



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Preparación de un sustrato de
poliacrilamida como matriz extracelular
sintética”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

JUAN MANUEL CASTILLO MARTÍNEZ

ASESORA

Ph.D MIRIAM VERÓNICA FLORES MERINO

COASESOR

M. EN C.Q. JESÚS ENRIQUE SÁNCHEZ FLORES



2020

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA	Acrilamida
AH	Ácido hialurónico
AIBA	2,2'-Azobis(2-amidinopropano) diclorhidrato
CS	Condroitín sulfato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DS	Dermatán sulfato
FDA	Food Drug Administration
FGF	Factor de crecimiento del fibroblasto
GAG	Glicosaminoglicanos
HS	Heparan sulfato
MBA	Metilenbiscarilamida
MEC	Matriz extracelular
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NIPAM	N-isopropilacrilamida
PA	Poliacrilamida
PBS	Fosfato buffer salino
PEG	Polietilenglicol
PG	Proteoglicanos

PHEMA	Polihidroxietilmetacrilato
PVA	Polivinil alcohol
RL	Radicales libres
UV	Ultravioleta
VBIC	Vinilbenzilisothioni

LISTA DE FIGURAS

Figura1. Representación de una célula interactuando con algunos componentes de la matriz extracelular

Figura2. Componentes principales de la MEC.

Figura 3. Representación de una molécula de colágeno fibrilar

Figura 4. Representación de algunas de las cascadas de señalización que son inducidas por la interacción del colágeno en la MEC.

Figura 5. Polimerización de PA.

Figura 6. Estructura química del AIBA

Figura7. Activación de PA mediante Sulfo-SANPAH y luz UV.

Figura 8. Modelo usado para evaluar el efecto de los hidrogeles en contacto indirecto con una monocapa de fibroblastos 3T3 Swiss.

Figura 9. Diseño de placa para evaluación de biocompatibilidad.

Figura 10. Comparación de medias de la concentración de formazan producido por los fibroblastos 3T3 Swiss.

Figura 11. Fibroblastos en contacto indirecto con el hidrogel de PA

Figura 12. Hidrogeles de PA sintetizados con diferentes concentraciones de fotoiniciador AIBA.

Figura 13. Comparación de medias del formazan producido por los fibroblastos 3T3 Swiss sembrados sobre los hidrogeles sintetizados con diferentes concentraciones de AIBA.

Figura 14. Micrografías de fibroblastos 3T3 Swiss sembrados sobre los hidrogeles sintetizados con diferentes concentraciones de AIBA las primeras 24 horas de cultivo.

Figura 15. Fibroblastos 3T3 Swiss sembrados sobre los hidrogeles sintetizados con diferentes concentraciones de AIBA tras 48 horas de cultivo.

Figura 16. Fibroblastos 3T3 Swiss sembrados sobre los hidrogeles sintetizados con diferentes concentraciones de AIBA tras 72 horas de cultivo.

Figura 17. Citocompatibilidad de los hidrogeles funcionalizados con colágeno en función de la concentración de AIBA durante 3 días en contacto directo con el hidrogel con colágeno

LISTA DE TABLAS

Tabla1. Clasificación de citotoxicidad por morfología y viabilidad celular

Tabla2. Cantidad de AIBA usado en la fabricación de los hidrogeles de PA.

Tabla 3. Efecto del uso del fotoiniciador AIBA en el crecimiento celular de fibroblastos 3T3 Swiss

CONTENIDO

Resumen.....	9
Introducción.....	10
Marco Teórico.....	14
• Matriz extracelular	15
• Función de la Matriz Extracelular.....	15
• Fibroblastos.....	16
• Componentes de la MEC.....	16
• Colágeno.....	17
• Proteoglicanos.....	17
Hidrogeles como análogos de MEC.....	18
• Efecto del ambiente 2d y 3d en el comportamiento celular.....	19
• Mecanotransducción.....	19
• Hidrogeles.....	20
• Polimerización	21
• Acrilamida y Poliacrilamida.....	22
• Fotoiniciadores.....	23
• Funcionalización de hidrogeles.....	25
Diseño de Biomateriales.....	26
• Características de un Biomaterial.....	27
• Biocompatibilidad.....	28
• Citotoxicidad.....	29
• Evaluación de citotoxicidad a través de MTT.....	30

Antecedentes.....	32
Objetivos.....	37
Hipótesis.....	38
Justificación.....	39
DesarrolloExperimental.....	41
• Síntesis de hidrogel.....	42
• Esterilización y equilibración de Hidrogel.....	42
• Descongelación.....	43
• Cambio de medio.....	43
• Tripsinización.....	44
• Conteo celular.....	44
• Plaqueo	45
• MTT.....	47
• Funcionalización de hidrogel de acrilamida con colágeno	47
• Análisis estadístico.....	48
Resultados y discusión.....	49
• Cultivo de fibroblastos en contacto indirecto con hidrogel de PA con 0.002g/ml de AIBA.....	50
• Síntesis de hidrogel con diferentes concentraciones de AIBA.....	52
• Cultivo de fibroblastos sobre hidrogel funcionalizado con colágeno.....	53
• Análisis de la citocompatibilidad.....	59
Conclusiones.....	63
Referencias.....	65

RESUMEN

Para que cualquier sistema biológico pueda llevar a cabo sus funciones correctamente necesita recibir una serie de estímulos específicos que le indica el estado del medio y de esta manera ser capaz de responder de manera coordinada y adecuada. El estudio de enfermedades, el desarrollo de nuevas tecnologías y la elaboración de nuevos biomateriales, requieren del uso de modelos biológicos que permitan obtener información acerca del funcionamiento del sistema, y así poder hacer predicciones que serán trasladadas a modelos aún más complejos. Uno de los modelos más usados es el cultivo celular y a pesar de que este ha aportado en gran medida a la generación de conocimiento en muchas áreas, tiene limitaciones. El diseño de sustratos que tengan la capacidad de proveer de mejores estímulos a las células es una de las maneras que se han propuesto para mejorar la información que se puede obtener de este modelo. El presente trabajo tuvo como objetivo diseñar un sustrato de poliacrilamida capaz de estimular a fibroblastos 3T3 Swiss de tal manera que estos pudieran crecer mejor que en un cultivo clásico de poliestireno. Para este propósito se polimerizaron hidrogeles de poliacrilamida con concentraciones crecientes de fotoiniciador AIBA, y se evaluó la citocompatibilidad que este material tenía al albergar fibroblastos 3T3 Swiss usando el ensayo de MTT. A continuación, se funcionalizó la superficie del material con colágeno para determinar si la presencia de esta proteína afectaba el crecimiento de los fibroblastos sobre la superficie del material en comparación los hidrogeles sin funcionalizar. Se encontró que los hidrogeles polimerizados con .02g de fotoiniciador AIBA estimularon de manera indirecta y en mayor medida el crecimiento de los fibroblastos en comparación con el control sin hidrogel y a las otras concentraciones usadas. Los hidrogeles recubiertos de colágeno fueron capaces de estimular el crecimiento de los fibroblastos en comparación con el control de fibroblastos sembrados directamente sobre los pozos. Así mismo se determinaron las cantidades de AIBA que son nocivas para las células y se determinó a biocompatibilidad de cada uno de los hidrogeles de acuerdo a la

ISO10993-5. Se logró crear un material con una interfaz proteica capaz de estimular positivamente el crecimiento de fibroblastos 3T3 Swiss in vitro, esto podrá ser de utilidad para el estudiar el efecto que diversos elementos de la matriz extracelular tienen sobre las células, además este sustrato también tiene el potencial de ser recubierto con una combinación de proteínas diferente, para destinar su uso a otro tipo de células.

INTRODUCCIÓN

Las células son entes biológicos que necesitan recibir estímulos del medio intra y extracelular para poder llevar a cabo procesos como el desarrollo de tejido, homeostasis, regeneración y diferenciación (Nelson & Bissell, 2006). El microambiente externo incluye factores de crecimiento, citocinas, células vecinas, proteínas de adhesión y todos estos elementos pueden llegar a encontrarse en la matriz extracelular (MEC) (Rozario & Desimone, 2011b) gracias a que está formada principalmente de una red de colágeno y proteoglicanos que tienen funciones de anclaje y soporte estructural que ayudan a la formación de gradientes de diferentes moléculas a los que las células serán capaces de responder (Järveläinen, 2009).

El efecto de las moléculas solubles y transitorias de la MEC que dictan los procesos celulares ha sido ampliamente estudiado y caracterizado, mientras que el efecto fisicoquímico y mecánico que el ambiente proporciona, y él cómo la célula puede responder a estos estímulos, ha sido estudiado en menor medida. Se ha descrito que el medio extracelular no es solo un soporte pasivo, sino un modulador activo de procesos como proliferación, migración y regeneración celular (Nelson & Bissell, 2006). Además, se ha descubierto que perturbaciones en cualquiera de los componentes de la matriz extracelular podría llevar a patologías severas como aparición de tipos cáncer más agresivos y fibrosis (Aung et al., 2014; Nakasaki et al., 2015). Los diferentes tejidos presentes en el cuerpo necesitan de condiciones específicas para llevar a cabo sus funciones de manera correcta, como la reparación de una herida, en este caso el tejido necesita que varios requerimientos se cumplan, según el tipo de daño, localización y gravedad (Mir et al., 2018).

Los cultivos convencionales en 2D nos han ayudado a comprender los mecanismos que las células usan para responder a estímulos y adaptarse a las condiciones que le son presentadas, pero es posible obtener mejor y más información de estos sistemas usando técnicas como el cultivo en 3D ya que de esta manera la brecha entre sistemas de cultivo celular y la fisiología celular se cierra considerablemente (Cukierman,

Pankov, & Stevens, 2001). En específico se necesita crear un sistema que permita emular lo mejor las propiedades de la MEC que está presente en los tejidos de forma natural, esto se ha logrado gracias al cultivo celular en matrices 3D. Este tipo de cultivo tiene como ventaja la promoción de la adhesión, transporte de nutrientes, gases y factores de crecimiento que las células necesitan, además de proveer un ambiente físico similar al presente en los tejidos, por lo que los biomateriales usados para estos fines han tenido un papel clave en mejorar nuestro entendimiento sobre las propiedades que la MEC tiene y como esta influencia la respuesta celular (Varghese & Elisseeff, 2006).

En este sentido los hidrogeles han probado ser de gran ayuda, ya que propiedades como su hidrofiliidad les permiten absorber agua y biomoléculas de diferentes tipos, además dependiendo de la naturaleza del polímero con el que están hechos y el método de síntesis, se pueden variar propiedades como módulo de elasticidad, porosidad y relieve, haciéndolos materiales versátiles. Asimismo pueden cubrir superficies y llenar espacios, lo que los hace atractivos para cerrar heridas, ya que si son previamente tratados con nutrientes, fármacos o factores que promuevan la homeostasis, pueden liberar su contenido de manera controlada (Magnus S. Ågren, 2016).

La creación de estos materiales necesita ser abordada interdisciplinariamente, haciendo uso de la ingeniería de tejidos, el cultivo celular y el diseño de biomateriales, para así crear andamios en los que uno o varios tipos celulares puedan crecer y ser estudiados in vitro o aplicar su uso directamente a la regeneración de tejidos. Existen un gran variedad de hidrogeles que han sido estudiados para aplicar su uso como análogos de matriz extracelular, tanto naturales como sintéticos; la poliacrilamida, que forma parte de estos últimos, fue originalmente usada como soporte de electroforesis en 1959 y sigue usándose actualmente en tareas que van desde el tratamiento de aguas residuales (Siyam, 2001), hasta el cultivo celular; gracias a que su síntesis puede ser dirigida fácilmente, controlando propiedades como su módulo de elasticidad y tamaño de poro, además de que es altamente reproducible.

Mucho de los biomateriales usados en el cultivo celular 3D por si solos no contienen todos los elementos necesarios para que células puedan alojarse y desarrollarse de forma normal, para esto es necesario proveer de manera externa dichos elementos, en otras palabras: es necesario modificar la composición interna y/o externa del hidrogel, añadiendo moléculas que promuevan la adhesión, proliferación y estimulen a las células como lo haría la MEC de manera natural. Sin embargo, hidrogeles fabricados con poliacrilamida no son capaces de adsorber proteínas per se, por lo tanto es necesario unirlos covalentemente para conferirles nuevas características a estos materiales (Pelham and Wang, 1997).

Capítulo 1: Marco Teórico

1. Matriz extracelular

Función de la matriz extracelular

La MEC es el componente no celular presente entre todos los tejidos y órganos, provee soporte físico, actúa como señalizador y organizador en procesos de formación de tejidos, diferenciación y homeostasis, incorpora biomoléculas en diferentes concentraciones para dar apoyo a una gran variedad de tejidos con demandas estructurales muy diversas (Figura1). Defectos en sus componentes se han asociado a patologías como la osteogénesis imperfecta y el síndrome de Ehlers – Danlos (Frantz, Stewart, & Weaver, 2010; Hubmacher & Apte, 2013).

En esta, gran cantidad de tipos celulares, mediante la mecanotransducción, regulan la expresión de genes y los cambios bioquímicos intracelulares. Debido a que las células constantemente sondan el ambiente aledaño y ajustan su microambiente mecánico como la reorganización de su membrana lipídica, canales iónicos activados por estrés, proteínas transmembranales, proteínas G unidas a receptores que pueden servir como mecanosensores (Fredberg et al., 2009; Wang, Tytell, & Ingber, 2009). Por lo tanto la MEC al estar formada de una red de macromoléculas que se unen para integrar un compuesto estable y que además almacena factores de crecimiento y moléculas bioactivas, es una entidad dinámica que determina comportamientos y características como proliferación, adhesión, migración, polaridad, diferenciación y apoptosis (Yue, 2014).

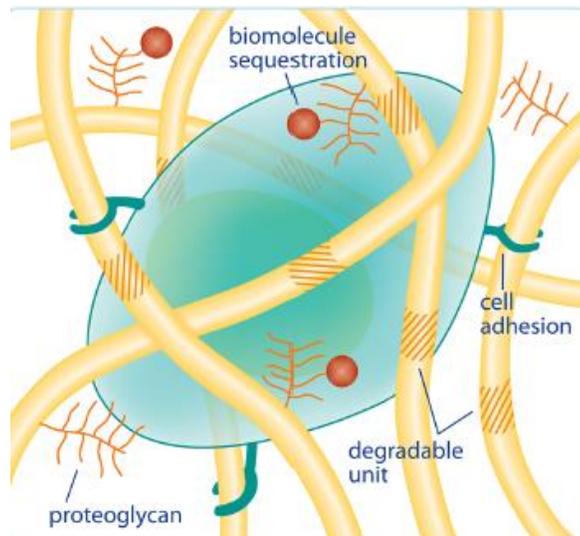


Figura1. Representación de una célula interactuando con algunos componentes de la matriz extracelular. Tomado de Connie et al., 2013.

Fibroblastos

Son las células más predominantes en el tejido conectivo, las cuáles secretan continuamente varios componentes de la matriz extracelular MEC como colágeno tipo 1 y 3. Dependiendo de su tejido de origen y estado fisiológico, estas células pueden adquirir fenotipos morfológicos distintos y adquirir varias propiedades funcionales. Un ejemplo de esto ocurre en el evento de una herida, aquí los fibroblastos migraran, proliferaran y producirán grandes cantidades de matriz colagenosa que ayudará a reparar y aislar el tejido dañado (Alberts *et al.*, 2015).

Componentes de la matriz extracelular

La MEC se compone principalmente de dos macromoléculas: los proteoglicanos (PG) y el colágeno (Figura2) (Järveläinen, 2009). Este último compone la mayor parte de la MEC y le confiere resistencia a estrés mecánico y sitios de unión a células. En contraste, los PG llenan el espacio entre el colágeno y forman un hidrogel con funciones de buffer, hidratación, unión y resistencia a diversas fuerzas (Fratzl *et al.*, 1998).

Aunque en menor cantidad, la MEC alberga macromoléculas como factores de crecimiento y citoquinas, por ejemplo el factor de crecimiento del fibroblasto (FGF) que se une a las cadenas heparan sulfato de los PG y puede formar gradientes de concentración que regulan la migración y proliferación (Lu, Takai, Weaver, & Werb, 2011).

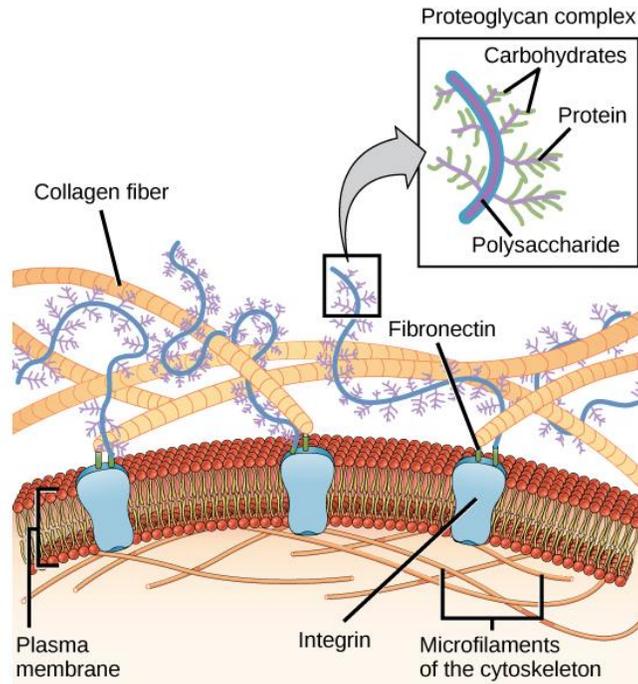


Figura 2. Componentes principales de la MEC. Tomado de Connie et al., 2013.

Colágeno

El colágeno es la proteína fibrosa más abundante en el cuerpo conformando el 30% de la masa de un organismo multicelular promedio; esta macromolécula provee fuerza tensil, regula la adhesión, tiene un rol importante en la quimiotaxis, migración y desarrollo de tejidos (Rozario & Desimone, 2011a). Es sintetizado por diversos tipos celulares como los fibroblastos, odontoblastos y osteoblastos para dar soporte estructural a las células (Leblond, 1989).

Está compuesto de 3 cadenas α polipeptídicas que forman una estructura triple hélice (Figura 3). Se ha descubierto que 46 cadenas de colágenos se unen entre ellas para

formar 28 tipos de colágeno (Mecham, 2012; Ricard-Blum, 2011), estos a su vez se catalogan en colágenos fibrilares (e.g., tipos I, II, III), colágenos formadores de redes (e.g., colágeno de membrana basal tipo IV), colágenos asociados a fibrillas con interrupciones en sus triple hélices (FACITs) (e.g., tipo IX, XII), y otros (e.g., tipo VI) (Yue, 2014).

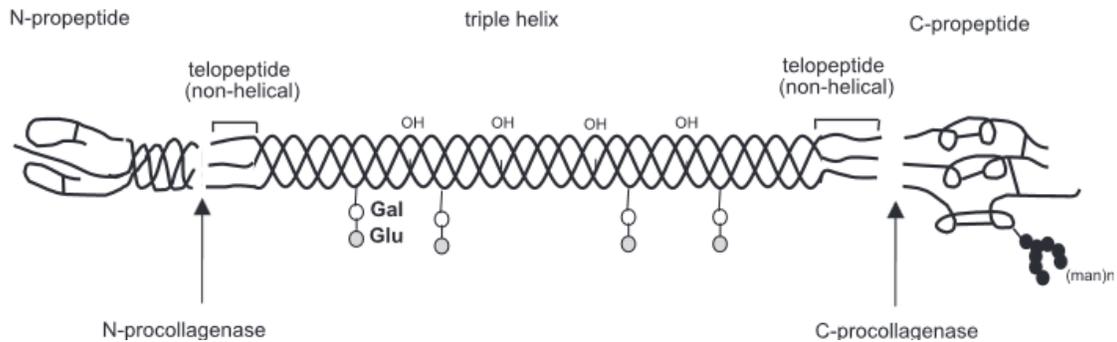


Figura 3. Representación de una molécula de colágeno fibrilar. Tomado de (Gelse, Po, & Aigner, 2003)

Proteoglicanos

Los PG son proteínas que tienen unidas en su centro cadenas de polisacáridos cargados negativamente, conocidas como glicosaminoglicanos (GAG) y están unidos covalentemente. Estos se pueden clasificar de acuerdo a la estructura de la secuencia de disacáridos que la conforman, algunos de sus subtipos son heparán sulfato (HS), condroitín sulfato (CS), queratán sulfato (KS) y dermatán sulfato (DS). La variedad de estas cadenas le confieren propiedades de unión y señalización diversas a las proteínas a las cuales se unen. (Schaefer & Schaefer, 2010).

Estas proteínas están presentes en gran medida en la MEC de tejidos conectivos. Participan como co receptores de factores de crecimiento, inician y modelan cascadas de señalización, además de proteger a los factores de crecimiento de proteasas

circundantes y guiar la migración celular mediante gradientes de concentración. En la membrana celular regulan la proliferación, endocitosis, migración, detección de factores de crecimiento y adhesión.(Fukuda, 2010)

2. Hidrogeles como análogos de MEC

Efecto del ambiente 2D y 3D en el comportamiento celular

A través de los años se ha demostrado que el ambiente *in vitro* tiene la capacidad de mediar cambios en el ciclo celular, metabolismo y en el transporte de macromoléculas (Birgersdotter, Sandberg, & Ernberg, 2005). Tan solo el número de genes expresados en tejidos y en líneas celulares varía un 30% aproximadamente y se cree que el ambiente extracelular activa cascadas extracelulares que influyen el fenotipo alterando los genes y la expresión de proteínas (Birgersdotter *et al.*, 2005). Un ejemplo de esto es que se ha observado que al cultivar células adherentes en un ambiente 2D, estas se polarizan, ya que solo una parte de la célula interactúa con la superficie y la otra está expuesta al medio (Zhang, Ellis-Behnke, & Zhao, 2013), lo que ocasiona una expresión atípica de proteínas relacionadas a la mecanotransducción y en consecuencia la expresión de un fenotipo anormal (Gieni & Hendzel, 2008).

En cambio el cultivo en 3D al tener una arquitectura tridimensional logra imitar de manera más acertada el microambiente nativo de las células, más específicamente el de las señales que la MEC utiliza para regular varios procesos ya mencionados con anterioridad. Esta capacidad es producto de la amplia gama de metodologías que existen para elaborar los materiales usados en este tipo de cultivo, ya que propiedades como dureza y porosidad pueden ser moduladas mediante las concentraciones y tipos de polímeros, o de agente entrecruzante, y propiedades como adherencia, proliferación o efectos de algún fármaco, pueden ser reguladas y estudiadas modulando la concentración de proteínas de unión, factores de crecimiento y fármacos usados en los materiales 3D.

Los diseños más comunes de andamios en 3d son los Esferoides, organoides, órganos en chips, hidrogeles, impresión en 3d con biomateriales, cada uno con diferentes ventajas y desventajas, usados en la investigación y/o en el tratamientos clínicos (Fang & Eglén, 2017).

Mecanotransducción

Es un proceso por el cual las células perciben y responden a estímulos mecánicos convirtiéndolos en señales bioquímicas que causara una respuesta celular específica (Figura 4). Esto revela un nuevo nivel de modulación celular y nuevo enfoque que se le puede dar al estudio de las propiedades de la MEC (Chalfie, 2010). Uno ejemplo de esto es el rol que tiene el citoesqueleto en la respuesta a estímulos físicos como la rigidez del ambiente (Alberts et al, 2015).

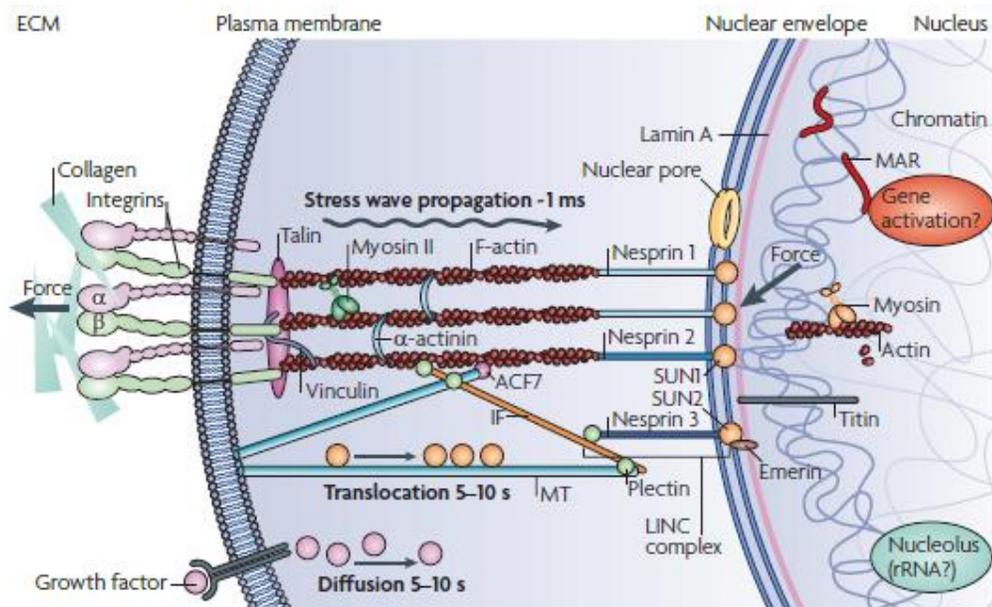


Figura 4. Representación de algunas de las cascadas de señalización que son inducidas por la interacción del colágeno en la MEC. Tomado de (Wang & Tytell, 2009).

Hidrogeles

Los hidrogeles son cadenas entrelazadas de polímeros capaces de almacenar agua gracias a los grupos funcionales ubicados en su estructura (Ahmed, 2015) y formar un ambiente 3D similar al de la mayoría de los tejidos, además facilitan el transporte de oxígeno, nutrientes, desechos y simulan el transporte de moléculas de manera muy aproximada a los ambientes naturales del cuerpo humano (Nguyen & West, 2002).

Estos se pueden clasificar en naturales y sintéticos, los primeros derivados de fuentes naturales como el colágeno, ácido hialurónico (AH), fibrina, alginato, agarosa y quitosano, pueden extraerse de la matriz extracelular de mamíferos o algas y servir para diferentes propósitos, además de ser bioactivos, biocompatibles y tener baja toxicidad. En segundo lugar están los sintéticos que pueden ser creados a través de métodos como la foto o termo polimerización, los materiales más comunes son el polihidroxietilmetacrilato (PHEMA), el polietilenglicol (PEG) y el polivinil alcohol (PVA). Las ventajas que estos suponen son el control de propiedades mecánicas, densidad del agente entrecruzante y biodegradación, con la desventaja de ser más citotóxicos y menos biocompatibles (Peppas, Hilt, Khademhosseini, & Langer, 2006).

Al haber una gran variedad de hidrogeles con propiedades distintas, pueden aplicarse en diversas situaciones, como el llenar el espacio entre tejidos, transportadores de biomoléculas, servir de estructuras tridimensionales que organicen a las células y otorgar estímulos adecuados para la formación de estímulos deseados (Drury & Mooney, 2003). No todos los hidrogeles promueven la adhesión celular por si solos, como es el caso de la poliacrilamida, esta necesita ser combinada o “funcionalizada” con otras moléculas que permitan esta interacción (Drury & Mooney, 2003). En contraste con lo anterior, existen los hidrogeles de alta biocompatibilidad como el Matrigel, hecho de extracto de matriz extracelular, que contiene laminina-111, colágeno IV, heparán sulfato, nidógeno-1 y factores de crecimiento como el factor de crecimiento del fibroblasto, factor de crecimiento transformante beta, el factor de crecimiento epidermal, entre otros. Este biomaterial ha sido usado para estudiar la progresión del cáncer (Benton, Kleinman, George, & Arnaoutova, 2011),

diferenciación celular, para cultivar explantes de una gran variedad de tejidos (Kleinman & Martin, 2005), por mencionar algunas de sus aplicaciones.

Polimerización

La manera en que los monómeros son ensamblados en cadenas poliméricas juega un papel clave en propiedades del hidrogel como elasticidad, viscosidad, dureza y resistencia a la temperatura.(Maitra & Shukla, 2014), dependiendo de la naturaleza del monómero es el tipo de polimerización a usar, en cualquiera de los casos, la estructura de este es alterada por el proceso de entrecruzamiento que se usa.

Dichos métodos pueden dividirse en dos tipos: los químicos y los físicos, los primeros se logran comúnmente a través de la polimerización por radicales de monómeros de bajo peso molecular, en presencia de agentes entrecruzantes que sirven como catalizadores de la reacción, la ventaja de este método es que algunas propiedades del hidrogel se pueden modular a través de la concentración de agente entrecruzante usado, pero los radicales libres (RL) liberados en el proceso pueden ser citotóxicos para las células así que se debe de evaluar su biocompatibilidad(Hennink & van Nostrum, 2012), así como la purificación del producto final. Los métodos físicos se caracterizan por evitar el uso de agentes entrecruzantes, por lo que la integridad de las moléculas bioactivas usadas es conservada en mayor medida, en consecuencia la biocompatibilidad aumenta, el inconveniente es que las propiedades mecánicas no son tan buenas y modulables en comparación con los métodos de polimerización químicos (Akhtar, Hanif, & Ranjha, 2016).

Acrilamida y poliacrilamida

La acrilamida (AA) es un monómero cristalino, blanco y altamente soluble en agua que se obtiene de la hidratación del acrilonitrilo. Su forma polimérica, la poliacrilamida (PA) (Figura 5), se usa principalmente en la investigación en técnicas como la electroforesis, cromatografía y en la microscopía electrónica, así mismo tiene aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales (Siyam, 2001) y elaboración de papel (Yuan & Hu, 2017). Su forma de monómero es neurotóxica, causando alucinaciones y entumecimiento de las extremidades, una vez que se polimeriza pierde estos efectos citototóxicos (Saboktakin, 2014).

El uso de PA ha llamado la atención en el campo del cultivo celular ya que cuenta con un rango amplio de propiedades mecánicas que pueden ser modificadas a través de las concentraciones del monómero y del método de polimerización. Lo anterior ha llevado a este material a contar con una gran cantidad de protocolos para la preparación de hidrogeles destinados en el uso en cultivo celular (Caliari & Burdick, 2016).

Por otro lado el uso de AC supone varias desventajas en el cultivo celular, la que se encuentra más frecuentemente en la literatura es que a pesar de tener una buena biocompatibilidad, por sí solo este material no es suficiente para promover la adhesión y proliferación celular, necesita ser funcionalizado y/o agregársele elementos bioactivos que auxilien en estos procesos. Así mismo se ha encontrado que cuando este polímero tiene un módulo de elasticidad bajo, tiende a presentar una topografía irregular e impredecible, lo cual es poco atractivo si se quieren desarrollar protocolos estandarizados para cultivo celular con resultados pronosticables (Saha et al., 2010). Por último, las metodologías de cultivo celular con poliacrilamida se limitan a su uso en cantidades pequeñas, ya que utilizar este polímero en grandes superficies puede resultar en un manejo complicado que afecte su topografía, por lo que trabajar con lotes pequeños es lo más recomendable (Syed, Karadaghy, & Zustiak, 2015).

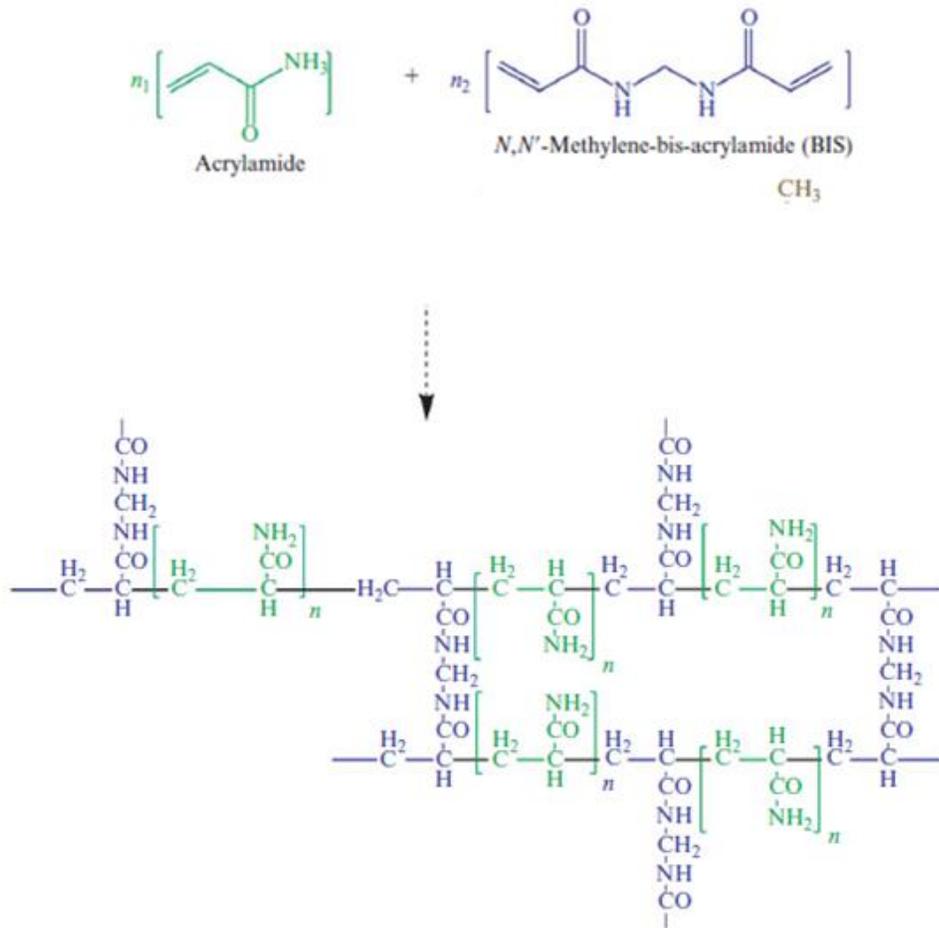


Figura 5. Polimerización de PA. Tomado de (Kadow, Georges, Janmey, & Beningo, 2007)

Fotoiniciadores

Son compuestos capaces de convertir energía lumínica a energía química en forma de especies iniciadoras, RL o cationes. Para que esto ocurra las bandas de absorción del fotoiniciador deben de sobrelaparse con las de emisión del espectro de la fuente de luz (Photoinitiators, 2001). Una vez que los radicales libres del fotoiniciador han interactuado con los monómeros, se unen dejándolos con un radical libre que a su vez se unirá a los demás monómeros y comenzarán a formarse cadenas hasta que la reacción finalice, formando así una red de cadenas. La activación y uso del fotoiniciador genera radicales libres que pueden resultar citotóxicos para las células en ciertas concentraciones, por lo que realizar ensayos de biocompatibilidad en los hidrogeles polimerizados a través de este método deben de ser realizados.

Existen una gran variedad de fotoiniciadores por RL, pero los más usados son los iniciadores azo y los peróxidos, los cuales pueden variar en eficiencia, en el tipo del radical formado y el tipo de cadena formada, lo cual los hace atractivos por adaptarse al tipo de producto deseado (Wako Pure Chemical Industries, 2016).

2,2'-Azobis (2-amidinopropano) diclorhidrato

También conocido como AIBA (Figura 6), es un iniciador de radicales libres, soluble en agua que puede ser activado térmicamente o por exposición a luz, está clasificado como un iniciador Azo ya que cuenta con un grupo Azo ($R-N=N-R'$). Este compuesto forma grupos carbono al activarse y las cadenas de polímeros que genera son lineales (Wako Pure Chemical Industries, 2016). Se han realizado estudios en donde se concluye que algunos de los RL remanentes de la reacción de polimerización son directamente citotóxicos o pueden reaccionar con el oxígeno formando radicales alcoxi y peroxi (Krishna et al., 1994).

Como iniciador de reacciones de polimerización en hidrogeles, ha sido usado para formar microgeles de N-isopropilacrilamida, metilénbiscarilamida y vinilbenzilisothioni (NIPAM), (MBA) (VBIC) (Meunier, Pichot, & Elaïssari, 2006). Cabe mencionar que este fotoiniciador ha sido poco utilizado en comparación de otros en la síntesis de hidrogeles, prueba de esto es la poca información bibliográfica encontrada en artículos y en libros acerca de sus efectos en células animales.

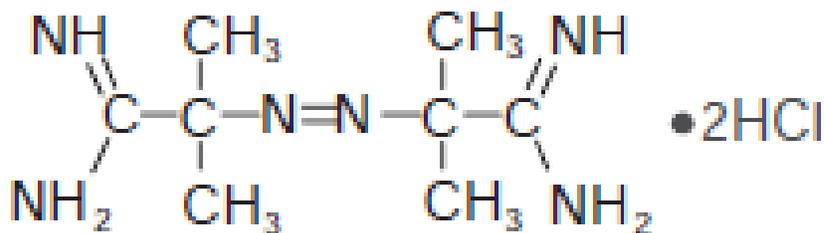


Figura 6. Estructura química del AIBA. Tomado de (Sigma- Aldrich, 2019).

Funcionalización de hidrogeles

A pesar de las ventajas que supone el uso de hidrogeles como la poliacrilamida en el cultivo celular, por sí solos no contienen moléculas bioactivas y son químicamente inertes, esto afecta directamente el comportamiento celular, pudiendo resultar en la expresión de un fenotipo distinto (Loessner et al., 2016) . En respuesta a este problema la funcionalización de hidrogeles busca incorporar biomoléculas a su estructura, estimulando a las células como lo haría el ambiente nativo. Para esto es necesario activar dichos materiales (Figura 7) de tal forma que puedan unirse a las moléculas de interés de manera estable.

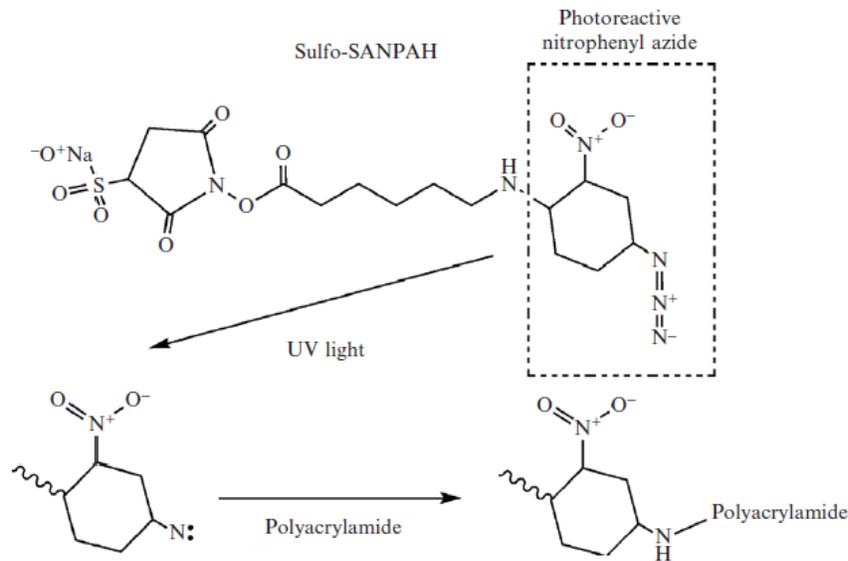


Figura7. Activación de PA mediante Sulfo-SANPAH y luz UV. Aquí el grupo reactivo nitrofenil azida se expone a luz UV de (320-350nm) para formar un grupo nitreno que puede reaccionar de manera inespecífica con la PA. Además el grupo sulfosuccinimidil también puede reaccionar con los grupos amino de las proteínas. Tomado de (Kadow et al., 2007).

3. Diseño de biomateriales

Características de un biomaterial

La ingeniería de tejidos es la fabricación de tejidos y órganos artificiales usando biomateriales que brinden un ambiente con los estímulos correctos para que las células respondan a ellos, y puedan realizar sus funciones de la manera en que lo harían en un ambiente in vivo (ISO 10993-5, 2009). Por lo tanto, para que un andamio celular pueda considerarse apto para usarse en la ingeniería de tejidos, debe de cumplir con ciertos requerimientos los cuales son biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas adecuadas, que la arquitectura del andamio sea la correcta y que las técnicas de manufactura del andamio sean accesibles y costeables. Para que el biomaterial sobre el cual el órgano, tejido o células interactuaran se catalogue como “diseñado”, debe de contar con 4 factores,

los cuales son andamio celular, células, bioreactor y factores de crecimiento (O'Brien, 2011).

Biocompatibilidad

Se refiere a la interacción de un sistema biológico con un material, y que esta no resulte ser tóxica o dañina para el sistema (Paleos, 2012). Para evaluar la biocompatibilidad de un material es necesario seguir un protocolo ya estandarizado y aceptado, para así poder tener un marco de referencia que nos permita comparar con otros estudios realizados de la misma manera el grado de sinergismo que existe entre estos, de lo contrario puede que los resultados se presten a interpretaciones diferentes y el método o producto obtenido de la investigación no pueda replicarse en otros lugares, o bien no sea comercializable ya que existirán dudas de su funcionamiento. Existen diferentes maneras de evaluar la biocompatibilidad de un material, estas dependen de la naturaleza del mismo o de la naturaleza del sistema biológico con el que estará en contacto al momento de su uso, los métodos considerados para evaluar la biocompatibilidad según la Food Drug Administration (FDA) son: citotoxicidad, sensibilización, hemocompatibilidad, pirogenicidad, implantación, genotoxicidad, carcinogenicidad, toxicidad reproductiva, en el desarrollo, y evaluación de degradación (Goode, 2016).

Desde que la poliacrilamida empezó a ser usada como biomaterial, fue sujeta a estudios que evaluaron su biocompatibilidad para destinarla a usarse en la cirugía reconstitutiva de tejidos blandos, gracias a que cuenta con la característica de degradarse lentamente y que no se desplaza entre tejidos (Bello et al., 2007; Christensen, Breiting, Aasted, Jørgensen, & Kebuladze, 2003; Von Buelow & Pallua, 2006). Además su toxicidad, comportamiento en relación a otros tejidos blandos, mamarios y glandulares, han sido bien caracterizados. (Christensen et al., 2003; Yang, 2008)

Citotoxicidad

Cualidad que tiene un compuesto de ser tóxico para las células, medir esta cualidad y relacionarla con la viabilidad de células en crecimiento es un recurso ampliamente usado para predecir el potencial tóxico que tendrá un material en un organismo (Riss, Moravec, & Niles, 2011). Existen dos métodos para evaluar esta propiedad, el cuantitativo y el cualitativo; este último se obtiene a partir de examinar las células microscópicamente y se presta especial atención en cambios de morfología, vacuolización, desprendimiento, lisis celular e integridad de la membrana. El método cuantitativo mide la muerte celular, la inhibición del crecimiento, la proliferación, la formación de colonias a través del número de células, cantidad de proteínas, enzimas liberadas, síntesis de colorantes y cualquier otro método que pueda ser cuantificado. Es importante señalar que cuando la viabilidad desciende de 70% el material se considera citotóxico, aunque también existe una clasificación para materiales evaluados en este criterio (Tabla 1) (ISO 10993-5, 2009).

Tabla1. Clasificación de citotoxicidad por morfología y viabilidad celular (ISO 10993-5, 2009).

Clasificación	Reactividad	Condición de los cultivos
0	Ninguna	Gránulos citoplasmáticos discretos, no hay lisis celular, no hay reducción en el crecimiento celular.
1	Poca	No más del 20% de las células están redondas, desadheridas o con gránulos intracitoplasmáticos. Pocas células muestran cambios en morfología y hay poca lisis observable.
2	Mediana	No más del 50% de las células están redondas, hay gránulos intracitoplasmáticos considerables, hay lisis y cambios morfológicos en menos del 50% de las células.
3	Moderada	No más del 70% de las células están desadheridas o lisadas, las membranas celulares están parcialmente dañadas, hay inhibición en del 50% del crecimiento celular.
4	Severa	Casi el 100% de las células tienen la membrana destruida.

Evaluación de citotoxicidad a través de MTT

El bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), es un reactivo usado para evaluar la actividad mitocondrial de las células, el mecanismo celular exacto aún no se entiende completamente, pero se sabe que el NADH u otras moléculas reductoras que transfieren electrones, participan en esta reacción, en donde el colorante amarillo del MTT se reduce produciendo formazan de color púrpura, para después ser expulsado de la célula mediante exocitosis en forma de cristales (Goodwin, Holt, Downes, & Marshall, 1995; Liu, Peterson, Kimura, & Schubert, 1997). El formazan metabolizado, puede ser después solubilizado y cuantificado en un espectrofotómetro a 570 nm para evaluar la cantidad de células que se encuentran metabólicamente activas, convirtiendo a este procedimiento en un ensayo colorimétrico.

Este ensayo de viabilidad celular es ampliamente aceptado y usado por la comunidad científica para la evaluación de la proliferación y metabolismo celular, gracias a que está ampliamente caracterizado y estandarizado, apareciendo en una gran cantidad de artículos publicados. Aunque este también supone varias desventajas, como la interferencia del rojo fenol en la lectura, la evaporación del solvente y que el pH de la solución influye en la lectura de la muestra (Plumb, Milroy, & Kaye, 1989). Otros problemas con el uso de este reactivo tienen que ver con el daño a la membrana que puede ocurrir al momento de la exocitosis de los cristales de formazan, que pueden dañar a la misma célula o a otras, por último uno de los problemas más grandes es que se debe de tener especial cuidado en usar las mismas condiciones de cultivo entre experimentos a que hasta pequeños cambios en la concentración de glucosa pueden alterar el metabolismo celular, dando origen a resultados que no reflejen los objetivos de la investigación (Riss et al., 2013).

Capítulo 2: Antecedentes

Antecedentes

Desde que el ser humano adquirió la capacidad de fabricar herramientas, el diseño de biomateriales ha estado presente en nuestras vidas, todo empezó reemplazando miembros perdidos con materiales como madera y vidrio, pero con el pasar de los años, estos se volvieron más complejos tanto en diseño como en complejidad del material usado, y no fue hasta los inicios del siglo 20 que empezaron a ser reemplazados con polímeros sintéticos, cerámicas y aleaciones de metal, que otorgaban mejor rendimiento, mejoraban la funcionalidad y eran más reproducibles (Nathaniel Huebsch and David J. Mooney, 2010)

A finales de los años cuarenta un oftalmólogo inglés llamado Harold Ridley, se dio cuenta de que el metacrilato que pilotos de aviones de la segunda guerra mundial tenían incrustado en los ojos, producto de escombros generados por fuego enemigo, no se infectaban y parecía haber regeneración tisular alrededor. El concluyo que este material era bueno para fabricar lentes intraoculares, los cuales son ahora son usados por alrededor de 10 millones de personas en todo el mundo (Ratner & Bryant, 2004).

Al principio se buscaba crear materiales inertes que evitaran el rechazo y que interactuaran de manera mínima con el huésped, pero pronto se empezó a probar la idea de unir componentes biológicos activos a la superficie de materiales sintéticos con el objetivo de que adquirieran la capacidad de promover la regeneración tisular, reclutar poblaciones celulares específicas, mandar señales que coordinen dichos procesos y facilitar la interacción célula-biomaterial. El objetivo era mimetizar el ambiente nativo de los tejidos blanco lo más posible, para esto aparecieron nuevos tipos de polímeros como los hidrogeles, que son capaces de albergar biomoléculas y fármacos en su interior liberándolos de forma controlada, características mecánicas como tamaño de poro y módulo de elasticidad pueden

ser moduladas, así como la estructura tridimensional de su superficie (Ratner & Bryant, 2004).

Un ejemplo de las aplicaciones que se le pueden dar a estos materiales lo da el PEG, a este polímero se le han logrado funcionalizar proteínas mediante inmovilización covalente, adsorción o interpenetración, incluso se ha logrado crear una interfaz con metales con oro y titanio, en donde por un lado está unido a dichos materiales y por el otro está recubierto con proteínas (Dalsin, Hu, Lee, & Messersmith, 2003).

Así como existen biomateriales sintéticos fabricados junto con componentes biológicos, también los hay de material de origen natural exclusivamente, tal vez uno de los casos más representativos lo da el Matrigel, un extracto de proteínas de la membrana basal, derivado de tumores EHS, que forma un gel a 37°C, ampliamente usado para cultivo de células, diferenciación y crecimiento de tumores (Kleinman & Martin, 2005). Este material se creó disgregando células de un tumor, para formar un hidrogel compuesto de una cantidad muy diversa de biomoléculas tales como: laminina, colágeno tipo 4, nidógeno, heparan sulfato, proteasas y factores de. Ahora se estudian sus efectos en diferentes líneas celulares, explantes de tejidos, cultivos primarios y células madre.

La primera vez que la poliacrilamida fue usada en conjunto con células fue hace más de 40 años por Schnaar & Kuhlenschmidt (1978), y se usaron hepatocitos, aunque estos no interactuaron directamente con la PA, ya que esta solo fue usada para inmovilizar azúcares. Más adelante trabajos como el de Oliver *et al.*, (1998) ya empezaban a funcionalizar la PA con otras proteínas y a dársele tratamientos con otros agentes para mejorar características como la adhesión y reducir el tiempo de hinchamiento.

A la par de estas investigaciones se fueron descubriendo diferentes métodos para conjugar elementos a la poliacrilamida, como el descrito por Robert J. Pelham, JR., (1997), en donde se usó el sulfo-SANPAH, que contiene un grupo fenilazida que reacciona de manera no específica con la poliacrilamida en presencia de luz uv y un grupo sulfosuccinimidyl que reacciona con aminas primarias de la PA. Además de este método existen otras alternativas como el desarrollado por Lagerholm & Jacobson (2005) en donde la superficie de este material se redujo con hidrato de hidrazina para alterar los grupos amida, la desventaja de esto es que solo se pueden utilizar proteínas que estén oxidadas con grupos aldehído y cetona para que el enlace covalente pueda formarse. En contraste se han desarrollado técnicas que cargan negativamente la poliacrilamida, permitiendo que aminoácidos con carga positiva puedan unirse electrostáticamente a la superficie y de esta manera conservar en mayor medida las propiedades nativas de las proteínas (Rooij et al. 20005).

Existen trabajos que han tenido como objetivo funcionalizar proteínas a la superficie de hidrogeles de PA para su uso en cultivo de células, intentando evaluar el efecto de variar características propias del hidrogel, usando diferentes métodos de polimerización, funcionalización y variando el tipo de proteínas añadidas. Como el realizado por Syed et al., (2015) en donde después de unir colágeno a la superficie de hidrogeles de poliacrilamida con diferentes módulos de elasticidad, se evaluó si estos eran capaces de promover la adhesión de células MDAMB-231, o el desarrollado por Chaudhuri et al., (2011) en donde se buscó copiar la elasticidad lateral de los músculos en hidrogeles de PA funcionalizados por colágeno para mimetizar el microambiente mecánico de estos tejidos, también ha habido esfuerzos por incorporar colágeno a la PA de manera ubicua para así generar un ambiente propicio para el crecimiento celular no solo en la superficie, permitiendo que las células puedan incorporarse al interior de este material (Baek et al., 2015).

Todos estos trabajos han tenido como conclusión que la PA es un buen material para usarse en cultivo celular, y que además la manera en que las células responden a este material depende de muchas variables que pueden controlarse a la hora de su fabricación, por lo que es importante conocer las características del ambiente nativo de las células a las que se va a cultivar.

OBJETIVOS

Generales

- Diseñar un hidrogel de poliacrilamida funcionalizado con colágeno capaz de promover el crecimiento celular

Específicos

- 1.Evaluar el efecto de la poliacrilamida polimerizada con el fotoiniciador AIBA sobre el crecimiento de células de vertebrado.
- 2.Evaluar el efecto de la poliacrilamida funcionalizada con colágeno sobre células de vertebrado.

HIPÓTESIS

El hidrogel de poliacrilamida funcionalizado con colágeno será un sustrato capaz de promover la proliferación celular en mayor medida que siendo cultivadas sobre una placa de cultivo.

JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de nuevos métodos de cultivo celular han permitido evaluar sistemas biológicos en condiciones cada vez más complejas, con el inconveniente de no ser adaptables a todos los sistemas y tener precios muy elevados, derivando en la necesidad de crear nuevas tecnologías más accesibles como los hidrogeles de poliacrilamida. Estos han sido propuestos como sustrato para cultivo celular, ya que son un material de uso común, accesible, sus propiedades son altamente modulables y existen una gran cantidad de protocolos para su elaboración, además su superficie puede ser funcionalizada con proteínas, otorgándole a las células un soporte más integral.

Sin embargo poco se sabe del potencial que tiene el uso de fotoiniciadores como AIBA para la polimerización de este material y su funcionalización con colágeno para su aplicación en cultivo celular. Por lo tanto el presente trabajo pretende evaluar el efecto de dichas condiciones sobre la viabilidad de células de vertebrado, probando así la capacidad de la poliacrilamida de convertirse en un sustrato adecuado para cultivo celular.

CAPÍTULO 3: Desarrollo Experimental

SÍNTESIS DE HIDROGEL

Para preparar el hidrogel de PA al 8% se utilizó la metodología de (Tse & Engler, 2010). Para este propósito se elaboró una solución de AA (Sigma-Aldrich,USA) al 40% y una de bis-acrilamida (Sigma-Aldrich,USA) al 2% stock con agua desionizada. A continuación las soluciones se mezclaron junto con 5.6 ml de agua desionizada, una vez que la solución se homogenizó por completo a través de agitación, se le añadieron 0.02g de fotoiniciador AIBA (Sigma-Aldrich,USA) y se mezcló en ausencia de luz. La solución fue después trasladada a jeringas de insulina estériles e introducidas a una cámara de luz UV (UVGL-25) a una distancia aproximada de 4 pulgadas durante 17 min a una longitud de onda de 365nm, para que así el fotoiniciador comenzara la reacción de polimerización. Una vez terminado el tiempo de exposición a la luz UV, las jeringas con el hidrogel se trasladaron inmediatamente a la campana de flujo laminar, ahí el hidrogel se expulsó cuidadosamente a una caja petri estéril y se cortó en secciones de aproximadamente 1mm de grosor con la ayuda de un bisturí y una hoja milimétrica. Por último las pastillas de hidrogel fueron almacenadas en un tubo cónico estéril con 10 ml de etanol al 70% a 4^oC.

ESTERILIZACIÓN Y EQUILIBRACIÓN DE HIDROGEL

Con el propósito de esterilizar los hidrogeles, diariamente durante una semana, se reemplazó la solución de etanol al 70% en la que se almacenaron, por etanol fresco con la misma concentración. Posteriormente, en el último día, una vez desechado el etanol se añadieron 10 ml de fosfato buffer salino (PBS) (Sigma-Aldrich,USA) estéril y se almacenó a 4^oC. Previo a realizar las pruebas de biocompatibilidad (5 días antes), el PBS del tubo cónico se desechó y se añadieron 15 ml de DMEM (Sigma-Aldrich,USA) para equilibrar el hidrogel.

DESCONGELACIÓN

Se utilizaron células 3T3 SWISS en pase 175 que se encontraban almacenadas en un criovial a -72°C . Este se llevó inmediatamente a la campana de flujo laminar y se froto suavemente con las manos hasta que todo el volumen fuera descongelado, inmediatamente se transfirió a un vial estéril y se añadieron 3 ml de DMEM completo, para centrifugarse a 1200 revoluciones por minuto a 18°C durante 5 minutos. Una vez finalizado el tiempo de centrifugación se llevó nuevamente a la campana de flujo laminar y se retiró el sobrenadante teniendo cuidado de no despegar el pellet celular, en seguida se resuspendió en 5 ml de DMEM completo y se añadió estreptomicina - penicilina (In Vitro) al 1%, por último se transfirió la suspensión celular a una caja de cultivo (Cell Treat) de 75cm^2 y se almacenó en una incubadora de CO_2 (Shel Lab) a 37°C bajo una atmósfera de CO_2 al 5%.

CAMBIO DE MEDIO

Se monitoreó el medio de cultivo diariamente y se cambió cada tercer día en condiciones estériles, antes de colocar el medio fresco, se enjuagó gentilmente con PBS estéril 3 veces, a continuación, se agregaron 5 ml de DMEM y estreptomicina-penicilina (In Vitro) al 1%, la caja se incubó a 37°C bajo una atmósfera de CO_2 al 5%.

Dentro de la campana de flujo laminar se retiró el medio de la caja de cultivo y se enjuagó gentilmente con PBS estéril 3 veces, a continuación, se agregaron 5 ml de DMEM completo fresco y estreptomicina – penicilina al 1%. La caja se almacenó en la incubadora 37°C bajo una atmósfera de CO_2 al 5%.

TRIPSINIZACIÓN

Se monitoreó diariamente la confluencia celular de las caja de cultivo, cuando esta llegaba al 80% se prepararon para llevar a cabo el proceso de tripsinización, que consiste en desadherir las células añadiendo 3 ml de verseno (EDTA, 0.5mM) y 200 ul de tripsina (Sigma-Aldrich, USA) en PBS, la caja se transfirió a la incubadora durante 7 minutos y una vez finalizado el tiempo de incubación se observaron las células en el microscopio a una magnificación de 4x para verificar que las células se despegaron completamente, una vez confirmado esto la caja se reintrodujo a la campana de flujo y se añadieron 3 ml de DMEM completo para inhibir la acción del verseno. Posteriormente la suspensión celular se transfirió a un tubo cónico de 15 ml para centrifugarse a 1200 rpm a 18°C durante 5 minutos. Terminado el tiempo de centrifugación, dentro de la campana de flujo laminar (Thermo Scientific) se retiró el sobrenadante cuidadosamente y se agregó 1 ml de DMEM completo, la solución se pipeteo hasta que el pellet celular se disgregara completamente. Por último, se tomaron 10 ul de suspensión celular y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga para posteriormente hacer conteo celular.

CONTEO CELULAR

A los 10ul de suspensión celular obtenidos en la etapa de tripsinización se le añadieron 30 ul de azul de tripano 4% (Sigma-Aldrich) para lograr una dilución 4:1, de esta solución se tomaron 10 ul y se transfirieron a una cámara de Neubauer con ayuda de una micropipeta. Se contaron solo las células de los cuadrantes de las esquinas a usando el objetivo de 10xen el microscopio óptico invertido (Labomed) y se utilizó la siguiente fórmula para obtener el número de células:

Células/ ml = (Total de células) (Factor de dilución / cuadrantes contados) x 10, 000

PLAQUEO

Una vez calculada la concentración celular se obtuvieron 1500 ul de suspensión celular con 10,000 cel/ml usando la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2 V_2$$

En una caja de 96 pozos (CELLTREAT) se sembraron por triplicado 100 ul de suspensión celular en concentraciones de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%, tomando como 100% 10,000 cel/ml, además se sembraron triplicados de control positivo (100% y agar), control de muerte (100% y dimetilsulfóxido (DMSO) y control negativo (medio completo); el DMSO de los controles de muerte se agregó 1 hora antes de realizar el ensayo de citotoxicidad.

Para obtener las diferentes concentraciones celulares en cada uno de los pozos asignados a 100% se agregó 100ul, a los que necesitaban concentraciones de 80% se les agregó 80ul y así hasta completar todos los pozos necesarios por día, por último se completó el volumen de 100 ul a todos los pozos que lo requerían con DMEM completo.

Lo anterior se realizó por triplicado, cada repetición en una placa de 96 pozos distinta para así evaluar el crecimiento celular durante 3 días de manera independiente, las células se almacenaron en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C durante 24 horas.

Una vez finalizado el tiempo de incubación se introdujeron puntas de micropipeta de 1000ul estériles y cortadas como se muestra en la figura 8, esto con el fin de poder introducir un hidrogel sintetizado con .02 g de fotoiniciador AIBA previamente equilibrado con DMEM en el pozo sin que este tocara la monocapa de fibroblastos, a continuación se añadieron 50 ul de DMEM completo para cubrir la superficie del hidrogel, las placas se almacenaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24, 48 y 72 horas respectivamente.

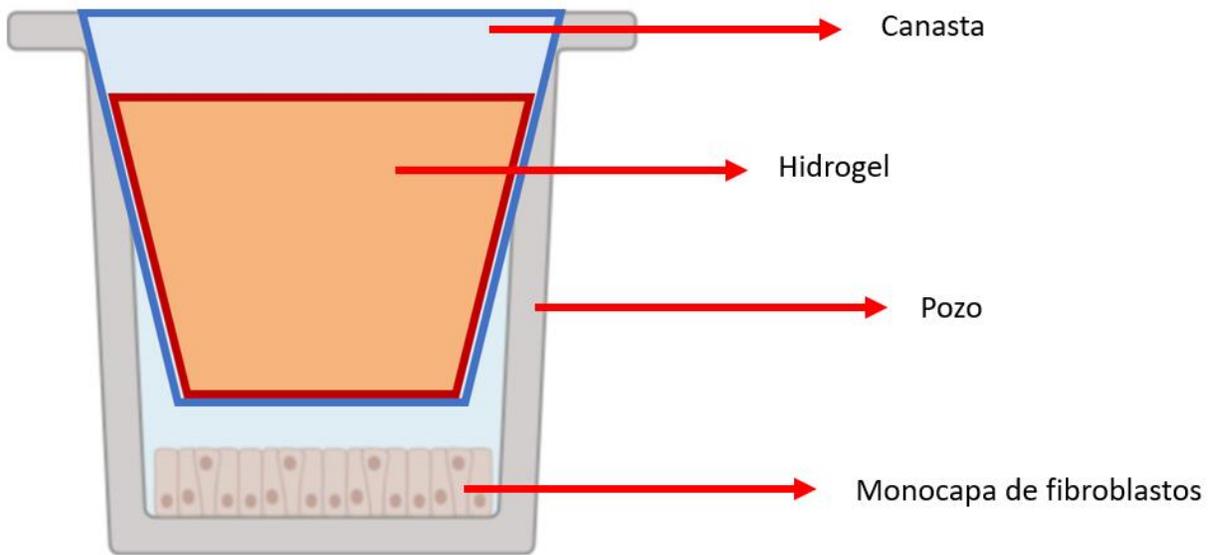


Figura 8. Modelo usado para evaluar el efecto de los hidrogeles en contacto indirecto con una monocapa de fibroblastos 3T3 Swiss.

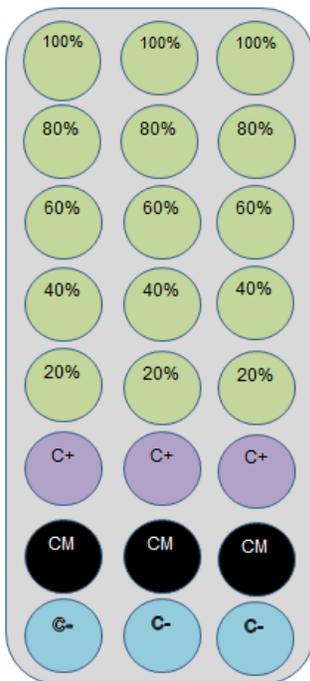


Figura 9. Diseño de placa para evaluación de biocompatibilidad. Se realizaron triplicados para cada una de las concentraciones y controles a evaluar, los tratamientos con hidrogel en suspensión celular están marcados como 100% (10,000cel/ml), 80% (8000cel/ml), 60% (6000cel/ml), 40% (4000cel/ml), 20% (2000cel/ml), además de los controles están marcados como control positivo (10,000 cel/ml y agar), control de muerte (10,000 cel/ml y 50ul de DMSO) y control negativo (medio completo).

MTT

Se prepararon 1100 ul de MTT (Sigma-Aldrich,USA) a una concentración de 0.5mg/ml para evaluar los biomateriales (hidrogeles). Antes de usarse la solución se esterilizó con un filtro de jeringa de 0.22um. Una hora antes de iniciar el ensayo de citotoxicidad, a los pozos marcados como control negativo se les añadieron 50 ul de DMSO y se dejó incubando durante una hora. A continuación, se retiraron las canastas con el hidrogel y el medio de los pozos, estos se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS estéril y por último se añadieron 50 ul del MTT previamente filtrado a todos los pozos. La placa fue protegida de la luz inmediatamente con papel aluminio y se dejó incubando durante 3 horas bajo una atmósfera de CO₂ a 37°C. Una vez finalizado el tiempo de incubación la solución de MTT se retiró de los pozos e inmediatamente se añadieron 50 ul de DMSO para disolver los cristales de formazan metabolizados por las células durante la incubación, para esto la placa se introdujo en un agitador orbital (Labnet) durante 10 minutos, al terminar se pipetearon cada uno de los pozos con la ayuda de una micropipeta para homogenizar aún más la solución y se transfirieron a pozos nuevos de la misma placa, por último se leyó en el lector de placas a 570 nm. Este procedimiento se repitió por cada día de viabilidad a evaluar.

FUNCIONALIZACIÓN DE HIDROGEL DE ACRILAMIDA CON COLÁGENO

Se polimerizaron 8 tipos de hidrogeles de PA al 8% variando la concentración del fotopolimerizador AIBA como se muestra en la Tabla 2. A estos hidrogeles se les dio el mismo tratamiento de esterilización y equilibración ya mencionado anteriormente.

Cada uno de estos fue trasladado a un pozo de una placa estéril en la campana de flujo laminar y a cada pozo se agregaron 150 ul de sulfo-SANPAH en concentración 2mg/ml, a continuación la caja se puso bajo una fuente de luz UV de 365 nm a una distancia de 3 pulgadas durante 10 minutos. Una vez finalizado el tiempo de exposición se retiró el sulfo- SANPAH y se enjuagaron los pozos 3 veces con HEPES 50 mM, pipeteando cuidadosamente para eliminar el exceso de sulfo-SANPAH. Se añadieron 150 ul de una solución de colágeno 0.10 mg/ml a cada uno de los pozos y se dejó incubando durante 12 horas a 37°C para que el colágeno se uniera a la

superficie del hidrogel. Una vez finalizado el tiempo de incubación, en la campana de flujo laminar se enjuagaron los hidrogeles con PBS hasta que la solución de colágeno se limpiara completamente, por último se esterilizó irradiando con luz UV durante 30 minutos.

Tabla 2. Cantidad de AIBA usado en la fabricación de los hidrogeles de PA.

Hidrogel	Cantidad de AIBA usado (g/ml)
1	8mg/ml
2	12mg/ml
3	16mg/ml
4	20mg/ml
5	24mg/ml
6	28mg/ml
7	32mg/ml
8	36mg/ml

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis ANOVA para observar si existió una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos con la versión STATGRAPHICS 2019.

CAPÍTULO 4: Resultados: Análisis y Discusión

Cultivo de fibroblastos en contacto indirecto con hidrogel de PA con 0.002g/ml de AIBA

Se evaluó el efecto que produce el contacto indirecto del hidrogel de poliacrilamida sobre la actividad metabólica de fibroblastos 3T3 Swiss, a través del ensayo de MTT (Fig. 1). Como control positivo se usaron fibroblastos sembrado directamente en los pozos con medio de cultivo (C+), como control de muerte a los fibroblastos con DMSO (CM), a pozos sin células como control negativo (C-) y el tratamiento con el hidrogel sintetizado con 20 mg/ml de AIBA (T).

Mediante el análisis ANOVA se encontró que las células en contacto indirecto con el hidrogel las primeras 24 horas ($0.11833333 \pm 0.01006645$) (Fig. 1A) no mostraron diferencia significativa con el control positivo (0.1126 ± 0.01193035) ($p < .05$), además se distribuyeron de manera homogénea el pozo (Fig. 2A). Al pasar 48 horas (Fig. 1 B), las células produjeron más formazan (0.166 ± 0.0127) que el control positivo ($0.12633333 \pm 0.00602771$) ($p < .05$). De igual manera estos se distribuyeron más homogéneamente en el pozo (Fig. 2 B y E). Por último, a las 72 horas de exposición al hidrogel (Fig. 1 C), hubo diferencia significativa entre el control positivo (0.202 ± 0.00818535) y el tratamiento (0.243 ± 0.01931321) ($p < .05$), siendo este último el que más formazan produjo. Se observó que la superficie cubierta por las células fue mucho mayor, teniendo en varias zonas del pozo un 100% de confluencia (Fig. 2 C y F).

Comparando la cantidad de formazan producido por el tratamiento y los controles a las 72 horas (Fig. 1 C), se puede observar que la presencia de los hidrogeles favoreció el crecimiento celular ($p < 0.05$).

Esto puede deberse al hecho de que los hidrogeles enriquecidos con DMEM suplementado tienen en su interior concentraciones mayores de factores que favorecen el crecimiento celular, y que además dichos factores son liberados continuamente; a diferencia de las células en pozos sin hidrogel cuyo microambiente no presenta las mismas cantidades de nutrientes ni presentan el mismo tipo de transporte. En estudios con otro tipo de hidrogeles se ha observado que el entrecruzamiento juega un papel importante en la capacidad de estos materiales para absorber elementos suspendidos en medios acuosos, así como su capacidad para liberarlos (Caliari & Burdick, 2016; H. Li, Wijekoon, & Leipzig, 2012), por lo que el proponer que la presencia de un hidrogel enriquecido con DMEM completo genera un microambiente favorable para las células es plausible.

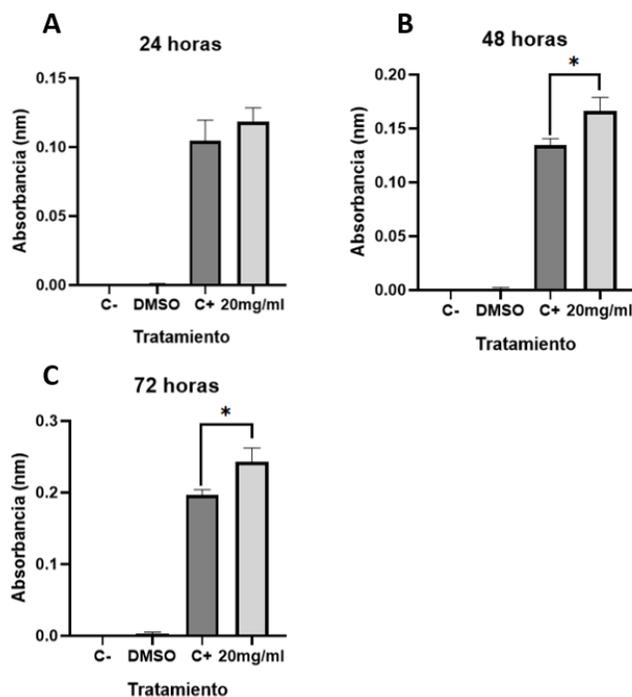


Figura 10. Comparación de medias de la concentración de formazan producido por los fibroblastos 3T3 Swiss. Estos fueron sembrados en contacto indirecto con el hidrogel de PA sintetizado con 20mg/ml de AIBA y los controles positivo (C+) y negativo (C-) y control de muerte (CM) a 24 (A), 48 (B) y 72 horas (C), n=23.

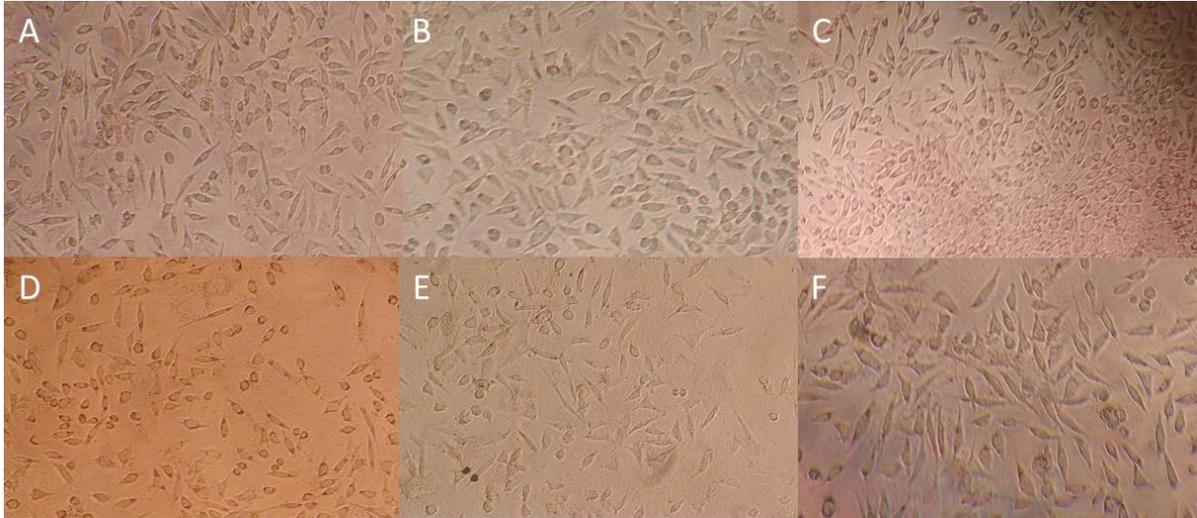


Figura 11. Fibroblastos en contacto indirecto con el hidrogel de PA. Estos fueron sintetizados con 2mg/ml de AIBA durante 24(A), 48 (B) y 72 horas (C) y sus respectivos controles D, E y F (10x).

SÍNTESIS DE HIDROGEL CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AIBA

Se observaron las variaciones en las características físicas (tamaño y relieve) de 8 hidrogeles de PA 8% polimerizados con diferentes concentraciones del fotoiniciador AIBA (8mg/ml, 12mg/ml, 16mg/ml, 20mg/ml, 24mg/ml, 28mg/ml, 32mg/ml y 36mg/ml) (Figura 12). Los hidrogeles preparados con concentraciones de 8mg/ml, 12mg/ml y 16mg/ml de AIBA (Figura 12A, 12B y 12C respectivamente) presentaron un relieve irregular y menor tamaño en comparación con el resto de los hidrogeles, además los que se polimerizaron en concentraciones de 8mg/ml, 12mg/ml de fotoiniciador (Figura 12A y 12B) presentaron una resistencia mínima a estímulos mecánicos, lo que resultó en una rápida desintegración al manipularlos. A concentraciones de 20mg/ml, 24mg/ml, 28mg/ml (Figura 12 D, E y F respectivamente) presentaron un relieve con pocas irregularidades y su consistencia permitió que fueran manipulados sin dañarse. Por último, los hidrogeles con concentraciones de 0.32mg/ml y 36 mg/ml de AIBA (Fig. 12G y 12H) presentaron características similares a los que contenían concentraciones de 20mg/ml, 24 mg/ml y 28 mg/ml (Fig. 12D, 12E y 12F respectivamente) con excepción de que al tacto presentaban una rigidez mayor.

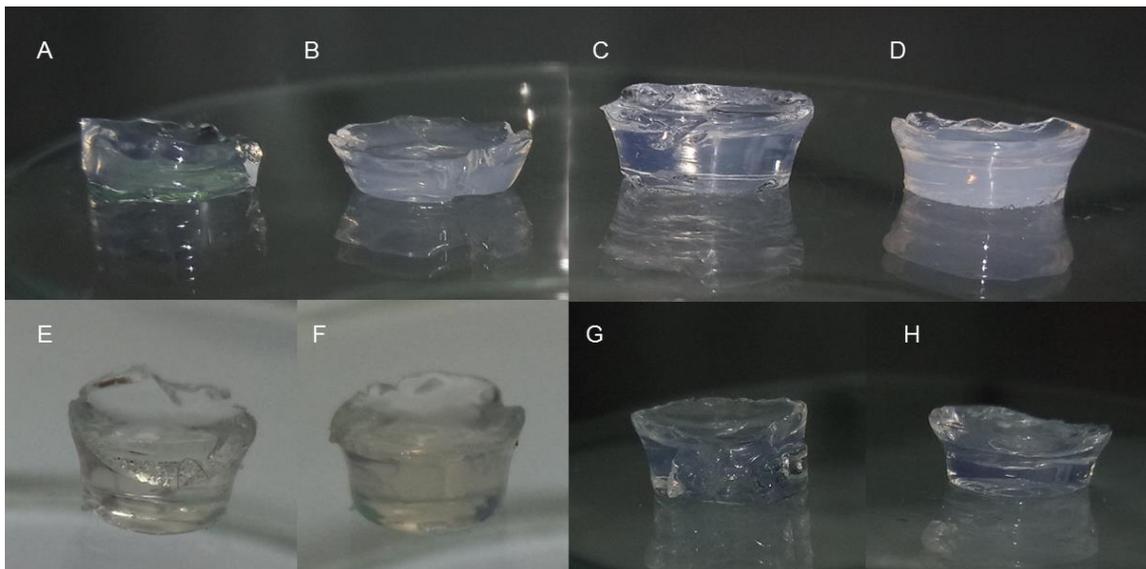


Figura 12. Hidrogeles de PA sintetizados con diferentes concentraciones de fotoiniciador AIBA. A: 8 mg/ml, B: 12 mg/ml, C: 16 mg/ml, D: 20 mg/ml, E: 24 mg/ml, F: 28 mg/ml, G: 32m g/ml y H: 36 mg/ml.

CULTIVO DE FIBROBLASTOS SOBRE HIDROGEL FUNCIONALIZADO CON COLÁGENO

Se evaluó el efecto de los hidrogeles de PA sintetizados con diferentes concentraciones del fotoiniciador AIBA (8mg/ml, 12mg/ml, 16mg/ml, 20mg/ml, 24mg/ml, 28mg/ml, 32mg/ml y 36mg/ml) en el crecimiento de fibroblastos 3T3 Swiss sembrados sobre la superficie del hidrogel funcionalizado con colágeno. Se consideró como blanco los pozos con medio de cultivo son células (B), como control positivo a los fibroblastos sembrados directamente en los pozos (C+), y para el control negativo a los fibroblastos con DMSO (CM).

Se propone que existe una relación entre el crecimiento de fibroblastos en los hidrogeles dependiente de la cantidad de fotoiniciador utilizado en la formulación del hidrogel, para esto nuevamente se el análisis ANOVA (Fig. 4). A las 24 horas de cultivo se observó un incremento en la concentración directamente proporcional a la concentración de AIBA usado en la síntesis de los hidrogeles 8mg/ml (1), 12mg/ml

(2), 16mg/ml (3), 20mg/ml (4) y 24mg/ml (5) (Fig. 4A). Siendo los hidrogeles 4 y 5 (0.291 ± 0.0235 y 0.3033 ± 0.04823 respectivamente) los que más estimularon la producción de este compuesto. La absorbancia registrada en los hidrogeles 1-5 (0.1793 ± 0.01625 , 0.17666667 ± 0.01021437 , 0.223 ± 0.0298 , 0.291 ± 0.0235 y 0.3033 ± 0.0482) fue significativamente más alta que el control positivo (0.1153 ± 0.0080) $p < 0.05$. Mientras que en los hidrogeles 6, 7 y 8 (0.15766667 ± 0.03808324 , 0.11233333 ± 0.0140119 y 0.007 ± 0.0043589) esta relación fue inversamente proporcional, es decir, a mayor concentración menor cantidad de formazan a las 24 horas de sembradas las células. El resumen del efecto que tuvieron las concentraciones de AIBA usado en la síntesis del hidrogel sobre el crecimiento celular se encuentra de manera resumida en la siguiente tabla:

Tabla 3. Efecto del uso del fotoiniciador AIBA en el crecimiento celular de fibroblastos 3T3 Swiss

Hidrogel	Absorbancia (nm)	Efecto	
		Estímulo crecimiento	Inhibió crecimiento
1 (8mg/ml)	0.1793 ± 0.01625	X	
2 (12mg/ml)	0.17666667 ± 0.01021437	X	
3 (16mg/ml)	0.223 ± 0.0298	X	
4 (20mg/ml)	0.291 ± 0.0235	X	
5 (24mg/ml)	0.3033 ± 0.04823	X	
6 (28 mg/ml)	0.15766667 ± 0.03808324		X
7 (32 mg/ml)	0.11233333 ± 0.0140119		X
8 (36 mg/ml)	0.007 ± 0.0043589		X
Control positivo	0.1153 ± 0.0080	N/A	N/A

Durante las primeras 24 horas (Fig. 6), los fibroblastos de los hidrogeles 1, 2, 3, 4 y 5 (Fig. 6 A, B, C, D y E) se adhirieron a la superficie del hidrogel y proliferaron de manera normal. Sobre la superficie del hidrogel sintetizado con 0.028g/ml de AIBA (Fig. 6F) se observaron células con morfología aberrante, y algunas otras se encontraban suspendidas en el medio de cultivo lo que indica una incompatibilidad entre el material y las células. Este fenotipo es característico de la muerte celular por Anoikis que se caracteriza por un cambio en la morfología celular y desadherencia al sustrato, ocasionado por cambios drásticos en la matriz extracelular (Gilmore, 2005).

La relación entre la cantidad de formazan producido por los fibroblastos a 48 y 72 horas y la concentración de AIBA usado fue similar que a 24 horas, los hidrogeles 4 y 5 en ambos días se mantuvieron como los que más estimularon la producción de este compuesto. De manera global se puede observar que la cantidad de formazan producido a las 72 horas por los hidrogeles 4 y 5 (0.556 ± 0.04058325 y 0.55666667 ± 0.04324735) fue significativamente mayor que la de los otros dos días (Fig. 4C), $p < .05$.

Transcurridas 48 horas de cultivo (Fig. 7), en los hidrogeles 1, 2, 3, 4, 5, y 6 (Fig.7 A, B, C, D, E y F respectivamente) se observó que la superficie se cubrió completamente por los fibroblastos, además su morfología fue, esta es una membrana ahusada con forma elíptica y simétrica, con un núcleo redondo y al centro. Es importante mencionar que los hidrogeles 5 y 6 fueron los que presentaron más confluencia. Al igual que el análisis a 24 horas, los fibroblastos sembrados en los hidrogeles 7 y 8 (Fig.7 G y H) se encontraban suspendidos en el medio, y mostraban signos de lisis ya que en el medio también se encontraron restos celulares.

Por último, a 72 horas de cultivo (Fig. 8) se observó que la superficie de los hidrogeles 1, 2 y 3 (Fig.8 A, B y C) estaba cubierta con menos células que 4 y 5 (Fig.8 y E), ya que se observó que en estos últimos se alcanzó el 100% de

confluencia celular en toda superficie. Por último, las células cultivadas en conjunto con los hidrogel 7 y 8 (Fig. 6 G y H) presentaron señales claras de daño celular como desadherencia al sustrato y presencia de vacuolas en el citoplasma, lo cual indica que las condiciones de síntesis de estos hidrogel no fueron lo suficientemente propicias para permitir el crecimiento de los fibroblastos.

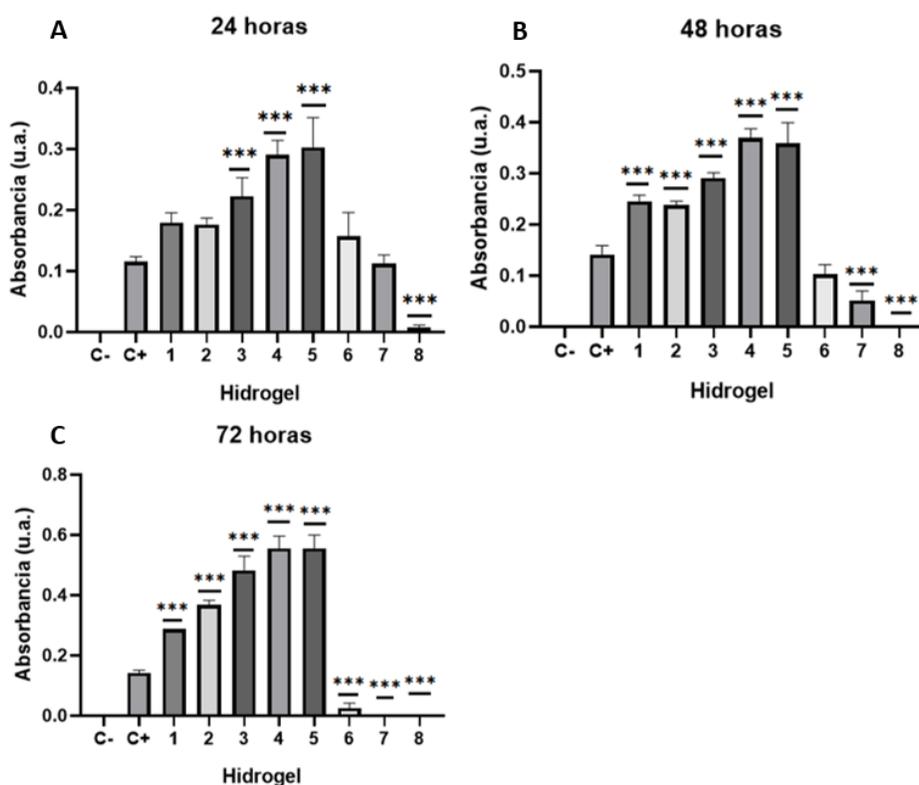


Figura 13. Comparación de medias del formazan producido por los fibroblastos 3T3 Swiss sembrados sobre los hidrogel sintetizados con diferentes concentraciones de AIBA. (B), control positivo (C+), hidrogel con 8 mg/ml de AIBA (1), 12 mg/ml (2), 16 mg/ml (3), 20 mg/ml (4), 24 mg/ml (5), 28 mg/ml (6), 32 mg/ml (7) y 36 mg/ml (8), n=30.

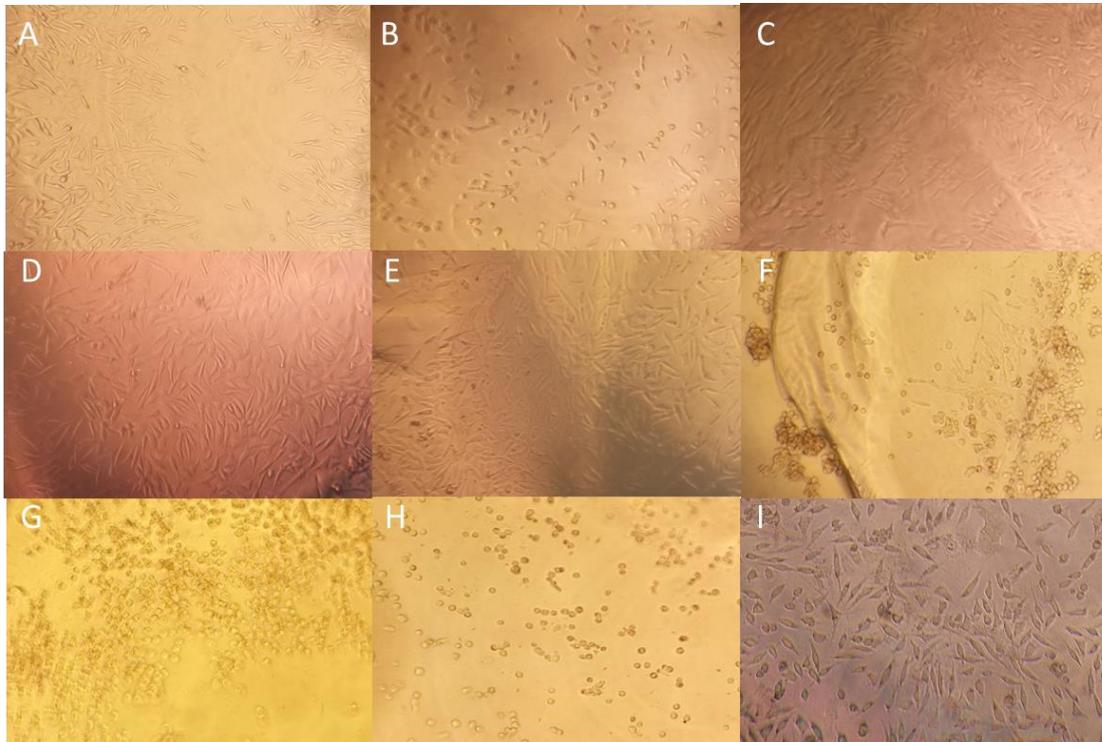


Figura 14. Micrografías de fibroblastos 3T3 Swiss sembrados sobre los hidrogeles sintetizados con diferentes concentraciones de AIBA las primeras 24 horas de cultivo. 8 mg/ml de AIBA (A), 12 mg/ml (B), 16 mg/ml (C), 20 mg/ml (D), 24 mg/ml (E), 28 mg/ml (F), 32 mg/ml (G) y 36 mg/ml (H) y control positivo de células sin hidrogel (I).

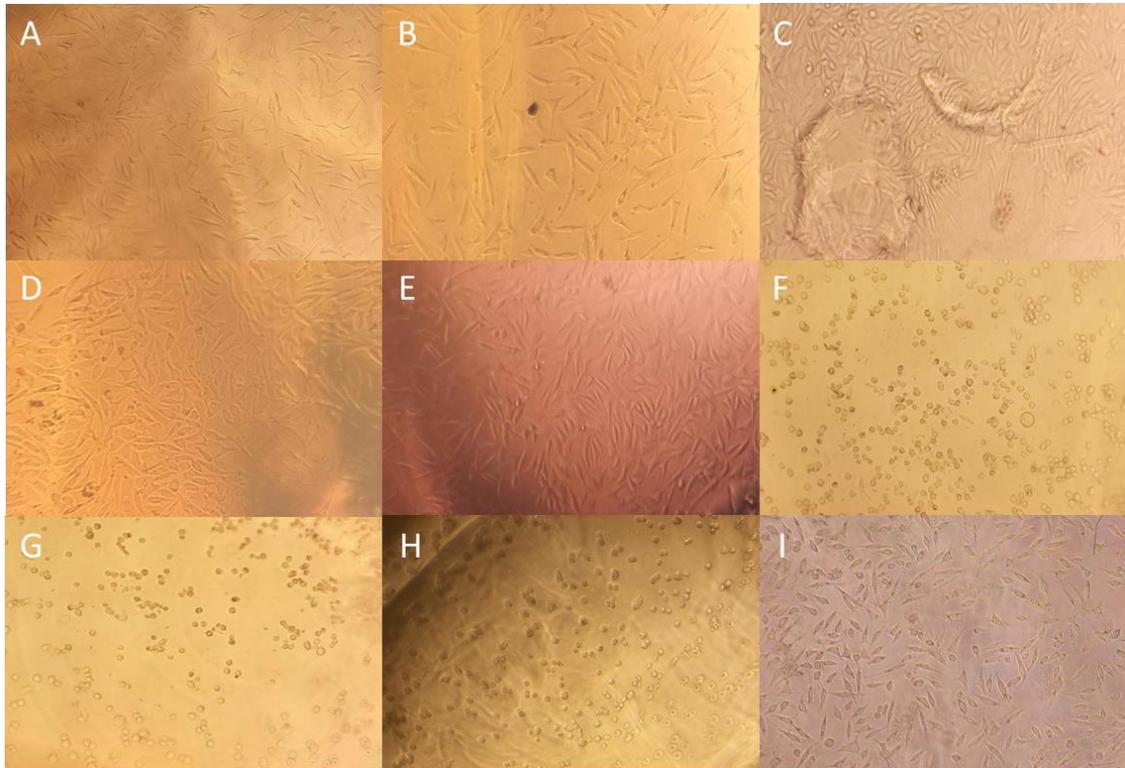


Figura 15. Fibroblastos 3T3 Swiss sembrados sobre los hidrogeles sintetizados con diferentes concentraciones de AIBA tras 48 horas de cultivo. Las concentraciones usadas fueron 8 mg/ml de AIBA (A), 12 mg/ml (B), 16 mg/ml (C), 2 mg/ml (D), 24 mg/ml (E), 28 mg/ml (F), 32 mg/ml (G) y 36 mg/ml (H) y control positivo (I) (10x).

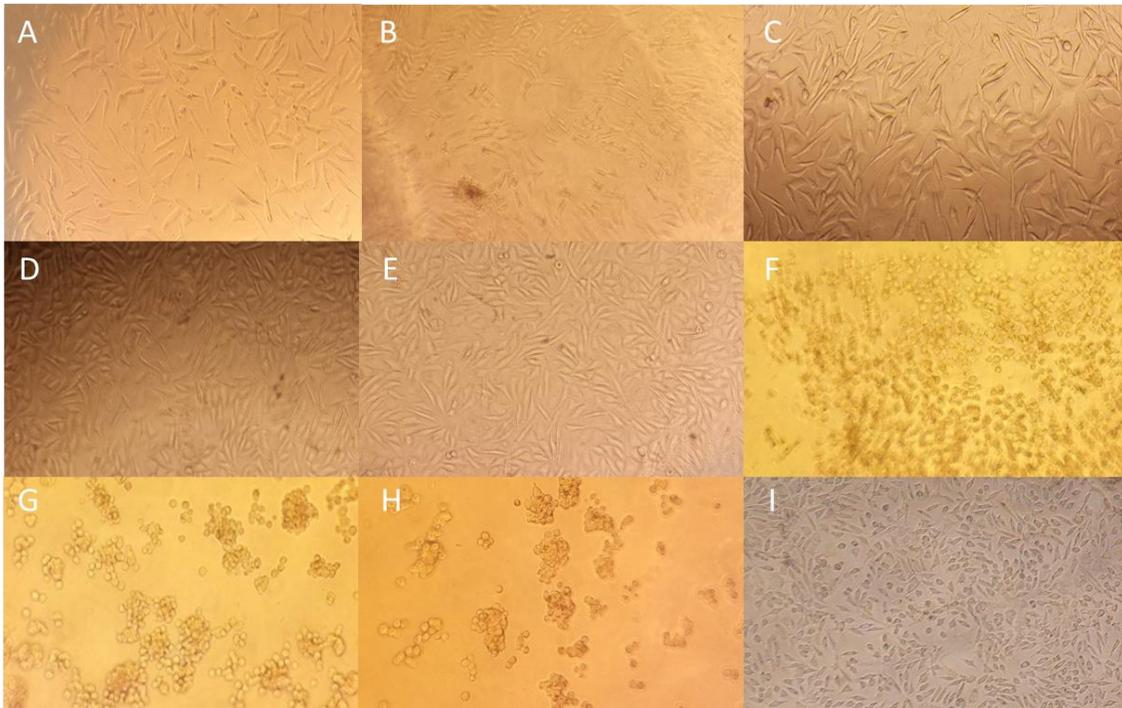


Figura 16. Fibroblastos 3T3 Swiss sembrados sobre los hidrogeles sintetizados con diferentes concentraciones de AIBA tras 72 horas de cultivo. 8 mg/ml de AIBA (A), 12 mg/ml (B), 16 mg/ml (C), 2 mg/ml (D), 24 mg/ml (E), 28 mg/ml (F), 32 mg/ml (G) y 36 mg/ml (H) y control positivo (I) (10x).

ANÁLISIS DE LA CITOCOMPATIBILIDAD

Para analizar el grado de citocompatibilidad de los hidrogeles de PA se siguió el procedimiento establecido por la ISO10993-5 usado para la evaluación biológica de equipos médicos. Brevemente, la citocompatibilidad se relacionó por medio de la medición de formazan producido, ya que como se ha mencionado con anterioridad, las células con actividad metabólica procesaran el MTT para formar este compuesto. Para calcular la viabilidad, se ocupó la siguiente fórmula:

$$Viabilidad(\%) = \frac{100 \times \text{promedio de valor es del tratamiento}}{\text{promedio de valores de los blancos o control positivo}}$$

En la figura 16 se puede observar los resultados de la citocompatibilidad de los hidrogeles evaluados, tomando como base el control positivo a las que corresponde a células que crecieron directamente en el pozo sin hidrogel. Los hidrogeles 1-5 sintetizaron más formazan que el control positivo, lo que indica que sobre su superficie había más células vivas y por lo tanto son citocompatibles bajo las condiciones estudiadas, siendo los hidrogeles 4 y 5 los que más estimularon a los fibroblastos. Por último los hidrogeles 6, 7 y 8 no cumplieron con el mínimo de biocompatibilidad necesario de acuerdo a la norma ya que presentaron una compatibilidad del $18.22\% \pm 0.0155$, $0\% \pm 0$ y $0\% \pm 0$.

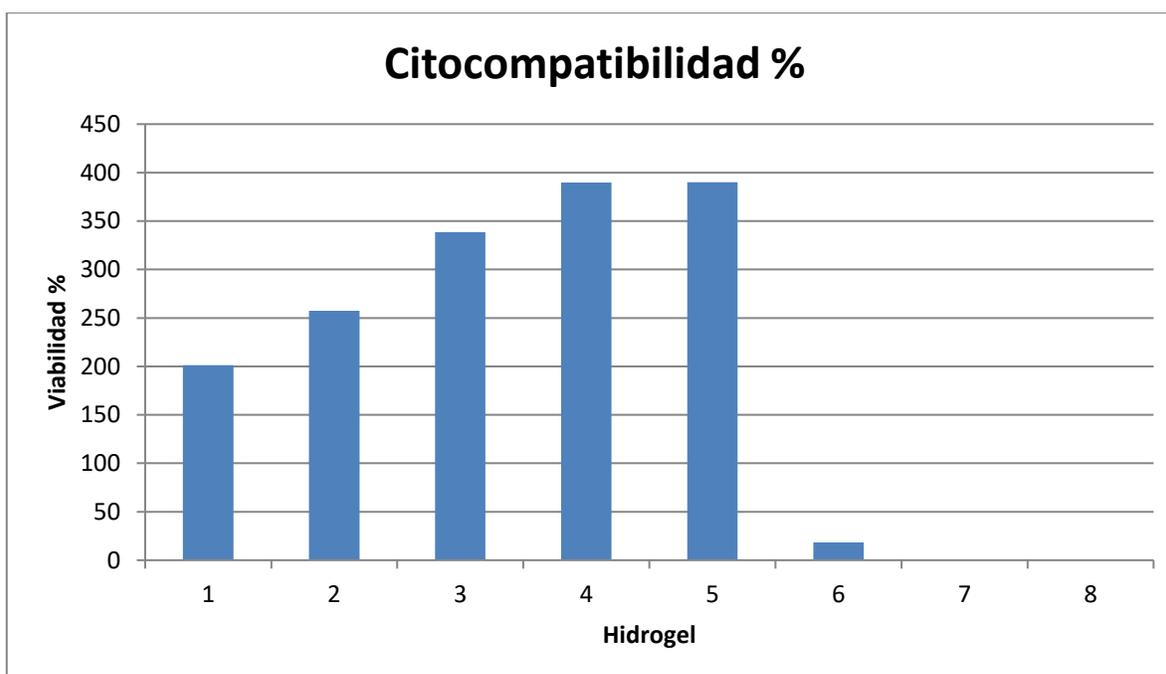


Figura 17. Citocompatibilidad de los hidrogeles funcionalizados con colágeno en función de la concentración de AIBA durante 3 días en contacto directo con el hidrogel con colágeno. Las concentraciones de AIBA usadas fueron 8 mg/ml de (1), 12 mg/ml (2), 16 mg/ml (3), 20 mg/ml (4), 24 mg/ml (5), 28 mg/ml (6), 32 mg/ml (7) y 36 mg/ml (8).

Aún en contacto indirecto, la presencia del hidrogel logró promover más el crecimiento de los fibroblastos que las condiciones normales de cultivo, esto puede deberse a que la poliacrilamida guardó una cantidad extra de medio y factores de crecimiento del suero fetal bovino en su interior, que se fue liberando gradualmente al medio durante los tres días de incubación. Esto concuerda con trabajos que han concluido que los hidrogeles son un buen almacenador y transportador de nutrientes, así como de proteínas (Caliari & Burdick, 2016; Lee, Cuddihy, & Kotov, 2008; R. H. Li, Altreuter, & Gentile, 2003; Wilson, Clegg, Leavesley, & Pearcy, 2005).

En relación a las diferentes propiedades mecánicas adquiridas por los hidrogeles de PA en base a la cantidad del fotoiniciador AIBA utilizado en su síntesis, se pudo observar un incremento en su rigidez directamente proporcional a la cantidad de fotoiniciador usado, esto se relaciona con trabajos como (Chaudhuri, 2017; Lee et al., 2008) en donde propiedades como el módulo de elasticidad y el tamaño de poro de hidrogeles pueden ser modulados cambiando factores al momento de la síntesis, un ejemplo muy claro de esto es la fabricación de hidrogeles para electroforesis con tamaños de poros estandarizados que permiten el paso de diversas biomoléculas. El aumentar la concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml la cantidad de AIBA en los hidrogeles 1 a 5 gradualmente, tuvo un efecto positivo en la proliferación celular (Fig.13). Las concentraciones 28 mg/ml 32 mg/ml y 36 mg/ml (hidrogeles F, G y H respectivamente) (Fig. 13) lograron formar un polímero más rígido a costa de disminuir la citocompatibilidad del hidrogel. Así mismo la cantidad de radicales libres producidos por el fotoiniciador excedió la que los fibroblastos pudieron tolerar, resultando en la muerte de estos en los hidrogeles 6, 7 y 8 (Fig.13). Por último, la presencia de colágeno en la superficie de los hidrogeles también fue un factor que moduló positivamente el crecimiento celular, ya que si comparamos la cantidad de formazan producido por los fibroblastos sembrados directamente en el pozo, contra la cantidad producida por ellos cuando fueron sembrados sobre el hidrogel funcionalizado, se hace notar que fue mayor en este último. En experimentos iniciales se intentó sembrar fibroblastos en la superficie de hidrogeles sin funcionalizar y se observó que muy pocos se adherían a la superficie, además los

que lograban hacerlo lo hacían débilmente, ya que cuando el polímero se retiraba de los pozos muchos fibroblastos perdían su forma y se desprendían.

CONCLUSIONES

Se creó una metodología para la polimerización y funcionalización de un hidrogel capaz de funcionar como sustrato compatible para fibroblastos de ratón 3T3 Swiss.

PERSPECTIVAS

Esto servirá como punto de partida para conocer mejor los estímulos a los que las células son expuestas y como estos impactan en su funcionamiento, para así algún día crear materiales que produzcan cultivos in vitro con fenotipos aún más parecidos a los observados in vivo, así como materiales que puedan ser utilizados directamente sobre lesiones y sean capaces de estimular a diversas poblaciones celulares de manera específica y controlada.

REFERENCIAS

- Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105–121.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>
- Akhtar, M. F., Hanif, M., & Ranjha, N. M. (2016). Methods of synthesis of hydrogels ... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 554–559.
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.022>
- Aung, A., Seo, Y. N., Lu, S., Wang, Y., Jamora, C., del Álamo, J. C., & Varghese, S. (2014). 3D traction stresses activate protease-dependent invasion of cancer cells. *Biophysical Journal*, 107(11), 2528–2537.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.078>
- Baek, K., Clay, N. E., Qin, E. C., Sullivan, K. M., Hyun, D., & Kong, H. (2015). In situ assembly of the collagen – polyacrylamide interpenetrating network hydrogel : Enabling decoupled control of stiffness and degree of swelling. *European Polymer Journal*, 72, 413–422.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.07.044>
- Bello, G., Jackson, I. T., Keskin, M., Kelly, C., Dajani, K., Studinger, R., ... Lee, A. (2007). The use of polyacrylamide gel in soft-tissue augmentation: An experimental assessment. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 119(4), 1326–1336. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000254824.13065.3b>
- Benton, G., Kleinman, H. K., George, J., & Arnaoutova, I. (2011). Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *International Journal of Cancer*, 128(8), 1751–1757.
<https://doi.org/10.1002/ijc.25781>
- Biosensors, C., Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug

Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 12(4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>

Birgersdotter, A., Sandberg, R., & Ernberg, I. (2005). Gene expression perturbation in vitro - A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in Cancer Biology*, 15(5 SPEC. ISS.), 405–412.

<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.06.009>

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, P. W. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). Garland Science.

Caliari, S. R., & Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Methods*, 13(5), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>

Chalfie, M. (2010). *Eukaryotic Mechanosensitive Channels*.

<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125836>

Chaudhuri, O. (2017). Viscoelastic hydrogels for 3D cell culture. *Biomaterials Science*, 5(8), 1480–1490. <https://doi.org/10.1039/c7bm00261k>

Christensen, L. H., Breiting, V. B., Aasted, A., Jørgensen, A., & Kebuladze, I. (2003). Long-term effects of polyacrylamide hydrogel on human breast tissue. *Plastic and Reconstructive Surgery*, Vol. 111, pp. 1883–1890.

<https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000056873.87165.5A>

Connie Rye, Robert Wise, Oshkosh Vladimir, Juru Kovski, Jung Choi, G. A. (2013). *Biology*.

Cukierman, E., Pankov, R., & Stevens, D. R. (2001). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Science Direct*, (May 2014).

<https://doi.org/10.1126/science.1064829>

Dalsin, J. L., Hu, B., Lee, B. P., & Messersmith, P. B. (2003). Mussel Adhesive Protein Mimetic Polymers for the Preparation of Nonfouling Surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, (8), 4253–4258.

<https://doi.org/10.1021/ja0284963>

Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, *24*(24), 4337–4351.

[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00340-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5)

Fang, Y., & Eglen, R. M. (2017). Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discovery*, *22*(5), 456–472.

<https://doi.org/10.1177/1087057117696795>

Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, *123*(24), 4195–4200.

<https://doi.org/10.1242/jcs.023820>

Fratzl, P., Misof, K., Zizak, I., Rapp, G., Amenitsch, H., & Bernstorff, S. (1998). Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *Journal of Structural Biology*, *122*(1–2), 119–122. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.3966>

Fredberg, J. J., Discher, D., Dong, C., Guilak, F., Ingber, D. E., Janmey, P., ... Weinbaum, S. (2009). Biomechanics: Cell research and applications for the next decade. *Annals of Biomedical Engineering*, *37*(5), 847–859.

<https://doi.org/10.1007/s10439-009-9661-x>.Biomechanics

Fukuda, M. (2010). Immunology. In *Methods in Enzymology* (Vol. 80).

[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04824-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04824-1)

Gelse, K., Po, E., & Aigner, T. (2003). *Collagens — structure , function , and biosynthesis*. (December). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>

Gieni, R. S., & Hendzel, M. J. (2008). Mechanotransduction from the ECM to the genome: Are the pieces now in place? *Journal of Cellular Biochemistry*, *104*(6), 1964–1987. <https://doi.org/10.1002/jcb.21364>

Gilmore, A. P. (2005). Anoikis. *Cell Death and Differentiation*, *12*, 1473–1477.

<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401723>

- Goode, J. (2016). Use of International Standard ISO 10993-1, Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. *Department of Health and Human Services Food and Drug Administration*, 68.
<https://doi.org/http://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm348890.pdf>
- Goodwin, C. J., Holt, S. J., Downes, S., & Marshall, N. J. (1995). Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *Journal of Immunological Methods*, 179(1), 95–103.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)00277-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)00277-4)
- Hennink, W. E., & van Nostrum, C. F. (2012). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 223–236.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.009>
- Hubmacher, D., & Apte, S. S. (2013). The biology of the extracellular matrix: Novel insights. *Current Opinion in Rheumatology*, 25(1), 65–70.
<https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835b137b>
- ISO 10993-5. (2009). International Organization for Standardization. *ISO 10993-5, 3 Ed*, 42.
- Järveläinen, H. (2009). Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.*, 61(2), 198–223.
<https://doi.org/10.1124/pr.109.001289.provided>
- Kadow, C. E., Georges, P. C., Janmey, P. A., & Beningo, K. A. (2007). Polyacrylamide Hydrogels for Cell Mechanics : Steps Toward Optimization and Alternative Uses. *METHODS IN CELL BIOLOGY*, 83(07), 29–46.
[https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)83002-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)83002-0)
- Kleinman, H. K., & Martin, G. R. (2005). Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology*, 15(5 SPEC. ISS.), 378–386.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.004>

- Krishna, M. C., Dewhirst, M. W., Friedman, H. S., Cook, J. A., Degraff, W., Samuni, A., ... Mitchell, J. B. (1994). Hyperthermic sensitization by the radical initiator 2,2'azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). I. In vitro studies. *International Journal of Hyperthermia*, 10(2), 271–281.
<https://doi.org/10.3109/02656739409009348>
- Lagerholm, B. C., & Jacobson, K. (2005). Bulk and micropatterned conjugation of extracellular matrix proteins to characterized polyacrylamide substrates for cell mechanotransduction assays. *SHORT TECHNICAL REPORTS*.
<https://doi.org/10.2144/000112026>
- Leblond, C. P. (1989). Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue, bone, and dentin. *The Anatomical Record*, 224(2), 123–138.
<https://doi.org/10.1002/ar.1092240204>
- Lee, J., Cuddihy, M. J., & Kotov, N. A. (2008). Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14(1), 61–86.
<https://doi.org/10.1089/teb.2007.0150>
- Li, H., Wijekoon, A., & Leipzig, N. D. (2012). 3D Differentiation of Neural Stem Cells in Macroporous Photopolymerizable Hydrogel Scaffolds. 7(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048824>
- Li, R. H., Altreuter, D. H., & Gentile, F. T. (2003). Transport Characterization of Cell Encapsulation. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(4), 365–373.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960520\)50:4<365::AID-BIT3>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960520)50:4<365::AID-BIT3>3.0.CO;2-J)
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., & Schubert, D. (1997). Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5- Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. 6(3).
- Loessner, D., Meinert, C., Kaemmerer, E., Martine, L. C., Yue, K., Levett, P. A., ... Hutmacher, D. W. (2016). Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms.

- Nature Protocols*, 11(4), 727–746. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.037>
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 3(12), 1–24. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>
- Magnus S. Ågren. (2016). Wound Healing Biomaterials Volume 2: Functional Biomaterials. In *Wound Healing Biomaterials Volume 2: Functional Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-456-7.00023-4>
- Maitra, J., & Shukla, V. K. (2014). Cross-linking in Hydrogels - A Review. *American Journal of Polymer Science*, 4(2), 25–31. <https://doi.org/10.5923/j.ajps.20140402.01>
- Maltman, D. J., & Przyborski, S. A. (2010). Developments in three-dimensional cell culture technology aimed at improving the accuracy of in vitro analyses. *Biochemical Society Transactions*, 38, 1072–1075. <https://doi.org/10.1042/BST0381072>
- Mecham, R. P. (2012). Overview of extracellular matrix. *Current Protocols in Cell Biology*, (SUPPL.57), 1–14. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1001s57>
- Meunier, F., Pichot, C., & Elaïssari, A. (2006). Effect of thiol-containing monomer on the preparation of temperature-sensitive hydrogel microspheres. *Colloid and Polymer Science*, 284(11), 1287–1292. <https://doi.org/10.1007/s00396-006-1514-7>
- Mir, M., Ali, M. N., Barakullah, A., Gulzar, A., Arshad, M., Fatima, S., & Asad, M. (2018). Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Progress in Biomaterials*, 7(1), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s40204-018-0083-4>
- Nakasaki, M., Hwang, Y., Xie, Y., Kataria, S., Gund, R., Hajam, E. Y., ... Jamora, C. (2015). The matrix protein Fibulin-5 is at the interface of tissue stiffness and inflammation in fibrosis. *Nature Communications*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms9574>

- Nathaniel Huebsch and David J. Mooney. (2010). Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*, 462(7272), 426–432.
<https://doi.org/10.1038/nature08601>.Inspiration
- Nelson, C. M., & Bissell, M. J. (2006). Of Extracellular Matrix, Scaffolds, and Signaling: Tissue Architecture Regulates Development, Homeostasis, and Cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22(1), 287–309.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315>
- Nguyen, K. T., & West, J. L. (2002). Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23(22), 4307–4314.
[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00175-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00175-8)
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- Paleos, G. A. (2012). What is Biocompatibility? *Pittsburgh Plastics Manufacturing*, 510, 1–8.
- Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A., & Langer, R. (2006). Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Advanced Materials*, 18(11), 1345–1360.
<https://doi.org/10.1002/adma.200501612>
- Photoinitiators, T. I. (2001). Applications : Free Radical Initiators. *Spectroscopy*, 3(1), 5–19. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200111>
- Plumb, J. a, Milroy, R., & Kaye, S. B. (1989). Effects of the pH Dependence of 3- (4 , 5-Dimethylthiazol-2-yl) -2 , 5-diphenyl- tetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-based Assay1. *Cancer Research*, 4435–4440.
- Ratner, B. D., & Bryant, S. J. (2004). BIOMATERIALS : Where We Have Been and Where We Are Going. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, (1), 41–75.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027>

- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., & Niles, A. L. (2011). Cytotoxicity Testing: Measuring Viable Cells, Dead Cells, and Detecting Mechanism of Cell Death. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 740, 103–114. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual [Internet]*, 114(8), 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>
- Robert J. Pelham, JR., and Y.-L. W. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(December), 13661–13665.
- Rooij, J. De, Kerstens, A., Danuser, G., Schwartz, M. A., & Waterman-storer, C. M. (2005). Integrin-dependent actomyosin contraction regulates epithelial cell scattering. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY*, 171(1), 153–164. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506152>
- Rozario, T., & Desimone, D. W. (2011a). *The Extracellular Matrix In Development and Morphogenesis: A Dynamic View*. 341(1), 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>.The
- Rozario, T., & Desimone, D. W. (2011b). *The Extracellular Matrix In Development and Morphogenesis: A Dynamic View Tania*. 341(1), 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>.The
- Saboktakin, M. R. (2014). *Acrylamide, Synthesis and Properties*. (January 2012).
- Saha, K., Kim, J., Irwin, E., Yoon, J., Momin, F., Trujillo, V., ... Hayward, R. C. (2010). Surface creasing instability of soft polyacrylamide cell culture substrates. *Biophysical Journal*, 99(12), 94–96. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.09.045>

- Schaefer, L., & Schaefer, R. M. (2010). Proteoglycans: From structural compounds to signaling molecules. *Cell and Tissue Research*, 339(1), 237–246.
<https://doi.org/10.1007/s00441-009-0821-y>
- Schnaar, L., & Kuhlenschmidt, S. (1978). *Adhesion of Chicken Hepatocytes with N-Acetylglucosamine to Polyacrylamide Gels Derivatized*. 253(21).
- Siyam, T. (2001). Designed Monomers and Polymers Development of acrylamide polymers for the treatment of waste water. *Designed Monomers and Polymers*, 4. <https://doi.org/10.1163/156855500300203377>
- Syed, S., Karadaghy, A., & Zustiak, S. (2015). Simple Polyacrylamide-based Multiwell Stiffness Assay for the Study of Stiffness-dependent Cell Responses. *Journal of Visualized Experiments*, (97), 1–12. <https://doi.org/10.3791/52643>
- Tathagata Chaudhuri, Florian Rehfeldt, H. Lee Sweeney, and D. E. D. A. (2011). Preparation of Collagen-Coated Gels that Maximize In Vitro Myogenesis of Stem Cells by Matching the Lateral Elasticity of In Vivo Muscle. *Methods Mol Biol.*, 1–15. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-063-2>
- Tim Oliver, K. J. & M. D. (1998). Design and Use of Substrata to Measure Traction Forces Exerted by Cultured Cells. *METHODS IN ENZYMOLOGY*, 298(1988).
- Tse, J. R., & Engler, A. J. (2010). Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Current Protocols in Cell Biology*, (SUPPL. 47), 1–16. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1016s47>
- Varghese, S., & Elisseeff, J. H. (2006). *Hydrogels for Musculoskeletal Tissue Engineering BT - Polymers for Regenerative Medicine*.
https://doi.org/10.1007/12_072
- Von Buelow, S., & Pallua, N. (2006). Efficacy and safety of polyacrylamide hydrogel for facial soft-tissue augmentation in a 2-year follow-up: A prospective multicenter study for evaluation of safety and aesthetic results in 101 patients. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 118(3 SUPPL.), 85–91.

<https://doi.org/10.1097/01.prs.0000234844.59251.3f>

- Wako Pure Chemical Industries, L. (2016). *Azo Polymerization Initiators Comprehensive Catalog*. 33. Retrieved from https://www.wako-chemicals.de/files/download/pdf/wako_azo_polymerization_initiators_catalog_25.pdf
- Wang, N., & Tytell, J. D. (2009). Mechanotransduction at a distance: Mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, (December 2015). <https://doi.org/10.1038/nrm2594>
- Wang, N., Tytell, J. D., & Ingber, D. E. (2009). Mechanotransduction at a distance: Mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1), 75–82. <https://doi.org/10.1038/nrm2594>
- Wilson, C. J., Clegg, R. E., Leavesley, D. I., & Percy, M. J. (2005). Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review. *Tissue Engineering*, 11(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1>
- Yang, T.-H. (2008). Recent Applications of Polyacrylamide as Biomaterials. *Recent Patents on Materials Science*, 1(1), 29–40. <https://doi.org/10.2174/1874464810801010029>
- Yuan, Z., & Hu, H. (2017). Preparation and Characterization of Crosslinked Glyoxalated Polyacrylamide Paper-Strengthening Agent. *Journal of Applied Polymer Science*, (October 2012). <https://doi.org/10.1002/app.36779>
- Yue, B. (2014). Biology of the Extracellular Matrix: An Overview Beatrice. *J. Glaucoma.*, 0000000000, 1–8. <https://doi.org/10.1097/IJG.000000000000108.Biology>
- Zhang, S., Ellis-Behnke, R., & Zhao, X. (2013). PuraMatrix: Self-assembling Peptide Nanofiber Scaffolds. *A Chapter in Scaffolding in Tissue Engineering*, 1–31. <https://doi.org/10.1201/9781420027563.ch15>