

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE HIDROGELES A  
PARTIR DE POLIETILENGLICOL DIACRILADO (PEGDA) Y COLÁGENO TIPO I  
Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS**

**VIVIANA RAQUEL GÜIZA ARGÜELLO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2009**

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE HIDROGELES A  
PARTIR DE POLIETILENGLICOL DIACRILADO (PEGDA) Y COLÁGENO TIPO I  
Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS**

**VIVIANA RAQUEL GÜIZA ARGÜELLO**

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero  
Químico**

**Director**

**PhD. MARIAH HAHN  
Texas A&M University**

**Lector**

**PhD. RODRIGO TORRES SÁEZ  
Universidad Industrial de Santander**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2009**

## DEDICATORIA

*Quiero dedicar este trabajo a mi hermanito Juan Pablo, centro, motor y eje de mi hogar, y gracias a quien el Señor nos bendice diariamente como familia.*

*A mis padres Raquel y Germán, por su amor incondicional y su incansable entrega a su labor de maestros en mi caminar por la vida.*

*A mis hermanos Andrés, Daniela y Jairo, mis mejores amigos.*

*A Bibian, Lina, Alba, Silvia y Juliana, mis ángeles de la guarda.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por Su infinita misericordia y bondad para conmigo y mi familia.

A mis padres, hermanos y amigos, por su cariño, apoyo y ayuda incondicionales.

A los ingenieros Dany Jair Muñoz Pinto y Andrea Carolina Jiménez, mis maestros  
y grandes amigos.

A la doctora Mariah Hahn y los demás integrantes de su grupo de investigación en  
ingeniería de tejido: Becky McMahon, Xin Qu, Allen Bulick, Bo Wang y Kyungoh  
Choi, por su compañía y apoyo durante el proceso de elaboración de este  
proyecto.

Al doctor Rodrigo Torres Sáez, por su dirección y colaboración en la realización de  
este trabajo.

A mi querida UIS por abrirme sus puertas y permitirme vivir una de las mejores etapas de  
mi vida.

## TABLA DE CONTENIDO

|  | pág. |
|--|------|
| INTRODUCCIÓN   | 1    |
| 1. FUNDAMENTO TEÓRICO  | 4    |
| 1.1 GENERALIDADES DE LOS HIDROGELES  | 4    |
| 1.1.1 Hidrogeles como agentes de relleno   | 4    |
| 1.1.2 Hidrogeles como vehículos para el transporte de moléculas bioactivas           | 4    |
| 1.1.3 Hidrogeles para el transporte celular  | 5    |
| 1.2 MECANISMO DE POLIMERIZACIÓN  | 5    |
| 1.3 HIDROGELES NATURALES VS HIDROGELES SINTÉTICOS                                    | 7    |
| 1.4 LA MATRIZ EXTRACELULAR (ECM) Y LA IMPORTANCIA DE LAS INTERACCIONES CÉLULA-MATRIZ | 10   |
| 2. METODOLOGÍA   | 13   |
| 2.1 PRUEBAS PRELIMINARES   | 14   |
| 2.1.1 Ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH)                        | 14   |
| 2.1.2 Ensayo PicoGreen para cuantificación de ADN                                    | 15   |
| 2.1.3 Pruebas comparativas de resistencia mecánica, hinchamiento y tamaño de poro    | 17   |
| 2.2 SÍNTESIS DE MATERIALES   | 19   |
| 2.2.1 Preparación y purificación de PEG diacrilado (PEGDA)                           | 19   |
| 2.2.2 Síntesis de colágeno tipo I acrilado y biológicamente activo                   | 21   |
| 2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES  | 22   |
| 2.3.1 Análisis por RMN de protón   | 22   |
| 2.3.2 Pruebas mecánicas, de hinchamiento y de tamaño de poro. Ajuste de propiedades  | 22   |
| 2.4 ENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS TIPO 3T3 Y 10T1/2                                       | 23   |

|   |    |
|---|----|
| 2.4.1 Pruebas preliminares de dispersión celular  | 23 |
| 2.4.2 Cultivo, mantenimiento y encapsulación de celular   | 23 |
| 2.4.3 Caracterización de los materiales en tiempo cero  | 24 |
| 2.4.4 Caracterización de los materiales en el tiempo  | 24 |
| <br>  |    |
| 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS  | 25 |
| 3.1 PRUEBAS PRELIMINARES  | 25 |
| 3.1.1 Ensayo de citotoxicidad LDH   | 25 |
| 3.1.2 Ensay PicoGreen   | 26 |
| 3.1.3 Pruebas comparativas de resistencia mecánica, hinchamiento y tamaño de poro de los hidrogeles a base de PEGDA 3.4K, 8K y 20K en presencia de colágeno | 26 |
| 3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES   | 28 |
| 3.2.1 Análisis estructural de PEGDA por RMN de protón   | 28 |
| 3.2.2 Ajuste de propiedades   | 28 |
| 3.3 ENCAPSULACIÓN CELULAR   | 32 |
| <br>  |    |
| 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES   | 35 |
| <br>  |    |
| BIBLIOGRAFÍA  | 37 |
| ANEXOS  | 46 |

## LISTA DE FIGURAS

|  | pág. |
|--|------|
| Figura 1. Fotopolimerización del PEGDA   | 6    |
| Figura 2. Estructura química del colágeno tipo I-acrilado  | 10   |
| Figura 3. Metodología experimental   | 13   |
| Figura 4. Esquema ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogeanasa (LDH)   | 15   |
| Figura 5. Obtención del polietilenglicol diacrilado (PEGDA)  | 20   |
| Figura 6. Ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogeanasa (LDH) para las encapsulaciones de células 10T1/2 en sucrosa 10% p/v y HBS usando PEGDA 8K 16 %                    | 25   |
| Figura 7. Cuantificación de ADN por ensayo de PicoGreen para células 10T1/2 encapsuladas en hidrogeles a base de PEGDA 8K 16% en sucrosa 10% p/v y HBS                         | 26   |
| Figura 8. Pruebas preliminares comparativas de difusión con dextrano de los hidrogeles a base de PEGDA 3.4K 11%, 8K 16% y 20K 30% con dos niveles de colágeno: 0mg/mL y 1mg/mL | 27   |
| Figura 9. Pruebas comparativas preliminares de módulo de Young para los hidrogeles a base de PEGDA 3.4K 11%, 8K 16% Y 20K 30% con dos niveles de colágeno: 0mg/mL y 1mg/mL     | 27   |
| Figura 10. Pruebas comparativas de difusión con dextrano variando la concentración de polímero para ajustar los tamaños de poro: ensayos 1 y 3                                 | 29   |
| Figura 11. Variación del módulo de Young con la concentración del polímero: ensayos 1, 2 y 3   | 30   |
| Figura 12. Pruebas comparativas de difusión con dextrano variando la concentración de polímero para ajustar los tamaños de poro: ensayos 4 y 5                                 | 30   |
| Figura 13. Variación del módulo de Young con la concentración del polímero: ensayos 4 y 5  | 31   |
| Figura 14. Relación de hinchamiento para las formulaciones escogidas de  |      |

|   |    |
|---|----|
| hidrogeles  | 32 |
| Figura 15. Variación del módulo de Young con el tiempo de cultivo         | 33 |
| Figura 16. Variación del tamaño de poro relativo con el tiempo de cultivo | 33 |

## LISTA DE ANEXOS

|  | pág. |
|--|------|
| Anexo A. Especificaciones del colágeno tipo I  | 46   |
| Anexo B. Preparación de la solución buffer HBS y de acetofenona  | 47   |
| Anexo C. Montaje para la fabricación de hidrogeles entre platôs  | 48   |
| Anexo D. Cálculos para la preparación de polietilenglicol diacrilado (PEGDA)                           | 49   |
| Anexo E. Análisis estructural por RMN de protón  | 51   |
| Anexo F. Información preliminar del laboratorio acerca de los hidrogeles a<br>Base de polietilenglicol | 61   |
| Anexo G. Cultivo y mantenimiento celular   | 64   |
| Anexo H. Cálculos realizados para la encapsulación celular   | 67   |

## RESUMEN

**TÍTULO:** SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE HIDROGELES A PARTIR DE POLIETILENGLICOL DIACRILADO (PEGDA) Y COLÁGENO TIPO I Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS\*

**AUTOR:** Viviana Raquel Güiza Argüello\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Ingeniería de tejido, Hidrogeles, Matriz polimérica, Colágeno, Polietilenglicol diacrilado, Fotopolimerización, Propiedades mecánicas.

**DESCRIPCIÓN:** El principio básico de la ingeniería de tejido es la combinación apropiada de células con un determinado tipo de material bajo ciertas condiciones que puedan llevar a la formación de tejido. La naturaleza del material así como sus propiedades físicas y químicas son de vital importancia a la hora de establecer dichas condiciones. Los materiales poliméricos tienen propiedades similares a las de los tejidos biológicos, y por esta razón, han sido extensamente estudiados en ingeniería de tejido. Además, el uso de polímeros sintéticos permite controlar las propiedades mecánicas y químicas de la matriz, a la vez que minimizan la respuesta inmunológica.

Los hidrogeles representan un tipo importante de biomateriales en biotecnología y medicina gracias a su alta biocompatibilidad, causando respuestas mínimas de inflamación y de daño del tejido. Los hidrogeles son empleados en ingeniería de tejido como agentes de relleno, como medio de transporte celular, y como estructuras tridimensionales que organizan las células y presentan estímulos que dirigen la formación de un tejido deseado.

La predicción y el control de las propiedades mecánicas de los hidrogeles son de gran importancia a la hora de estudiar la aplicabilidad de los mismos. En este trabajo se mostró que dichas propiedades dependen principalmente de la estructura del polímero y su concentración en la solución precursora. A través de variaciones en la composición de la solución precursora del polímero se observó un control fácil de las propiedades mecánicas de estos hidrogeles. Lo anterior y los resultados de los estudios preliminares que indicaron una buena viabilidad celular en la solución de sucrosa 10% (p/v), hacen que los hidrogeles de polietilenglicol diacrilado sean materiales aptos para la encapsulación de células y potenciales herramientas para estudiar la influencia de las propiedades mecánicas de la matriz polimérica en la respuesta y eventual diferenciación celular.

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Phd. Mariah Hahn, Texas A&M University. Lector: Phd. Rodrigo Torres Sáez, Universidad Industrial de Santander.

## ABSTRACT

**TITLE:** SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND PREPARATION OF HYDROGELES FROM POLYETHYLENE GLYCOL DIACRYLATE (PEGDA) AND COLLAGEN TYPE I AND THEIR POTENTIAL APPLICATION IN TISSUE ENGINEERING\*

**AUTHOR:** Viviana Raquel Güiza Argüello\*\*

**KEY WORDS:** Tissue Engineering, Hydrogels, Scaffold, Collagen, Polyethylene glycol diacrylate, Fotopolimerization, Mechanical properties.

**DESCRIPTION:** The basic premise of tissue engineering is to combine the appropriate cells with a material under conditions that lead to tissue formation. The nature of the material and its physical and chemical properties are critical to creating the desired conditions for tissue formation. Polymeric materials have drawn a great deal of interest in the field of tissue engineering due to their general high biocompatibility, and mechanical properties which parallel the properties of soft tissues. In addition, the use of synthetic materials allows a tight control over the mechanical and chemical properties of the scaffold while the immunogenic response is minimized.

Hydrogels represent an important class of biomaterials in biotechnology and medicine because most of them exhibit excellent biocompatibility, causing minimal inflammatory responses and tissue damage. Hydrogels have many different functions in the field of tissue engineering. They are applied as space filling agents, as delivery vehicles for bioactive molecules, and as three-dimensional structures that organize cells and present stimuli to direct the formation of a desired tissue.

The prediction and control of mechanical properties in hydrogels is of great importance in assessing the applicability of hydrogels. In this work, it was shown that the mechanical properties of hydrogels are highly dependent on the polymer structure as well as its concentration in the precursor solution. Through variations in the polymer composition in the precursor solution, it was remarkably facile to control the mechanical properties of hydrogels. Based on this fact along with the results of the preliminary tests, which proved good cell viability in the precursor solution of sucrose 10% w/v, PEGDA-based hydrogels are suitable materials for cell-encapsulation and can be used in further research to study the influence of the mechanical properties of the scaffold on cell response.

---

\* Graduation Project

\*\* Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering Department. Advisor: PhD. Mariah Hahn, Texas A&M University. Text Reader: PhD. Rodrigo Torres Sáez, Universidad Industrial de Santander.

## INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejido es un campo interdisciplinar que involucra biología celular, ciencia de los materiales, ingeniería de reacción e investigación clínica, con el objetivo de crear tejidos y órganos nuevos. Actualmente, muchos de los avances en ingeniería de tejido han sido el resultado de la combinación de estas áreas para la creación de ambientes que promuevan el desarrollo de tejidos nuevos que puedan exhibir propiedades similares a las de los respectivos tejidos naturales. Este enfoque busca fundamentalmente promover un ambiente que permita la integración y diferenciación celular, y con ello, el desarrollo de tejido nuevo.

En este mismo contexto, las células madre y las células progenitoras juegan un papel importante en la comprensión y desarrollo de este tipo de tejidos. No obstante, existen varios problemas fundamentales asociados con estos dos tipos de células que necesitan ser considerados antes de analizar su potencial. Particularmente, mientras se ha demostrado que las células madre y las células progenitoras provenientes de diferentes orígenes se diferencian en una variedad de células, y en algunos casos, formando tejidos funcionales (Levenberg, *et al.*, 2002), aún sigue siendo un reto para los científicos el diferenciar dichas células de una manera controlada, eficiente y reproducible que permita finalmente la creación de determinados tejidos. La ingeniería de tejido podría proveer mecanismos que faciliten el control físico y químico en tres dimensiones del ambiente de las células madre, permitiendo así el desarrollo de nuevos sustitutos para tejidos.

Por otra parte, el principio básico de la ingeniería de tejido es la combinación apropiada de células con un determinado tipo de material bajo ciertas condiciones que puedan llevar a la formación de tejido. La naturaleza del material así como sus propiedades físicas y químicas son de vital importancia a la hora de establecer dichas condiciones. Por ejemplo, las propiedades mecánicas de los metales y cerámicos junto con la bioactividad de algunos de éstos como la hidroxiapatita, ha

permitido su empleo en aplicaciones ortopédicas (Hench, 1998; Ducheyne y Qiu, 1999). Por otro lado, los materiales poliméricos tienen propiedades similares a las de los tejidos biológicos, y por esta razón, han sido extensamente estudiados en ingeniería de tejido.

Tanto los polímeros naturales como sintéticos han sido ampliamente utilizados para aplicaciones en ingeniería de tejido. Materiales naturales como el colágeno y alginatos han sido empleados en la fabricación de matrices (Marijnissen, *et al.*, 2002). Específicamente, el colágeno ha sido exitosamente usado para reconstrucción de piel, y muchos tipos de matrices diseñadas a partir de él ya se encuentran disponibles para uso clínico. Sin embargo, a pesar de los prometedores resultados obtenidos, existen dos factores que han motivado el desarrollo de polímeros sintéticos para aplicaciones en ingeniería de tejido: la dificultad para controlar las propiedades mecánicas y las velocidades de degradación sobre un rango amplio (Lee, Singla y Lee, 2001) y, la constante posibilidad de que dichos materiales naturales provoquen respuestas inmunológicas (Schmidt y Baier, 2000). Adicionalmente, la utilización de polímeros sintéticos permite controlar las propiedades mecánicas y químicas de la matriz, a la vez que minimizan la respuesta inmunológica.

El presente trabajo tiene como objetivo la síntesis, caracterización y preparación de hidrogeles a partir de polietilenglicol diacrilado (PEGDA) y colágeno tipo I con el fin de analizar su potencial aplicación en ingeniería de tejidos. Con este propósito se sintetizaron tres tipos de PEGDA: 3.4K, 8K y 20K, y haciendo uso de las diferentes herramientas disponibles para determinar su porcentaje de acrilación, resistencia mecánica y tamaño de poro, se realizaron ensayos en los cuales se varió la concentración nominal del polímero en búsqueda de 3 formulaciones (una por cada tipo de PEGDA) que tuvieran módulos de Young significativamente diferentes y tamaños de poro similares. Luego de determinar dichas formulaciones, se realizó la encapsulación de las líneas celulares 3T3 y 10T1/2 empleando como estímulo bioquímico dos niveles de colágeno: 0,267mg/mL y

0,053mg/mL. Finalmente, se estudió la variación del módulo de Young y tamaño de poro en cada tipo de hidrogel al cabo de cero, una y tres semanas de cultivo, y con base en estos resultados se estableció la aplicación potencial de dichos materiales en ingeniería de tejidos, como herramienta clave para analizar el impacto de las propiedades mecánicas y estructurales de la matriz polimérica en la diferenciación celular.

## 1. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 1.1 GENERALIDADES DE LOS HIDROGELES

Los hidrogeles son materiales poliméricos entrecruzados e hidrofílicos que representan un tipo importante de biomateriales en biotecnología y medicina gracias a su alta biocompatibilidad, causando respuestas mínimas de inflamación y de daño del tejido (Graham, 1998). Además, pueden absorber grandes cantidades de agua sin la disolución del polímero debido a su estructura hidrofílica pero a la vez entrecruzada, la cual les confiere características físicas similares a las de los tejidos suaves.

Las matrices poliméricas o hidrogeles tienen diferentes funciones en el campo de la ingeniería de tejido: son empleadas como agentes de relleno, como medio de transporte celular, y como estructuras tridimensionales que organizan las células y presentan estímulos que dirigen la formación de un tejido deseado (Drury y Mooney, 2003).

**1.1.1 Hidrogeles como agentes de relleno.** Los agentes de relleno comprenden las matrices poliméricas que se utilizan para rellenar, prevenir adhesión o servir como bioadhesivos. La propiedad fundamental de un hidrogel de relleno es su capacidad de mantener un volumen deseado y una integridad estructural por un periodo de tiempo determinado. Estos materiales se han empleado para tratar enfermedades como incontinencia urinaria (Cummings, Boullier y Parra, 1996; Dmochowski y Appell, 2000; Bent, *et al.*, 2001) así como en cirugía plástica y reconstructiva (Loebbeck, *et al.*, 2001).

**1.1.2 Hidrogeles como vehículos para el transporte de moléculas bioactivas.** Los hidrogeles también pueden ser utilizados para estabilizar y transportar moléculas bioactivas y encapsular células secretoras. Actualmente, la mayoría de las drogas de estructura molecular grande y pequeña son aplicadas a los pacientes sistemáticamente sin el uso de una matriz polimérica. En consecuencia,

se requiere grandes dosis para obtener un efecto local determinado debido a la biotransformación de la droga y su absorción no específica por parte de otros tejidos. Esto no solamente es costoso, sino que puede traer consigo efectos secundarios. Por ejemplo, el transporte en el sistema de grandes cantidades de factores de crecimiento endoteliales vasculares (VEGF), el cual debería promover angiogénesis sólo a nivel local, puede traer consigo la neovascularización no deseada de otros tejidos o el crecimiento de tumores (EPSTEIN, *et al.*, 2001). Además, lo que es necesario o benéfico para un tejido, puede ser tóxico para otro. En este sentido, un hidrogel que permita el transporte local y específico es altamente deseable en muchas situaciones.

La encapsulación celular es un método alternativo para el transporte de drogas a largo plazo que tiene como propósito utilizar las células para secretar una molécula de interés. En la actualidad, muchas de las deficiencias enzimáticas y hormonales son tratadas por administración oral o por inyección de la sustancia que se carece. La encapsulación celular ofrece un método por el cual dicha sustancia puede ser liberada por largos periodos de tiempo.

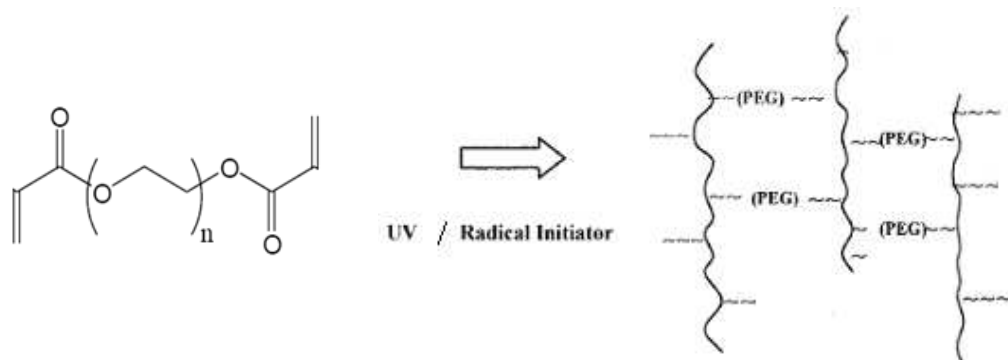
**1.1.3 Hidrogeles para el transporte celular.** Los hidrogeles son materiales empleados para el transporte celular y desarrollo de tejido debido a que poseen redes tridimensionales altamente hidratadas, las cuales proveen a las células un espacio para adherirse, proliferar y diferenciarse. Los hidrogeles también pueden transmitir señales químicas a las células por medio de la incorporación de factores de crecimiento y señales mecánicas mediante la manipulación de las propiedades mecánicas del material (Drury and Mooney, 2003).

## **1.2 MECANISMO DE POLIMERIZACIÓN**

Los hidrogeles son producidos por fotopolimerización en presencia de luz ultravioleta la cual interactúa con los fotoiniciadores (componentes muy sensitivos a la luz) con el fin de generar radicales libres encargados de iniciar la reacción de

polimerización para dar lugar a la formación de hidrogeles entrecruzados. Por ejemplo, en la estructura del polietilenglicol diacrilado (PEGDA), como se observa en la figura 1, el polietilenglicol (PEG) es la columna vertebral del macrómero y el diacril es el grupo en el extremo de la cadena. Cuando un PEG hidrogel es formado por fotopolimerización, la matriz tridimensional se crea con los grupos acrilados los cuales constituyen los puntos de entrecruzamiento.

Figura 1. Fotopolimerización del PEGDA



Algunos de los factores fundamentales a la hora de escoger el fotoiniciador a usar son su biocompatibilidad, solubilidad en agua, estabilidad y citotoxicidad (Fouassier, 1995). Los derivados de la acetofenona que contienen grupos acrílicos han exhibido una sustancial reducción en la cantidad de fotoiniciador sin reaccionar con pérdidas insignificantes en la eficiencia de iniciación (Scranton, Bowman y Peiffer, 1997; Decker, 1987). Asimismo, en varios estudios se han usado derivados de la acetofenona, como la 2,2-dimetoxi-2-fenil acetofenona, como fotoiniciadores para fabricar hidrogeles a partir de polietilenglicol (PEG) (West y Hubbell, 1999; Mann, *et al.*, 2001; Dumanian, *et al.*, 1995).

Los hidrogeles producidos por fotopolimerización son estables y mecánicamente fuertes debido a los entrecruzamientos covalentes que conforman la matriz polimérica. De esta manera, la fotopolimerización es una técnica atractiva debido a que ocurre rápidamente la conversión de la solución polimérica en el gel bajo

condiciones fisiológicas de temperatura con una mínima producción de calor. Además, ésta fotopolimerización puede ser controlada en tiempo y espacio (Nguyen y West, 2002).

A su vez, el uso de hidrogeles fotopolimerizados permite también ajustar las propiedades de los materiales. Por ejemplo, una manera de controlar las propiedades mecánicas es ajustando la densidad de entrecruzamiento del hidrogel. Esto se puede lograr modificando la concentración del macrómero en la solución. La densidad de entrecruzamiento es directamente proporcional al módulo de Young del gel, e inversamente proporcional al hinchamiento del mismo. Estas dos propiedades son fundamentales en ingeniería de tejido porque la primera afecta las propiedades de transporte y la segunda determina la funcionalidad del material e influencia el comportamiento celular (Sheng, *et al*, 2004).

### **1.3 HIDROGELES NATURALES VS HIDROGELES SINTÉTICOS**

Los hidrogeles derivados de polímeros naturales se han empleado en diversas aplicaciones en ingeniería de tejido, gracias a que poseen propiedades macromoleculares similares a las de la matriz extracelular (ECM) natural. Los componentes purificados provenientes de ECMs animales y ECMs libres de células son una de las opciones más lógicas para el diseño de matrices en ingeniería de tejido, ya que éstas retienen aspectos relevantes de la estructura compleja y composición química de la ECM natural. Las ECMs libres de células han sido exitosamente desarrolladas para la producción comercial de productos utilizados en la reparación de tejido suave. Sin embargo, son menos confiables como elementos terapéuticos debido a su alto potencial de inmunogenicidad y la posible transmisión de enfermedades. Por otra parte, componentes purificados de ECM, tales como colágeno y ácido hialurónico (HA), pueden ser combinados y procesados con otros componentes de ECM con el fin de crear materiales estándares y mejor definidos que sean potencialmente menos inmunogénicos y

que posean una estructura similar a la de la ECM nativa (Matthews, *et al.*, 2002). Dichos materiales han sido ampliamente usados como sustratos para la adhesión celular y reparación de tejido con resultados prometedores. Por su parte, fibras derivadas de la seda de oruga y de araña han sido empleadas por muchos años en aplicaciones biomédicas que requieren alta resistencia, particularmente como suturas (Altman, *et al.*, 2003).

A pesar de lo anterior, existen muchos problemas asociados a los polímeros naturales, especialmente lo relacionado con la purificación, respuesta inmunológica y transmisión patógena, que han motivado el desarrollo de biomateriales sintéticos como sustratos celulares.

Una variedad de polímeros sintéticos biodegradables han sido extensamente estudiados y caracterizados para su uso como matrices poliméricas en ingeniería de tejido, incluyendo el ácido poliláctico (PLLA), ácido poliglicólico (PGA), polietilenglicol (PEG), policaprolactonas, poliortoésteres, polianídridos y policarbonatos, (Martina y Hutmacher, 2007). Su facilidad para ser sintetizados químicamente a gran escala, combinada con la aprobación de la *Federal Drug Administration* (FDA) de muchos de estos polímeros, ha motivado la aplicación de polímeros sintéticos en el campo de la ingeniería de tejido. Adicionalmente, la habilidad para copolimerizar, combinar y controlar el peso molecular de dichos materiales, le ha ofrecido a los ingenieros de tejido la flexibilidad de ajustar las propiedades mecánicas y de degradación de un material para una aplicación específica.

En los últimos años, ha aumentado el interés por estudiar los hidrogeles producidos a partir de polietilenglicol (PEG). El PEG posee un amplio rango de propiedades adecuadas para aplicaciones biomédicas, especialmente por su baja toxicidad (Peppas, *et al.*, 2000; Hubbell, 1999; Harris, 1992).

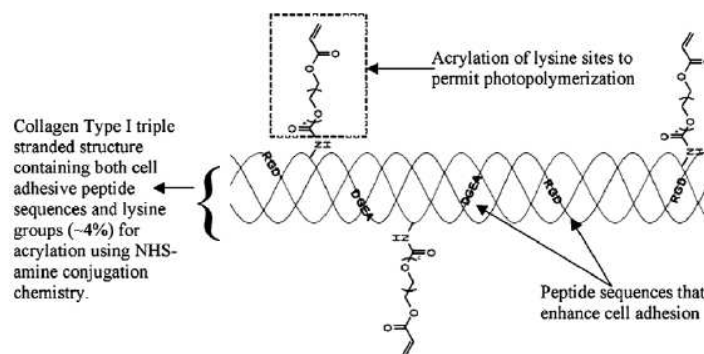
El polietilenglicol es el poliéter más importante a nivel comercial. Los PEGs son preparados por polimerización de óxido de etileno y están disponibles comercialmente en un amplio rango de pesos moleculares que varían desde 300g/mol hasta 10.000.000g/mol. Los números que frecuentemente se incluyen en los nombres de los PEGs indican su peso molecular promedio; por ejemplo, un PEG con un peso molecular promedio de aproximadamente 3.500 daltons es llamado PEG 3.500, o PEG 3.5K. El PEG, cuya estructura es  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_n\text{-H}$ , posee baja toxicidad y es usado en una amplia variedad de productos. Es también la base de muchos laxantes y cremas y empleado en soluciones oftálmicas. Cuando se combina con ciertas medicinas que contienen proteínas, el PEG permite una evacuación lenta de dichas proteínas de la corriente sanguínea. Esto ayuda a reducir la toxicidad y a prolongar el efecto de la droga, permitiendo así intervalos de tiempo más largos entre dosis. Hasta la fecha, los hidrogeles a partir de PEG han sido ampliamente estudiados como sustratos para encapsulación celular (Bryant, *et al.*, 2004; Nuttelman, Tripodi y Anseth; 2005). Este tipo de hidrogeles es considerado como un análogo sintético de la matriz extracelular (ECM), muy apropiado para aplicaciones en ingeniería de tejido, debido en gran parte a su biocompatibilidad inherente y al hecho de que provee una base estructural a la cual se le puede conferir las funcionalidades claves de una matriz extracelular nativa (Peyton, *et al.*, 2006).

Por otra parte, es importante mencionar que a pesar de su baja toxicidad y mínima respuesta inmunológica, los hidrogeles sintéticos no promueven la adhesión y función celular, ya que la mayoría de las células no tienen receptores para los polímeros formadores del hidrogel y, por lo tanto, no se pueden adherir. Una manera de solucionar este problema y desarrollar una superficie altamente adhesiva es a través del acoplamiento covalente a la ECM de una proteína o secuencias de péptidos capaces de enlazar los receptores celulares al polímero. El péptido comúnmente usado para estos fines es la secuencia aminoácida argininina-glicina-acido aspártico (o RGD), el cual es derivado de numerosas

proteínas presentes en la ECM, tales como; fibronectina, laminina, vitronectina, y colágeno (West y Hubbell, 1997).

El colágeno es un material que tiene gran aplicación en la parte biomédica por ser la proteína más abundante en los tejidos de los mamíferos. Sin embargo, para que pueda ser adherido a la matriz polimérica, el colágeno necesita una modificación estructural que le permita al mismo tiempo conservar sus propiedades bioactivas. Esto puede lograrse gracias a que en su estructura de tres cadenas posee grupos de lisina, los cuales facilitan la química de bioconjugación usando química NHS:NH<sub>2</sub> (Sebra, *et al.*, 2007). De esta manera, la adición de grupos acrilados le confiere al colágeno la capacidad de ser fotopolimerizado con la solución polimérica de PEG precursora. La figura 2 representa esquemáticamente la estructura del colágeno tipo I acrilado

Figura 2. Estructura química del colágeno tipo I-acrilado



Fuente: Sebra, *et al.*, 2007

#### 1.4 LA MATRIZ EXTRACELULAR (ECM) Y LA IMPORTANCIA DE LAS INTERACCIONES CÉLULA-MATRIZ

Las células dentro del cuerpo del ser humano responden a diferentes estímulos presentes en la matriz extracelular (ECM), un importante componente regulador y estructural de los tejidos, el cual está conformado por proteínas fibrosas, proteoglucanos y glicoproteínas. En consecuencia, uno de los principales temas

de investigación en ingeniería de tejido ha sido el desarrollo y creación de matrices extracelulares sintéticas que presenten características análogas a las naturales. El microambiente extracelular tiene profundos efectos en diferentes funciones celulares, incluyendo diferenciación, apoptosis y proliferación. A pesar de que muchos estudios han demostrado que la liberación local de factores solubles afecta la función celular, la composición de la matriz extracelular (ECM) igualmente ayuda a direccionar el comportamiento celular (Assoian y Klein, 2008). Probablemente, la idea más reciente respecto a la influencia de la ECM sobre las células, radica en que la rigidez de la ECM provee información a las células. Varios estudios han discutido los efectos que la rigidez de la ECM tiene en la diferenciación celular (Discher, Janmey y Wang, 2005; Georges y Janmey, 2005). Existe evidencia que sugiere que el crecimiento y la diferenciación celular, y en últimas, la formación de tejido dependen del estímulo mecánico conferido a las células (Kim, *et al.*, 1999; Buttler, Goldstein y Guilak, 2000). Dichos estudios han revelado que las propiedades mecánicas de la ECM alteran la forma celular y bioquímica intracelular así como la expresión genética debido a la capacidad de la ECM de resistir fuerzas de tracción celulares, y por ende, su capacidad de dirigir el comportamiento celular cuando las células se encuentran bajo la influencia de estímulos solubles adicionales (Chen, *et al.*, 1997).

Se han investigado diferentes fuentes sintéticas para la elaboración de matrices en un esfuerzo por crear nuevos materiales y técnicas de fabricación viables a la vez que se ajustan propiedades como fuerza mecánica, interconectividad y porosidad (Mikos, *et al.*, 1993; Lutolf y Hubbell, 2005; Khademhosseini, *et al.*, 2005). Otras investigaciones se han enfocado en definir el tipo de células más apropiado para cada aplicación en estudio. La combinación ideal entre tipo de matriz y células varía de acuerdo con el tipo de tejido que se desee desarrollar. Es precisamente ahí donde radica la importancia de investigar las interacciones entre células y matrices. Dicha interacción influye tanto en la funcionalidad celular como en las propiedades globales de la matriz (Dado y Levenberg, 2009).

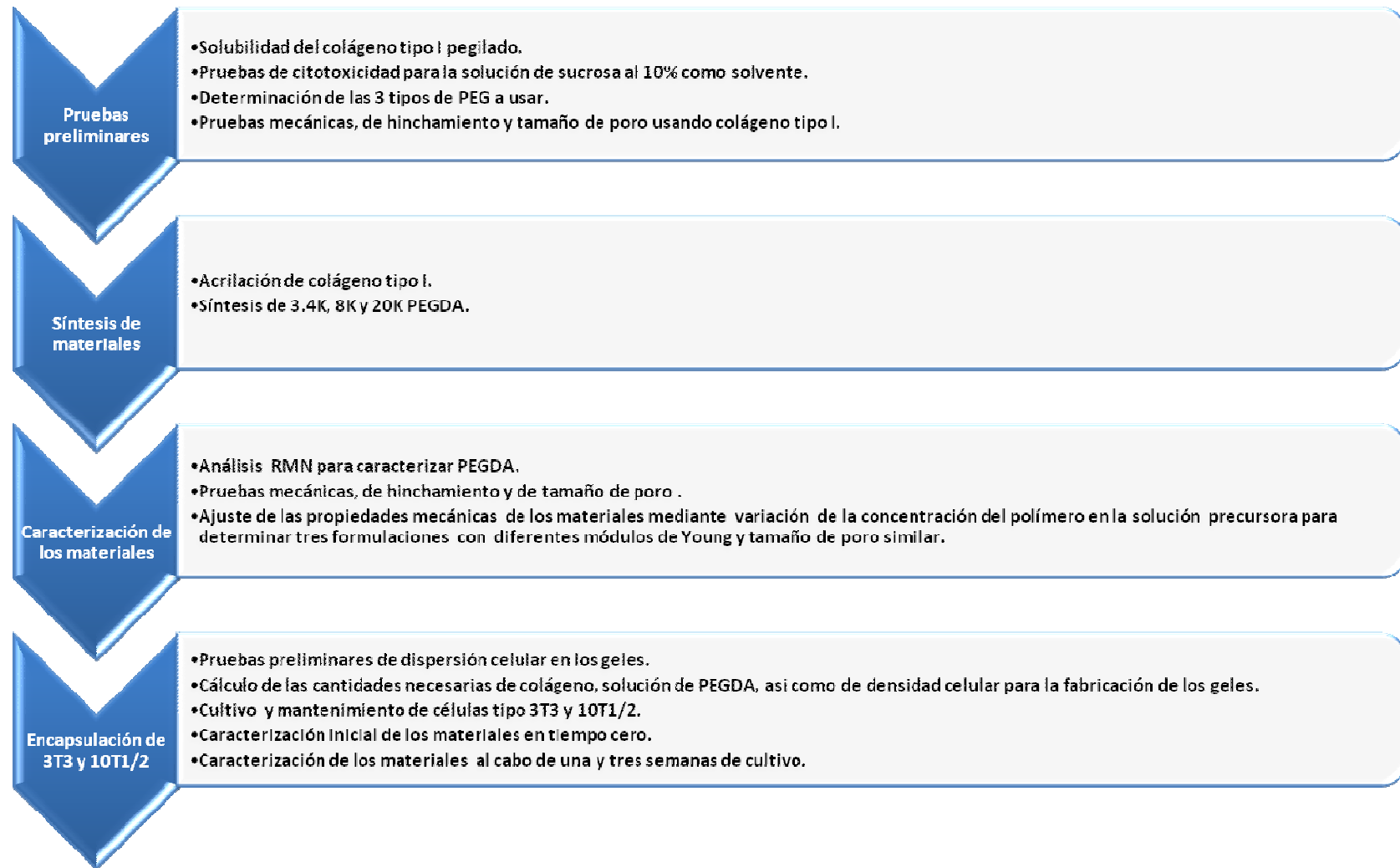
La interacción entre las células y su ambiente es influenciada ampliamente por la arquitectura de la matriz, y por sus propiedades mecánicas y bioquímicas. Las matrices poliméricas proveen el soporte requerido para la adhesión celular y posterior crecimiento dentro de un ambiente tridimensional, conllevando eventualmente a la formación de tejido. La influencia mecánica de la matriz es derivada de propiedades que incluyen su material, tamaño de poro, velocidad de degradación y estructura. Evidentemente, matrices poliméricas con diferentes propiedades influirán de manera diferente el comportamiento celular y la calidad y naturaleza del producto final.

Además de las propiedades químicas de un material, los ingenieros de tejido han reconocido que aspectos estructurales pueden influenciar profundamente las funciones celulares, comportamiento y la eventual formación de tejido (Nelson, 2005; Ingber, 2005; Downing, *et al.*, 2005). Por lo tanto, las propiedades mecánicas de un material y los métodos para modular la distribución de estímulos mecánicos transferidos por el material a las células han sido de crucial interés en ingeniería de tejido debido a que han demostrado afectar fuertemente el fenotipo, función y patrón de organización celular (Ingber, 2002; Engler, *et al.*, 2006; Niklason, *et al.*, 1999).

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La figura 3 resume la metodología experimental empleada en el presente trabajo.

Figura 3. Metodología experimental



## 2.1 PRUEBAS PRELIMINARES

Uno de los objetivos de esta primera fase del experimento fue analizar la solubilidad del colágeno tipo I en la solución precursora de PEGDA. Existen dos clases de solventes típicos utilizados en la fabricación de hidrogeles en el laboratorio: HBS y PBS. Éstas son dos soluciones buffer con un pH alrededor de 7,4, grado de alcalinidad necesario para el mantenimiento y funcionamiento celular. Sin embargo, debido a las características del colágeno tipo I a usar (colágeno de cola de rata Tipo I, Biosciences), se hizo necesario encontrar una solución precursora de PEGDA con un pH inferior a 7, ya que según las especificaciones del producto (ver Anexo A), el colágeno era insoluble a un pH neutro.

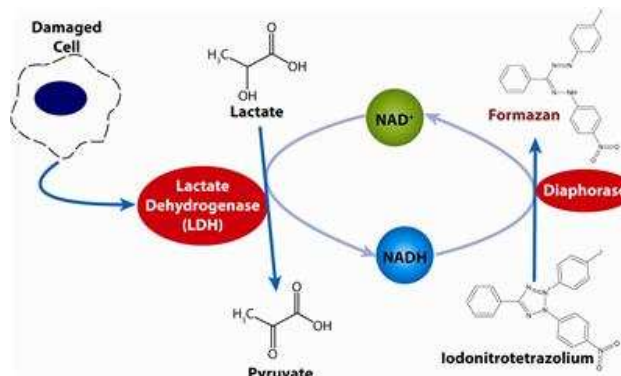
Con base en estudios anteriores (Almany y Seliktar, 2005), se decidió examinar como solvente para la solución precursora de PEGDA una solución al 10% p/v de sucrosa en agua doblemente deionizada. Como la solución de colágeno debía ser eventualmente esterilizada mediante filtración (MILLEX , 0,22µm, Millipore Express, PES Membrane), se realizaron pruebas de solubilidad para encontrar la concentración máxima a la cual la solución de colágeno era filtrable. Se encontró que la solubilidad máxima del colágeno en una solución al 10% p/v de sucrosa era de 4mg/mL, pero sólo fue posible filtrar a una concentración máxima de 3mg/mL.

Por otra parte, se llevaron a cabo pruebas que permitieron evaluar la viabilidad celular en la solución de sucrosa al 10% p/v. Los métodos empleados para dicho fin fueron el ensayo de citotoxicidad LDH (Roche) y el ensayo PicoGreen (Molecular Probes) para cuantificación de ADN.

**2.1.1 Ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH).** La muerte celular puede ocurrir ya sea por apoptosis o por necrosis. Lactato deishidrogenasa (LDH) es una enzima citosólica soluble que es liberada en el medio de cultivo una vez que ocurre una pérdida de integridad de la membrana debido a apoptosis o a

necrosis. Por consiguiente, la actividad de la LDH sirve como un método general para evaluar la citotoxicidad asociada a componentes químicos o factores ambientales tóxicos. El kit de citotoxicidad de LDH permite evaluar la actividad de la LDH presente en el medio de cultivo usando una reacción enzimática acoplada en dos pasos sobre un periodo definido de tiempo. En el primer paso, el LDH cataliza la reducción de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  y  $\text{H}^+$  por oxidación del lactato a piruvato. En el segundo paso, la diaforasa, un co-factor enzimático, usa el  $\text{NADH}$  y  $\text{H}^+$  recién formados para catalizar la reducción de la sal de tretrazolium (INT) en formazan, una sustancia altamente coloreada que absorbe fuertemente a una longitud de onda de 490/520 nm (ver figura 4).

Figura 4. Esquema ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH)



Fuente: Biosciences, 2008

**2.1.2 Ensayo PicoGreen para cuantificación de ADN.** El reactivo PicoGreen es un tinte fluorescente de ácidos nucleicos ultrasensitivo que permite cuantificar la concentración de ADN de doble cadena, la cual es una medida del número de células vivas presentes en una muestra. El PicoGreen se liga al ADN de doble cadena permitiendo ser detectado por fluorescencia a aproximadamente a excitación/emisión ~480nm/520nm.

Los dos ensayos de viabilidad celular en sucrosa al 10% p/v fueron realizados por

duplicado. El procedimiento fue el siguiente: se encapsularon células tipo 10T1/2 a una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células/mL en dos tipos diferentes de hidrogeles; el primero, usando como solvente HBS y, el segundo, utilizando sucrosa al 10% p/v en agua doblemente deionizada. Ambos geles fueron fabricados entre platos (ver Anexo C) usando PEGDA 8K al 16% w/v, acetofenona (ACROS, 99%) / NVP (ALDRICH, 99%) (300mg/mL ) al 1% v/v y luz ultravioleta (UV) por 4min (Spectroline, UV Transilluminator). Una vez producidos, los geles fueron incubados en cajas petri con PBS por 15 minutos con el fin de lavarlos y permitir la difusión del exceso de acetofenona (fotoiniciador). A continuación, cuatro muestras (A, B, C y D) de cada gel fueron tomadas usando un perforador metálico de 1,42mm de diámetro y posteriormente incubadas por una hora en platos de 12 pozos (Falcon) con medio DMEM (Cellgro) para reducir el estrés celular y minimizar la concentración de sustancias tóxicas en los geles. Luego, el medio fue sustituido con 500µL de medio fresco en cada pozo y las muestras fueron incubadas por 24 horas.

Al cabo de las 24 horas, el medio fue removido de cada muestra y transferido a microtubos estériles de 1,5mL para análisis de LDH. Por otra parte, los geles fueron pesados para realizar el ensayo de cuantificación de ADN.

En el análisis de LDH se utilizaron platos de 96 pozos (Fisher), y se tomaron 50µL de medio de cada muestra por duplicado. En seguida se añadieron 100µL de la solución de trabajo en cada pozo y se comenzaron a contabilizar 20 minutos. El plato fue entonces centrifugado por 2 minutos a 1.000rpm para eliminar burbujas, las cuales ocasionan ruido durante las lecturas. Luego el plato se leyó por 10min (Synergy HT multi-detection microplate reader, Fisher Scientific) a 490/520nm absorbancia. Una vez pasados los 20 minutos, se agregaron 50µL de la solución inhibidora en cada pozo y se leyó el plato en el punto final de la reacción (490/520nm absorbancia).

El ensayo de cuantificación de ADN PicoGreen se llevó a cabo así: se utilizaron las soluciones precursoras empleadas en las encapsulaciones celulares, y se prepararon los geles para los estándares en microtubos de 1,5mL (Corning). Dichos geles no contenían células; en lugar de eso, presentaban una sustancia que simulaba la presencia de ADN (DNA de timo de cordero, FLUKA), la cual es reconocida por el PicoGreen (Molecular Probes). Después de ser fotopolimerizados, se adicionó agua para que se hincharan igual que las muestras y se congelaron junto con ellas a -80°C antes de la digestión.

Durante la digestión de las muestras y estándares, se adicionó en cada microtubo NaOH 0,12N en una proporción 5:1 respecto al peso de gel. Posteriormente, se llevó el conjunto a un baño de agua a 37°C por 72 horas, tiempo después del cual fueron centrifugados a 10.000rpm durante 10min. A continuación, se tomaron por duplicado 20µL de cada una de las muestras y estándares y se agregaron a microtubos de 1,5mL. Los tubos individuales fueron neutralizados con 2µL de HCL 1N. Se adicionaron entonces 80µL de solución de buffer TE y luego 100 µL del reactivo de trabajo PicoGreen asegurando un mezclado completo. Finalmente, las muestras y estándares fueron incubadas por 5 minutos protegidos de la luz y luego transferidos a un plato de 96 pozos (blanco Costar) en volúmenes de 150µL para medir fluorescencia (excitación/emisión ~480 nm/520 nm). Con las lecturas obtenidas, se graficó una curva estándar en donde se ubicaron las muestras, resultados que se tradujeron a número de células, usando el factor de conversión porcino de 6,6 pico gramos de ADN por célula (Greogy, 2000).

**2.1.3 Pruebas comparativas de resistencia mecánica, hinchamiento y tamaño de poro.** Teniendo en cuenta que uno de los objetivos del proyecto era obtener tres tipos de PEGDA con módulos de Young significativamente diferentes, con base en datos previos obtenidos en el laboratorio (ver Anexo F) se decidió trabajar con PEGDA 3.4K, 8K y 20K (tomados de las reservas del laboratorio) a unas concentraciones iniciales de 11%, 16% y 30% p/v, respectivamente.

Partiendo de estas formulaciones, se quiso observar en primera instancia la influencia del colágeno en cada uno de los PEGDA por separado, en lo referente a resistencia mecánica, porcentaje de hinchamiento y tamaño de poro. Para tal fin, se prepararon en total 6 soluciones precursoras de PEGDA (dos para cada tipo) en 10% p/v sucrosa: el primer set de 3 soluciones sin colágeno, y el segundo set con una concentración inicial de colágeno tipo I de 1mg/mL. Los geles para pruebas mecánicas y de tamaño de poro fueron fabricados entre platos usando como fotoiniciador acetofenona (ACROS, 99%) / NVP (ALDRICH, 99%) (300mg/mL ) al 1% v/v y luz ultravioleta por 4min (Spectroline, UV Transilluminator). Luego, los geles fueron transferidos a cajas petri con PBS. Después de 1 hora se tomaron muestras utilizando un perforador de 8mm (Miltex). Las muestras destinadas para pruebas mecánicas fueron sometidas a compresión cíclica entre 5µm y 50µm de desplazamiento (INSTRON, 3342) durante un número total de 10 ciclos, siendo el último ciclo el empleado para calcular el módulo de Young del material por regresión lineal.

De otro lado, las muestras tomadas para análisis comparativos de tamaño de poro se sometieron al ensayo de difusión con dextrano. Las muestras fueron dejadas por una noche en HBS + azida de sodio 0,05% p/v (ver Anexo B). Al día siguiente, las muestras fueron pesadas removiendo el exceso de humedad con un paño para laboratorio (Kimwipe) y transferidas a un plato de 48 pozos con 500µL de solución de concentración 50µg/mL de dextrano 70s (PM: 70gr/mol) en HBS + azida de sodio 0,05% p/v, y fueron incubadas por 24 horas a temperatura ambiente protegidas de la luz. Posteriormente, se retiró el exceso de humedad en las muestras las cuales fueron transferidas a un nuevo plato de 48 pozos con 500µL de HBS + azida de sodio 0.05% p/v protegidas de la luz. El plato se incubó por 24 horas más a temperatura ambiente para permitir que todo el dextrano presente se difundiera fuera de los geles. Finalmente, en el último día del ensayo, se prepararon los estándares de dextrano por dilución en serie utilizando la misma solución precursora usada para los geles. En un plato de 96 pozos (blanco Costar)

se tomaron 200µL por duplicados de las soluciones estándar y de las soluciones en las cuales se encontraban los geles y se hicieron las lecturas de fluorescencia (excitación/emisión 480nm/520nm) (Synergy HT multi-detection microplate reader, Fisher Scientific).

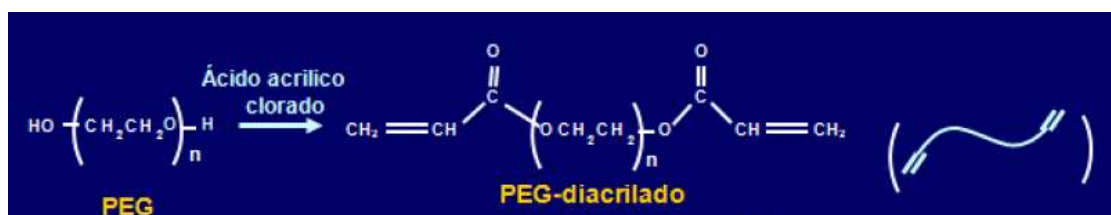
Por su parte, los geles para la prueba de porcentaje de hinchamiento se fabricaron usando platos de 48 pozos (Falcon) mediante la adición de 200µL de la solución polimérica precursora respectiva por triplicado, volumen que fue fotopolimerizado bajo las mismas condiciones de los geles fabricados entre platos. Los geles fueron inmediatamente pesados y posteriormente incubados en PBS a 37°C por 24 horas, tiempo después del cual fueron nuevamente pesados. El porcentaje de hinchamiento fue calculado por diferencia de pesos.

## **2.2 SÍNTESIS DE MATERIALES**

**2.2.1 Preparación y purificación de PEG diacrilado (PEGDA).** La síntesis del PEGDA es un proceso que dura cuatro días, el cual empieza con el secado del PEG en un horno de vacío. Tres diferentes formulaciones fueron escogidas para este estudio: 3.4K, 8K, y 20K PEG (FLUKA). En el primer día, 20g de cada formulación fueron tomados y puestos en el horno de vacío (Isotemp Vacuum Oven, Fisher Scientific) toda la noche para eliminar la humedad. Asimismo, todo el material de vidrio fue secado en el horno a 120°C por una noche. En el segundo día se llevó a cabo la reacción de acrilación. Por cada lote de PEG, un balón con llave de paso de vidrio fue evacuado y luego neutralizado con argón tres veces para eliminar el oxígeno presente. Después el PEG fue agregado en presencia de argón. El proceso de evacuación y neutralización se repitió tres veces. A continuación, se añadió diclorometano anhidro (DCM) (SIGMA, 99,5%). Una vez que se añadieron 20mL de DCM, se comenzó a agitar la mezcla. A continuación, el balón fue evacuado y neutralizado tres veces más para remover posibles trazas de oxígeno. Luego se adicionó la trietilamina (TEA) (SIGMA, 99,5%). Una vez

más, el sistema fue evacuado y neutralizado y se dejó la mezcla en agitación por 5 minutos. Por último, se agregó ácido acrílico clorado muy lentamente después de lo cual el balón fue evacuado y neutralizado de nuevo. El sistema de reacción se dejó durante toda la noche a 4°C. La figura 5 esquematiza la reacción de acrilación.

Figura 5. Obtención de polietilenglicol diacrilado (PEGDA)



Fuente: Gelves y Ortiz, 2007

Durante el tercer día se realizó la separación del PEGDA con el fin de separar el exceso de TEA en una fase orgánica y filtrar el PEGDA. La mezcla de reacción en el balón se transfirió a un embudo de decantación donde fue añadido  $\text{K}_2\text{CO}_3$  2M en una cantidad equivalente al doble de las moles de ácido acrílico clorado (SIGMA, 99%) empleadas en el segundo día. El embudo de decantación fue tapado y agitado vigorosamente por 5, 10, 15, 20...60 segundos, asegurando el venteo del embudo entre cada agitación para liberar el  $\text{CO}_2$  formado. Este proceso se repitió hasta que la mezcla adquirió la consistencia de una emulsión color leche. Finalmente, la emulsión fue dejada toda la noche para permitir la separación de fases por gravedad.

En el último día del proceso, la fase orgánica más liviana en el embudo fue decantada en un vaso de precipitados de 1.000mL y agitada. Entretanto, y para remover el agua de la solución, se añadió  $\text{MgSO}_4$  anhidro (ACROS, 97%) hasta que la mezcla adquirió una consistencia homogénea de color leche. Posteriormente, la solución fue filtrada al vacío para remover el  $\text{MgSO}_4$ . De la solución resultante se precipitó el PEGDA usando éter dietílico anhidro (Fisher,

95%). La mezcla fue agitada por 10 minutos para asegurar el desplazamiento del exceso de TEA presente en la fase orgánica. Se empleó filtración al vacío para separar el PEGDA precipitado, el cual se secó al aire libre toda la noche. Una vez seco, el PEGDA fue molido con un mortero hasta obtener un fino polvo del cual se tomaron muestras para análisis de Resonancia Nuclear Magnética (RMN) y posteriormente fue almacenado a -20°C. (Ver Anexo D)

Una vez los resultados de RMN confirmaron la estructura del producto deseado, los PEGDA fueron sometidos a un proceso de purificación donde se dializaron usando agua doblemente deionizada (2L) por 24 horas para remover impurezas, empleando tres tipos de membranas: 1.000, 7.000 y 10.000 (Pierce) para el PEGDA 3.4K, 8K y 20K, respectivamente. Después de esto, el PEGDA dializado fue almacenado a -20°C y, finalmente, liofilizado.

**2.2.2. Síntesis de colágeno tipo I acrilado y biológicamente activo.** El colágeno tipo I (Biosciences, colágeno de cola de rata tipo I) fue acrilado de la siguiente manera: el colágeno se mezcló poco a poco en una relación 1:1 con una solución 50mM de bicarbonato de sodio, controlando que el pH de la mezcla se mantuviera entre 7,4 - 8, y así poder acoplar los grupos lisina con polietilenglicol N-hidroxisuccinamida monoacrilado (ACRL-PEG-NHS, PEG espaciador de MW 3400), el cual fue agregado en una relación molar de 0,5 (ACRL-PEG-NHS:NH<sub>2</sub>). El sistema se dejó reaccionar por tres horas a temperatura ambiente con agitación constante. Después de esto, el colágeno ya acrilado se dializó con una solución 0,1N de HCl y luego en agua doblemente deionizada por 24 horas cada vez (Slide-A-Lyzer, MWCO de 10,000, Pierce) para remover el exceso de ACRL-PEG-NHS y otros posibles subproductos de la reacción. Finalmente, la solución de colágeno se almacenó a -20°C y se liofilizó con el fin de obtener un producto fibroso sólido.

## 2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

**2.3.1. Análisis por RMN de protón.** El RMN (Resonancia Magnética Nuclear) es un método de medida que permite obtener información estructural de un material de una manera no invasiva, ya que es rápido y no produce cambios en las propiedades del material (Dobmann, *et al.*, 2002). El principio del RMN está basado en el hecho de que los núcleos (por ejemplo, H, F, Na, Cl, P) son resonantes a una frecuencia específica en un campo magnético determinado. La frecuencia a la cual ocurre la resonancia depende de la fuerza del campo magnético aplicado. Si la fuerza del campo varía en espacio, es posible recolectar información acerca de los núcleos en diferentes posiciones. En general, la intensidad de la señal es proporcional a la densidad de spin, y el decaimiento de la señal depende de la interacción de los spins con sus alrededores. Es así como se pueden obtener imágenes o perfiles a través de la manipulación de un campo magnético principal usando gradientes (Joannes, 2006).

Para llevar a cabo los análisis de RMN de protón, se disolvieron 30mg de muestra en 1 mL de óxido de deuterio (agua pesada) en tubos para RMN y, posteriormente, dichas muestras fueron analizadas en un espectrómetro de RMN de 300MHz. El porcentaje de acrilación de cada lote de PEGDA se calculó teniendo en cuenta las diferentes frecuencias a las cuales los hidrógenos de los grupos acrilados y los de la cadena principal (PEG) son resonantes (ver Anexo E).

**2.3.2. Pruebas mecánicas, de hinchamiento y de tamaño de poro. Ajuste de propiedades.** Se llevaron a cabo las pruebas comparativas de resistencia mecánica y de tamaño de poro, así como las de hinchamiento para comenzar a ajustar dichas propiedades y obtener tres formulaciones diferentes (3.4K, 8K y 20K) con diferente módulo de Young y tamaño de poro similares.

## **2.4 ENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS TIPO 3T3 Y 10T1/2**

El Anexo H muestra en detalle todos los cálculos realizados para llevar a cabo la encapsulación celular por duplicados de células tipo 3T3 y 10T1/2 en términos de requerimientos de solución polimérica precursora, solución de colágeno, densidad celular y materias primas para los montajes.

**2.4.1. Pruebas preliminares de dispersión celular.** Con el fin de asegurar una dispersión homogénea de las células en la solución polimérica a fotopolimerizar, se realizaron pruebas de dispersión en los geles más viscosos (20K 30%) usando células tipo 10T1/2.

**2.4.2. Cultivo, mantenimiento y encapsulación celular.** Las células tipo 3T3 y 10T1/2 se tomaron de células conservadas por crio-preservación con un número de pase 3 y se llevaron a pase 7, el cual determina la edad celular. El cultivo fue mantenido con medio DMEM (Cellgro) con suero fetal bovino al 10% p/v (FBS, SIGMA) y penicilina 5% p/v, medio que satisface las necesidades energéticas celulares y previene la contaminación del cultivo celular. El anexo G muestra el procedimiento para realizar el pase de las células para su cultivo y expansión.

Para la encapsulación celular se removieron las células de los frascos de cultivo (ver Anexo G); posteriormente, para eliminar el exceso de medio se centrifugaron y se mezclaron homogéneamente con las soluciones de PEGDA-colágeno-acetofenona previamente esterilizadas por medio de filtración (MILLEX, 0.22 $\mu$ m, Millipore Express, PES Membrane). Los hidrogeles fueron fabricados en plataformas, siendo éstas luego expuestas a luz UV (Spectroline, UV Transilluminator) por tres minutos en cada lado. De esta forma se fabricaron 24 hidrogeles, 12 por cada línea celular: 4 hidrogeles por cada tipo de formulación (3.4K, 8K y 20K) de los cuales 2 correspondían al nivel de estímulo bioquímico bajo (colágeno bajo), 0,053 mg/mL, y los otros 2 al nivel alto de estímulo

bioquímico (colágeno alto), 0,267 mg/mL. Los hidrogeles se cultivaron bajo condiciones similares a las empleadas para el mantenimiento celular.

**2.4.3. Caracterización de los materiales en tiempo cero.** Partiendo de las soluciones precursoras utilizadas para la encapsulación, se fabricaron los geles en blanco (sin células) para someterlos a pruebas comparativas mecánicas y de tamaño de poro. Para sustituir el volumen del pellet de células se usó un volumen similar de solución de PBS con el fin de tener en cuenta la influencia del volumen de líquido adicional en las propiedades de los materiales.

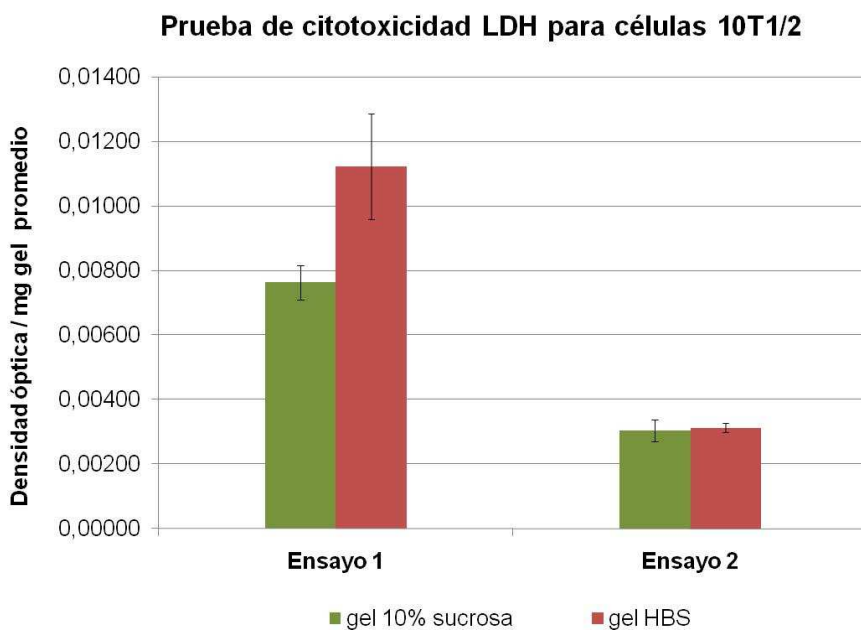
**2.4.4 Caracterización de los materiales en el tiempo.** Al cabo de una y tres semanas de cultivo se tomaron muestras para pruebas de resistencia mecánica y tamaño de poro.

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

#### 3.1 PRUEBAS PRELIMINARES

**3.1.1 Ensayo de citotoxicidad LDH.** En la figura 6 se muestran los resultados del efecto de la sucrosa sobre la viabilidad celular de la línea celular 10T1/2 soportadas en hidrogeles fabricados en soluciones HBS y sucrosa al 10% (p/v), utilizando la prueba de LDH. Los resultados indicaron que la citotoxicidad de la solución de sucrosa (10% p/v) en agua doblemente deionizada no era mayor que la del HBS, solución buffer más comúnmente usada en el laboratorio para la elaboración de hidrogeles. En consecuencia, es factible el uso de sucrosa en la síntesis de hidrogeles como soporte para crecimiento de células e ingeniería de tejido.

Figura 6. Ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH) para las encapsulaciones de células 10T1/2 en sucrosa 10% p/v y HBS usando PEGDA 8K 16%.



**3.1.2 Ensayo PicoGreen.** Por otro lado, las pruebas de ADN confirmaron los resultados obtenidos en el ensayo LDH, ya que en los geles fabricados en sucrosa al 10% p/v se observó una mayor población de células viables, tal como se muestra la figura 7.

**3.1.3 Pruebas comparativas de resistencia mecánica, hinchamiento y tamaño de poro de los hidrogeles a base de PEGDA 3.4K, 8K y 20K en presencia de colágeno.** Las figuras 8 y 9 muestran los resultados de las pruebas preliminares de resistencia mecánica y tamaño de poro de los hidrogeles a base de PEGDA 3.4K, 8K y 20K en presencia de colágeno, los cuales indicaron que la adición de colágeno a una concentración inicial de 1mg/mL no afectaba significativamente dichas propiedades de los materiales, lo que permitió reducir costos durante las pruebas posteriores de ajuste de propiedades ya que en éstas no fue necesario utilizar colágeno.

Figura 7. Cuantificación de ADN por ensayo de PicoGreen para células 10T1/2 encapsuladas en hidrogeles a base de PEGDA 8K 16% en sucrosa 10% p/v y HBS.

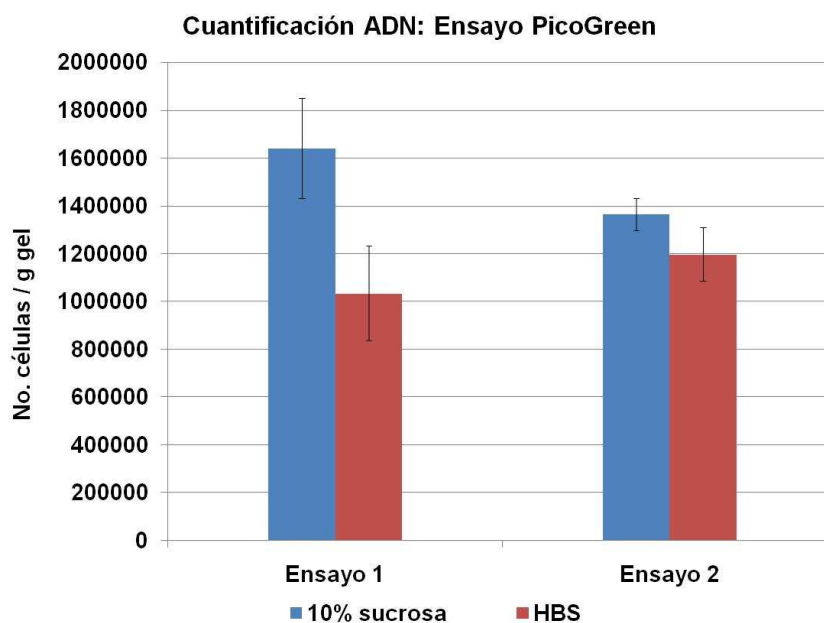


Figura 8. Pruebas preliminares comparativas de difusión con dextrano de los hidrogeles a base de PEGDA 3.4K 11%, 8K 16% y 20K 30%: con dos niveles de colágeno: 0mg/mL y 1mg/mL

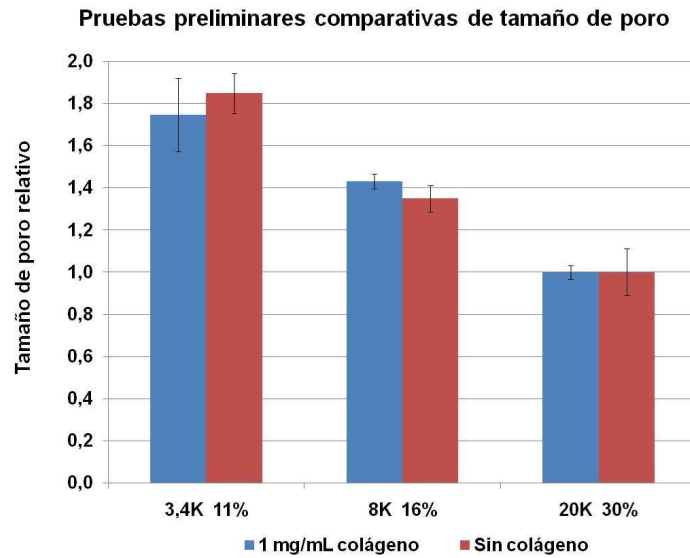
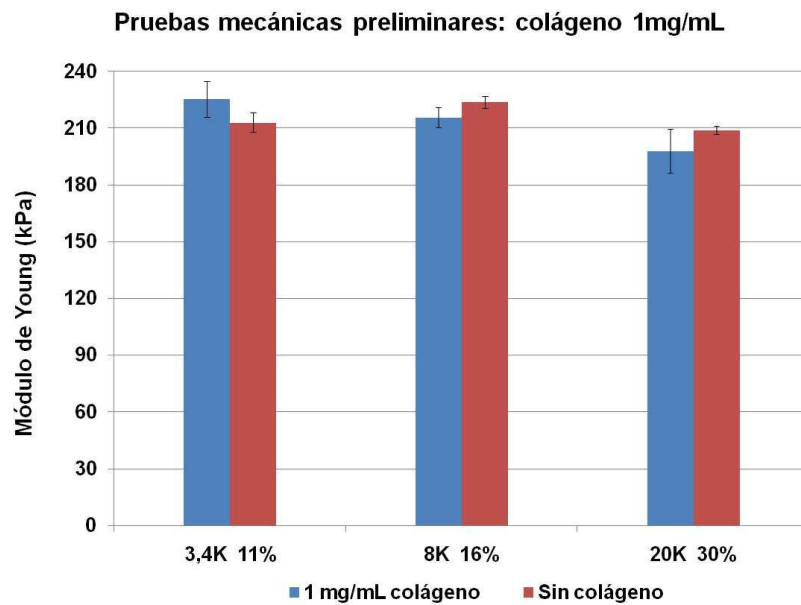


Figura 9. Pruebas comparativas preliminares de módulo de Young para los hidrogeles a base de PEGDA 3.4K 11%, 8K 16% y 20K 30% con dos niveles de colágeno: 0mg/mL y 1mg/mL



## **3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES**

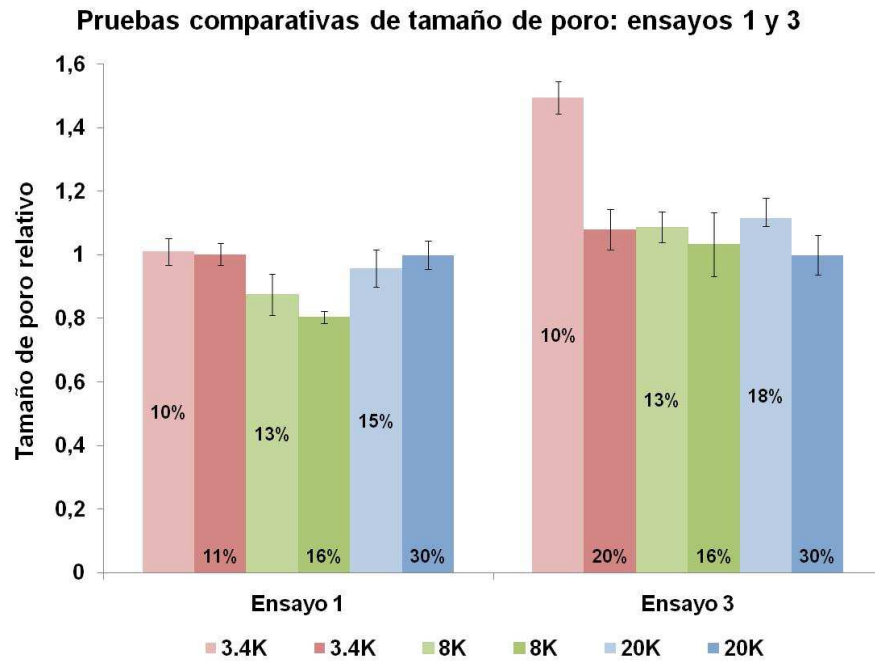
**3.2.1 Análisis estructural de PEGDA por RMN de protón.** A partir de los resultados de las pruebas mecánicas y de poro preliminares de los hidrogeles, se sintetizaron 3 lotes nuevos de PEGDA; 3.4K, 8K y 20K, y se iniciaron las pruebas de ajuste de propiedades para obtener tres formulaciones diferentes (una por cada tipo de PEGDA) que presentaran módulos de Young significativamente diferentes y tamaños de poro similares.

Los análisis de RMN de protón para dichos lotes mostraron que el PEGDA 3.4K tenía un 81% de acrilación, mientras que el de 8K y 20K habían alcanzado 70,3% y 63,6% de acrilación, respectivamente (ver Anexo F). Debido a que la densidad de entrecruzamiento es directamente proporcional al porcentaje de acrilación, para poder afirmar que los tres tipos de hidrogeles tenían similares densidades de entrecruzamiento, se requirió ajustar esta variable reacrilando los lotes de 8K y 20K y, así, obtener porcentajes de acrilación alrededor del 80% para todos los tipos de PEGDA. Una vez que los análisis de RMN de protón indicaron que estos porcentajes eran los deseados, se procedió a purificar y liofilizar los PEGDAs, con el fin de dar inicio a las pruebas de ajuste de propiedades mecánicas y tamaño de poro.

**3.2.2 Ajuste de propiedades.** En las figuras 10 y 11 se pueden observar los resultados de los primeros tres ensayos realizados. Con base en la información previa que se tenía acerca de los hidrogeles 3.4K, 8K y 20K, se notó que los PEGDA presentaban un comportamiento inconsistente y atípico reflejado en la amplia variación en los resultados de un ensayo a otro para una misma formulación lo que sugería que por alguna razón los PEGDA se estaban entrecruzando antes de entrar en contacto con el fotoiniciador y la luz ultravioleta haciéndolos difíciles de filtrar. Más adelante, al comparar otros lotes liofilizados con no liofilizados, se concluyó que el problema posiblemente radicaba en el liofilizador el cual no estaba realizando suficiente vacío, por consiguiente, las

muestras no eran secadas completamente, y dicha humedad sería la causa de esta anomalía.

Figura 10. Pruebas comparativas de difusión con dextrano variando la concentración de polímero para ajustar los tamaños de poro: ensayos 1 y 3.



Teniendo en cuenta lo anterior, se decidió entonces acrilar tres nuevos lotes de PEG de 3.4K, 8K y 20K, omitiendo esta vez la etapa de purificación. Los nuevos porcentajes de acrilación fueron 75%, 88.6%, 76.3% para el 3.4K, 8K y 20K, respectivamente.

Con una mayor consistencia respecto a los ensayos anteriores, se obtuvieron los resultados de los ensayos 4 y 5, mostrados en las figuras 12 y 13.

Figura 11. Variación del módulo de Young con la concentración del polímero: ensayos 1, 2 y 3.

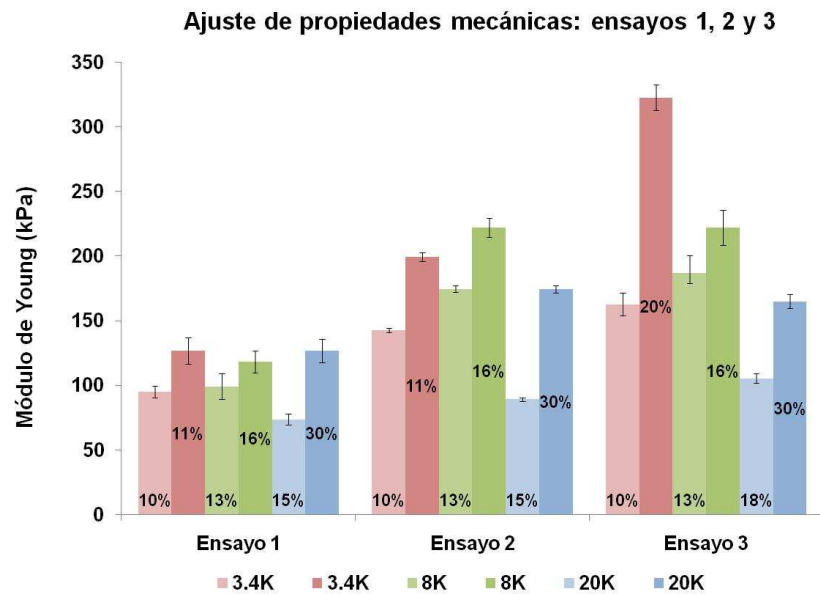
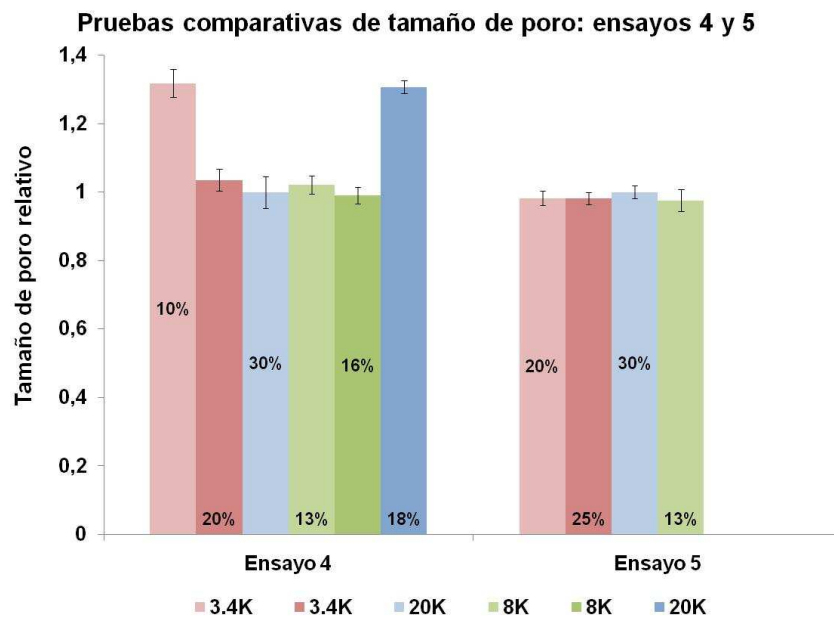
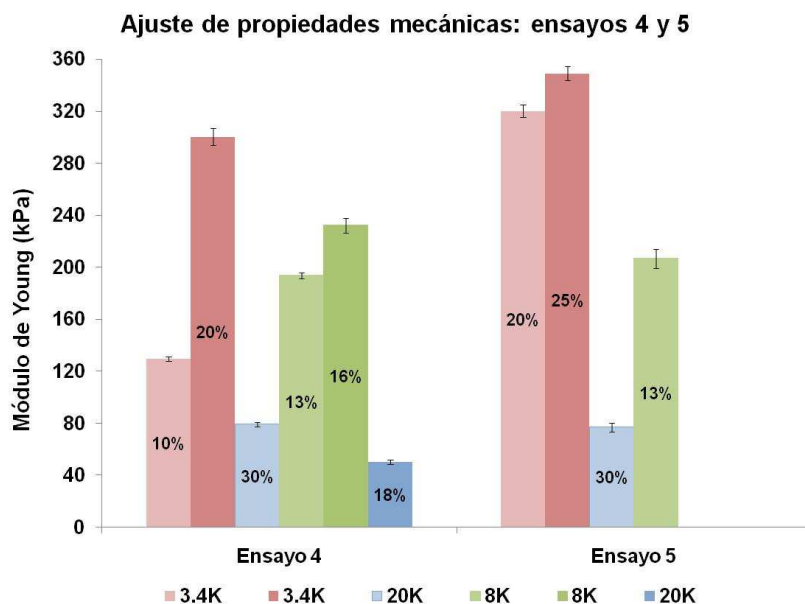


Figura 12. Pruebas comparativas de difusión con dextrano variando la concentración de polímero para ajustar los tamaños de poro: ensayos 4 y 5.



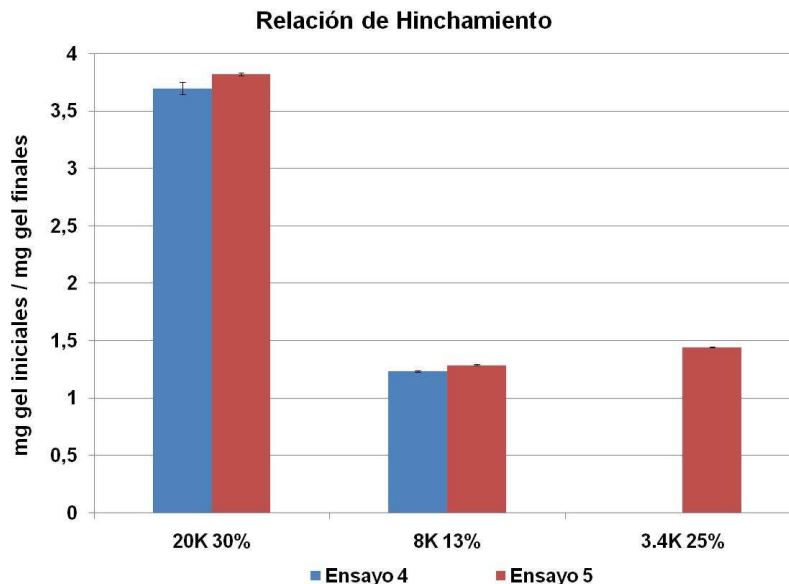
Con base en los resultados anteriores, se descartaron las formulaciones 3.4K 10% y 20K 18% debido a que presentaron un tamaño de poro significativamente diferente con respecto a los de las demás hidrogeles. Después de realizado el ensayo 5, se escogieron las siguientes formulaciones para la posterior encapsulación celular: 3.4K 25%, 8K 13% y 20K 30%.

Figura 13. Variación del módulo de Young con la concentración del polímero: ensayos 4 y 5.



Asimismo, durante estos dos últimos ensayos, se llevaron a cabo pruebas de tasa de hinchamiento para las tres formulaciones escogidas (ver figura 14). De acuerdo con los resultados obtenidos, se calculó un porcentaje de hinchamiento promedio, valor indispensable para ajustar la densidad celular en los geles de la encapsulación, al igual que la concentración de colágeno, la cual debía ser igual en los geles después del hinchamiento.

Figura 14. Relación de hinchamiento para las formulaciones escogidas de hidrogeles



### 3.3 ENCAPSULACIÓN CELULAR

Partiendo de los datos de las pruebas mecánicas y de tamaño de poro realizadas a tiempo cero, una y tres semanas de cultivo, se elaboraron las figuras 15 y 16, las cuales muestran la variación del módulo de Young y el tamaño de poro relativo.

De acuerdo con la figura 15, los geles de 3.4K y 8K presentan un aumento significativo en el módulo de elasticidad al cabo de la primera semana de cultivo, mientras que alrededor de la tercera semana, las diferencias entre estos valores se reducen. Además, existe la tendencia de encontrar módulos de Young más altos para las encapsulaciones de células 3T3, lo cual podría estar relacionado con la bioquímica particular del gel y la manera como los dos tipos de células remodelan la estructura del mismo (Dado y Levenberg, 2009).

Figura 15. Variación del módulo de Young con el tiempo de cultivo

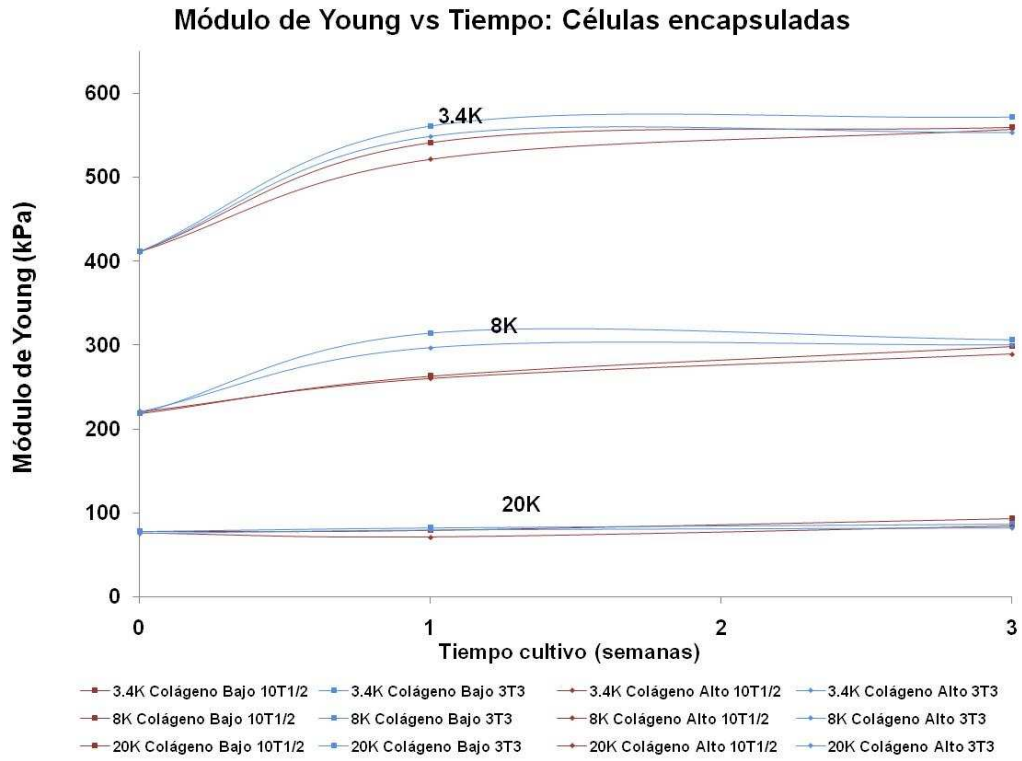
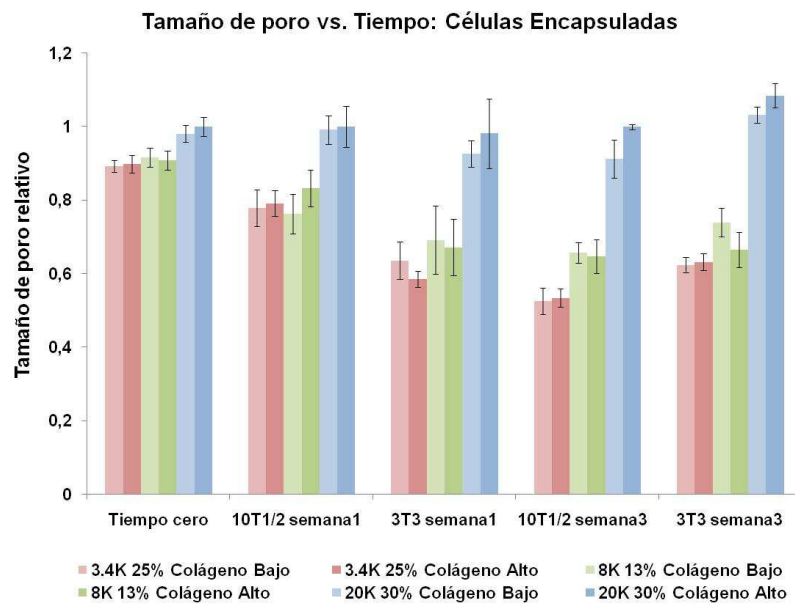


Figura 16. Variación del tamaño de poro relativo con el tiempo de cultivo



Sin embargo, para los geles de 20K se observa que el módulo de Young permanece casi constante durante todo el tiempo de cultivo, lo cual se comprueba en los resultados obtenidos de la prueba de difusión con dextrano (figura 16) que mostró que para estos geles el tamaño de poro se mantuvo aproximadamente constante con el tiempo. Por el contrario, para los geles de 3.4K y 8K hay una evidente disminución en el tamaño de poro del tiempo cero al tiempo una semana, siendo dicha disminución más marcada para los geles que contenían células 3T3. No obstante, en la tercera semana se muestra que las diferencias de tamaño de poro entre las dos encapsulaciones son menores que en la primera semana. Asumiendo que la producción celular de proteínas fuera la responsable de los cambios en las propiedades de los geles de 3.4K y 8K, es posible que para los geles de 20K, factores como su gran capacidad de hinchamiento y densidad de entrecruzamiento, hayan impedido que la producción de sustancias de la matriz extracelular no fuese lo suficientemente alta para causar cambios sustanciales en la estructura del material.

#### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados de las pruebas de LDH y PicoGreen, la solución de sucrosa al 10% es un buen sustituto del HBS para la fabricación de hidrogeles en casos donde por razones de solubilidad no sea posible utilizar soluciones salinas, ya que su citotoxicidad no es superior a la de esta solución buffer.

El tamaño de poro de los hidrogeles no sólo depende de la densidad de entrecruzamiento y de las dimensiones moleculares, sino también del carácter hidrofílico del macrómero. Durante el experimento se observó que para lograr tamaños de poro similares, y contrarrestar los efectos de su alta capacidad de hinchamiento (alrededor de 3,75 veces su volumen inicial), las formulaciones de PEGDA 20K fueron las más concentradas. En conclusión, el efecto hidrofílico del material puede compensar los efectos de concentración y dimensión molecular a la hora de especificar el tamaño de poro de un material.

Las propiedades mecánicas de un hidrogel, las cuales dependen fundamentalmente de la estructura del polímero, son extremadamente importantes con el fin de seleccionar los materiales para una aplicación determinada. Como consecuencia, se requiere emplear métodos directos como el análisis estructural por RMN de protón, e indirectos, como la prueba de difusión con dextrano, para obtener información acerca de la estructura de dichos materiales.

Una vez que las propiedades mecánicas de un material han sido determinadas, se deben ajustar de acuerdo al objetivo del experimento. Lo anterior puede lograrse alterando la composición del polímero empleado, o modificando la densidad de entrecruzamiento. Se observó que durante el ajuste de propiedades, un aumento en el módulo de elasticidad correspondía a un incremento en la concentración del polímero, lo cual a su vez fue inversamente proporcional al tamaño de poro del material.

Teniendo en cuenta la reconocida biocompatibilidad del PEG y sus propiedades similares a las de los tejidos suaves, y con base en los resultados de este experimento, los cuales demostraron la facilidad para ajustar y controlar sus propiedades mecánicas, futuros estudios podrían enfocarse en el estudio de la influencia de dichas propiedades en el comportamiento y diferenciación celular a través de un análisis bioquímico de los geles para obtener más información acerca de las interacciones célula-ambiente extracelular.

Particularmente, para el experimento realizado, se recomienda realizar un análisis bioquímico que permita comprobar la hipótesis de que la producción de componentes de la matriz extracelular fue la responsable del aumento del módulo de elasticidad de los geles de 3.4K y 8K. Además, un análisis de cuantificación de proteínas permitiría determinar si, a pesar de poseer la misma cantidad de proteínas que los geles de 3.4K y 8K, los geles de 20K no presentaron cambios sustanciales en sus propiedades estructurales, debido a su naturaleza altamente hidrofílica y a su densidad de entrecruzamiento específica.

## BIBLIOGRAFÍA

AARONSON, Stuart A. y IBDARO, George J. Development of 3T3-like lines from BALB/c mouse embryo cultures: Transformation susceptibility to SV40. J. En: Journal of Cellular Physiology. 1968. vol. 72, no. 2, p. 141-148.

ALBERTS, Bruce, *et al.* Molecular biology of the cell. 3 ed. New York: Garland, 1994. 1392 p.

ALMANY, Liora y SELIKTAR, Dror. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. En: Biomaterials. Mayo, 2005. vol. 26, no. 15, p. 2467-2477.

ALTMAN, G.H., *et al.* Silk-based biomaterials. En: Biomaterials. Febrero, 2003. vol. 24, no. 3, p. 401-416.

ASSOIAN, Richard K. y KLEIN, Eric A. Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. En: Trends in cell biology. Julio,. 2008. vol. 18, no. 17, p. 347-352.

AUGST, Alexander D.; KONG, H. J. y MOONEY, David J. Alginate hydrogels as biomaterials. En: Macromolecular Bioscience. 2006. vol. 6, no. 8, p. 623-633.

BENT, A.E., *et al.* Collagen implant for treating stress urinary incontinence in women with urethral hypermobility. En: The Journal of urology. 2001. vol. 166, no. 4, p. 1354-1357.

BIOSCIENCES. CytoScan LDH Cytotoxicity Assay. 2008.

BONFOCO, E., *et al.* Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Agosto, 1995. vol. 92, no. 16, p. 7162-7166.

BRYANT, Stephanie J., *et al.* Encapsulating chondrocytes in degrading PEG hydrogels with high modulus: engineering gel structural changes to facilitate cartilaginous tissue production. En: Biotechnology and bioengineering. 2004. vol. 86, no. 7, p. 747-55.

BUTLER, D.L.; GOLDSTEIN, S.A. y GUILAK, F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. En: Journal of Biomechanical Engineering. Diciembre, 2000. vol. 122, no. 6, p. 570-575.

CENDRON, M, *et al.* The biological behavior of autologous collagen injected into the rabbit bladder. En: The Journal of urology. 1995. vol. 154, no.2, p. 808-811.

CHEN, C.S., *et al.* Geometric control of cell life and death. En: Science. 1997. vol. 276, no. 5317, p. 1425-1428.

COWIN, Stephen C. How is a tissue built? En: Journal of biomechanical engineering. 2000. vol. 122, no. 6, p. 553-69.

CUMMINGS, J.M.; BOULLIER, J.A. y PARRA, R.O. Transurethral collagen injections in the therapy of post-radical prostatectomy stress incontinence. En: The Journal of urology. Marzo, 1996. vol. 155, no. 3, p. 1011-1013.

DADO, Dekel y LEVENBERG, Shulamit. Cell–scaffold mechanical interplay within engineered tissue. En: Seminars in Cell & Developmental Biology. 2009.

DECKER, C. UV-curing chemistry: past, present, and future. En: Journal of coatings technology. 1987. vol. 59, no. 751, p. 97-106.

DISCHER, Dennis.E.; JANMEY, Paul y WANG, Yu-Li. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. En: Science. 2005. vol. 310, no. 5751, p. 1139-1143.

DMOCHOWSKI, Roger R. y APPELL, Rodney A. Injectable agents in the treatment of stress urinary incontinence in women: where are we now?. En: Urology. 2000. vol. 56, no. 6A, p. 32-40.

DOBMANN, G. *et al.* The Potential of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) to Non-Destructively Characterize Early-Age Concrete by an One-Sided Access (OSA) Technique. En: NDE. 2002. 10 p.

DOWNING, B.R., *et al.* The influence of microtextured basal lamina analog topography on keratinocyte function and epidermal organization. En: Journal of Biomedical Materials Research. Enero, 2005. vol. 72, no. 1, p. 47–56.

DRURY, Jeanie L. y MOONEY, David J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. En: Biomaterials. 2003. vol. 24, no. 24, p. 4337-4351.

DUCHEYNE P. y QIU Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. En: Biomaterials. 1999. vol. 20, no. 23-24, p. 2287-2303.

DUMANIAN, G.A., *et al.* A new photopolymerizable blood vessel glue that seals human vessel anastomoses without augmenting thrombogenicity. En: Plastic and reconstructive surgery. 1995. vol. 95, no. 5, p. 901-907.

ENGLER, A.J., *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. En: Cell. Agosto, 2006. vol. 126, no. 4, p. 677-689.

EPSTEIN S.E, *et al.* Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. En: Cardiovascular Research. 2001. vol. 49, p. 532–542.

FOUASSIER, Jean-Pierre. Photoinitiation, Photopolymerization, and Photocuring: Fundamentals and Applications. New York: Hanser Gardner Publications, 1995. 388 p.

GELVEZ, Leidy Marcela y ORTIZ, Diana Rocio. Estudio del comportamiento de células encapsuladas en hidrogeles de polietilenglicol en presencia de diferentes polisacáridos, con fines de reconstrucción de tejidos. Trabajo de grado presentado para optar al título de Ingeniero Químico. Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander, 2007. 70 p.

GEORGES, P.C. y JANMEY, P.A. Cell type-specific response to growth on soft materials. En: Journal of Applied Physiology. Abril, 2005. vol. 98, no. 4, p. 1547-1553.

GRAHAM, NB. Hydrogels: Their future, Part I. En: Medical device technology. 1998. vol. 9, no. 1, p. 18-22.

----- . Hydrogels: Their future, Part II. En: Medical device technology. 1998. vol. 9, no. 3, p. 22-25.

GREOGY, T.R. Nucleotypic effects without nuclei: genome size and erythrocyte size in mammals. En: Genome. Octubre, 2000. vol. 43, no. 5, p. 895-901.

HARRIS, Milton J. Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications. New York: Springer, 1992. 408 p.

HENCH, LL. Bioceramics. En: Journal of the American Ceramic Society. 1998. vol. 81, p. 1705-1728.

HUBBELL, J. A. Bioactive biomaterials. En: Current Opinion in Biotechnology. Abril, 1999. vol. 10, no. 2, p. 123-129.

INGBER, D.E. Mechanical control of tissue growth: function follows form. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Agosto, 2005. vol. 102, no. 33, p. 11571-11572.

----- . Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. En: Circulation research. 2002. vol. 91, no. 10, p. 877-887.

JOANNES, Sebastiaan. NMR imaging of curing processes in alkyd coatings. Geboren te Best. Eindhoven: Eindhoven University of Technology, 2006. 127 p.

KHADEMHOSEINI, Ali, *et al.* Microscale technologies for tissue engineering and biology. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005. vol. 103, no. 8, p. 2480-2487.

KIM, Byung-Soo, *et al.* Cyclic mechanical strain regulates the development of engineering smooth muscle tissue. En: Nature Biotechnology. 1999. vol. 17, p. 979-83.

LEE, Chi H; SINGLA, Anuj y LEE, Yugyung. Biomedical applications of collagen. En: International Journal of Pharmaceutics. Junio, 2001. vol. 221, no. 1-2, p. 1-22.

LEVENBERG, Shulamit, *et al.* Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Abril, 2002. vol. 99, no. 7, p. 4391-4396.

LOEBSACK, Anna, *et al.* In vivo characterization of a porous hydrogel material for use as a tissue bulking agent. En: Journal of biomedical materials research. 2001. vol. 57, no. 4, p. 575-581.

LUTOLF, M.P. y HUBBELL, J.A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. En: Nature biotechnology. 2005. vol. 23, no. 1, p. 47-55.

MANN, Brenda K., *et al.* Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering. En: Biomaterials. 2001. vol. 22, no. 22, p. 3045-3051.

MARIJNISSEN, W., *et al.* Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. En: Biomaterials. 2002. vol. 23, p. 1511-1517.

MARTINA, Monique y HUTMACHER, Dietmar W. Biodegradable polymers applied in tissue engineering research: a review. En: Polymer international. 2007. vol. 56, no. 2, p. 145-157.

MATTHEWS, Jamil A., *et al.* Electrospinning of collagen nanofibers. En: Biomacromolecules. Enero, 2002. vol. 3, no. 2, p. 232-238.

MIKOS, A.G., *et al.* Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. En: Biomaterials. 1993. vol.14, no. 5, p. 323-330.

NELSON, C.M., *et al.* Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Agosto, 2005. vol. 102, no. 33, p. 11594-11599.

NGUYEN, Kytai T. y WEST, Jennifer L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. En: Biomaterials. Noviembre, 2002. vol. 23, no. 22, p. 4307-4314.

NIKLASON, L.E., *et al.* Functional arteries grown in vitro. En: Science. Abril, 1999. vol. 284, no. 5413, p. 489-493.

NUTTELMAN, Chares R.; TRIPODI, Margaret C. y ANSETH, Kristi S. Synthetic hydrogel niches that promote hMSC viability. En: Matrix biology. 2005. vol. 24, no. 3, p. 208-18.

PEPPAS, N. A., *et al.* Hydrogels in pharmaceutical formulations. En: European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. 2000. vol. 50, no. 1, p. 27-46.

PEYTON, Shelly R., *et al.* The use of poly(ethylene glycol) hydrogels to investigate the impact of ECM chemistry and mechanics on smooth muscle cells. En: Biomaterials. Octubre, 2006. vol. 27, no. 28, p. 4881-4883.

REZNIKOFF, C. A.; BRANKOW, D. W. y HEIDELBERGER, C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. En: Cancer Research. Diciembre, 1973. vol. 3, no. 12, p. 3231-3238.

ROWLEY, J.A.; MADLAMBAYAN, G. y MOONEY, D.J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. En: Biomaterials. 1999. vol. 20, no. 1, p. 45-53.

SCHMIDT, C.E. y BAIER, J.M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. En: Biomaterials. 2000. vol. 21, p. 2215-2231.

SCRANTON, Alec B.; BOWMAN, Christopher N. y PEIFFER, Robert W. Photopolymerization: Fundamentals and Applications. Estados Unidos: American Chemical Society, 1997. 262 p.

SEBRA, Robert P., *et al.* Controlled polymerization chemistry to graft architectures that influence cell-material interactions. En: Acta Biomaterialia. Marzo, 2007. vol. 3, no. 2, p. 151-191.

SHENG, Lin-Gibson, *et al.* Synthesis and Characterization of PEG Dimethacrylates and their Hydrogels. En: Biomacromolecules. Abril, 2004. vol. 5, no. 4, p. 1280-1287.

SHI, Chunmeng, *et al.* Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. En: Journal of Surgical Research. 2006. vol. 133, no. 2, p. 185-192.

SIKAVITSAS, Vassilios I.; TEMENOFF, Johnna S. y MIKOS, Antonios G. Biomaterials and bone mechanotransduction. En: Biomaterials. 2001. vol. 22, no. 19, p. 2581-2893.

TODARO, G.J. y GREEN, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. En: The Journal of Cell Biology. Mayo, 1963. vol. 17, p. 299-313.

WEST, Jennifer L. y HUBBELL, Jeffrey A. Bioactive polymers. En: ATALA, Anthony y MOONEY, David; Synthetic biodegradable polymer scaffolds. Boston: Birkhauser, 1997. p. 83-95.

----- . Polymeric biomaterials with degradation sites for proteases involved in cell migration. En: Macromolecules. 1999. vol. 32, no. 1, p. 241-244.

WNEK, Gary E. y BOWLING, Gary L. Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering. Virginia, USA: Advisory Board, 2004. vol. 2.

ZHAO, Xian, *et al.* Synthesis of bioadhesive hydrogels from chitin derivatives. En: International Journal of Adhesion and Adhesives. Junio, 2001. vol. 21, no. 3, p. 227-232.

## **ANEXOS**

### **ANEXO A. ESPECIFICACIONES DEL COLÁGENO TIPO I**

A continuación se dan las especificaciones del colágeno tipo I empleado en el desarrollo del proyecto:

NÚMERO DE CATALOGO: 354236

FUENTE: cola de rata.

CANTIDAD: 100 miligramos de proteína (medidos por piroquimioluminiscencia)

CONCENTRACIÓN: 3,38 mg/mL

FORMULACIÓN: 0,02N Ácido Acético

USOS: el colágeno de cola de rata tipo I puede ser usado como un gel o como recubrimiento delgado.

CONTROL DE CALIDAD:  $\geq 90\%$ . Este producto ha sido probado por su habilidad para promover la adhesión y proliferación de células humanas de fibrosarcoma HT 1080.

El colágeno de cola de rata tipo I se preparó con filtración de membrana (0.2 micron). Se obtuvieron resultados negativos para los tests de detección de bacteria, hongos y micoplasma.

ESTABILIDAD: Estable por un periodo mínimo de 3 meses a partir de la fecha de envío si se almacena a 2-8°C. El colágeno de cola de rata tipo I se precipita

cuando su pH alcanza la alcalinidad.

## **ANEXO B. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN BUFFER HBS Y DE ACETOFENONA**

### **PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE HBS**

- ✓ Disolver 1,19g de HEPES (HYCLONE) en 500mL de agua doblemente deionizada.
- ✓ Agregar 4,38g de NaCl (FISHER).
- ✓ Ajustar el pH de la anterior solución a 7,4 utilizando NaOH 1N.

### **PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ACETOFENONA (FOTOINICIADOR PARA LA FABRICACIÓN DE HIDROGELES)**

- ✓ Disolver en un microtubo de 2mL 300mg de 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (ACROS) en 1mL de 1-vinil-2-pirrolidinona (ALDRICH).
- ✓ Hacer vortex, cubrir el tubo con papel aluminio para proteger de la luz.
- ✓ Tapar y envolver con parafina.

## **ANEXO C. MONTAJE PARA LA FABRICACIÓN DE HIDROGELES ENTRE PLATOS**

En las siguientes figuras se muestra el montaje empleado en la fabricación de hidrogeles entre platos.

Figura C1. Vista lateral del montaje entre platos.

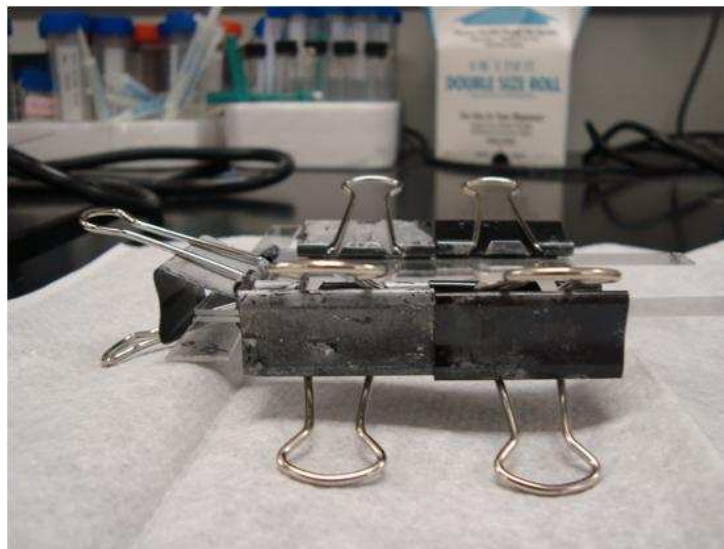
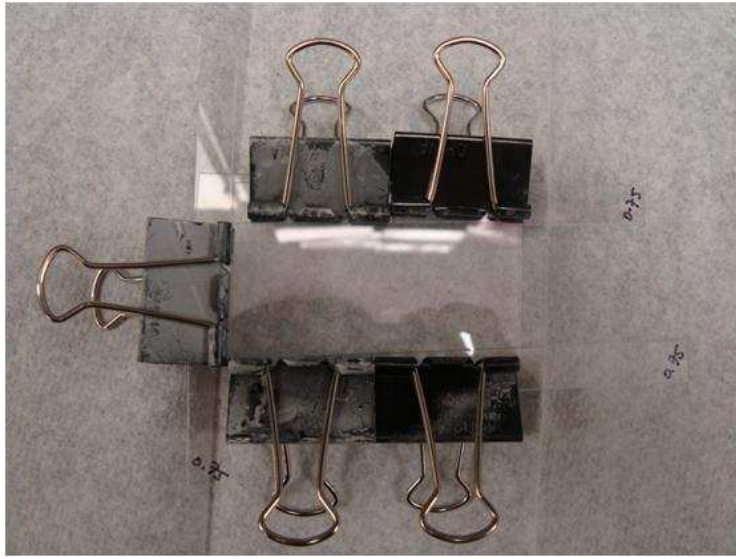


Figura C2. Vista superior del montaje entre platos



## ANEXO D. CÁLCULOS PARA LA PREPARACIÓN DE POLIETILENGLICOL DIACRILADO (PEGDA)

Los siguientes son los cálculos realizados para la síntesis de 20g de PEG 8K:

a. Cálculo de las moles de PEG con base en la masa secada en el horno de vacío.

$$20g \left( \frac{1 \text{ mol}}{8.000g} \right) = 0,0025 \text{ moles PEG}$$

b. Cálculo de la cantidad de ácido acrílico clorado requerido en un 200% de exceso con respecto al PEG diacrilado.

$$(0,0025 \text{ moles PEG}) * (2 \text{ Grupos Terminales}) * (2 \text{ veces en Exceso}) \\ = 0,01 \text{ moles Ácido Acrílico Clorado}$$

$$(0,01 \text{ moles Ácido Acrílico Clorado}) * \left( \frac{90,51g}{1 \text{ mol}} \right) * \left( \frac{1 \text{ mL}}{1,14g} \right) \\ = 0,794 \text{ mL Ácido Acrílico Clorado}$$

c. Cálculo de la cantidad de TEA requerida en un 100% de exceso con respecto al PEG diacrilado.

$$(0,0025 \text{ moles PEG}) * (2 \text{ Grupos Terminales}) * (1 \text{ vez en Exceso}) = 0,005 \text{ moles TEA}$$

$$(0,005 \text{ moles TEA}) * \left( \frac{101,9g}{1 \text{ mol}} \right) * \left( \frac{1 \text{ mL}}{0,726g} \right) = 0,702 \text{ mL TEA}$$

d. Cantidad de  $K_2CO_3$  2M requerida para la separación de fases.

$$(0,01 \text{ moles \u00c1cido Acr\u00edlico Clorado}) * \left(\frac{2 \text{ moles } K_2CO_3}{1 \text{ mol}}\right) * \left(\frac{1L K_2CO_3}{2 \text{ moles}}\right) \\ = 10 \text{ mL } K_2CO_3$$

De manera similar, los mismos c\u00e1lculos fueron hechos para los lotes de 3.4K y 20K PEG (20gr cada uno). El cuadro D1 resume estos c\u00e1lculos.

Cuadro D1. Volumen de reactivos requeridos por lote de PEG.

| PEG  | Moles PEG | Volumen Trietilamina (mL) | Volumen \u00c1cido Acr\u00edlico Clorado (mL) | Volumen $K_2CO_3$ (mL) |
|------|-----------|---------------------------|---|------------------------|
| 3.4K | 0,0059    | 1,66                      | 1,874   | 23,6                   |
| 8K   | 0,0025    | 0,702                     | 0,794   | 10                     |
| 20K  | 0,001     | 0,281                     | 0,317   | 4                      |

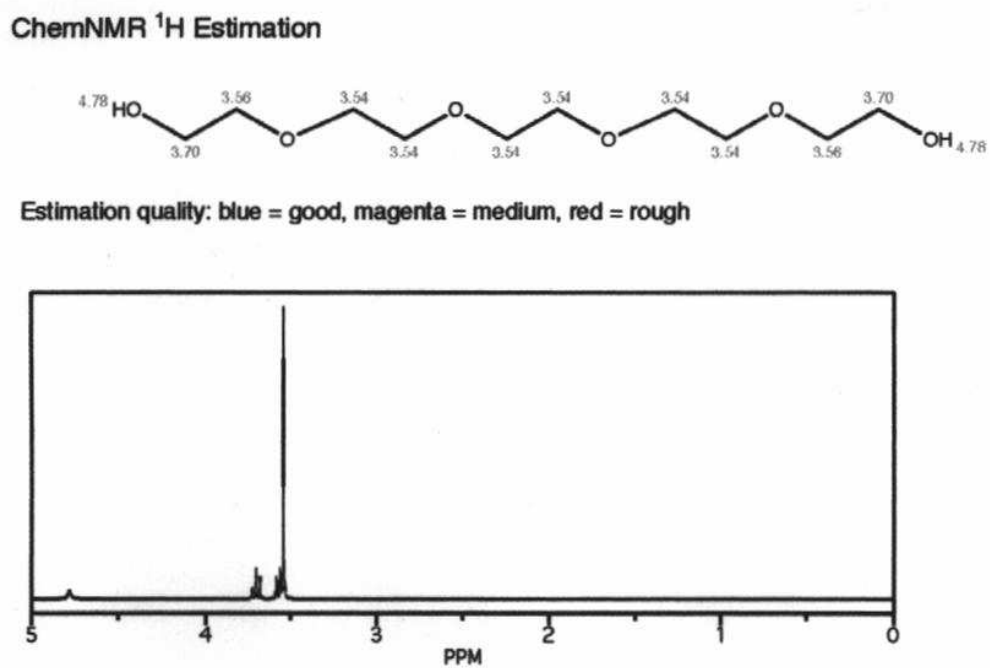


## ANEXO E. ANÁLISIS ESTRUCTURAL POR RMN DE PROTÓN

### ESPECTRO DE RMN DEL PEG

En la siguiente figura se puede observar el espectro de RMN de protón del polietilenglicol (PEG):.

Figura E1. Espectro de RMN de protón del PEG

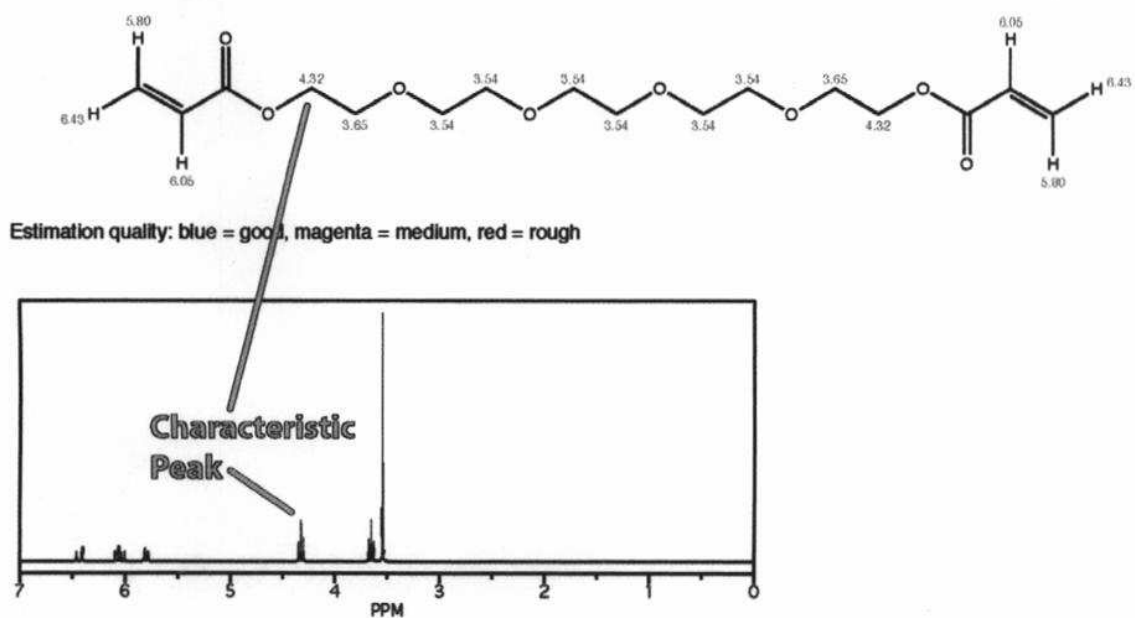


### ESPECTRO DE RMN DEL PEGDA

En la siguiente figura se puede observar el espectro de RMN de protón del polietilenglicol diacrilado (PEGDA):

Figura E2. Espectro de RMN de protón del PEGDA

ChemNMR  $^1\text{H}$  Estimation



## ESPECTROS OBTENIDOS A PARTIR DEL ANÁLISIS DE RMN DE PROTÓN

A continuación se presentan los espectros de RMN de protón de todos los lotes de PEGDA utilizados en el desarrollo de este proyecto:



Figura E4. PEGDA 8K 70.3% acrilación

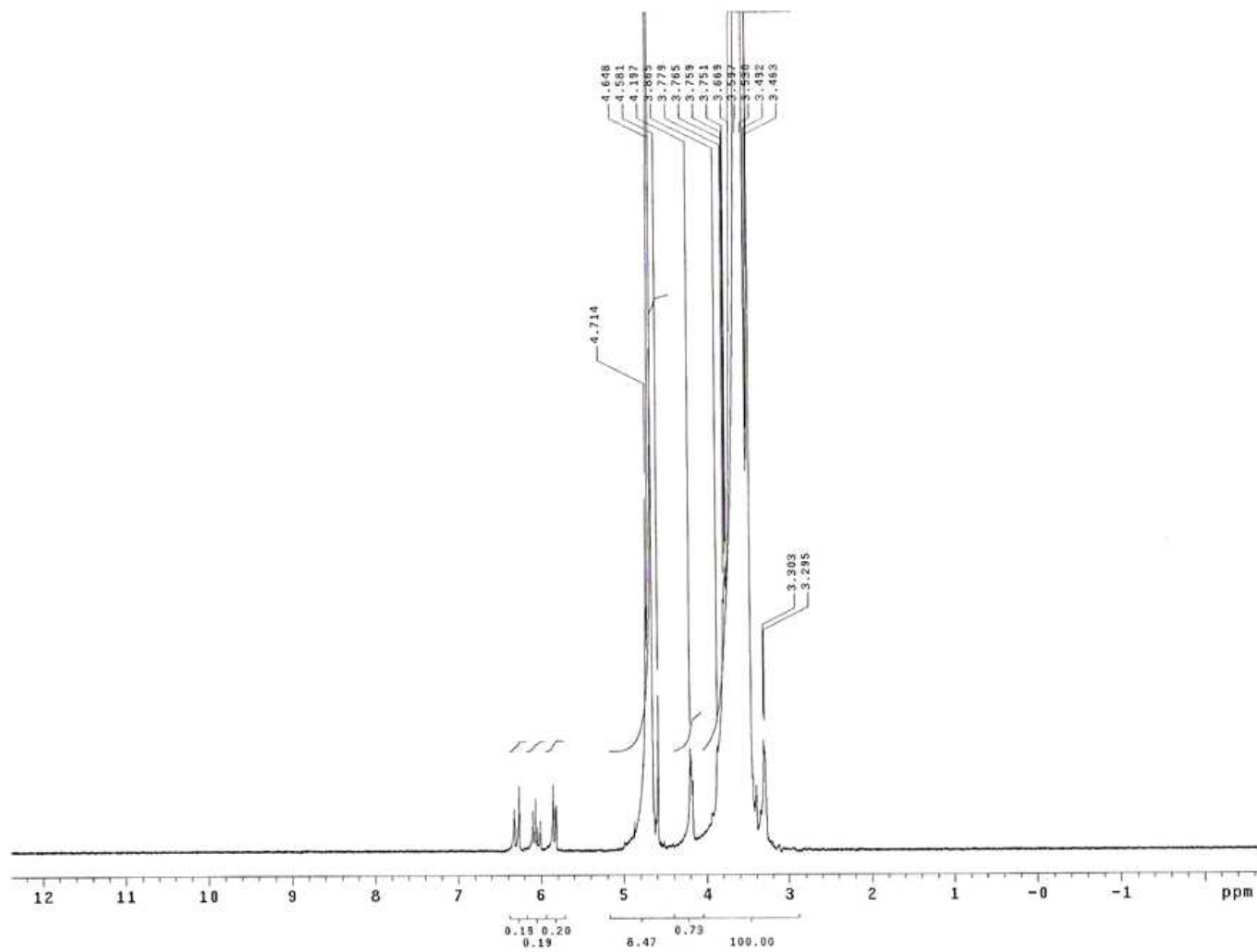
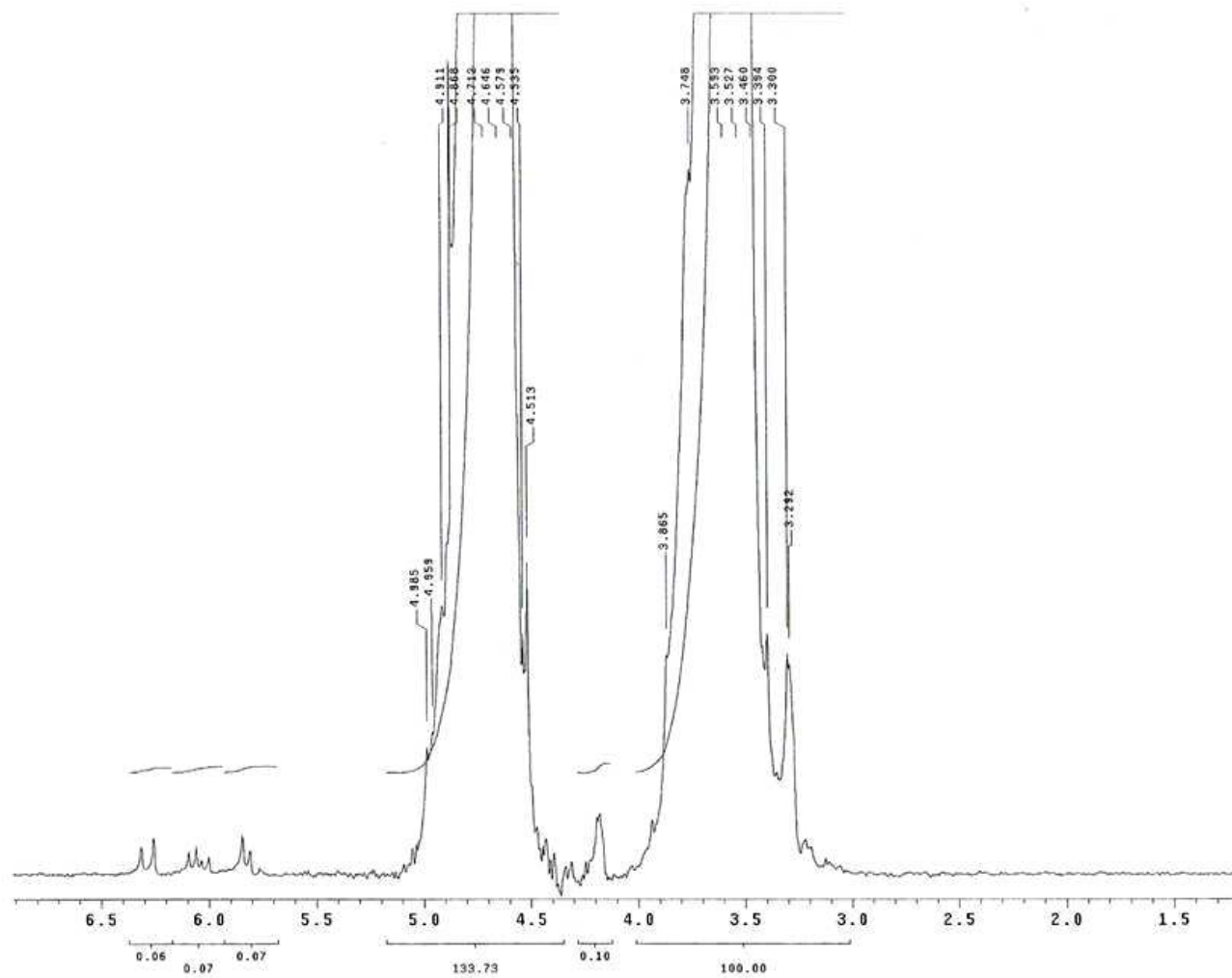


Figura E5. PEGDA 20K 63.6% acrilación



**Set inicial de PEGDAs: resultados después de reacriliación. Lotes liofilizados y usados en ensayos 1,2 y 3.**

Figura E6. PEGDA 8K 81% acrilación

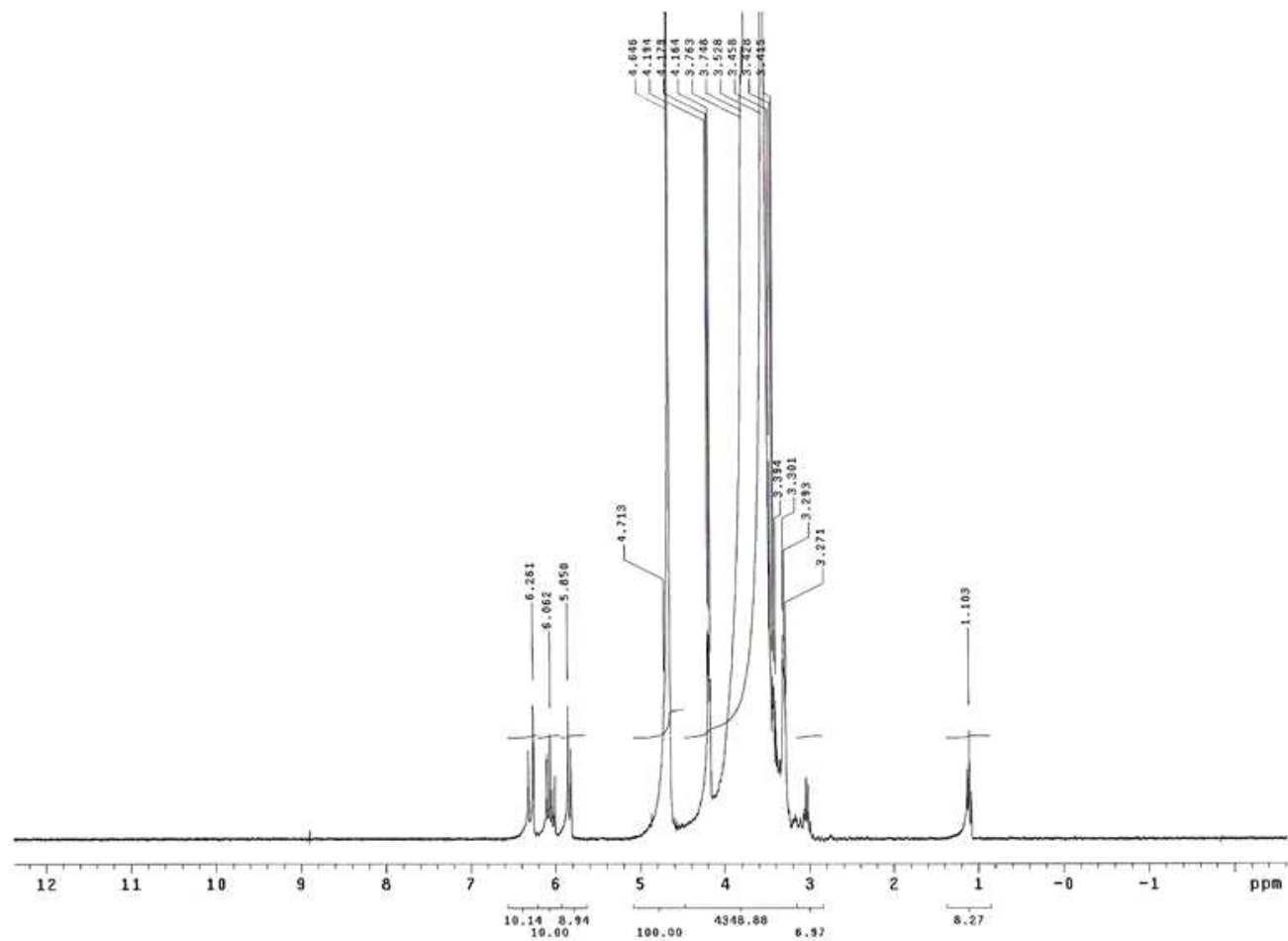
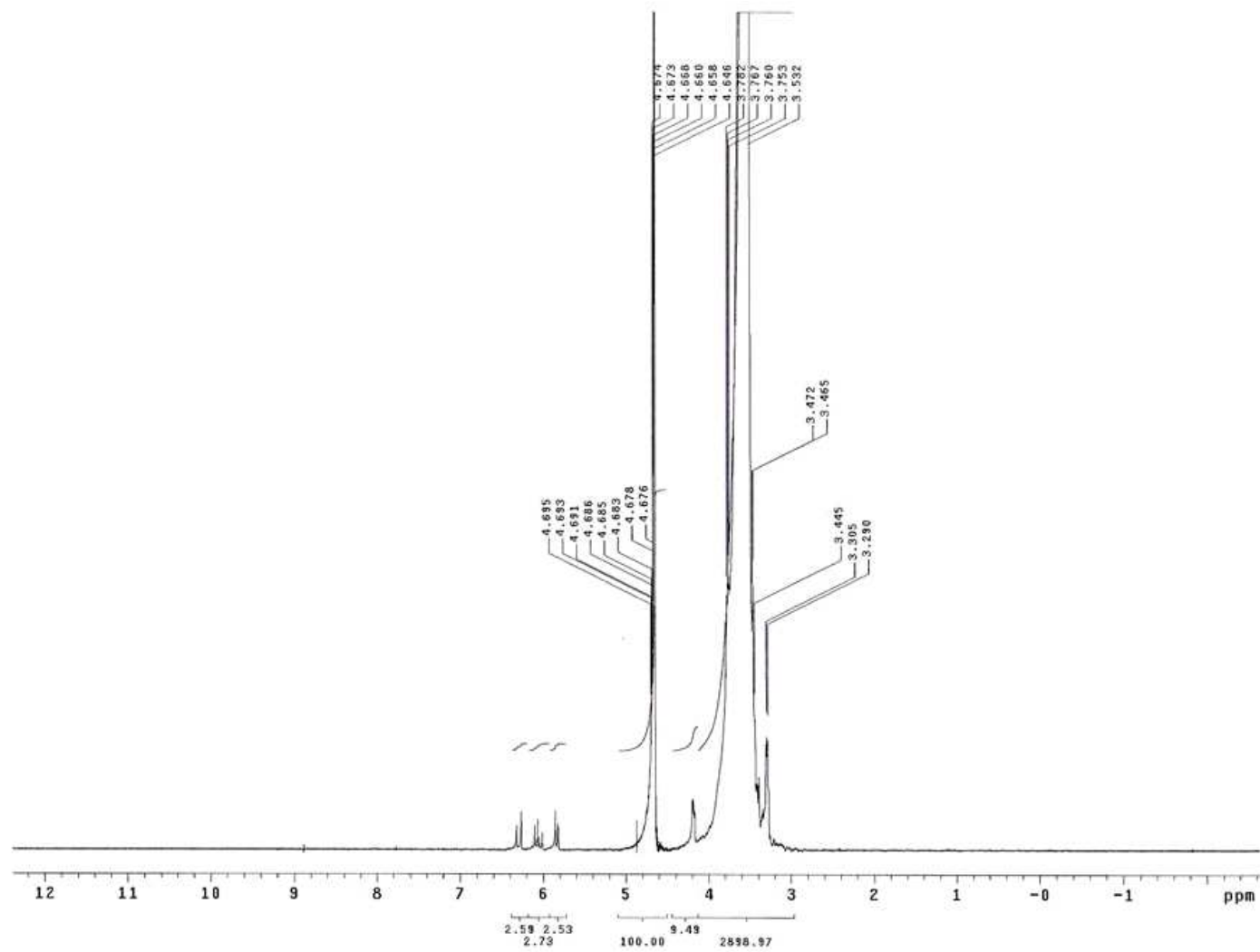


Figura E7. PEGDA 20K 82% acrilación



**Nuevo set de PEGDAs: Lotes usados en ensayos 4 y 5.**

Figura E8. PEGDA 3.4K 75% acrilación

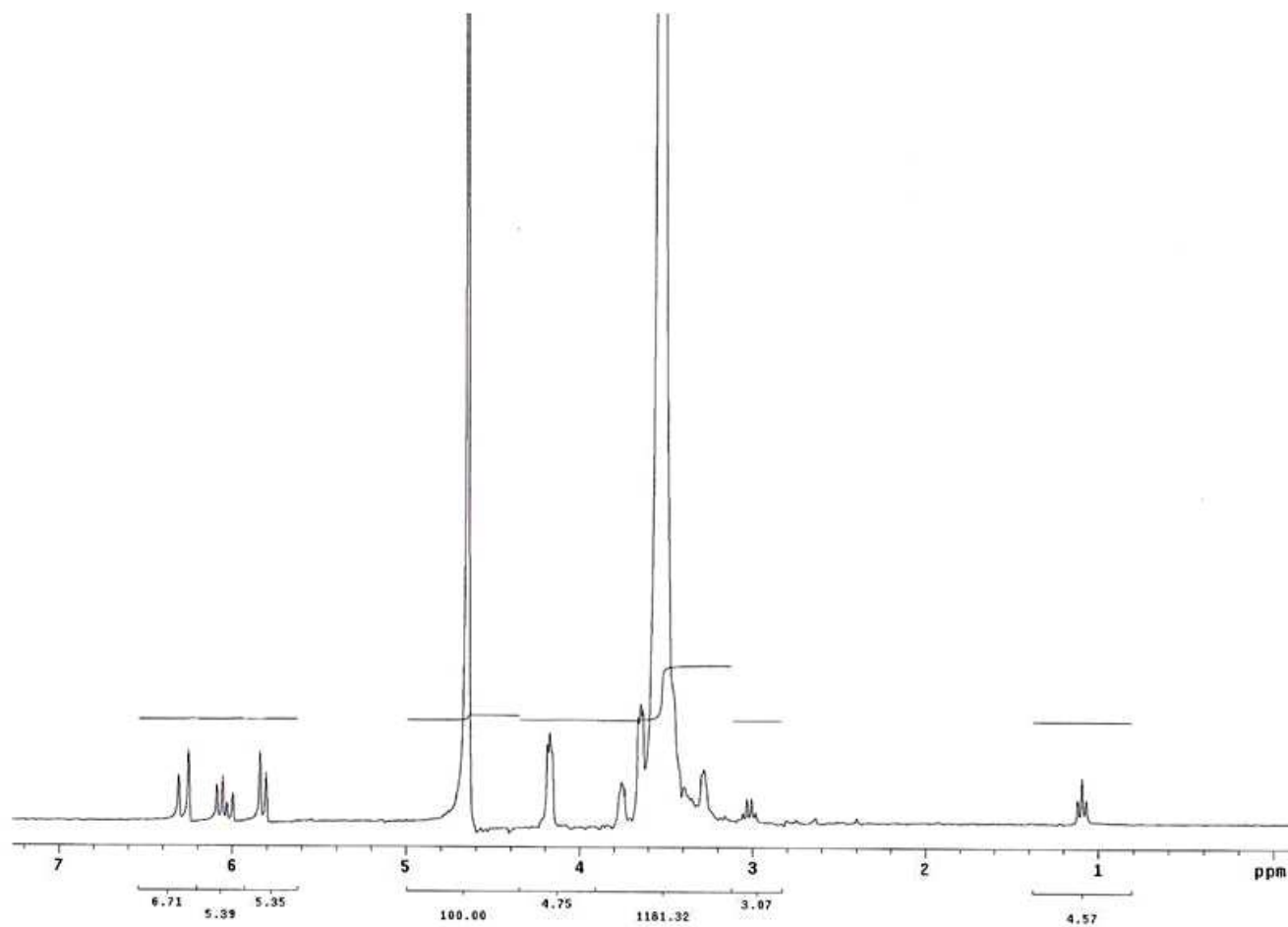


Figura E9. PEGDA 8K 88.6% acrilación

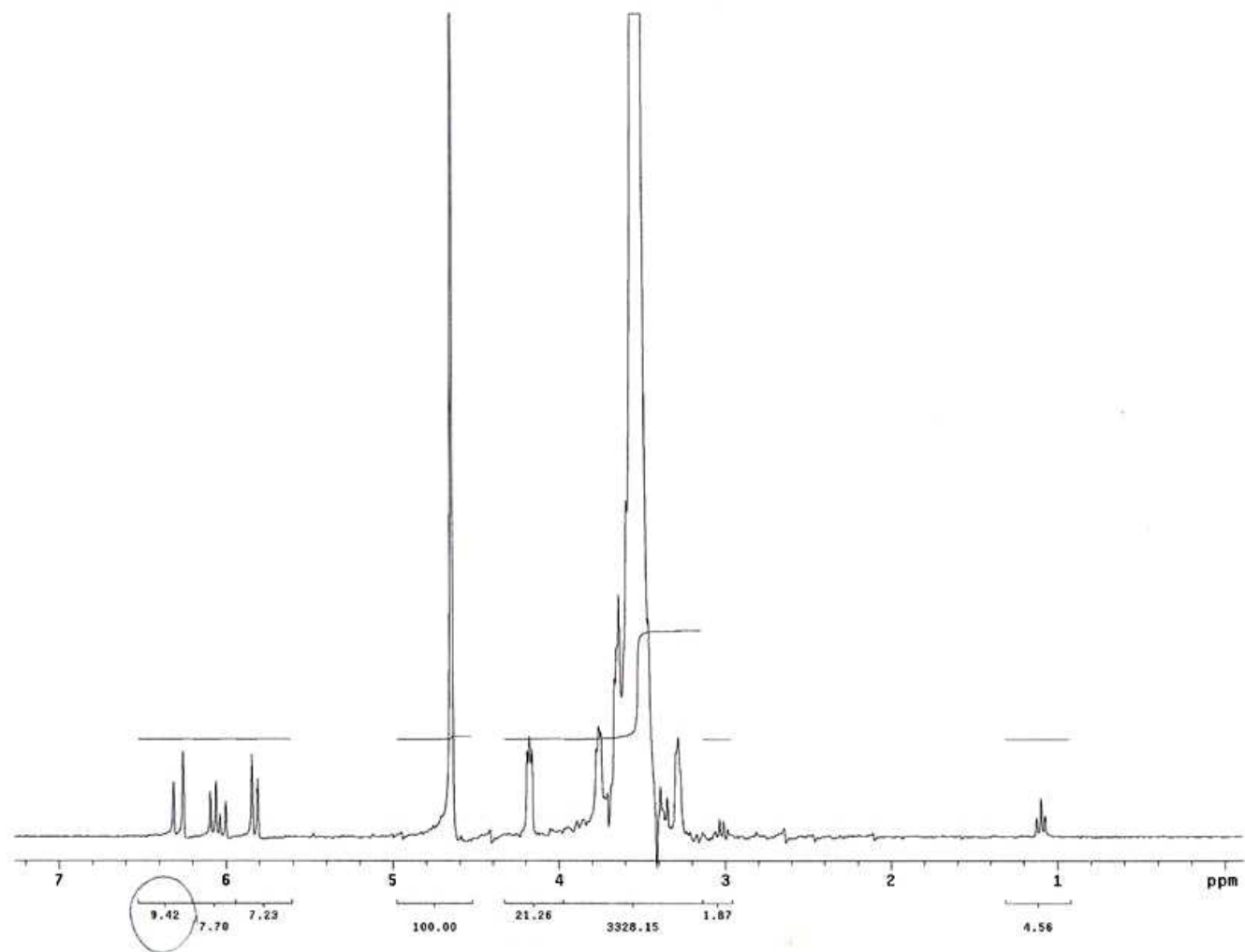
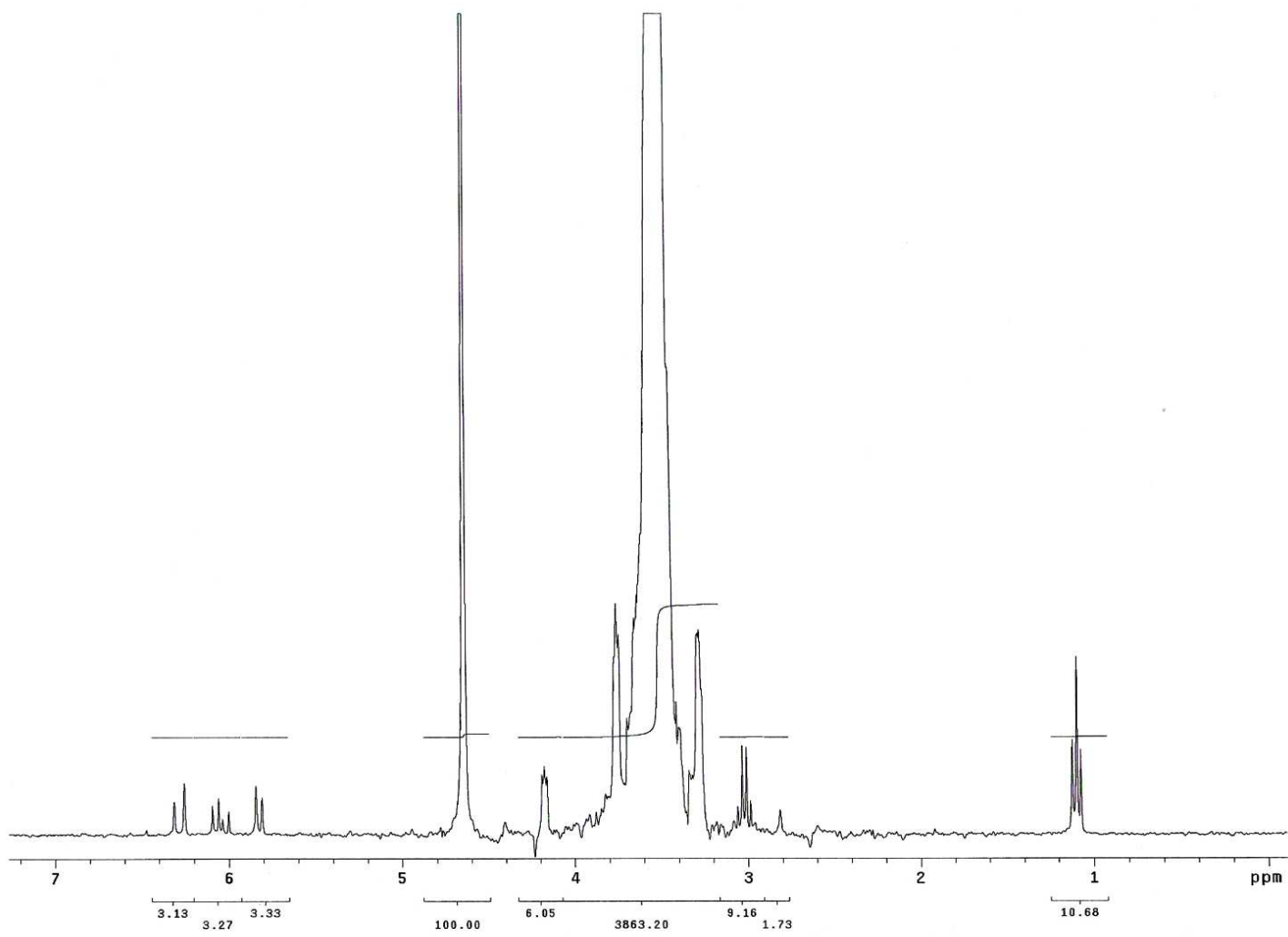


Figura E10. PEGDA 20K 76.3% acrilación



## ANEXO F. INFORMACIÓN PRELIMINAR DEL LABORATORIO ACERCA DE LOS HIDROGELES A BASE DE POLIETILENGLICOL

En el cuadro F1 se muestran los datos recolectados de pruebas de hinchamiento para los diferentes tipos de PEGDA usados en el laboratorio:

Cuadro F1. Datos recolectados de pruebas de hinchamiento para los diferentes tipos de PEGDA

| Gel   | %      | Peso Inicial (g) | Peso gel hinchado (g) | Peso seco (g) | Peso húmedo (g) | % Peso húmedo (g) | Peso después hinchamiento (g) | Peso después hinchamiento (g) | Relación de hinchamiento R | R' (peso gel hinchado / peso inicial) |
|-------|--------|------------------|-----------------------|---------------|-----------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| 3.350 | 10     | 0,1950           | 0,2020                | 0,0220        | 0,0070          | 3,5897,           | 0,1800                        | 89,1089                       | 9,1818                     | 1,0359                                |
|       |        | 0,1980           | 0,1990                | 0,0220        | 0,0010          | 0,5051            | 0,1770                        | 88,9447                       | 9,0455                     | 1,0051                                |
|       | 20     | 0,1970           | 0,2780                | 0,0420        | 0,0810          | 41,1168           | 0,2360                        | 84,8921                       | 6,6190                     | 1,4112                                |
|       |        | 0,1970           | 0,2490                | 0,0420        | 0,0520          | 26,3959           | 0,2070                        | 83,1325                       | 5,9286                     | 1,2640                                |
|       | 30     | 0,2110           | 0,3340                | 0,0630        | 0,1230          | 58,2938           | 0,2710                        | 81,1377                       | 5,3016                     | 1,5829                                |
|       |        | 0,1960           | 0,3160                | 0,0570        | 0,1200          | 61,2245           | 0,2590                        | 81,9620                       | 5,5439                     | 1,6122                                |
| 6.000 | 5      | 0,1700           | 0,1730                | 0,0120        | 0,0030          | 1,7647            | 0,1610                        | 93,0636                       | 14,4167                    | 1,0176                                |
|       |        | 0,1830           | 0,1900                | 0,0160        | 0,0070          | 3,8251            | 0,1740                        | 91,5789                       | 11,8750                    | 1,0383                                |
|       | 10     | 0,1720           | 0,1850                | 0,0140        | 0,0130          | 7,5581            | 0,1710                        | 92,4324                       | 13,2143                    | 1,0756                                |
|       |        | 0,2030           | 0,3050                | 0,0440        | 0,1020          | 50,2463           | 0,2610                        | 85,5738                       | 6,9318                     | 1,5025                                |
|       | 20     | 0,2090           | 0,3130                | 0,0450        | 0,1040          | 49,7608           | 0,2680                        | 85,6230                       | 6,9556                     | 1,4976                                |
|       |        | 0,1330           | 0,2560                | 0,0310        | 0,1230          | 92,4812           | 0,2250                        | 87,8906                       | 8,2581                     | 1,9248                                |
| 30    | 0,1450 | 0,2780           | 0,0350                | 0,1330        | 91,7241         | 0,2430            | 87,4101                       | 7,9429                        | 1,9172                     |                                       |
|       | 8.000  | 10               | 0,1670                | 0,1980        | 0,0190          | 0,0310            | 18,5629                       | 0,1790                        | 90,4040                    | 10,4211                               |

| Gel    | %      | Peso Inicial (g) | Peso gel hinchado (g) | Peso seco (g) | Peso húmedo (g) | % Peso húmedo (g) | Peso después hinchamiento (g) | Peso después hinchamiento (g) | Relación de hinchamiento R | R' (peso gel hinchado / peso inicial) |
|--------|--------|------------------|-----------------------|---------------|-----------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
|        | 20     | 0,1940           | 0,2430                | 0,0230        | 0,0490          | 25,2577           | 0,2200                        | 90,5350                       | 10,5652                    | 1,2526                                |
|        |        | 0,2120           | 0,3950                | 0,0470        | 0,1830          | 86,3208           | 0,3480                        | 88,1013                       | 8,4043                     | 1,8632                                |
|        | 30     | 0,0760           | 0,1330                | 0,0120        | 0,0570          | 75,0000           | 0,1210                        | 90,9774                       | 11,0833                    | 1,7500                                |
|        |        | 0,2200           | 0,4770                | 0,0660        | 0,2570          | 116,818           | 0,4110                        | 86,1635                       | 7,2273                     | 2,1682                                |
|        |        | 0,2120           | 0,4670                | 0,0650        | 0,2550          | 120,283           | 0,4020                        | 86,0814                       | 7,1846                     | 2,2028                                |
| 10.000 | 10     | 0,1730           | 0,2370                | 0,0210        | 0,0640          | 36,9942           | 0,2160                        | 91,1392                       | 11,2857                    | 1,3699                                |
|        |        | 0,1870           | 0,2620                | 0,0230        | 0,0750          | 40,1070           | 0,2390                        | 91,2214                       | 11,3913                    | 1,4011                                |
|        | 20     | 0,2060           | 0,4090                | 0,0450        | 0,2030          | 98,5437           | 0,3640                        | 88,9976                       | 9,0889                     | 1,9854                                |
|        |        | 0,2110           | 0,4280                | 0,0470        | 0,2170          | 102,844           | 0,3810                        | 89,0187                       | 9,1064                     | 2,0284                                |
|        |        | 0,2110           | 0,5130                | 0,0690        | 0,3020          | 143,128           | 0,4440                        | 86,5497                       | 7,4348                     | 2,4313                                |
| 30     | 0,1970 | 0,4800           | 0,0630                | 0,2830        | 143,655         | 0,4170            | 86,8750                       | 7,6190                        | 2,4365                     |                                       |
| 20.000 | 10     | 0,1770           | 0,3530                | 0,0190        | 0,1760          | 99,435            | 0,3340                        | 94,6176                       | 18,5789                    | 1,9944                                |
|        |        | 0,1760           | 0,3510                | 0,0200        | 0,1750          | 99,4318           | 0,3310                        | 94,3020                       | 17,5500                    | 1,9943                                |
|        | 20     | 0,1710           | 0,5110                | 0,0350        | 0,3400          | 198,830           | 0,4760                        | 93,1507                       | 14,6000                    | 2,9883                                |
|        |        | 0,1670           | 0,4780                | 0,0340        | 0,3110          | 186,228           | 0,4440                        | 92,8870                       | 14,0588                    | 2,8623                                |
|        | 30     | 0,1730           | 0,5130                | 0,0350        | 0,3400          | 196,532           | 0,4780                        | 93,1774                       | 14,6571                    | 2,9653                                |
|        |        | 0,1980           | 0,6310                | 0,0420        | 0,4330          | 218,687           | 0,5890                        | 93,3439                       | 15,0238                    | 3,1869                                |
| Deg    | 10     | 0,1540           | 0,2160                | 0,0110        | 0,0620          | 40,260            | 0,2050                        | 94,9074                       | 19,6364                    | 1,4026                                |
|        |        | 0,1570           | 0,2230                | 0,0120        | 0,0660          | 42,0382           | 0,2110                        | 94,6188                       | 18,5833                    | 1,4204                                |

Figura F1. Relación de hinchamiento

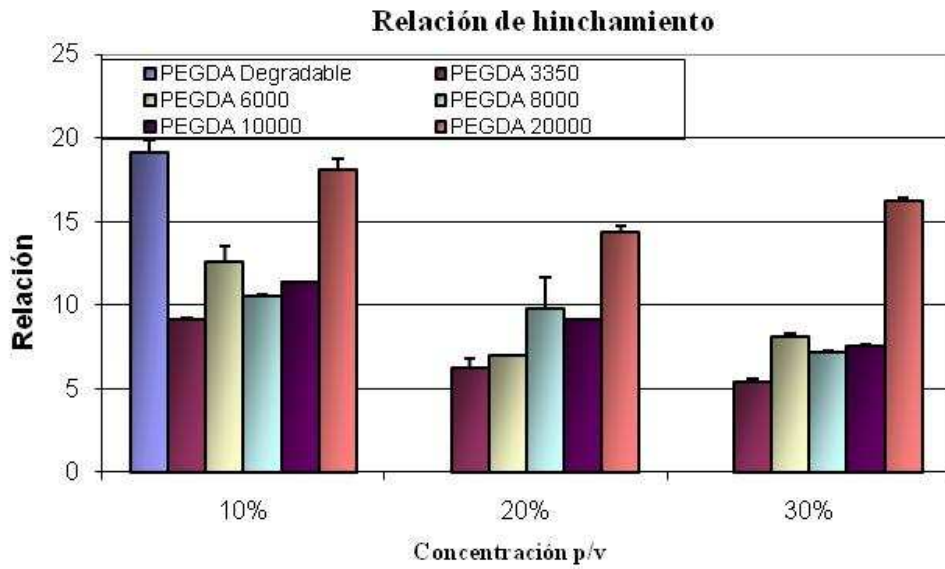
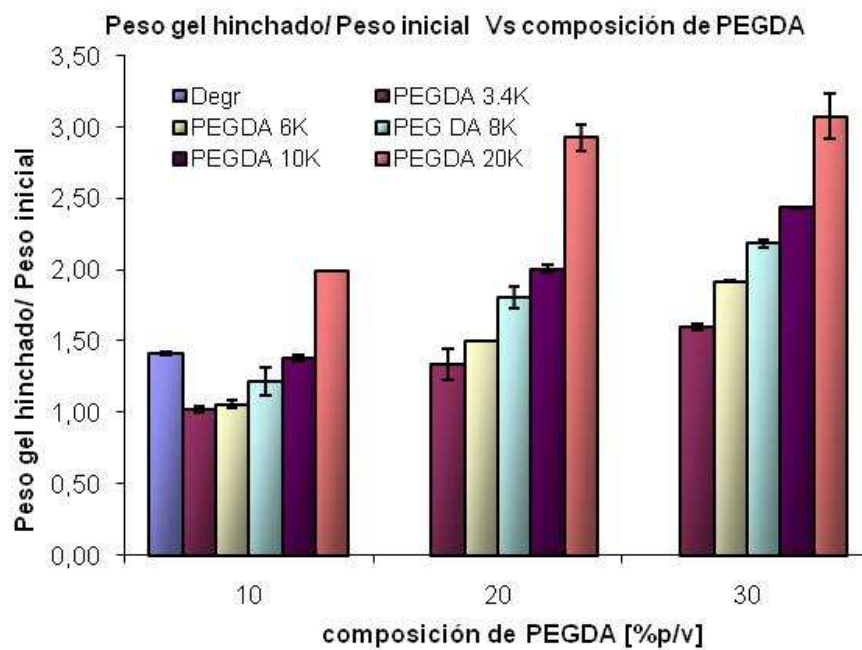


Figura F2. Relación de hinchamiento vs composición de PEGDA



## ANEXO G. CULTIVO Y MANTENIMIENTO CELULAR

### ***Materiales:***

- Medio de cultivo celular
- Solución buffer fosfatada (PBS)
- tripsina/EDTA

### ***Preparación:***

- Calentar el medio, PBS, y tripsina a 37°C en un baño de agua.
- Limpiar la cámara de bioseguridad con alcohol al 70%.
- Limpiar todos los elementos que entran a la cámara con etanol al 70%.

### ***Procedimiento:***

1. Remueva el medio viejo del frasco con una pipeta aspiradora.
2. Añada 5 mL de PBS al frasco. Permita un contacto del PBS con las células de al menos 5 minutos.
3. Remueva el PBS.
4. Añada ~4 mL de 1/2X tripsina. Incline el frasco para asegurar que la superficie del fondo se cubra totalmente con la solución.
5. Permita que la tripsina actúe por ~5-7 minutos a temperatura ambiente. Después de 5 minutos, observe las células en el microscopio para evitar tripsinizar por mucho tiempo. La tripsinización se complete cuando aproximadamente todas (al menos 95%) de las células se han desprendido de la superficie y no se encuentran en agregados. El tiempo total de exposición con tripsina no debería exceder los 10 minutos. Si al cabo de 10 minutos las células no se han desprendido de la superficie, golpee cuidadosamente el frasco.
6. Agregue 4 mL de medio al frasco.

7. Remueva todo el contenido del frasco con una pipeta y añádale en un tubo de 15 mL .
8. Enjuague la superficie del frasco con 4 mL de medio y añada esto al tubo de 15 mL. El paso anterior sirve para inhibir la reacción de tripsinización.
9. Cierre el tubo y centrifugue a 800 G por 5 minutos. Mientras las células son centrifugadas, prepare los nuevos frascos añadiendo 7mL de medio y márkuelos apropiadamente.
10. Encontrará un pellet visible en el fondo del tubo de 15mL. Remueva todo el sobrenadante que sea posible sin interferir con las células.
11. Resuspenda las células en medio (normalmente 5-6 mL). Proceda a realizar el pase (generalmente 1:10 es estándar).
12. Coloque los frascos en la incubadora.
14. Limpie la cámara.

Las siguientes figuras muestran el equipo y elementos básicos para el cultivo y mantenimiento celular:

Figura G1. Incubadora para mantenimiento celular

Figura G2. Geles en cultivo



Figura G3. Frascos para cultivo celular



Figura G4. Cámara estéril de bioseguridad nivel 2





## ANEXO H. CÁLCULOS REALIZADOS PARA LA ENCAPSULACIÓN CELULAR

A continuación se presentan los cuadros que resumen los cálculos realizados para la encapsulación de las líneas celulares 10T1/2 y 3T3:

Cuadro H1. Primer set (Colágeno Alto), datos iniciales

| PM PEGDA | Conc. Nominal | Factor hinchamiento | Geles totales | Solución precursora de PEG (%) | Solución precursora colágeno |
|----------|---------------|---------------------|---------------|--------------------------------|------------------------------|
| 3.4K     | 25%           | 1,45                | 4             | 28,7                           | 3 mg / mL                    |
| 8K       | 13%           | 1,26                | 4             | 14,64                          |                              |
| 20K      | 30%           | 3,75                | 4             | 45                             |                              |

Cuadro H2. Primer set (12 geles totales), base de cálculo: un gel de 1mL

| PM PEGDA | Conc. Colágeno después hinchamiento (mg/mL) | Conc. Colágeno antes hinchamiento (mg/mL) | Colágeno/gel (mL) | Solución del PEG/gel (mL) |
|----------|---|---|-------------------|---------------------------|
| 20K      | 0,267                                       | 1   | 0,33333           | 0,66666                   |
| 8K       | 0,267                                       | 0,33642                                   | 0,11214           | 0,88786                   |
| 3.4K     | 0,267                                       | 0,38715                                   | 0,12905           | 0,87095                   |

Cuadro H3. Primer set (12 geles totales), escalado a un gel de 1,5mL

| PM PEGDA | Colágeno/gel (mL) | Solución del PEG/gel (mL) | Geles totales | Colágeno total de solución precursora (mL) | PEG total de solución precursora (mL) | Relación PEG/colágeno |
|----------|-------------------|---------------------------|---------------|--|---------------------------------------|-----------------------|
| 20K      | 0,5               | 1,                        | 4             | 2  | 4                                     | 2,000                 |
| 8K       | 0,168             | 1,33                      | 4             | 0,67284                                    | 5,32716                               | 7,917                 |
| 3.4K     | 0,193             | 1,306                     | 4             | 0,7743                                     | 5,2257                                | 6,749                 |

Cuadro H4. Primer set (12 geles totales), volumen total + exceso (después de filtrado)

| PM PEGDA | Colágeno total de solución precursora (mL) | PEG total de solución precursora (mL) | Relación PEG/colágeno |
|----------|--|---------------------------------------|-----------------------|
| 20K      | 3  | 6                                     | 2,000                 |
| 8K       | 0,95                                       | 7,525                                 | 7,921                 |
| 3.4K     | 1,15                                       | 7,75                                  | 6,739                 |

Cuadro H5. Segundo set (Colágeno Bajo), datos iniciales

| PM PEGDA | Conc. Nominal | Factor hinchamiento | Geles totales | Solución precursora de PEG (%) | Solución precursora colágeno |
|----------|---------------|---------------------|---------------|--------------------------------|------------------------------|
| 3.4K     | 25%           | 1,45                | 4             | 25,66                          | 3 mg / mL                    |
| 8K       | 13%           | 1,26                | 4             | 13,3                           |                              |
| 20K      | 30%           | 3,75                | 4             | 32,14                          |                              |

Cuadro H6. Segundo set (12 geles totales), base de cálculo: un gel de 1mL

| PM PEGDA | Conc. Colágeno después hinchamiento (mg/mL) | Conc. Colágeno antes hinchamiento (mg/mL) | Colágeno/gel (mL) | Solución del PEG/gel (mL) |
|----------|---|---|-------------------|---------------------------|
| 20K      | 0,053                                       | 0,2                                       | 0,067             | 0,9333                    |
| 8K       | 0,053                                       | 0,067                                     | 0,022             | 0,9776                    |
| 3.4K     | 0,053                                       | 0,077                                     | 0,026             | 0,9742                    |

Cuadro H7. Segundo set (12 geles totales), escalado a un gel de 1,5mL

| PM PEGDA | Colágeno/gel (mL) | Solución del PEG/gel (mL) | Geles totales | Colágeno total de solución precursora (mL) | PEG total de solución precursora (mL) | Relación PEG/colágeno |
|----------|-------------------|---------------------------|---------------|--|---------------------------------------|-----------------------|
| 20K      | 0,1               | 1,4                       | 4             | 0,4  | 5,6                                   | 14,000                |
| 8K       | 0,034             | 1,466                     | 4             | 0,135                                      | 5,865                                 | 43,587                |
| 3.4K     | 0,039             | 1,461                     | 4             | 0,155                                      | 5,845                                 | 37,745                |

Cuadro H8. Segundo set (12 geles totales), volumen total + exceso (después de filtrado)

| PM PEGDA | Colágeno total de solución precursora (mL) | PEG total de solución precursora (mL) | Relación PEG/colágeno |
|----------|--|---------------------------------------|-----------------------|
| 20K      | 0,5  | 7                                     | 14,000                |
| 8K       | 0,175                                      | 7,625                                 | 43,571                |
| 3.4K     | 0,2  | 7,55                                  | 37,750                |

Cuadro H9. Cantidades totales

| PM PEGDA | Colágeno total Set 1 (mL) | Colágeno total Set 2 (mL) | PEG total. Set 1 (mL) | PEG total. Set 2 (mL) | PEG total requerido (g) | Colágeno total (mL) | Total 10% sucrosa (mL) |
|----------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|
| 3.4K     | 1,15                      | 0,2                       | 7,75                  | 7,55                  | 4,16158                 | 5,975               | 49,425                 |
| 8K       | 0,95                      | 0,175                     | 7,525                 | 7,625                 | 2,115785                |                     |                        |
| 20K      | 3                         | 0,5                       | 6                     | 7                     | 4,9498                  |                     |                        |

Cuadro H10. Células

| PM PEGDA | Densidad celular después de hinchamiento (células/mL) | Factor de hinchamiento | Células totales para un gel de 1mL | Células totales para un gel de 1,5mL | Geles totales de 1,5mL | Células totales requeridas |                        |
|----------|---|------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|
|          |   |                        |                                    |                                      |                        | Células 10T1/2 requeridas  | Células 3T3 requeridas |
| 20K      | 2.000.000   | 1,45                   | 2.900.000                          | 4.350.000                            | 8                      | 17.400.000                 | 17.400.000             |
| 8K       | 2.000.000   | 1,26                   | 2.520.000                          | 3.780.000                            | 8                      | 15.120.000                 | 15.120.000             |
| 3.4K     | 2.000.000   | 3,75                   | 7.500.000                          | 11.250.000                           | 8                      | 45.000.000                 | 45.000.000             |

Cuadro H11. Espaciadores

| PM<br>PEGD<br>A | Factor de<br>hinchamiento | Hinchamiento<br>o asociado<br>al grosor | Espaciador<br>usado<br>(mm) | Grosor<br>final<br>(mm) | Número<br>de<br>geles | Espaciadores<br>totales | Espaciadores<br>totales de<br>1,1mm |
|-----------------|---------------------------|---|-----------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| 20K             | 1,45                      | 1,13185119<br>6                         | 1,1                         | 1,245                   | 8                     | 24                      | 32                                  |
| 8K              | 1,26                      | 1,08008229<br>8                         | 1,1                         | 1,188                   | 8                     | 24                      | 32                                  |
| 3.4K            | 3,78                      | 1,55361625<br>3                         | 0,78                        | 1,165                   | 8                     | 24                      | 32                                  |