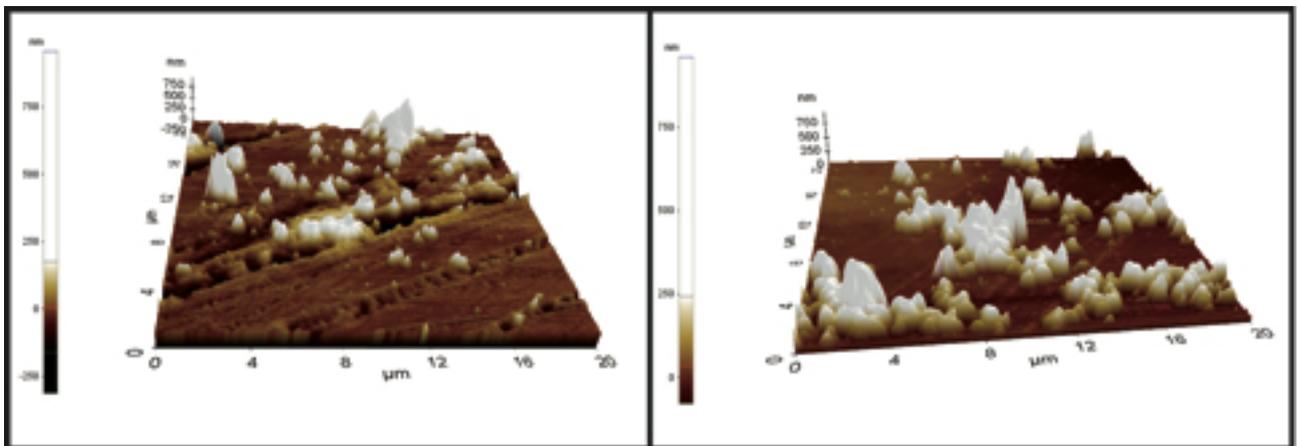
PFM y las placas sin PFM. Esto se debió principalmente a que la superficie sin PFM es más hidrofóbica, por lo que las proteínas no tienden a depositarse.



**Figura 4.13** Partículas lentivirales depositadas en placas PD tras una incubación de 3 horas. El lavado se hizo con agua destilada. En la figura se muestran la diferencia entre muestras modificadas con PFM (Columna de la izquierda) y muestras modificadas sin PFM (columna de la derecha).

En resumen, los resultados del análisis por AFM confirman que el tratamiento con PFM de la superficie es efectivo para lograr la unión de partículas a la misma, aunque aún queda por determinar de forma concluyente si las partículas observadas son partículas lentivirales u otro tipo de partículas presentes en el medio.

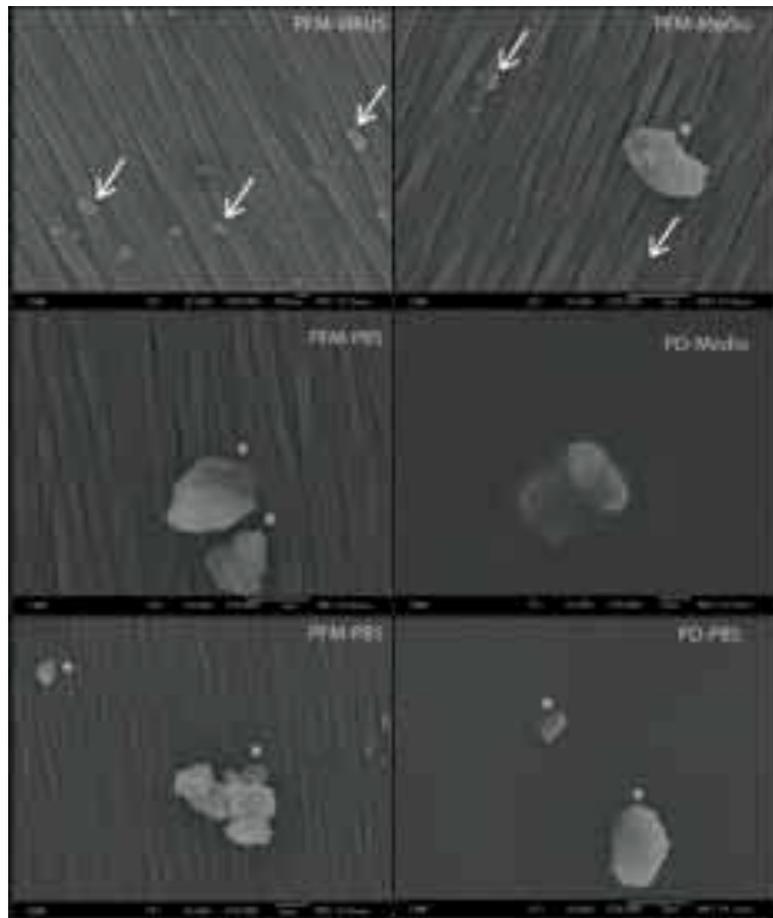
En el experimento de la figura 4.12, el número de partículas lentivirales que se observa en la superficie (considerando cada partícula como un virión individual) es de aproximadamente 2 partículas/ $\mu\text{m}^2$  (40 en una superficie de 20  $\mu\text{m}^2$ ), lo que indica una eficiencia relativamente baja en la unión de las partículas a la superficie en las condiciones empleadas. Parece claro que para conseguir la máxima eficacia en la transducción de las células habría que aumentar el número de partículas en la superficie. Una forma de lograrlo sería aumentando el tiempo de incubación con la solución de partículas lentivirales, como efectivamente se comprobó en los experimentos realizados a mayores tiempos, donde un aumento del tiempo de incubación (hasta 3 h) se traduce en un aumento del número de partículas en la superficie, llegando a las 5 partículas  $\mu\text{m}^2$  (figura 4.14).



**Figura 4.14** Comparación entre dos tiempos de exposición de las placas de cultivo modificadas a las partículas lentivirales a)  $t=30$  minutos b)  $t= 3$  horas. Ambos con agitación orbital

Los medios que contienen las partículas lentivirales poseen una gran cantidad de proteínas procedentes del suero utilizado, las cuales pudieron ser detectadas por el AFM. Para ello se realizó SEM para analizar la morfología de las partículas enlazadas en la superficie en presencia o ausencia de vectores virales.

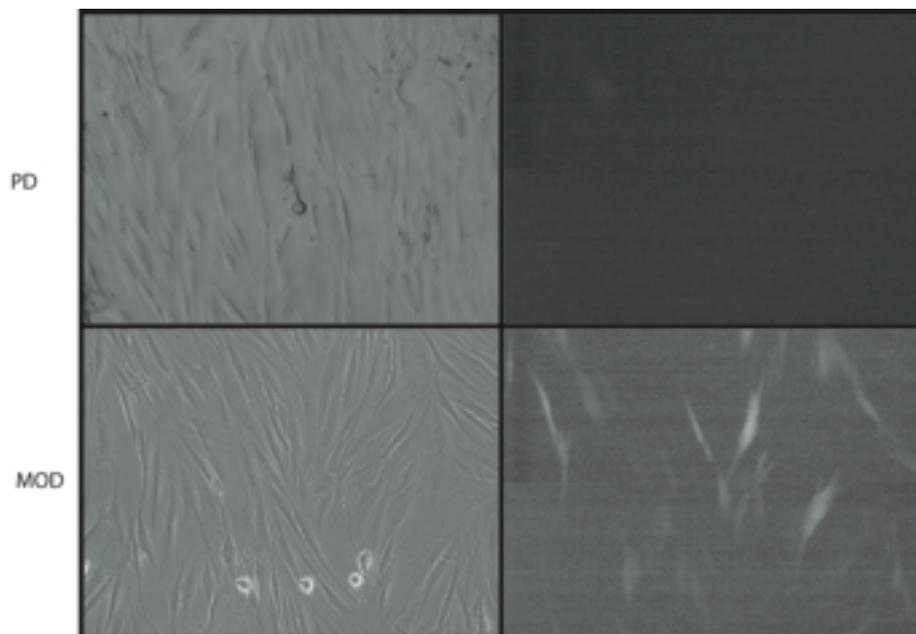
En la figura 4.15 se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido. Analizando las imágenes se pudo comprobar cómo la condición donde aparecen más partículas de aspecto similar a viriones lentivirales es PFM-partícula lentiviral en comparación con PFM-Medio. En el caso de NoPFM-Medio, no se observa ninguna partícula, confirmando de esta forma lo que ya se observó a través del AFM, en donde el poliestireno sin tratar no se ancló ningún tipo de partícula que tuviera naturaleza proteica. Las líneas que se observan en algunas de las superficies son debidas al tratamiento que se siguió para realizar el procedimiento de punto crítico, ya que el poliestireno a temperaturas de 80°C se reblandece y se curva. Esto no interfirió en la correcta observación de las superficies (las muestras que no presentan estas líneas fueron tratadas con una temperatura menor). Las partículas grandes que se observan (> de 500 nm) son probablemente debidas a cristales de sales presentes en los medios.



**Figura 4.15** Imágenes de microscopía electrónica de barrido en las que se ven las diferencias existentes entre los tratamientos desarrollados. a) PFM-partículas lentivirales b) PFM-medio con suero c) PFM-PBS d) No PFM-Medio e) PFM-PBS f) no PFM-PBS

### 4.4.3 Actividad biológica de las partículas lentivirales ancladas/Optimización del sistema

Previo a la optimización de los parámetros necesarios para aumentar la densidad del tapizado se tuvo que verificar la actividad transductiva de las partículas lentivirales ancladas en la superficie. Para ello, se compararon dos tipos de superficie: una placa PD-PFM y una placa PD-No PFM. La figura 4.16 muestra el resultado de la comparación entre ambas placas, las cuales se hicieron reaccionar con partículas lentivirales codificando el gen reportero de GFP. Para realizar este experimento, tras la modificación superficial correspondiente, las placas se trataron con gelatina al 0,1% en PBS para facilitar la adherencia de las células. En los resultados se puede observar una significativa capacidad de transducción. Concretamente, la citometría realizada sobre las células crecidas en ambos tipos de placas mostró que la transducción fue más de 10 veces superior en la placa modificada (35% vs 3%) (figura 4.17)



**Figura 4.16** Gráfico donde se indica el porcentaje de infección celular en los fibroblastos utilizados. b) imágenes de visible y fluorescencia de fibroblastos de ratón en placas PD y PD-PFM

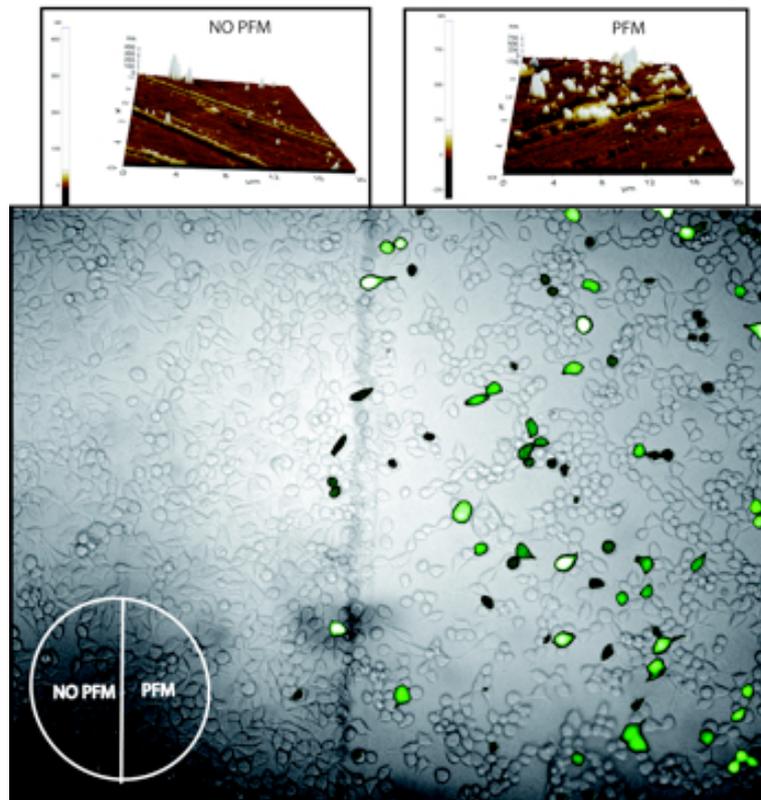


Figura 4.17 Infección en placa de cultivo tratada, mitad con PFM mitad sin PFM panel superior: imagen realizada con el AFM donde se muestra las partículas en ambos lados; en el panel inferior imagen de fluorescencia donde se observa como la mitad donde existen las partículas lentivirales, las células son infectadas.

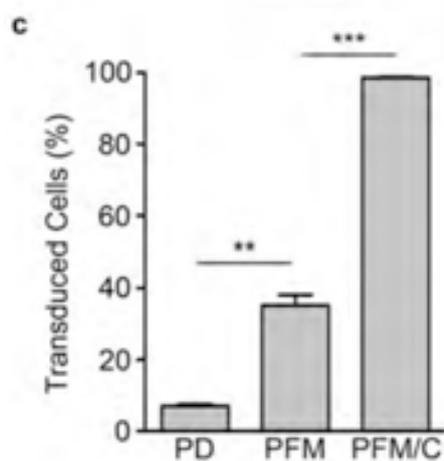


Figura 4.18 Resultados obtenidos de la citometría realizada a las placas PD-No PFM y placas PD-PFM, comparadas con el control positivo.

Continuando con la demostración de la eficacia del tapizado con PFM, en la figura 4.18 se muestra el resultado de un experimento en el que se trató una misma placa, la mitad con PFM y la otra sin PFM y se realizó el experimento con el protocolo habitual (suspensión viral durante 30 minutos a 37°C). Se pudo observar claramente que gran parte de las células adheridas a la superficie donde estaba el PFM expresaron el gen reportero (GFP), mientras que las adheridas a la sección donde no había PFM no fueron transducidas.

Una vez analizada la presencia de las partículas lentivirales en la superficie, así como su actividad transductiva, se procedió a realizar una optimización de los parámetros del tapizado. La actividad de las partículas lentivirales de la superficie es directamente proporcional a dos parámetros: la densidad de partículas unidas y la actividad infecciosa de dichas partículas (fracción de partículas biológicamente activas). Para simplificar, en el desarrollo experimental planteado se consideró que la fracción de partículas activas era constante en todas las muestras. A partir de los resultados obtenidos hasta este punto, se puede concluir que la densidad de las partículas (su eficacia de unión a la superficie) se vio afectada a su vez por dos parámetros. El primero de ellos es el tipo de superficie, ya que el poliestireno no tratado es altamente hidrofóbico, lo que origina que ninguna partícula se adhiera a la superficie por fuerzas débiles, mientras que las placas de cultivo (TC) son hidrofílicas, por lo que las proteínas pueden verse atraídas por la superficie. El otro factor importante es el tiempo de exposición de las partículas en la superficie con PFM: al aumentar el tiempo de exposición aumenta la cantidad de partículas en la superficie (como se vio en la Figura 4.14). Teniendo en cuenta la estabilidad de las partículas lentivirales [26] se decidió fijar un tiempo de exposición de 3 h, como un compromiso entre la ganancia de densidad y la pérdida de actividad con el tiempo.

Generalizando, el número de partículas unidas a la superficie debe ser directamente proporcional a la magnitud de la difusión de las partículas presentes en el medio, pues sólo pueden unirse aquellas partículas que entren en contacto físico directo con la superficie y puedan así reaccionar con el PFM. Por tanto, se puede considerar que, dados una hidrofiliidad y un tiempo de exposición constantes (se consideran “óptimos”):

mayor difusión de las partículas infectivas durante la incubación con la superficie previamente tratada con PFM → mayor probabilidad de contacto partículas-superficie (PFM)

→ mayor eficacia de unión de las partículas infectivas → mayor densidad superficial de partículas infectivas → mayor eficacia de transferencia genética

Es decir, si se quiere maximizar la eficacia de la transferencia genética, además de optimizar el tiempo de incubación con la superficie previamente tratada con PFM, se tendrá que maximizar la difusión (que es la suma de los componentes de la difusión molecular y la advección) de las partículas transductivas durante dicha incubación. (ecuación 4.1)

**Ecuación 4.1: Ecuación de la difusión que viene dada por sus dos componentes, difusión molecular y la advección.**

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c - \vec{v} \cdot \nabla c.$$

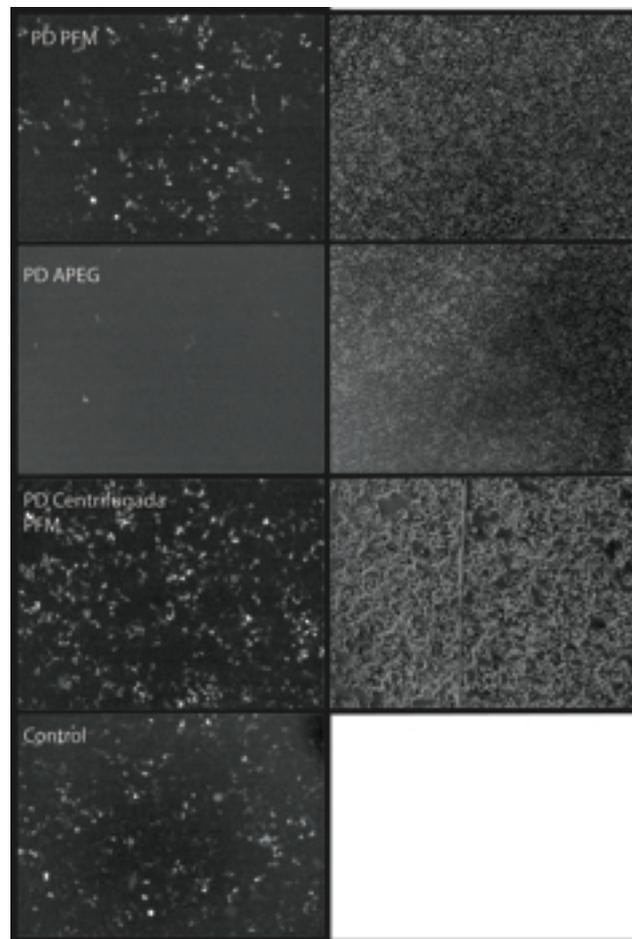
Para ello se deben tener en cuenta los parámetros físicos de los que depende, que son los siguientes (excluyendo el tiempo, fijado ya empíricamente como constante a 3 h):

- Concentración de partículas en el medio.
- Temperatura.
- Fuerza de gravedad.

La magnitud de la difusión de las partículas, y por tanto la densidad de tapizado de las mismas, es directamente proporcional a dichos parámetros. Se han de considerar constantes la concentración de la disolución (corresponde al título lentiviral) y la temperatura (37°C, es la temperatura más alta a la cual las partículas lentivirales son estables durante varias horas). Por tanto, para optimizar la eficacia de transferencia genética, se deberá optimizar mediante la fuerza de gravedad que actúe sobre las partículas. Además, para maximizar el contacto de las partículas con la superficie, se usan el mínimo volumen suficiente para cubrir la placa (cuanto menor sea el volumen, mayor será la relación entre la superficie con la cual entren en contacto las partículas y dicho volumen).

Para aumentar las fuerzas G y obtener un mayor rendimiento en la infección se realizó una centrifugación a 3.000g durante la incubación con las partículas lentivirales. De esta forma, se favoreció en gran medida la difusión, aumentando así el contacto partículas-PFM y consiguiendo una mayor densidad en la superficie. Esto quedó demostrado en la figura 4.19 en la que se observa como la muestra que está centrifugada tiene un mayor nivel de

transducción, prácticamente igual al máximo obtenido con el control de infección mediante el método habitual (partículas en suspensión).



**Figura 4.19** Infección de células a través de las partículas lentivirales depositadas en diferentes superficies tratadas. La columna de la izquierda corresponde a la infección transcurridas 24h vista con luz ultravioleta, la columna del extremo derecho corresponde a luz visible a las 48h y la del centro corresponde a luz ultravioleta en células a las 48h

Tras la comprobación de la actividad de transducción de las superficies modificadas y su optimización se quiso demostrar que dicha actividad era debida efectivamente a partículas lentivirales unidas covalentemente al PFM. Para ello, se comprobó la actividad de transducción de dos tipos de superficies diferentes, ambas recubiertas con partículas lentivirales

- Placas PD\_PFM y bloqueadas con amino-PEG.
- Placas PD-PFM

Se utilizó el amino-PEG para modificar la hidrofiliicidad de la superficie y bloquear los grupos reactivos del PFM impidiendo así que posteriormente las partículas lentivirales pudieran reaccionar y anclarse en la superficie. Además, el grupo polietilenglicol que quedaba expuesto tenía la suficiente hidrofobicidad como para desfavorecer que las partículas infecciosas fueran absorbidas y pudieran transducir posteriormente las células (Figura 4.20). Los resultados obtenidos mostraron que, efectivamente, en las placas tratadas con amino-PEG (APEG) no se detectó prácticamente expresión alguna de GFP (figura 4.20).

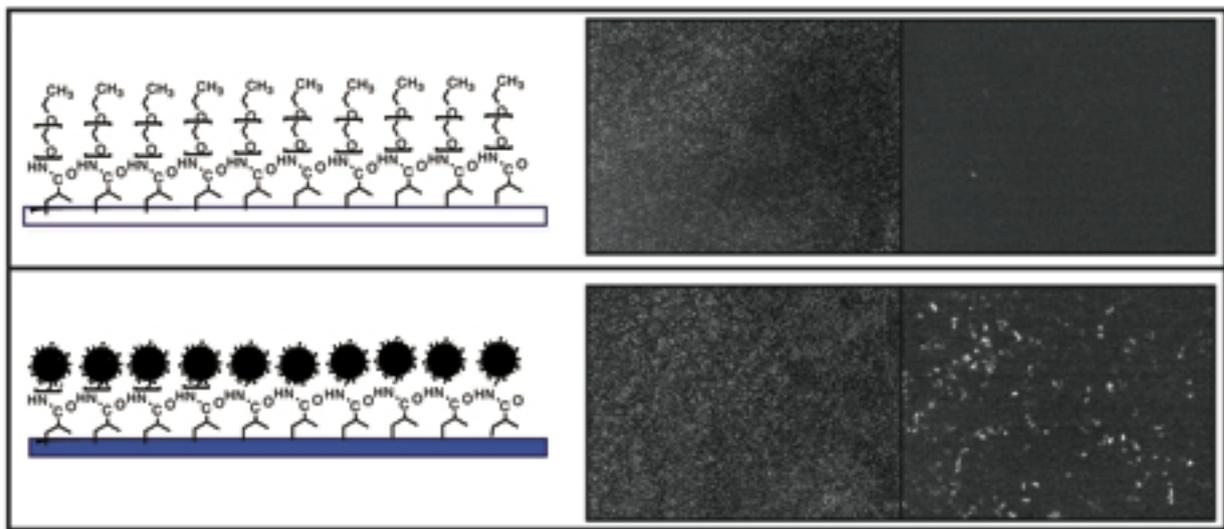
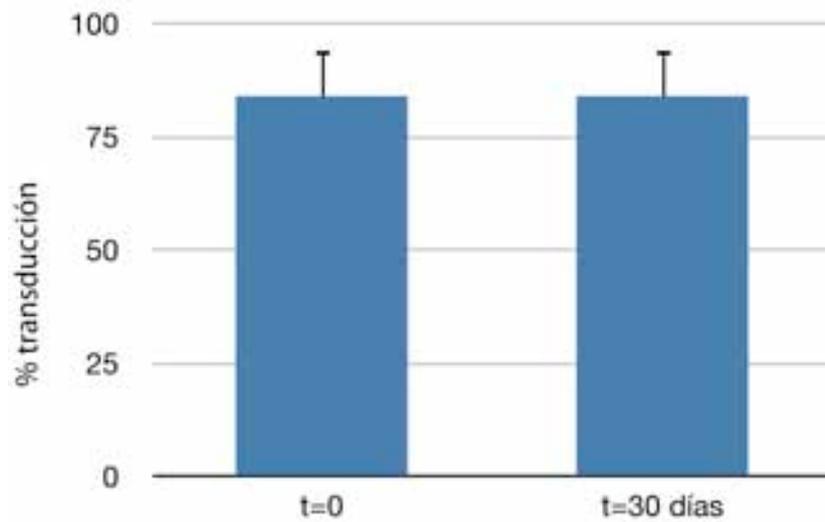


Figura 4.20 Comparación entre dos superficies diferentes partiendo de placas modificadas con PFM. Parte superior: Placas recubiertas con Amino-PEG. Parte inferior Placas recubiertas con lentivirus

Se puede concluir por tanto que mediante la tecnología desarrollada en el presente estudio se obtuvo una superficie con capacidad para modificar genéticamente células de mamífero de una manera eficiente y reproducible.

#### 4.4.4 Almacenamiento de las placas

Demostrada la capacidad infectiva de las superficies fabricadas, era de interés determinar si dichas placas pueden almacenarse, lo cual supondría una gran facilidad de uso. Para ello, se comprobó si existía pérdida de eficiencia en las placas almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  transcurridos 30 días.



**Figura 4.21: Resultados de la infección del Almacenaje de placas PD tapizadas con lentivirus.**

En la figura 4.21 se puede ver como las placas que se mantuvieron 30 días a  $-80^{\circ}\text{C}$  no sufrieron pérdida alguna de actividad. Con ello podemos concluir que las placas modificadas con partículas lentivirales pueden ser almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por periodos de 1-4 semanas conservando la práctica totalidad de su actividad, lo que le confiere a las placas CRS una gran facilidad de uso, una vez hayan sido fabricadas.

#### 4.4.5 Transferencia genética empleando otros vectores (no lentivirales)

Además de partículas lentivirales, se estudió la posibilidad de producir CRS empleando otro tipo de vectores virales, en concreto, vectores adenovirales, que son unos de los más empleados en procedimientos de terapia génica. Asimismo, se estudió la posibilidad de emplear vectores no virales, concretamente el reactivo comercial lipofectamina, que es uno de los agentes de transfección más comúnmente empleados en investigación. En la figura 4.22 se puede ver un resumen de los resultados obtenidos, en los que se ve claramente que ambos tipos de partículas también pueden ser empleadas para producir CRS, aunque con distintos niveles de eficacia.

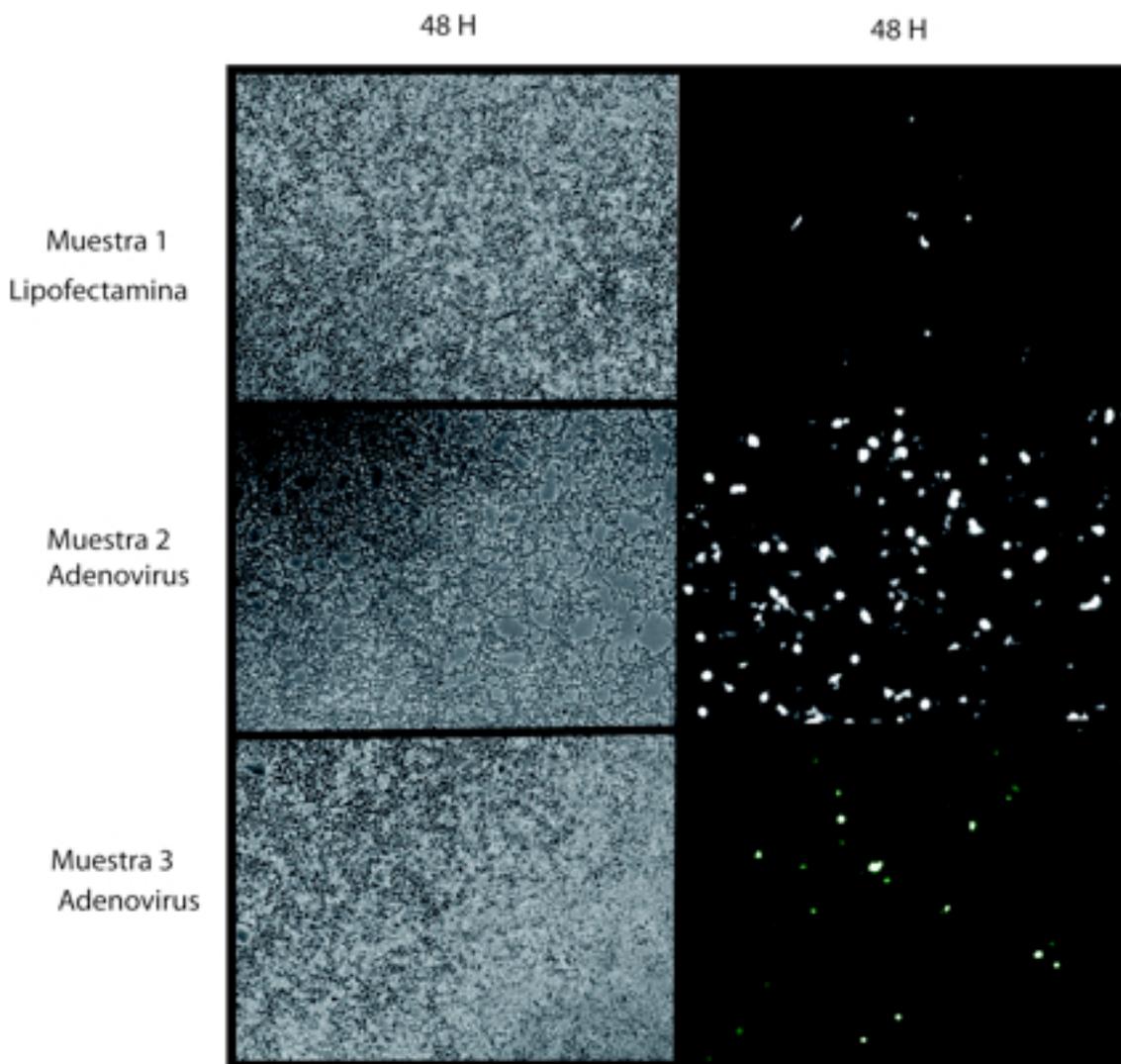


Figura 4.22 Infección de células a través de adenovirus y complejos de lipofectamina depositadas en placas CRS. La columna de la derecha corresponde a luz visible mientras que la otra es luz ultravioleta. Entre la muestra 2 y la muestra 3 varía el tiempo de reacción del adenovirus con la placa, 60 minutos y 30 minutos respectivamente.

#### 4.4.6 Transferencia de siRNA

En los últimos 10 años, el siRNA ha sido muy empleado como sistema de silenciamiento selectivo de genes específicos de interés. El nombre *siRNA* son las siglas en inglés de *small interfering RNA*, en español RNA pequeño de interferencia o RNA de silenciamiento. Es un tipo de ARN no codificante monocatenario con una longitud de 20 a 25 nucleótidos que es altamente específico (complementario) para algunas regiones de la secuencia de nucleótidos de su ARN mensajero gen respectivo. Interviene en el mecanismo denominado interferencia de ARN (*RNA interference*, RNAi), donde el siRNA reduce la expresión de un gen específico inhibiendo su traducción (en general promoviendo la degradación del mRNA). Los siRNAs también actúan en rutas endógenas tales como en la defensa antiviral o en la organización de la estructura de la cromatina en un genoma. La complejidad de estas rutas es el objeto de intensos estudios, y su descubrimiento fue la razón por la cual Craig C. Mello y Andrew Fire recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2006.

La especificidad y la robustez del efecto de RNAi sobre la expresión génica hace de este mecanismo una valiosa herramienta en investigación, tanto en cultivos celulares como en organismos vivos, ya que dsRNAs o siRNAs sintéticos o transgénicos pueden introducirse en las células para inducir el silenciamiento selectivo de genes específicos de interés. Esto ha permitido un gran avance en el desarrollo de la biología celular, ya que el RNAi es una herramienta simple y rápida para la comprensión de la función de los genes mediante ensayos de reducción de función (*knockdown*).

El péptido RAWA-H8, desarrollado en el laboratorio del Dr. Antonio Bernad [20], es un excelente agente de transducción de siRNA. Es, por tanto, un candidato perfecto para desarrollar un sistema totalmente sintético, junto al uso de las placas CRS, mediante el cual se proceda a realizar el silenciamiento de genes específicos en células eucariotas.

Para ello se contó con la colaboración del Dr. Alberto Fraile-Ramos del CNB-CSIC, en donde se sintetizó el RAWA-H8 para su utilización en el sistema CRS. La Tabla 4.2 muestra los diferentes experimentos realizados para demostrar el uso de esta tecnología. En todos los experimentos se empleó un siRNA anti-GFP, marcado con AlexaFluor555.

Tabla 4.2 Resumen de experimentos realizados con los complejos siRNA:RAWA-H8

	PFM	Muestras	HEPES
Control	NO	siRNA	SI
Positivo			
PFM-HEPES	SI	siRNA	SI
PFM-noHepes	si	siRNA	no
PFM- concentrado	SI	siRNA	Si

En primer lugar, es importante utilizar un protocolo en el que no se desnaturalicen los complejos utilizados, por lo que se probó el uso de un tamponador (Hepes) para la neutralización de los productos resultantes de la reacción con el PFM. Posteriormente, se probó con diferentes concentraciones para ver el efecto que tiene este sobre la transducción. Para analizar los resultados, las células se analizaron con un citómetro.

En la figura 4.23 se muestran los resultados de citometría de las células transfectadas mediante el complejo Rawa-H8/SiRNA. El efecto que tuvo el agente tamponador Hepes sobre el sistema es destacable ya que permite que el 24% de las células sembradas sean susceptibles de ser transfectadas frente al 10% cuando no se utiliza este reactivo. Por otro lado, como ya se ha discutido en anteriores apartados, es importante la densidad del tapizado a la hora de transfectar con las placas CRS. Es por ello que se aumentó la concentración de los complejos para ver tal efecto. Como resultado se obtuvo un sistema capaz de transfectar cerca del 60% de las células sembradas, lo cual indica la idoneidad del sistema CRS para el silenciamiento selectivo de genes de interés en células de mamífero.

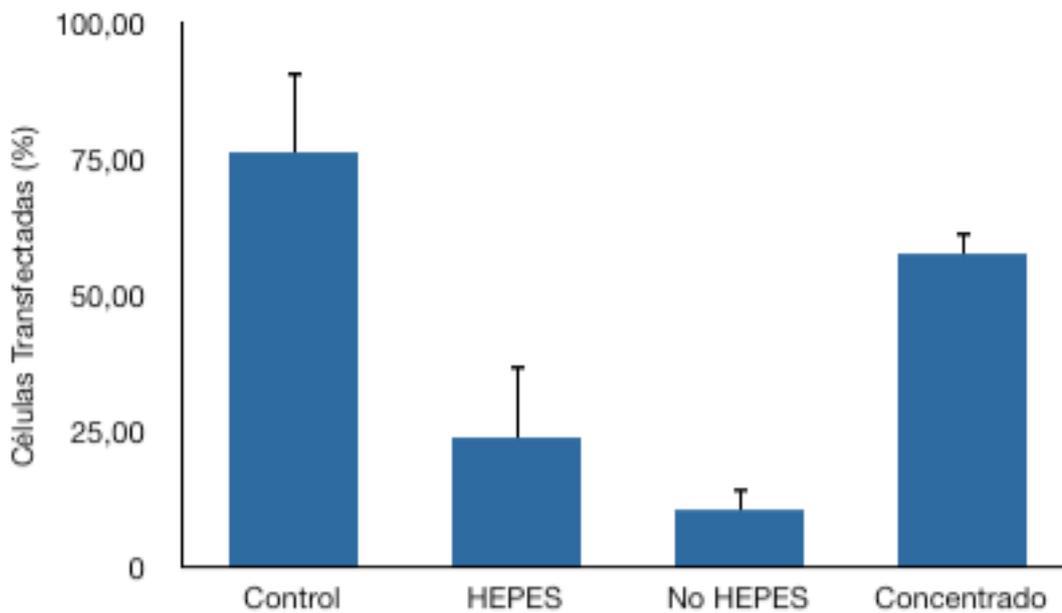


Figura 4.23 Porcentajes de infección de las placas con el complejo de transducción, comparando la infección realizada con la tamponación del HEPES y sin la tamponación. Porcentaje de infección de las placas con el complejo de transducción, en función de la concentración de complejo utilizado

#### 4.4.7 Obtención de iPSC

El principal objetivo a la hora de desarrollar una superficie con capacidad de modificación genética (y por el cual se ha denominado a dicha superficie como 'CRS') era disponer de una técnica capaz de reprogramar células de mamífero con la máxima sencillez y eficacia posibles. Basándose en los trabajos previos de otros autores, se utilizaron placas de poliestireno tratadas con partículas lentivirales que codificaban los cuatro genes empleados originalmente por Yamanaka para realizar la reprogramación (Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc). De esta forma, se esperaba disponer de una superficie con capacidad para reprogramar fibroblastos embrionarios murinos para obtener células iPS.

Para realizar la reprogramación celular se siguieron dos procedimientos ligeramente distintos (ver figura 4.9), cuya principal diferencia fue el uso o no de MEF inactivados (iMEF) como *feeder layer*. El uso de iMEF como *feeder layer* es una técnica comúnmente empleada en el cultivo de células ES murinas, pues los iMEF proporcionan el factor de crecimiento LIF, que es esencial para el mantenimiento de la pluripotencia de dichas células [1]. Para evaluar que las placas CRS utilizadas estaban en buen estado y el tapizado se había practicado de forma

correcta se realizó en paralelo un control de transducción con las mismas condiciones de cultivo y de tapizado que los lentivirus para la reprogramación (figura 4.24). Las partículas víricas que se usaron en todos los experimentos fueron preparados en el instante en el que se realizaba el experimento, para evitar posibles variantes debidos a la congelación de las partículas.

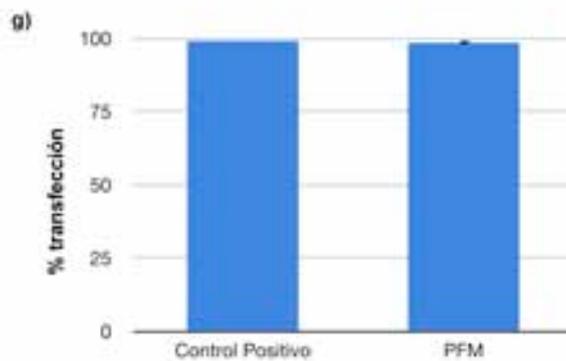
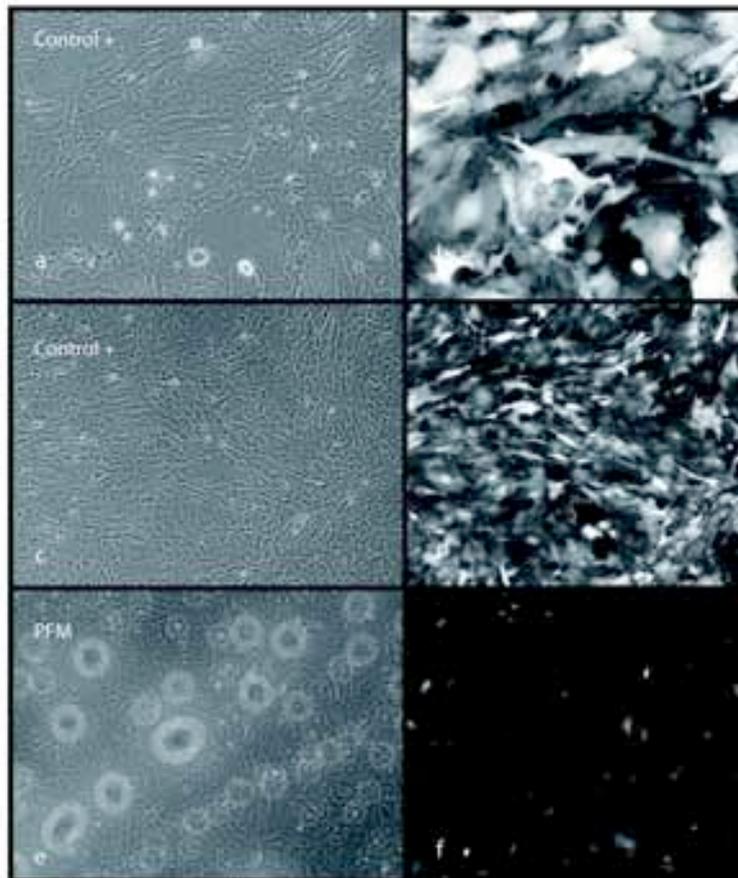
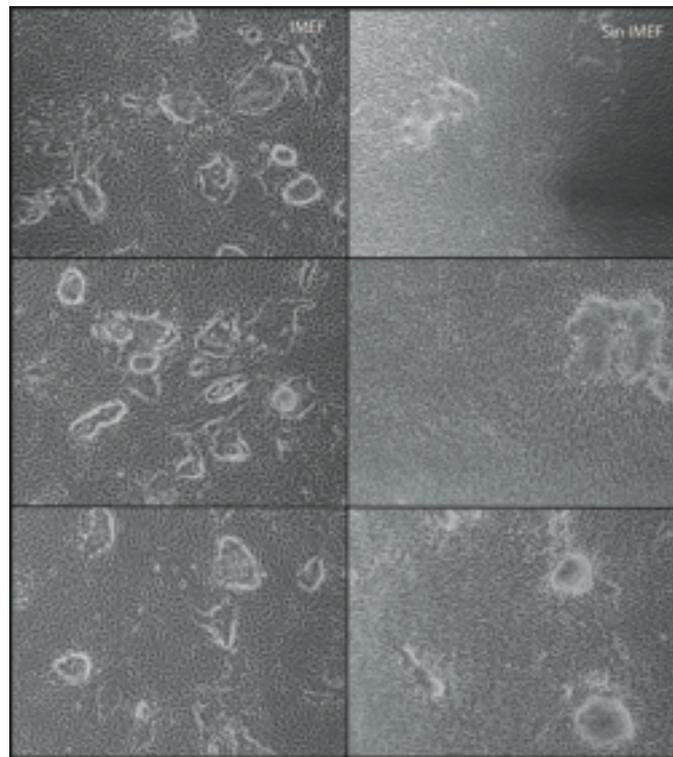


Figura 4.24 Control de infección en el instante de la reprogramación, realizado en paralelo con un lentivirus eGFP con las mismas condiciones de tratamiento

En el control de transducción que se realizó, el 99,1% de las células fueron infectadas, expresando el gen reportero GFP. Estos resultados indican que las placas CRS tenían el potencial suficiente para la transducción eficiente y posterior reprogramación de los MEFs utilizados.

Al comparar los dos procedimientos utilizados, se puede ver (figura 4.25) que el número de colonias que se obtuvieron fue significativamente mayor cuando se expandieron las células sometidas al contacto con las partículas lentivirales sobre MEFs inactivados (el número de colonias ya en el día 8 fue aproximadamente 5 a 1).



**Figura 4.25 Comparación de las colonias obtenidas mediante los dos métodos utilizados**

Transcurridos 10 días tras la infección, el número de colonias que se obtuvieron mediante el sistema CRS fue significativamente mayor que el obtenido mediante el procedimiento habitual (partículas lentivirales en suspensión). Concretamente, el número de células infectadas fue unas 8,5 veces mayor ( $P < 0.0001$ , Student's t-test). Esto corresponde a la obtención una colonia de células iPS por cada 10.000 células inicialmente sometidas a reprogramación. Es decir, en condiciones comparables, las CRS proporcionaron una eficiencia de reprogramación

del 0.1%, frente al 0.012% de eficiencia obtenida utilizando las condiciones habituales (figura 4.26).

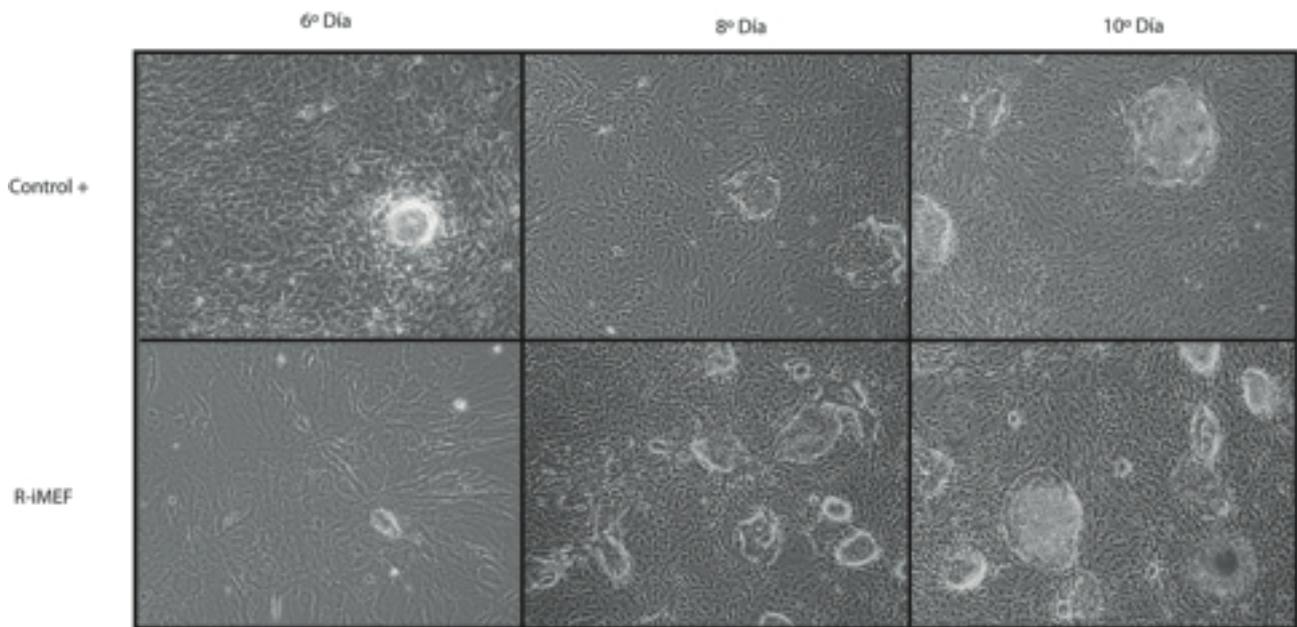
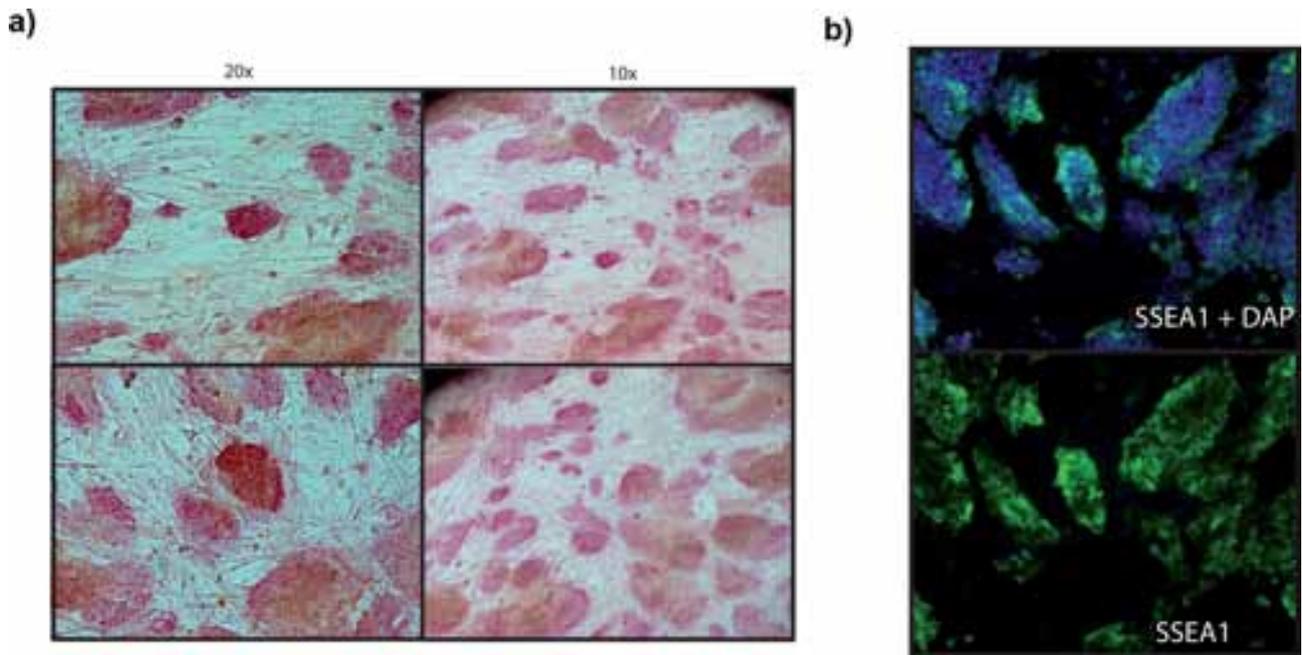


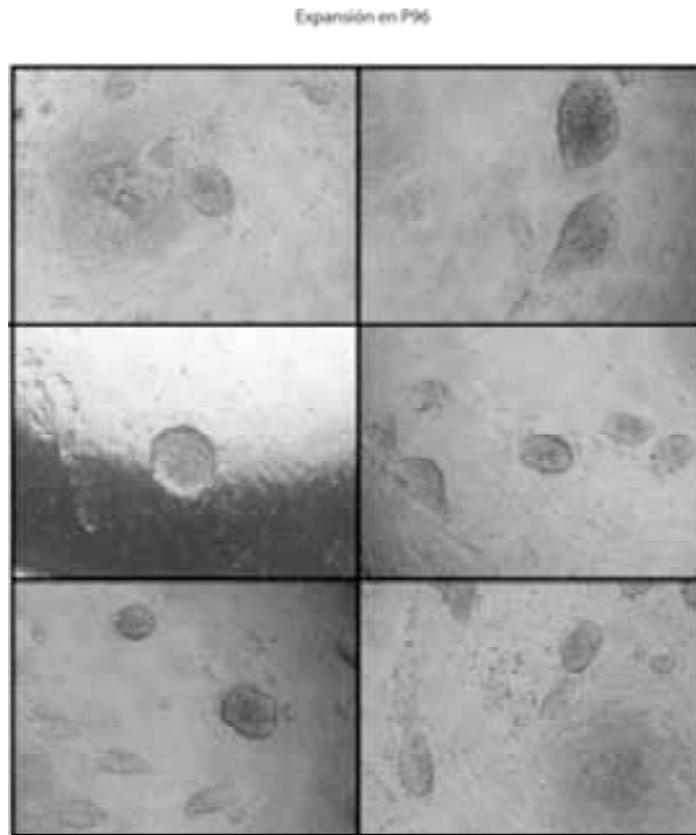
Figura 4.26 Crecimiento de colonias a lo largo de los días, en el control realizado y con las placas CRS

Todas las colonias obtenidas (*IPSC-like*) fueron positivas para la expresión de fosfatasa alcalina y para el marcador específico de ESC el SSEA-1 (figura 4.27).



**Figura 4.27: Expresión de fosfatasa Alkalina en las iPS (a) y expresión de SSEA1 (b)**

Tras picar 48 de las colonias con aspecto de células IPS y sembrarlas en pocillos individuales con iMEF, la mitad de ellas lograron expandirse con éxito. Estas 24 líneas celulares obtenidas se expandieron durante al menos 15 pases celulares y se procedió a su caracterización fenotípica.



**Figura 4.28** Crecimiento de colonias tras picarlas y expandirlas en las placas de 96

Se realizaron RT-PCR para examinar si los genes característicos de células ES también se expresaban en las células obtenidas con las CRS. Como control negativo se usaron las células de partida (MEFs). Se emplearon primers que amplifican específicamente los transcritos de los genes endógenos, pero no los de los transgenes. Las células obtenidas coincidieron en su patrón de expresión de todos los marcadores con las ESC (figura 4.29).

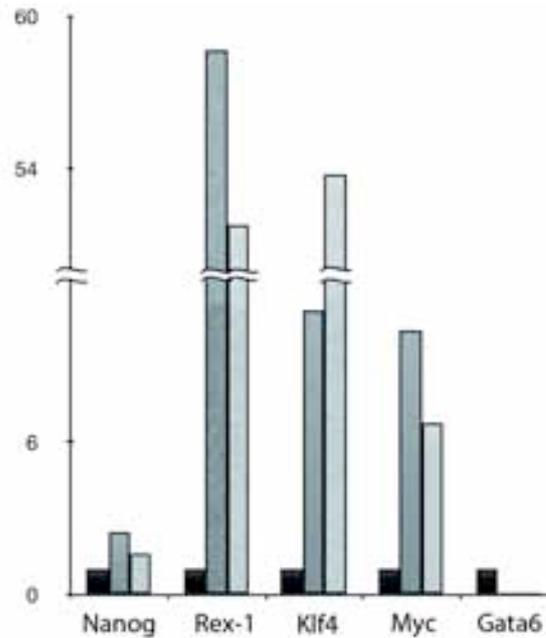
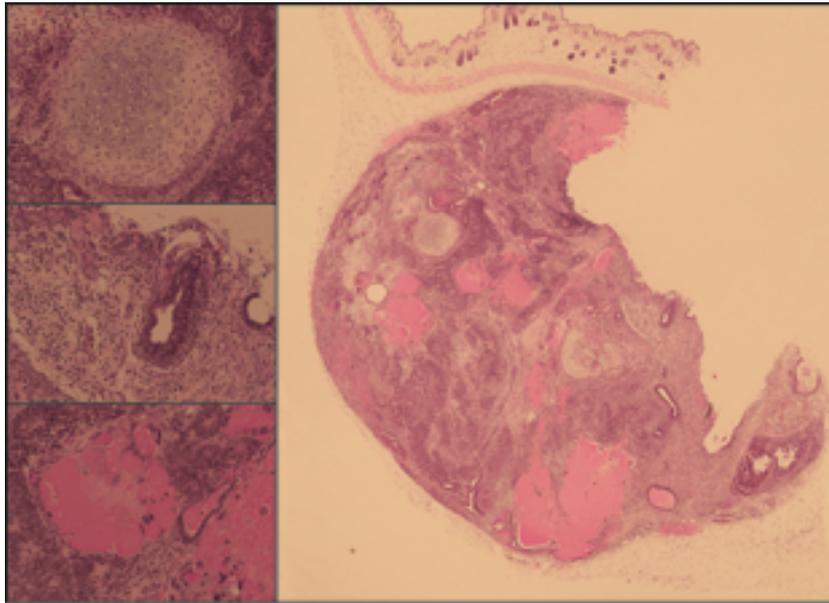


Figura 4.29: Expresión de los principales genes de pluripotencia.

Otra prueba para comprobar la pluripotencia de las células obtenidas fue la diferenciación *in vitro* a cardiomiocitos. Para ello, se obtuvieron cuerpos embrionarios (*embryo bodies*, EB) mediante el método de la ‘gota colgante’ y posteriormente dichos EBs se sembraron en pocillos en medio de ESC sin LIF. Transcurridos 15 días se observaron las primeras evidencias de grupos de células latiendo, con un ritmo poco uniforme. Al cabo de dos días esos primeros focos dejaron de latir, pero comenzaron otros nuevos, los cuales lo hicieron con mayor fuerza y regularidad. Es de destacar que al cabo de un día, alrededor del primer foco aparecieron otros focos de cardiomiocitos con actividad contráctil (Ver video s4.1).

Por último, se examinó la capacidad de formación de teratocarcinomas *in vivo*. Para ello se inyectaron las células de forma subcutánea en ratones NOD-SICD. En cuatro de los ocho ratones inyectados se desarrollaron tumores visibles. Los análisis anatomopatológicos de dichos tumores mostraron la existencia de células de las tres capas germinales (figura 4.30).



**Figura 4.30** Histología de los tumores extraídos a los ratones tras la inyección de iPSC, donde se pueden distinguir las tres capas germinales en las que se derivan las iPSC

#### 4.4.8 Pruebas preliminares *in vivo*

Una de las aplicaciones teóricas de esta tecnología de CRS es su posible uso *in vivo*, por lo que se realizó un estudio preliminar en ratas sobre esta posibilidad. Se decidió usar láminas de material implantadas de forma subcutánea. Para ello, era necesario conseguir un material lo más fino y liso posible, algo que se podía realizar mediante la técnica del "spin coater".

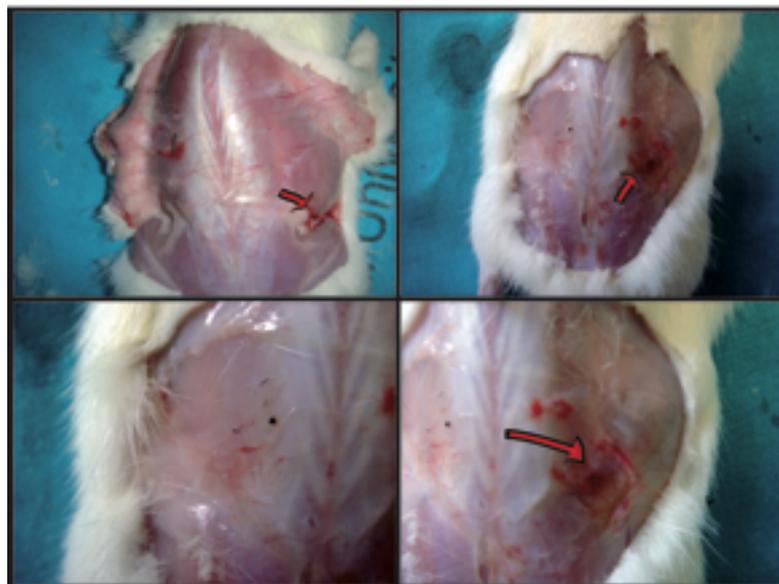
El recubrimiento de las láminas con las partículas lentivirales se realizó con un procedimiento similar al empleado anteriormente para las placas petri. El material utilizado en esta ocasión fue el polidimetil Siloxano (PDMS), por su facilidad a la hora de sintetizarlo y por su moldeabilidad previa al curado.

En el experimento se utilizaron 3 ratas Wistar a las que se les implantaron las láminas de PDMS, en el lado izquierdo como control negativo (utilizando medio de cultivo para la neutralización del PFM) y en el lado derecho se utilizó la lámina con partículas lentivirales con el gen reportero GFP, con el objetivo de realizar una transducción *in vivo* de las células

musculares del animal, aprovechando la facilidad que tienen estas células a la hora de ser infectadas, ya que son las células más expuestas.

El implante se dejó 48 horas, tras las cuales se procedió la eutanasia de los animales. En una primera observación macroscópica de la fluorescencia de los tejidos circundantes no se observó expresión de GFP. Sin embargo, sí se observó que en la zona donde se implantaron las láminas con PDMS+Virus se había producido un hemorragia en el tejido en contacto directo con la superficie modificada (figura 4.31). Esta primera evidencia hace pensar que las láminas modificadas con virus tuvieron algún efecto *in vivo*, pues las láminas PDMS+medio de cultivo no produjeron ninguna alteración visible en los tejidos circundantes. Sin embargo, cuando se analizaron mediante microscopía de fluorescencia criocortes del tejido en contacto con los implantes, no se pudo ver expresión de GFP.

Por tanto, es necesario profundizar mucho más en el estudio del potencial de transducción *in vivo* de las CRS antes de poder conseguir conclusiones definitivas.



**Figura 4.31** Imágenes post-implante de las láminas de PDMS. En la zona izquierda se detalla la zona donde fue implantada la lámina modificada con la partícula lentiviral, la cual originó una hemorragia

## 4.5 DISCUSIÓN

---

En el presente trabajo se ha desarrollado y validado un método mediante el cual se pueden realizar transfecciones localizadas para la modificación genética de células eucariotas, haciendo uso de superficies de diseño, denominadas CRS (*Cell Reprogramming Surfaces*). Aprovechando las nuevas tecnologías desarrolladas por diferentes grupos de investigación sobre la obtención de células reprogramadas [27-30], con esta tecnología CRS se pueden obtener células iPS mediante un sistema controlado en el espacio y en el tiempo, tal y como se comprueba con la modificación selectiva en sólo una mitad de las placas de cultivo. Este mecanismo novedoso le confiere una gran ventaja a la hora de ser utilizado, ya que permite la reprogramación selectiva de células in vitro.

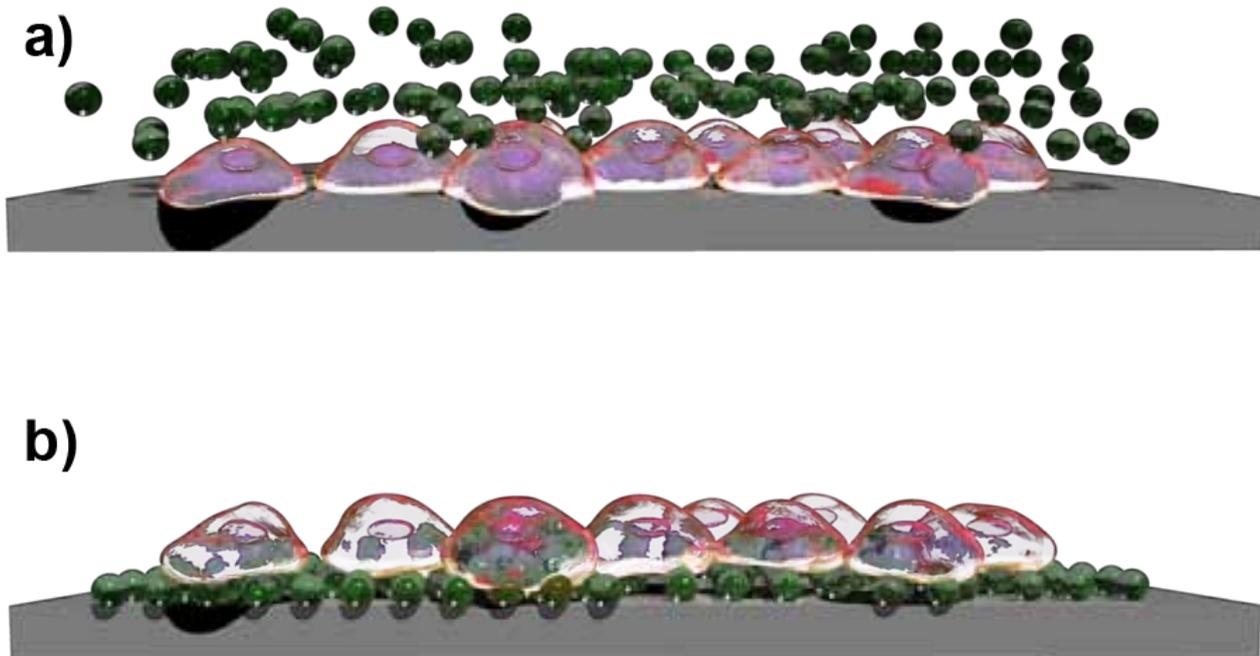
El mecanismo que siguen estos sistema de infección es mediante fusión de las membranas aprovechando la unión covalente que existente entre los virus y las superficies. Este mecanismo provoca que las células entren en contacto directo con las partículas lentivirales, con lo que la eficiencia de transducción es muy elevada. Es importante analizar el enlace covalente que se produce en las superficies dado que la cantidad de partículas es muy elevado y no todas estarán en contacto con el PFM. No obstante, la modificación superficial que se practica con dicha molécula, hace que exista una gran cantidad de enlaces inespecíficos, que originan un fuerte enlace al estilo de la estreptavidina-biotina. Probablemente también existan aglomeraciones de partículas lentivirales, que estarán fuertemente unidas a la superficie por la gran cantidad de fuerzas inespecíficas. Con todo esto la eficiencia de transducción es muy alta.

En los resultados se han utilizado varios tipos de partículas, divididos en dos grupos fundamentales, sintéticos y no sintéticos. En estos últimos hay una gran diferencia entre los adenovirus y los lentivirus. En el caso de los adenovirus, el mecanismo de transfección es diferente al de los lentivirus, ya que tienen que ser fagocitados por la célula, lo que origina que al estar unidos covalentemente, sea más complicado la infección. No obstante también se consiguieron buenos resultados, posiblemente gracias a las uniones inespecíficas comentadas anteriormente.

En el sistema utilizado con RAWA-H8, a la vista de los resultados obtenidos en la citometría, se puede ver como el efecto del HEPES en la tamponación del complejo, permite obtener una

mayor eficiencia. Además, se realizó un segundo control, en el que se bloqueó la placa con aminoPEG, lo cual dio como resultado una menor eficacia de transducción, como era de esperar por el efecto de la menor hidrofiliidad de la superficie. Los resultados, por tanto, indican que para poder trabajar con el sistema RAWA-H8, se deberá utilizar la máxima concentración posible de los complejos, para así aumentar su densidad en la superficie modificada. De esta forma, se podría obtener un buen sistema localizado para la transfección de oligonucleótidos en células eucariotas.

Centrándonos en la obtención de las iPSC, y más concretamente en las diferencias observadas entre la tecnología CRS y el sistema habitual de reprogramación (suspensión lentiviral), las hipótesis que surgen para explicar el aumento de la eficiencia en las placas CRS son dos. Por un lado, el tiempo que permanecen las células en contacto con las partículas lentivirales es mayor, ya que al estar situados en la superficie de cultivo a lo largo de los 4 días de infección, a medida que las células van creciendo, se podrían ir infectando con virus aún activos. Por el contrario, el sistema habitual de infección, deja a las células en contacto con el virus durante 5 ó 6 horas para evitar la muerte celular provocada por toxicidad del sobrenadante lentiviral. Otra hipótesis que podría surgir es el número de partículas infectivas existente por unidad celular. Al estar las partículas unidas a una superficie, se podría pensar que las células tienen un contacto más íntimo con las mismas, lo que tendría como resultado una mayor eficiencia en la infección. Esto podría explicar el porqué de la eficiencia de la reprogramación fue casi 10 veces mayor empleando las CRS. Es de destacar también que el título viral (unidades infectivas/ml) en el momento de realizar la infección no era igual en ambos casos, ya que aunque en un principio se añadía la misma concentración de partículas lentivirales, una vez realizada la reacción con la superficie se eliminaba todo el material sobrante que no había reaccionado, por lo que el “título” sería menor aunque se tenga una mayor densidad en la superficie (figura 4.32).



**Figura 4.32** Comparación de los métodos utilizados a la hora de realizar las transfecciones. En la parte superior se muestra la suspensión de partículas lentivirales y en la parte inferior el tapizado de las placas con estas partículas. Se puede ver como en el tapizado el contacto entre la partícula y la célula es mucho mayor que en el caso de la suspensión.

Así, se tiene un sistema mediante el cual, se aumenta la transducción en las células humanas y se puede controlar espacial y temporalmente la localización de esta transducción, siendo una gran ventaja para su posterior uso *in vivo*. Esta tecnología es compatible con cualquier otro desarrollo metodológico para la obtención de iPSC, como puede ser el uso de sistemas no integrativos [31] o incluso otros recientemente desarrollados como el uso de moléculas sintéticas de RNA [32].

En las pruebas *in vivo* realizadas no se observaron células que expresaran el transgén, Sin embargo, esto no permite concluir que la aproximación no sea válida, pues sí que se observó una clara diferencia entre la zona con superficies modificadas con partículas lentivirales y la zona control. Dicha diferencia consistió en la aparición de zonas hemorrágicas en donde estaba expuesta la lámina con partículas virales, pero no la lámina sólo con las proteínas. Esto podría ser debido a que las partículas virales empleadas, al poseer una envuelta fusogénica, pudieron ocasionar la rotura de algunos vasos sanguíneos en la zona del implante. Sin embargo, en este momento, esto no es más que una mera conjetura y será necesario un trabajo mucho más profundo para poder concluir si estos modelos basados en CRS tiene utilidad *in vivo*, aunque los resultados presentados dejan abierta la puerta.

## 4.6 BIBLIOGRAFÍA

---

1. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
2. Okita, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotency by defined factors*. Exp Cell Res. **316**(16): p. 2565-70.
3. Vierbuchen, T., et al., *Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors*. Nature, 2010. **463**(7284): p. 1035-41.
4. Francesch, L.G., E; Balcells, M; Edelman, E; Borros, S, *Fabrication of Bioactive Surfaces by plasma polymerization techniques using a novel acrylate derived monomer*. Plasma Processes and Polymers, 2005. **2**(60): p. 605-611.
5. Langer, R. and D.A. Tirrell, *Designing materials for biology and medicine*. Nature, 2004. **428**(6982): p. 487-92.
6. Tessmar, J., A. Mikos, and A. Gopferich, *The use of poly(ethylene glycol)-block-poly(lactic acid) derived copolymers for the rapid creation of biomimetic surfaces*. Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4475-86.
7. Duque, L., et al., *Reactions of Plasma-Polymerised Pentafluorophenyl Methacrylate with Simple Amines*. Plasma Processes and Polymers, 2010. **7**(11): p. 915-925.
8. Francesch, L., et al., *Fabrication of Bioactive Surfaces by Plasma Polymerization Techniques Using a Novel Acrylate-Derived Monomer*. Plasma Processes and Polymers, 2005. **2**(8): p. 605-611.
9. Marí-Buyé, N., et al., *Functionalized, Swellable Hydrogel Layers as a Platform for Cell Studies*. Advanced Functional Materials, 2009. **19**(8): p. 1276-1286.
10. Hoogerbrugge, P.M., et al., *Treatment of patients with severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase (ADA) deficiency by autologous transplantation of genetically modified bone marrow cells*. Hum Gene Ther, 1992. **3**(5): p. 553-8.
11. Buss, W.G., *Human immunodeficiency virus, the legal meaning of "handicap," and implications for public education under federal law at the dawn of the age of the ADA*. Iowa Law Rev, 1992. **77**(4): p. 1389-508.
12. Prescott, L.M., J.P. Harley, and D.A. Klein, *Microbiología*. 5<sup>ta</sup> ed2004, Madrid: McGraw-Hill Interamericana. XXX, 1240 p.
13. Luo, D., et al., *Controlled DNA delivery systems*. Pharm Res, 1999. **16**(8): p. 1300-8.
14. Wyman, T.B., et al., *Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers*. Biochemistry, 1997. **36**(10): p. 3008-17.
15. Floch, V., et al., *Cationic phosphonolipids as non viral vectors for DNA transfection in hematopoietic cell lines and CD34+ cells*. Blood Cells Mol Dis, 1997. **23**(1): p. 69-87.
16. Niidome, T., et al., *Chain length of cationic alpha-helical peptide sufficient for gene delivery into cells*. Bioconjug Chem, 1999. **10**(5): p. 773-80.
17. Morris, M.C., et al., *Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery*. Curr Opin Biotechnol, 2000. **11**(5): p. 461-6.
18. del Pozo-Rodriguez, A., et al., *A proline-rich peptide improves cell transfection of solid lipid nanoparticle-based non-viral vectors*. J Control Release, 2009. **133**(1): p. 52-9.
19. Read, M.L., A. Logan, and L.W. Seymour, *Barriers to Gene Delivery Using Synthetic Vectors*. Adv Genet, 2005. **53PA**: p. 19-46.

20. Fominaya, J., et al., *An optimized amphiphilic cationic peptide as an efficient non-viral gene delivery vector*. J Gene Med, 2000. **2**(6): p. 455-64.
21. Brun, S., et al., *VSV-G pseudotyping rescues HIV-1 CA mutations that impair core assembly or stability*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 57-71.
22. Zufferey, R., et al., *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9873-80.
23. Bett, A.J., L. Prevec, and F.L. Graham, *Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors*. J Virol, 1993. **67**(10): p. 5911-21.
24. Danthinne, X. and M.J. Imperiale, *Production of first generation adenovirus vectors: a review*. Gene Ther, 2000. **7**(20): p. 1707-14.
25. Brun, S., et al., *VSV-G pseudotyping rescues HIV-1 CA mutations that impair core assembly or stability*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 57.
26. Higashikawa, F. and L. Chang, *Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors*. Virology, 2001. **280**(1): p. 124-31.
27. Yamanaka, S., *A fresh look at iPS cells*. Cell, 2009. **137**(1): p. 13-7.
28. Yoshida, Y. and S. Yamanaka, *iPS cells: a source of cardiac regeneration*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(2): p. 327-32.
29. Dey, D. and G.R. Evans, *Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells by Nuclear Reprogramming*. Stem Cells Int, 2011. **2011**: p. 619583.
30. Hackett, C.H. and L.A. Fortier, *Embryonic stem cells and iPS cells: sources and characteristics*. Vet Clin North Am Equine Pract, 2011. **27**(2): p. 233-42.
31. Gonzalez, F., S. Boue, and J.C. Izpisua Belmonte, *Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(4): p. 231-42.
32. Rosa, A. and A.H. Brivanlou, *Synthetic mRNAs: powerful tools for reprogramming and differentiation of human cells*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(5): p. 549-50.



# CONCLUSIONES

■



## CONCLUSIONES

---

El trabajo que se describe en la tesis, engloba los tres puntos fundamentales que se plantean en un biomaterial: estructura, composición y superficie. A lo largo de la tesis se han desarrollado nuevas estructuras, nuevos biomateriales y nuevas superficies, todo ello desde un punto de vista de aplicación en la biomedicina y en la medicina regenerativa. Además se han utilizado técnicas de síntesis que permiten eliminar partículas tóxicas para el sistema mediante el uso de microondas, comenzando por el desarrollo de una nueva estructura porosa interconectada de fácil fabricación, pasando por un nuevo composite inyectable diseñado para ejercer funciones estructurales además de liberador de fármacos y terminando en una superficie capaz de modificar genéticamente células, algo que permitirá en un futuro avanzar en gran medida en la medicina regenerativa personalizada. De esta forma se cumple con los objetivos planteados al inicio de la tesis de la que se obtienen las siguientes conclusiones:

1. Se ha puesto a punto un procedimiento de síntesis, asistido por microondas, de un elastómero (*biorubber*), sin necesidad de utilizar catalizadores para la reacción. El procedimiento desarrollado es más rápido, en varios órdenes de magnitud, que la síntesis realizada mediante calefacción convencional. El método permite, al mismo tiempo controlar el grado de reticulación del elastómero y por consiguiente controlar las propiedades mecánicas del mismo en función de las aplicaciones finales del material.
2. Se ha puesto a punto un método de modificación superficial del *biorubber* utilizando grafting mediante plasma frío. Dicho método ha permitido una primera aproximación en la interacción célula-superficie, consiguiendo una mayor hidrofiliidad y bioactividad gracias a la introducción de péptidos o proteínas unidos covalentemente a la superficie. Con ello se demuestra la posible utilización de este material en diferentes aplicaciones como puede ser liberador de fármacos, señalizador mediante el anclado de factores de crecimiento o, incluso, como stent biodegradable.

3. Gracias a los péptidos C3a y C5a, se ha realizado una primera aproximación en la utilización de este material como transportador (*carrier*) de fármacos en el organismo. Las células inflamatorias, gracias a la llamada del complemento, han colonizado el biomaterial en toda su extensión, siendo éste un primer paso para la utilización del *biorubber* como *scaffold* en regeneración de tejidos.
4. En función de las necesidades, se han realizado diferentes diseños de *scaffolds*. Se ha conseguido un material altamente poroso que permite una difusión interna de fluidos, consiguiéndose la supervivencia de las células adheridas en su interior. También se ha obtenido un material con un tamaño de poro menor, también interconectado, que permite la fabricación de piezas más pequeñas. Por último, se ha fabricado, mediante técnicas de prototipado rápido, un material estructurado.
5. En los experimentos *in vivo* se ha comprobado como este material es biocompatible ya que no produce inflamación severa, ni rechazo en el organismo. En las diferentes muestras que se han realizado, se ha ido mejorando la interconexión de los poros del material y con ello aumentando la difusión de nutrientes, lo que permite una mayor supervivencia de las células que colonizan el *biorubber*. Al igual que se ha demostrado que en ambientes enzimáticos, el *biorubber* con bajo grado de reticulación es un material biodegradable en un tiempo aproximado de 12 semanas.
6. Se ha obtenido un nuevo composite, formado por un poliéster biodegradable y por un cerámica bioactiva. Dicho material posee unas magníficas propiedades estructurales, que le permiten ser inyectado en caliente (45°C) y endurecer a temperatura corporal, consiguiendo ejercer una función estructural en sistemas vertebrales a la vez que aporta soluciones regeneradoras a medida que se va biodegradando en el interior del organismo, liberando tanto factores de crecimiento como fármacos al organismo.
7. Dicho material posee una dureza controlada en función de la cantidad de carga que se le aplique, de las condiciones de reacción con las que se sintetiza y de los monómeros utilizados, pudiendo adaptar dicho material a la densidad ósea del paciente.

8. El composite ha demostrado ser biodegradable, tras ser implantado en defectos calvarios de rata, sin muestras severas de inflamación e intolerancia por parte de los animales implantados. El composite ha sido eliminado del organismo y biodegradado en al menos 12 semanas, posiblemente gracias a la biodegradación enzimática del organismo.
9. El composite ha demostrado unas buenas propiedades para trabajar como adhesivo interno, consiguiendo unas propiedades similares a las de los adhesivos actuales, con la ventaja de ser biodegradable y bioactivo en función de la carga que se le aplique en el interior del mismo. El composite ha presentado mejores capacidades adhesivas cuando el porcentaje de carga del material es elevado, pudiendo regular por tanto la capacidad adhesiva del material en función de las necesidades que se requieran para cada tejido.
10. Se ha conseguido una superficie capaz de modificar genéticamente células, mediante partículas lentivirales y otras partículas sintéticas como son el péptido RAWA-H8 y lipofectamina, unidas todas ellas covalentemente a la superficie. Dentro de esta misma superficie se ha conseguido realizar modificaciones parciales mediante eGFP demostrando la posibilidad de modificar genéticamente células de forma selectiva y puntual gracias al efecto del Plasma Frío y de la acción de unión covalente que ejerce el Pentafluorofenil Metacrilato.
11. Se ha conseguido obtener células iPS con esta superficie gracias a la infección lentiviral, aumentando en 8 veces el rendimiento del método habitual desarrollado por Shinya Yamanaka.
12. Partiendo de estas células iPS, se ha conseguido obtener otros linajes como son las células cardíacas partiendo de fibroblastos de ratón, con lo que se ha podido demostrar el uso de estas células como regeneradoras de ciertas partes dañadas del cuerpo, pudiendo obtener casi cualquier tipo celular en función del microambiente en el que se encuentren las células.



# **ARTÍCULOS Y PATENTES**



## ARTÍCULOS Y PATENTES

---

- David Horna, C.E.S., Núria Agulló, Salvador Borrós., *Biodegradable elastomers for applications in tissue engineering and regenerative medicine*. *Afinidad*, 2007. **64**(529): p. 404-414.
- Degano, I.R., et al., The effect of self-assembling peptide nanofiber scaffolds on mouse embryonic fibroblast implantation and proliferation. *Biomaterials*, 2009. 30(6): p. 1156-65.
- David Horna , Juan Carlos Ramírez , Anna Cifuentes , Antonio Bernad , Salvador Borrós and Manuel A. González. Efficient cell reprogramming using bioengineered surfaces. In press.
- Borrós Gómez, Salvador (Barcelona, ES), Horna Tomas, David (Barcelona, ES), Thermoplastic paste for repairing living tissues. Patente española concedida, actualmente en proceso PCT, PCT/ES2009/070143, y en fases regionales en Canadá, Japón, Europa y EEUU.
- Manuel Ángel González, Juan Carlos Ramírez, Antonio Bernad Miana, David Horna Tomás, Salvador Borrós Gómez, Anna Cifuentes superficies bioactiva capaz de modificar genéticamente o tejidos biológicos y su uso. P200931268