



Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA (2014-2015)

**MONITORIZACIÓN DE LA SIEMBRA Y
CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES EN ANDAMIOS SITUADOS
EN EL INTERIOR DE DISPOSITIVOS
MICROFLUÍDICOS**

Director:

Luis Fernández Ledesma.
(Dpto. Ingeniería Mecánica)
(Grupo GEMM – I3A)

HÉCTOR FORONDA HERRERA

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Fundamentos y aplicaciones biotecnológicas de la tecnología microfluídica	2
2.2 Utilización de scaffolds en cultivo celular	3
2.3 Uso de lentivirus como vectores de transfección celular	3
3. OBJETIVOS.....	4
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
4.1 Tipos celulares, medios y condiciones de cultivo	4
4.2 Tipos de scaffold empleados	5
4.3 Cuantificación de cultivos celulares	6
4.4 Pruebas de resistencia al Opti-MEM.....	6
4.5 Transfección lentiviral.....	6
4.5.1 Análisis de la eficiencia en la transfección	10
4.6 Cultivo celular en scaffolds	10
4.6.1 Proceso de cultivo	10
4.6.2 Lavado, extracción y contaje.....	11
4.7 Cultivo en chips con scaffolds integrados	11
4.7.1 Siembra e incubación	12
4.7.2 Evaluación de la implantación celular	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
5.1 Resistencia celular al Opti-MEM	12
5.2 Evaluación de la eficiencia en la transfección lentiviral	14
5.3 Estudio de la implantación celular en diferentes variedades de scaffolds.....	16
5.4 Eficacia en el cultivo en chips microfluídicos con scaffolds integrados.....	18
6. CONCLUSIONES.....	19
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
8. ANEXOS	22

RESUMEN

La tecnología de la microfluídica, desarrollada a partir de 1980, ofrece unas inmejorables perspectivas de desarrollo a multitud de campos diferentes, donde puede contribuir a simplificar significativamente ciertos procesos o aumentar su nivel de fiabilidad. En concreto, su aplicación en el campo de los cultivos celulares ofrece la posibilidad de recrear con mayor realismo el ambiente natural de las células dentro del organismo frente a los cultivos en placas Petri o flasks más habituales y sin renovación del medio. Además permite una monitorización mucho más detallada del cultivo al estar éste miniaturizado dentro de "chips", permitiendo un control individualizado de su crecimiento. En este trabajo se estudió la capacidad de células madre mesenquimales, de la línea celular MG63, para proliferar en el interior de diferentes variedades de scaffolds, y su capacidad para colonizar éstos una vez ubicados en el interior de chips microfluídicos. Para ello, este estudio precisó de una transfección previa de nuestra línea celular mediante la utilización de lentivirus portadores del gen GFP, facilitando con ello el análisis celular bajo un microscopio de fluorescencia. Asimismo, con el objetivo de identificar las condiciones óptimas de realización para cada experimento, fueron ejecutados bajo diferentes condiciones, ya fuera modificando la carga viral añadida (diluciones 1:2, 1:4, 1:8 o 1:16) o la concentración de protamina (0, 5 y 10 µg/mL) en el proceso de transfección, o mediante el empleo de medios celulares modificados (estándar, methocel 20%, colágeno) o modificando previamente los scaffolds (funcionalización por plasma. Del mismo modo, las líneas celulares alternativas U251 y HUVEC fueron usadas para identificar posibles variaciones experimentales debidas al tipo celular empleado. Al término de este proyecto se observó que las células MG63 poseen la capacidad de proliferar en el interior de scaffolds ubicados en chips, siendo el tipo de scaffold empleado y su tratamiento previo factores determinantes para el éxito del proceso.

ABSTRACT

Microfluidics technology, developed around 1980, offers excellent development prospects multitude of different fields, which can help to significantly simplify certain processes or increase their level of reliability. In particular, its application in the field of cell culture offers the possibility to mimic the natural environment of the cells within the body in a more realistic way than the more common cell cultures in Petri plates or flasks, with a stagnant culture media. It also allows a much more detailed monitoring of the cell culture due to it being miniaturized within the "chips", enabling an individualized control of its growth. In this work it was studied the ability of mesenchymal stem cells, from the MG63 cell line, to proliferate within different types of scaffolds, along with its ability to colonize these once located within microfluidic chips. To do this our study required of a prior transfection of our cell line by using lentivirus carrying GFP gene, thereby facilitating cell analysis under a fluorescence microscope. Likewise, in order to identify the optimal testing conditions for each experiment, they were performed under different conditions, either by modifying the added viral load (1:2, 1:4, 1:8 or 1:16 dilutions) or the protamine concentration (0, 5 and 10 µg/mL) in the transfection process, or by using a modified cell media (standard, methocel 20%, or collagen) or modifying the scaffolds previously (plasma activation. Likewise, the alternative cell lines U251 and HUVEC were tested in order to identify possible experimental variations due to the cell type used. At the end of this project it was observed that MG63 cells possess the ability to proliferate in scaffolds located within chips, being the type of scaffold employed and its pretreatment determining factors for the success of the process.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Fundamentos y aplicaciones biotecnológicas de la tecnología microfluídica

La microfluídica surgió en torno a 1980-1990 como un campo interdisciplinar fruto de aportaciones de campos tan diversos como la biología molecular, la bioseguridad, la microelectrónica o el análisis molecular³, y podría resumirse como la disciplina encargada del estudio del comportamiento de los fluidos en microescala y sus posibles aplicaciones tecnológicas.

Aunque este campo de estudio puede ser de relevancia en multitud de sectores diferentes, desde impresoras de micro-inyección hasta dispositivos de micro-propulsión, es de especial interés para la biotecnología su utilización en el campo de los cultivos celulares, donde proporciona múltiples ventajas¹ respecto a los cultivos habituales en medio estanco como placas, flasks o sistemas de pocillos.

Para ello es necesario el diseño y fabricación de dispositivos específicos denominados “chips”, consistentes en una delgada matriz polimérica que contiene en su interior una o más cámaras internas diseñadas para facilitar el crecimiento celular en su interior, y que se encuentran comunicadas con el exterior a través de un serie de canalículos a través de los cuales se producen la siembra y la entrada y salida de medio de cultivo.

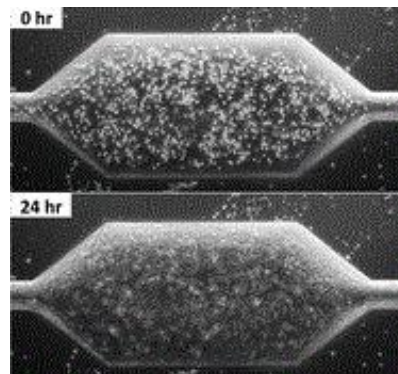


Imagen 1: Cámara interna de un chip tras el inóculo celular².

Entre las ventajas que ofrece este sistema de cultivo se encuentra en un lugar destacado su mayor fidelidad a la hora de recrear las condiciones naturales de las células en el organismo gracias al suministro constante de medio fresco, lo que evita la acumulación de sustancias de desecho y permite conocer en todo momento la composición del medio en que las células se encuentra inmersas. Este mismo sistema de perfusión continua de medio permite además, en caso de desearlo, inducir gradientes químicos o situar en posición *downstream* dispositivos que monitoricen la composición del medio retirado, habilitando un análisis en tiempo real¹.

Por supuesto este sistema de renovación del medio implica una automatización que elimina la necesidad de recambiar el medio de cultivo de forma periódica, simplificando con ello las tareas en el laboratorio.

Asimismo, el menor número de células en el interior del chip permite un análisis en mayor detalle, monitorizando las células de modo individual en lugar de cómo cultivo en su conjunto.

Es necesario aclarar que también existen dificultades de cara al uso de esta tecnología, entre las que se incluyen la inexistencia de protocolos de trabajo bien definidos como consecuencia de ser una tecnología novedosa, lo escaso del volumen de trabajo en caso de requerirse posteriores análisis del medio, y la dificultad para el diseño y control de los propios chips y sus canales internos¹.

2.2 Utilización de scaffolds en cultivo celular

Los scaffolds (andamios) son estructuras poliméricas de carácter poroso, fibroso o laminar cuya finalidad es facilitar el crecimiento celular en su superficie con respecto al que se obtendría directamente sobre las placas Petri o de pocillos.

Su principal utilidad es su capacidad para recrear el ambiente original en que crecerían en el organismo, habilitando su crecimiento en tres dimensiones y permitiendo un desarrollo tisular mucho más realista.

Esto tiene un especial potencial en el campo de la biomedicina, en cuanto a las facilidades que ofrece para optimizar aplicaciones futuras en la regeneración celular, de tal modo que las células puedan colonizar y regenerar el tejido dañado⁴. En este caso sería necesario que el material utilizado en hipotéticos scaffolds fuese biodegradable y pudiera ser finalmente sustituido por estructuras orgánicas completamente.

La utilización de células madre para la regeneración de tejidos, incluyendo la regeneración ósea, necesitaría de un sistema de scaffolds como el descrito para recrear el ambiente extracelular necesario para un apropiado crecimiento celular⁶. Una vez embebidas las células madre en el scaffold, éstas podrían diferenciarse en su interior y regenerar el tejido de un modo mucho más favorable del que podría alcanzarse naturalmente.

2.3 Uso de lentivirus como vectores de transfección celular

Los lentivirus son una de las clases de retrovirus existentes, y se caracterizan por un largo periodo de incubación y por su capacidad para infectar tanto células en división como en reposo. Su capacidad para insertar DNA de gran tamaño en las células que infecta los ha convertido en uno de los métodos más fiables y utilizados para la manipulación genética celular.

La mayoría de lentivirus modificados actuales derivan de cepas de VIH, VIS o VIF, que han sido adecuadamente atenuados para que no supongan un peligro en su utilización.

Entre sus muchas aplicaciones prácticas como herramientas de investigación se encuentran la inserción de genes específicos, ya sea como marcadores celulares (GFP, YFP, etc) o como método para revertir auxotrofías, etc. También es importante su utilización en la expresión de shRNAs o iRNAs, lo que permite investigar las funciones de genes concretos al comprobarse que efectos conlleva su inhibición.

La optimización que estos vectores lentivirales han experimentado con el tiempo ha aumentado su efectividad y disminuido sus efectos secundarios, lo que actualmente permite su utilización en campos de aplicación médica como la terapia génica⁷, capaz de tratar enfermedades de origen genético sustituyendo o insertando el gen dañado o ausente que las desencadena.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la viabilidad de un cultivo celular de células madre mesenquimales en scaffolds sintéticos situados en el interior de chips microfluídicos, de cara a su posible aplicación en el campo de la ingeniería de tejidos. Para ello se estudió la influencia de tres variables:

- Tipo de scaffold empleado: PLLA poroso, PLLA electro-spinning, colágeno o policarbonato.
- Tratamientos adicionales para mejorar la adherencia: Medio estándar, methocel 20%, colágeno u oxidación con plasma.
- Tipo celular: MG63, U251 y HUVEC.

Para alcanzar este objetivo, previamente al estudio se hicieron una serie de experimentos destinados a dotar a las cepas celulares a emplear de un marcaje adecuado que permitiera su correcta observación una vez insertas en el scaffold. Esto requirió de una transfección lentiviral previa con el propósito de insertar en ellas el gen de la proteína fluorescente verde (GFP).

A su vez, esta operación requirió de un análisis previo para determinar el nivel de resistencia celular a un cultivo prolongado en Opti-MEM, un medio carente de suero, y que supone un paso necesario para el éxito de la transfección.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Tipos celulares, medios y condiciones de cultivo

En la realización de este trabajo, se utilizaron tres líneas celulares diferentes, con el objetivo de comprobar posibles diferencias a los diferentes tratamientos. Las cepas utilizadas fueron:

- **MG63**: Línea celular procedente de osteosarcoma, de morfología similar a los fibroblastos, y que servirá de modelo principal a este proyecto para recrear una posible colonización mediante células madre mesenquimales.
- **U251**: Línea celular procedente de glioblastoma. Servirá como control para observar diferencias respecto a otras líneas celulares tumorales.
- **HUVEC**: Células endoteliales humanas procedentes de endotelio vascular, no tumoral. Servirán de control para comprobar posibles diferencias entre variantes derivadas de líneas tumorales y células humanas normales.

Los medios empleados variaron según el tipo celular, consistiendo éstos en los siguientes:

- **Medio D10**: Utilizado por las células MG63, consiste en DMEM 1g/L glucosa suplementado hasta alcanzar concentraciones de 1% BSA, 1% L-Glutamina, 1%Penicilina, 0,3 mM HEPES y 2,5mg/mL fungizona).
- **Medio D10 HG**: Utilizado por las células U251, su composición es idéntica a la del medio D10, pero utilizándose como base DMEM rico en glucosa (4,5 g/L).

- **Medio EGM-2:** Utilizado por las células HUVEC, se trata de un medio especial para el cultivo de células endoteliales humanas.

Estos tipos celulares a emplear se mantuvieron en cultivo de forma continua en al menos 2 flasks por cada tipo celular, a fin de mantener un stock permanente que utilizar en los diferentes experimentos a realizar, siendo las condiciones de cultivo de 37°C y 5% CO². El recambio de los medios fue cada dos días en el caso de las células MG63 y U251, y cada 5 días en el caso de las HUVEC. Al alcanzarse niveles del 80% de confluencia o superiores, se realizaban subcultivos en nuevos flasks.

Todas las manipulaciones se realizaron en condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar (cambios de medio, subcultivos, preparación de medios, manipulación de scaffolds y chips) o en una cabina de bioseguridad (inóculo lentiviral y periodo de seguridad subsiguiente).

Durante el desarrollo de las fases 1 y 2 del trabajo se requirió además el cultivo de las células en medio Opti-MEM, carente de suero y suplementos, para su transfección mediante lentivirus, pero manteniendo las condiciones de cultivo invariables (37°C 5% CO₂)

4.2 Tipos de scaffold empleados y condiciones de siembra

Para la evaluación del crecimiento celular en scaffolds seleccionamos cuatro modelos diferentes con distinta estructura y/o materiales.

- PLLA poroso: Scaffold elaborado a partir de PLLA, de estructura rígida e interior poroso. Es completamente opaco debido a su gran grosor, lo que complica la visión de las células en su interior al observar bajo el microscopio.
- PLLA fibroso: Scaffold de PLLA con estructura fibrosa, elaborado mediante la técnica del electrospinning⁸. Bajo el microscopio óptico es translucido, pero aunque deja pasar la luz es difícil discernir las células en su interior.
- Colágeno: Scaffold laminar consistente en una lámina de colágeno de micras de espesor sobre la que crecen las células. Se trata por tanto de un scaffold bidimensional.
- Policarbonato: Scaffold laminar de estructura y funcionalidad similares al de colágeno, siendo por tanto también un scaffold bidimensional.

En el momento de la siembra de los scaffold, ésta se realizó de forma simultánea bajo diferentes condiciones con el objetivo de comprobar posibles cambios en la efectividad de la colonización celular en los diferentes tipos de scaffold. Las condiciones empleadas fueron:

- Medio estándar: Siembra sin modificaciones, simplemente añadiendo el cultivo celular a una placa con el scaffold incluido.
- Methocel 20%: Siembra del scaffold utilizando células en su medio habitual pero con una adición de un 20% en methocel. El methocel es empleado habitualmente para evitar la adherencia de las células al fondo de placas o flasks, favoreciendo la formación de esferoides⁹ por agregación de unas células con otras. Se pretende comprobar si su presencia en el medio favorece la unión celular al scaffold sobre el fondo del pocillo.

- **Colágeno:** Siembra de las células tras haber sido adicionado a su medio habitual colágeno, con el fin de que forme una capa estable sobre el scaffold. A continuación se vertería medio normal sobre la capa ya establecida.
- **Activación con plasma:** En este caso la siembra se realiza con células en su medio habitual, pero habiendo sometido antes a los scaffolds a un proceso de activación de soporte mediante plasma¹⁰ que favorece la adhesión celular al funcionalizar la superficie.

4.3 Realización de subcultivos y cuantificación de los cultivos celulares

En caso de encontrarse un cultivo celular a un nivel de confluencia superior al 80%, se procede a retirar el medio existente, para a continuación lavar con 5 mL de PBS durante 1 min. Acabado el lavado, se retira el PBS y se añaden 5 mL de tripsina directamente sobre las células. De ahí se lleva al incubador 5 min a 37°C y 5% CO₂.

A continuación se añaden 5 mL de medio nativo para neutralizar la tripsina, se toma el volumen completo (5mL medio + 5mL tripsina) y se procede a su centrifugación 5min a 1500 rpm. Finalmente se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet celular en 2 mL de medio.

Una vez hecho esto se procede al conteo celular, llevado a cabo mediante observación en microscopio óptico utilizando una cámara de Neubauer, incluyendo los 4 cuadrantes principales.

Una vez determinada la concentración de la suspensión celular, se toma de ésta el volumen de inóculo necesario en función de la concentración final celular deseada, siendo ésta de 200.000 células/mL para placas de 24 pocillos en las pruebas de ensayo y de 7.000.000 células/mL para la siembra de flasks en stock.

4.4 Ensayo de resistencia al Opti-MEM

El experimento consiste en medir la resistencia de las tres líneas celulares que planeamos transfectar a dicho proceso, que requiere un cultivo de entre 16 a 24 horas en medio Opti-MEM, carente de suero.

- Sembrar de células MG63, U251 y HUVEC en una placa de 24 pocillos a una densidad de 200.000 cél/mL, ocupando cada cultivo 4 pocillos, y añadiendo a continuación medio nativo hasta completar un volumen de 2125µL (las células MG63 en medio D10, las U251 en D10-HG, y las HUVEC en medio HUVEC).
- Mantener las células en cultivo durante 24h a 37°C y 5% CO₂.
- Pasado ese tiempo se retira el medio, se lava la superficie con PBS, y se añade medio Opti-MEM hasta alcanzar los 2125 µL.
- Mantener nuevamente las células 24h a 37°C y 5% CO₂.

4.5 Transfección lentiviral

Este experimento es transfectar las líneas celulares U251 y MG63 con el gen de la GFP (Green Fosforescent Protein) utilizando vectores lentivirales con el objetivo de conferir a las células

una fluorescencia que permita observarlas posteriormente en el interior de los scaffolds y chips en pruebas posteriores.

- Sembrar células U251 y MG63 en dos placas de 24 pocillos a una densidad de 200.000 cél/mL en un volumen total de 250µL por pocillo, siendo un total de 8 pocillos para cada tipo celular.

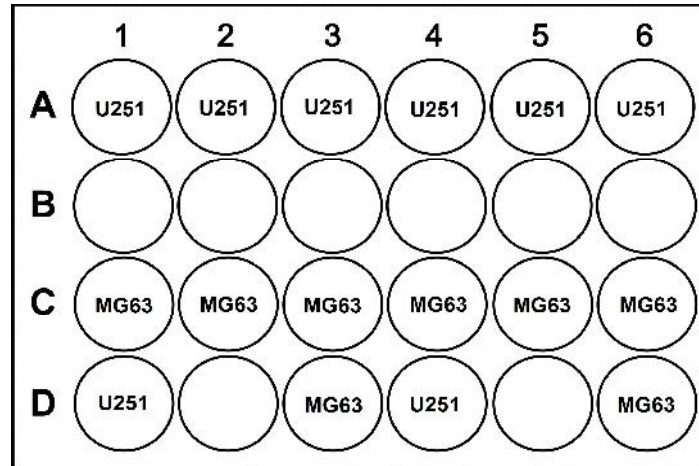


Figura 1: Distribución de los tipos celulares en cultivo en la placa de 24 pocillos.

- Incubar a 37°C y 5% CO₂ durante 24h, renovando el medio de ambos tipos celulares tras 12 desde el inicio del cultivo, usándose en cada una su respectivo medio nativo.
- Pasadas las 24h desde el momento de la siembra, se procede a infectar las células con lentivirus en medio OptiMEM. Para ello se plantearon varias condiciones diferentes, con el objetivo de optimizar el proceso transfectivo. Estas variaciones consistieron en usar diferentes concentraciones de carga lentiviral y de protamina, sustancia encargada de favorecer el proceso de transfección gracias a su habilidad para condensar y estabilizar el DNA.

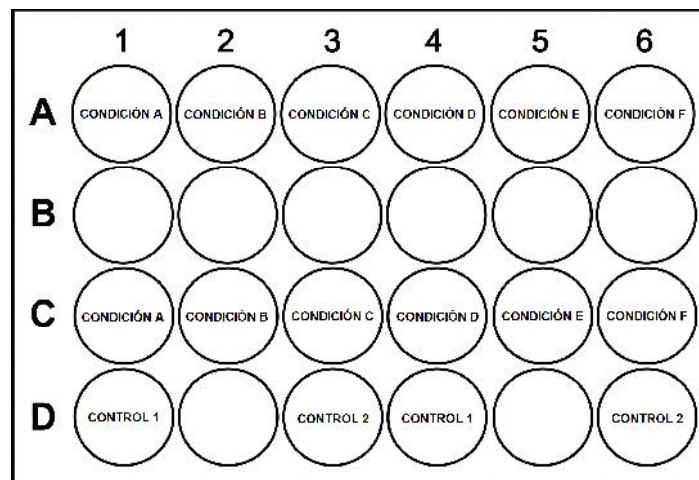


Figura 2: Distribución de las condiciones de experimentación sobre la placa de 24 pocillos.

- Para la infección se realizaron las siguientes diluciones, partiendo de un stock de Protamina a 1mg/mL:

Condición A: Lentivirus 1:2. Sin protamina.

250µL Lentivirus + 250µL OptiMEM = 500 µL (250µL a cada pocillo)

Condición B: Lentivirus 1:2. Protamina 5µg/mL.

250µL Lentivirus + 247,5µL OptiMEM + 2,5 µL Protamina = 500µL (250µL a cada pocillo)

Condición C: Lentivirus 1:2. Protamina 10µg/mL.

250µL Lentivirus + 245µL OptiMEM + 5µL Protamina = 500µL (250µL a cada pocillo)

Condición D: Lentivirus 1:4. Protamina 5µg/mL.

125µL Lentivirus + 372,5µL OptiMEM + 2,5µL Protamina = 500µL (250µL a cada pocillo)

Condición E: Lentivirus 1:8. Protamina 5µg/mL.

62,5µL Lentivirus + 435µL OptiMEM + 2,5µL Protamina = 500µL (250µL a cada pocillo)

Condición F: Lentivirus 1:16. Protamina 5µg/mL.

31,25µL Lentivirus + 466,25µL OptiMEM + 2,5µL Protamina = 500µL (250µL a cada pocillo)

Control 1: Sin Lentivirus. Protamina 5µg/mL.

497,5µL OptiMEM + 2,5µL Protamina = 500µL (250µL a cada pocillo)

Control 2: Sin Lentivirus. Sin Protamina.

500µL OptiMEM (250µL a cada pocillo)

- Incubar 4h a 37°C, 5% CO₂.
- Retirar el medio con los lentivirus, lavar con PBS, y sustituir añadir 500 µL de OptiMEM.
- Incubar 18h a 37°C, 5% CO₂
- Pasadas 18h de la infección, retirar el OptiMEM y reemplazarlo por el medio nativo en igual volumen al retirado, 500 µL (D10 en las MG63 y D10HG en las U251).
- Incubar 24h a 37°C 5% CO₂.

- Retirar el medio de cada pocillo a un tubo de ensayo independiente (500 μ L), lavar con 100 μ L/pocillo de PBS (añadiendo éste al tubo de ensayo correspondiente), y finalmente añadir 50 μ L/pocillo de tripsina 1x.
- Se deja actuar la tripsina 5 minutos en la estufa a 37°C y se inactiva con la adición de 150 μ L de medio nativo. A continuación se toman los 200 μ L de volumen final y se trasladan al tubo de ensayo correspondiente. Para acabar se hace un lavado final del pocillo con 200 μ L de medio nativo y se añade al resto, obteniéndose un volumen final de 1100 μ L en cada uno de los tubos de ensayo.
- Una vez recogido el contenido de todos los pocillos centrifugar los tubos a 1500 rpm durante 5 min a 20°C, y posteriormente desechar el sobrenadante y resuspender el pellet obtenido en 4mL de medio nativo.
- Finalmente se toma una muestra de 10 μ L para contaje y se siembran los 3990 μ L de cada tubo en placas de 6 pocillos, de acuerdo al siguiente esquema:

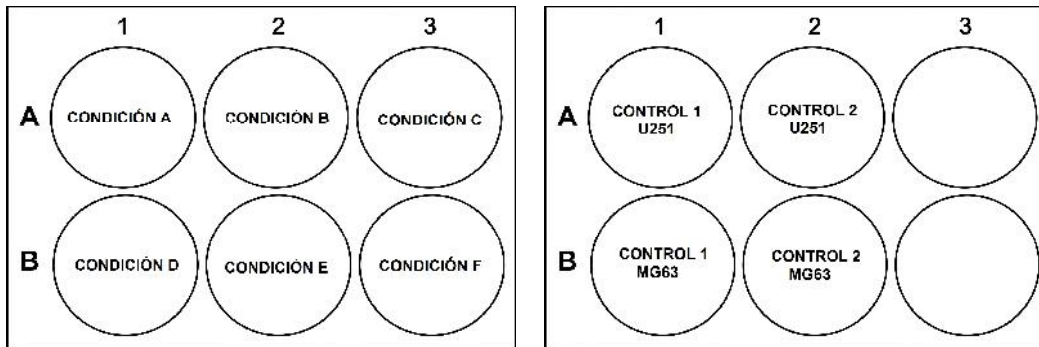


Figura 3: Distribución esquemática de las condiciones ensayadas.

- Incubar las placas a 37°C y 5% CO₂ hasta que se acerquen al punto de confluencia.
- A continuación, repetir el proceso de reciclado del medio, lavado y tripsinación, realizando la resiembra en placas Petri individuales de 90mm, una por cada condición y tipo celular (6 de MG63, 6 de U251 y 4 controles).
- Es necesario un periodo de incubación de varios días bajo condiciones controladas para asegurar que los posibles lentivirus activos que puedan quedar dejen de ser infectivos, por lo que las placas en cultivo han de pasar de 4 a 6 días en incubación en una estufa emplazada en un laboratorio de bioseguridad nivel II hasta que sea seguro su transporte y/o congelación.

Durante ese tiempo se continua con la incubación a 37°C y 5% CO₂, llevando a cabo resiembras cada vez que se alcanza la confluencia en alguna de ellas mediante el proceso habitual de tripsinización y repartiendo las células existentes a partes iguales entre 2 placas de 90mm (recuperando de nuevo las células en todos los pasos) o transfiriéndolas a un flask de mayor volumen si éste pasa a ser excesivo para una placa Petri.

- Una vez finalizado el periodo de seguridad, tomar una parte para fijar en formol y comprobar bajo un microscopio de fluorescencia que la transfección ha sido exitosa.

Una vez asegurada la efectividad del proceso, las células pueden ser ya trasladadas a otro laboratorio con menor seguridad para posteriores utilidades de éstas y/o ser preparadas para su almacenamiento en congelación según el protocolo correspondiente.

4.5.1 Análisis de la eficiencia en la transfección

Con el objetivo de evaluar el éxito relativo de la transfección para cada tipo celular y condición se procede a analizar las muestras en un citómetro de flujo, que permitirá diferenciar el porcentaje presente en cada una de células transfectadas y células normales, en base a la presencia o no del fluoróforo GFP en las células.

Será la muestra con mayor éxito en la transfección la que será utilizada a posteriori en el resto de pruebas.

4.6 Cultivo celular en scaffolds

El objetivo de esta prueba es comprobar cuál de los diferentes modelos de scaffold proporciona el ambiente más adecuado para la colonización y crecimiento de nuestras líneas celulares, y bajo qué condiciones concretas se alcanza una mayor efectividad.

Para ello se utilizamos 4 modelos de scaffold y 4 condiciones diferentes (Medio nativo, methocel 20%, colágeno, y tratamiento por plasma a los scaffold).

Se realizaron 2 pruebas consecutivas con el fin de observar posibles diferencias entre ambas y comprobar el grado de fidelidad de los resultados.

4.6.1 Proceso de cultivo:

- Sembrar de células MG63, U251 y HUVEC una placa de 24 pocillos a una densidad final de 200.000 cél/mL, para lo cual se tomó el volumen correspondiente de inóculo, valorando cada caso tras el conteo el volumen preciso y sabiendo que el volumen final ha de ser de 1 mL.

Este volumen celular de siembra no consistió en exclusiva de células en suspensión, sino que le fueron adicionados distintos componentes de cara a aplicar las diferentes condiciones a estudiar:

- Condiciones A o D: Medio nativo o plasma

Sin modificaciones al inóculo celular

- Condición B: Methocel

Adición de methocel al inóculo hasta alcanzar una proporción del 20% en éste.

- Condición C: Colágeno

Adición al inóculo de una solución de colágeno, capaz de polimerizar a temperatura ambiente, con el fin de que ésta polimerice sobre el scaffold y mantenga a las células confinadas a su entorno cercano.

Realizar el inóculo de todas las condiciones directamente sobre el scaffold para asegurar una siembra óptima de éste.

- A continuación, añadir el medio nativo necesario hasta completar un volumen final de 1 mL por pocillo, sin aplicarlo directamente sobre el scaffold para evitar la dispersión de las células ya añadidas.

La excepción a esta regla es la condición B, donde el medio a añadir deberá haber sido suplementado previamente con methocel hasta alcanzar la concentración del 20% requerida.

- Mantener las células en cultivo durante 24h a 37°C y 5% CO₂.

4.6.2 Lavado, extracción y contaje

- Tomar una nueva placa de 94 pocillos y preparar un lavado de scaffolds de forma seriada.

Cada scaffold contará en dicha placa con 3 pocillos con las siguientes finalidades:

Pocillo 1: Contiene 100 µL de PBS. Tras retirar el scaffold de su pocillo con unas pinzas estériles, éste es sumergido en este pocillo durante 2 min con el objetivo de eliminar cualquier posible célula no adherida, así como cualquier resto de medio que pueda influir en la posterior tripsinización.

Pocillo 2: Contiene 100 µL de tripsina. Una vez lavados en PBS, los scaffold son traspasados a este pocillo donde permanecen 5 min con el objetivo de que las células adheridas al scaffold se desprendan. Tras finalizar el periodo de 5 min se adicionan 100 µL de medio para desactivarla.

Pocillo 3: Contiene 100 mL de PBS, y su función es lavar una última vez el pocillo para retener cualquier posible célula que aún quedara en su interior.

- Añadir los 100 microlitros del pocillo 3 al 2 y proceder al contaje, que fue realizado en una Cámara de Neubauer, utilizando los 4 cuadrantes principales.

4.7 Cultivo en chips con scaffold integrado

Para este experimento se seleccionaron 2 chips conteniendo un tipo diferente de scaffold cada uno, y estando ambos elaborados en PLLA. El primero contenía dentro de sus 3 cámaras internas un scaffold de PLLA poroso, mientras en el segundo se emplearon scaffolds de PLLA fibroso.

4.7.1 Siembra e incubación

En este experimento la siembra se realizó en exclusiva con células MG63, siguiendo el proceso habitual de preparar un inóculo con 200.000 células/mL a partir de los cultivos en stock.

La siembra se llevó a cabo mediante una micropipeta, con la que la suspensión celular fue introducida a través de los orificios de los microcanales.

Tras observar bajo microscopio óptico que las células se encontraban efectivamente en su interior, se procedió a colocar cada chip en una placa Petri de 90mm diferente, y cubrirla con medio nativo a fin de evitar la desecación del medio interno del chip.

Se mantuvieron las células en cultivo durante 24h a 37°C y 5% CO₂.

4.7.2 Evaluación de la implantación celular

Una vez finalizadas las 24h de cultivo se tomaron los chips y se procedió a observarlos bajo un microscopio de fluorescencia, bajo el cual podría observarse su interior gracias a la expresión de la proteína GFP.

En este caso no se realizó un conteo que permitiera determinar el éxito en la siembra de cada scaffold de forma cuantitativa, sino que se procedió a un análisis cualitativo en base únicamente a la observación de las imágenes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resistencia celular al Opti-MEM

Se llevó a cabo una prueba preliminar destinada a determinar la resistencia al medio Opti-MEM de cada línea celular, lo cual suponía un paso necesario de cara a la posterior transfección lentiviral. Se realizó según el apartado 4.4 de esta memoria, utilizándose para ello cultivos de células MG63 a un 60% de confluencia, U251 a un 25%, y un cultivo HUVEC a un 5%.



Imagen 2: Células MG63 antes (izq) y después (dcha) de la incubación por 24h en Opti-MEM.

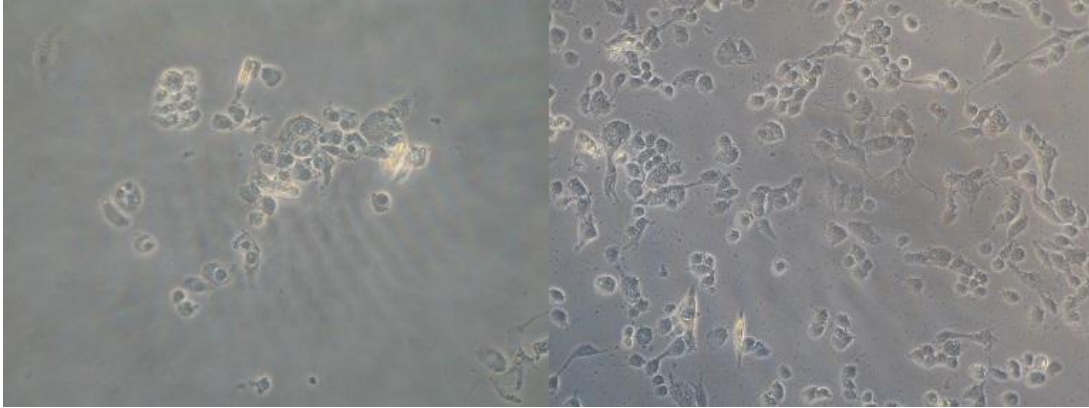


Imagen 3: Células antes (izq) y después (dcha) de la incubación por 24h en Opti-MEM.

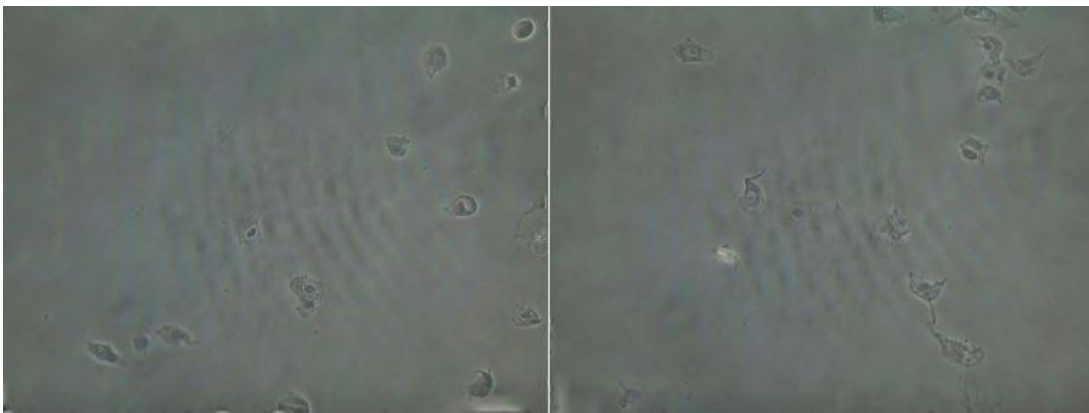


Imagen 4: Células HUVEC antes (izq) y después (dcha) de la incubación por 24h en Opti-MEM.

Tras la comparación visual entre la situación previa a las 24h de cultivo en Opti-MEM y el estado de proliferación celular tras dicha prueba observando bajo el microscopio óptico, los resultados pueden resumirse en la siguiente comparación:

Tabla 1: Resultados obtenidos tras la prueba de resistencia al Opti-MEM.

	TIPO CELULAR	CONFLUENCIA
T = 0h	MG63	60%
	U251	25%
	HUVEC	5%
T = 24h	MG63	80%
	U251	40%
	HUVEC	5%

De la tabla anterior se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Todos los tipos celulares ensayados son capaces de sobrevivir a un periodo de 24h en medio Opti-MEM sin un aumento apreciable en la mortalidad celular.
- Los tipos celulares MG63 y U251 son capaces de proliferar en este medio en igual medida que en su medio nativo.
- Las células HUVEC ven su crecimiento interrumpido durante las 24h que dura la incubación en Opti-MEM.

Por tanto, es necesario tomar en cuenta estos datos a la hora de proceder a la transfección lentiviral posterior, procurando que los tipos celulares MG63 y U251 se encuentren a un nivel de confluencia tal que no se sobrepase el 100% durante el proceso de 24h de transfección.

Por el contrario, en una transfección de células HUVEC, al no existir el riesgo de un crecimiento excesivo, será aconsejable un nivel de confluencia lo más alto posible de cara a aumentar las posibilidades de transfección por parte de los lentivirus.

5.2 Evaluación de la eficiencia en la transfección lentiviral

Esta prueba, que se realizó según el apartado 4.5, permitió la transfección de los tipos celulares MG63 y U251 mediante lentivirus portadores del gen de la GFP, permitiendo asimismo determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo dicho proceso. Las células obtenidas sería utilizadas a continuación en las siembras de scaffolds y chips microfluídicos.

Los cultivos celulares se inocularon con hasta 4 concentraciones virales diferentes respecto al stock (1:2, 1:4, 1:8 y 1:16), y simultáneamente se testaron 3 concentraciones diferentes de Protamina (0, 5 y 10 µg/mL), siendo estos los resultados, obtenidos a partir de la información proporcionada por el citómetro de flujo (Anexos 1 y 2):

Tabla 2: Resultados obtenidos para cada condición en la transfección lentiviral.

TIPO CELULAR	DILUCIÓN VIRAL	[PROTAMINA] (µg/mL)	% TRANSFECTADO	% WILD TYPE
MG63	1:2	0	66,91	31,08
		5	85,42	14
		10	77,16	22,27
	1:4	5	81,08	17,51
	1:8	5	72,22	27,05
	1:16	5	51,17	47,44
	-	0	0	100
		5	0	100

U251	1:2	0	90,15	9,82
		5	91,24	8,29
		10	90,36	9,43
	1:4	5	82,28	17,15
	1:8	5	70,38	28,86
	1:16	5	53,57	45,15
	-	0	0	100
		5	0	100

Estos resultados nos permiten afirmar que el método empleado permite transfectar líneas celulares con éxito con independencia del tipo celular, alcanzándose porcentajes de éxito superiores al 70% en todos los casos salvo en diluciones lentivirales de 1:16 y siendo por tanto éste un método laborioso pero eficaz para insertar genes marcadores en las líneas celulares a emplear.

En cuanto al empleo de diferentes concentraciones de lentivirus y protamina puede concluirse lo siguiente:

- En base a las pruebas realizadas a una misma concentración viral (1:2) y con variación de la concentración de protamina, puede concluirse que la concentración óptima para su empleo es de 5 µg/mL, mediante la cual se alcanzan los mayores porcentajes de éxito en ambos tipos celulares.

Asimismo, queda evidenciado que en células MG63 ésta tiene un efecto negativo a concentraciones elevadas de 10 µg/mL, obteniendo resultados inferiores incluso respecto a aquellas preparaciones con 5 mg/mL y menor carga lentiviral (dilución 1:4).

En células U251 también se observa un decrecimiento en el éxito transfectivo a altas concentraciones de protamina, pero en mucha menor medida.

- La concentración lentiviral empleada parece ser también un factor decisivo, descendiendo paulatinamente el éxito de la transfección según disminuye la carga lentiviral inoculada. El paso de una dilución lentiviral de 1:8 a una 1:16 muestra un empeoramiento del éxito transfectivo muy superior al resto de diluciones.
- El tipo celular empleado también es un factor determinante, ya que ambas líneas celulares demuestran diferir en su sensibilidad a la protamina. Por un lado, en ausencia de protamina las células U251 demuestran un éxito mucho mayor en el proceso transfectivo que las células MG63, con una diferencia de un 90,15% frente a un 66,91%.

Sin embargo, mientras las células MG63 ven sensiblemente aumentada la eficiencia transfectiva con la adición de protamina, con aumentos de casi un 20% al usar concentraciones de 5 µg/mL, las células U251 apenas ven variar su índice de éxito apenas un 1% en las mismas condiciones. Esta mayor sensibilidad de las células MG63 también tiene su reverso negativo a altas concentraciones de protamina (10 µg/mL), donde la eficiencia disminuye en mucha mayor medida que en la línea celular U251.

Por tanto, por haber sido las células que alcanzaron un mayor éxito en su transfección, se seleccionaron las células MG63 transfectadas de acuerdo a una dilución lentiviral 1:2 y una concentración de protamina de 5 µg/mL para ser utilizadas en las pruebas subsiguientes de cultivo en scaffolds y chips.

5.3 Estudio de la implantación celular en diferentes variedades de scaffolds

En este experimento, realizado de acuerdo al apartado 4.6 de esta memoria, se procedió al cultivo de células MG63 sobre diferentes variedades de scaffold con el objetivo de evaluar la idoneidad de cada uno de ellos. Asimismo se evaluaron diferentes modificaciones del medio o los scaffold de cara a identificar posibles mejoras respecto al cultivo estándar.

Se realizó en primer lugar un análisis visual a fin de detectar posibles contaminaciones y de observar el crecimiento celular sobre los scaffolds, obteniéndose las siguientes imágenes:

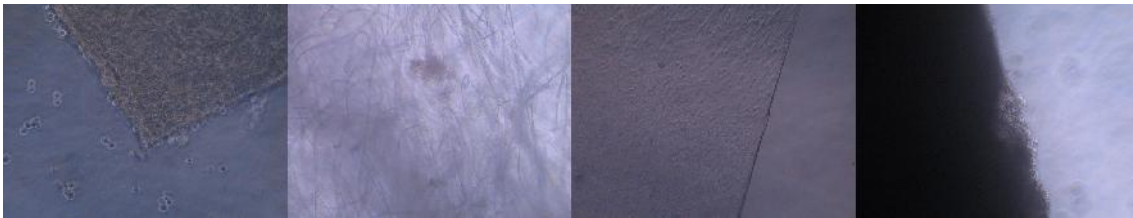


Imagen 5: Células MG63 creciendo en medio estándar en scaffolds de colágeno (izq), PLLA fibroso (centr-izq), PC (ctr-dcha) y PLLA poroso (dcha).

En el análisis visual del cultivo en condiciones estándar pueden detectarse pequeñas cantidades de células adheridas al scaffold en todos los casos salvo en el de PC. Esta diferencia aparente puede deberse al carácter laminar de dicho scaffold, en el cual las células podrían encontrarse en la cara no visible de éste.



Imagen 6: Células MG63 creciendo en medio con metocel 20% en scaffolds de colágeno (izq), PLLA fibroso (ctr-izq), PC (ctr-dcha) y PLLA poroso (dcha).

En el caso de los cultivos en medio suplementado con methocel, pueden localizarse células en todas las variedades de scaffold, aunque con un mayor éxito aparente en los scaffolds de PC y PLLA poroso.

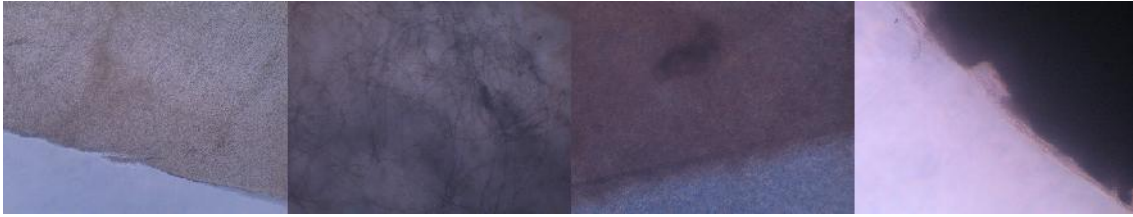


Imagen 7: Células MG63 creciendo en medio suplementado con colágeno en scaffolds de colágeno (izq), PLLA fibroso (ctr-izq), PC (ctr-dcha) y PLLA poroso (dcha).

En los casos de cultivo en medio polimerizado con colágeno, pueden detectarse pequeños grupúsculos de células en los scaffold laminares de PC y colágeno, pero no en los tridimensionales de PLLA. Esta diferencia puede estar motivada por una combinación de la mayor opacidad de los scaffolds sumada a una facilidad mayor del colágeno para polimerizar adecuadamente sobre superficies bidimensionales como las ofrecidas por los modelos de PC y colágeno.



Imagen 8: Células MG63 creciendo en medio estándar en scaffolds de colágeno (izq), PLLA fibroso (ctr-izq), PC (ctr-dcha) y PLLA poroso (dcha) sometidos previamente a un tratamiento por plasma¹⁰.

Finalmente en los scaffolds sometidos a una activación por plasma pueden detectarse células en todos los scaffolds, en cantidades apreciables en todos ellos.

A continuación se procedió al conteo de las células existentes en cada scaffold, siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.6.2 de esta memoria. Los resultados, expuestos en número de células contabilizadas en la suma de los 4 cuadrantes de la Cámara de Neubauer fueron los siguientes:

Tabla 3: Resultado del conteo celular tras la colonización de los scaffolds.

	MEDIO ESTÁNDAR			METHOCEL 20%			COLÁGENO			PLASMA		
	E1	E2	M	E1	E2	M	E1	E2	M	E1	E2	M
PLLA Poroso	820	823	821.5	852	854	853	836	839	837.5	866	868	867
PLLA fibroso	812	815	813.5	843	846	844.5	828	831	829.5	858	861	859.5
Policarbonato	824	827	825.5	855	857	856	836	839	837.5	869	871	870
Colágeno	816	819	817.5	847	851	849	832	835	833.5	862	865	863.5

Los datos obtenidos reflejan que, a igualdad de condiciones, el scaffold que permite una mayor proliferación celular es el de policarbonato, seguido a continuación del de PLLA poroso, el de colágeno, y finalmente el de PLLA fibroso. Esto es observable a simple vista bajo el microscopio óptico, con la excepción del scaffold de PLLA poroso donde su extrema opacidad impide visualizar la células de su interior, aparentando una menor efectividad a la que realmente posee. Este problema podría solucionarse visualizándolo bajo un microscopio de fluorescencia que nos permitiera localizar las células internalizadas.

Por otro lado, todas las modificaciones estudiadas en esta prueba mejoraron la proliferación celular respecto a su situación basal en medio estándar, siendo los aumentos obtenidos los siguientes:

- a) Colágeno: Aumento medio de la colonización celular del scaffold de un 1,94% respecto al medio estándar.
- b) Methocel 20%: Aumento medio de la colonización celular de un 3,8% respecto al cultivo en medio estándar.
- c) Plasma: Aumento medio de un 5,55% en la colonización celular respecto al cultivo en scaffolds sin tratar.

Por tanto tras este experimento se puede concluir que si bien todos los métodos de ensayo empleados han sido exitosos en mayor o menor medida, el método más efectivo es con diferencia el tratamiento por plasma de los scaffolds.

Asimismo puede afirmarse que los scaffolds que más favorecen la colonización celular son el policarbonato entre los scaffolds laminares, y el PLLA poroso en los tridimensionales, sin que exista una predominancia clara de una categoría sobre la otra.

5.4 Eficacia en la siembra de chips con scaffold integrado

Para la realización de esta prueba final, realizada de acuerdo al punto 4.7 de Materiales y Métodos, se seleccionaron dos chips de PLLA con scaffolds diferentes incorporados en sus cámaras internas. Los scaffolds seleccionados fueron los dos modelos tridimensionales, el PLLA poroso y el PLLA fibroso, por ser aquellos que simulan con mayor fidelidad el ambiente natural de las células en el interior de un ser vivo.

Tras la siembra y un periodo de incubación de 24h se procedió a la observación de las células mediante microscopía de fluorescencia a fin de evaluar el éxito en la siembra de los diferentes scaffolds. Se observaron células en crecimiento en ambos tipos de scaffold en todos los canales, pero con diferencias sustanciales que permiten obtener las siguientes conclusiones:

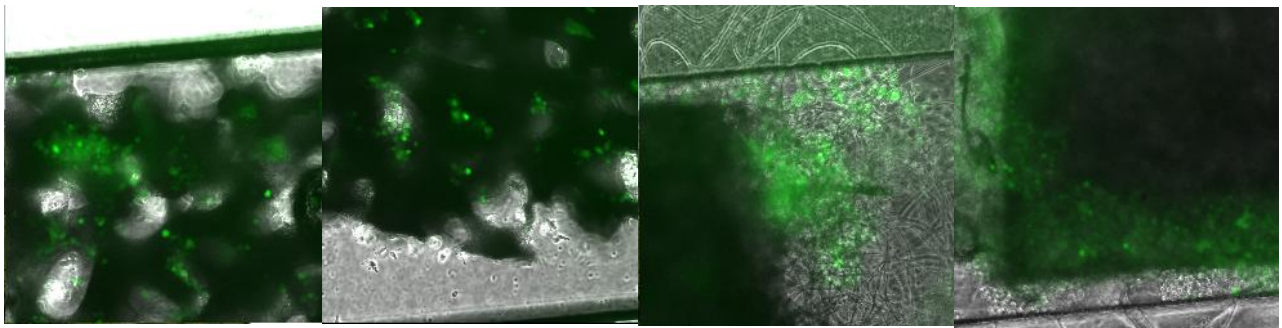
- d) En el caso del PLLA fibroso, las células no se internalizaron correctamente y crecieron únicamente en las regiones limítrofes del scaffold, mientras que en el PLLA poroso penetraron en su interior sin dificultad y colonizaron el scaffold de forma homogénea.
- e) La siembra parece ser mucho más homogénea en el caso del PLLA poroso, al no observarse diferencias sustanciales en la densidad celular entre unos canales y otros. Sin

embargo en el chip con scaffolds de PLLA fibroso se observan dos canales con una elevada concentración celular mientras el restante está casi vacío.

Es muy probable que estas diferencias deriven de la propia estructura interna del scaffold, donde las fibras parecen suponer un mayor obstáculo para la internalización de las células y donde se depende casi en exclusiva de la retención de éstas en las regiones limítrofes del scaffold, donde un arrastre excesivo puede eliminar casi todo el inóculo.

Es por tanto que se concluye que los scaffolds de PLLA poroso ofrecen mejores perspectivas en cuanto al éxito de la implantación celular en scaffolds internalizados en chips microfluídicos de cara su posible aplicación futura en estos dispositivos.

Imagen 2: Crecimiento celular sobre scaffolds de PLLA poroso (izq) y PLLA fibroso (dcha) observados bajo microscopio de fluorescencia.



Los datos relativos al éxito de la implantación y cultivo obtenidos en los diferentes modelos de scaffold son consistentes con los resultados obtenidos en el punto 5.3 de esta memoria, donde los scaffolds de PLLA poroso demostraron ya ser más eficaces que su contraparte fibrosa.

6. CONCLUSIONES

a) Resistencia al cultivo en Opti-MEM

- Todos los tipos celulares testados (MG63, U251 y HUVEC) fueron capaces de sobrevivir, sin un aumento apreciable en la muerte celular, a un periodo de incubación de 24h en medio Opti-MEM, carente de suero.
- Mientras los tipos celulares MG63 y U251 fueron capaces de mantener una tasa de crecimiento elevada, las células HUVEC mantuvieron invariable su grado de confluencia.

b) Trasfección lentiviral

- Los 3 factores estudiados: concentración de protamina, dilución de la carga lentiviral y tipo celular influyeron significativamente en la eficiencia de la transfección.

- La influencia de la dilución de la carga viral deja de ser perceptible a partir de diluciones de 1:4, presentando a partir de ésta proporciones casi idénticas de células transfectadas.
- La protamina aumenta efectivamente la eficiencia del proceso de transfección cuando se suministra al medio a una concentración de 5 µg/mL, siendo a partir de ahí ineficaz e incluso contraproducente en algún caso.
- El tipo celular se probó como un factor de interés debido a la diferente sensibilidad que mostraron las células MG63 y U251 frente a la protamina, siendo ésta mucho más eficaz en su cometido cuando se aplicaba a células MG63.

c) Implantación celular en scaffolds

- Entre todos los scaffolds ensayados, aquellos que permitieron un mayor éxito en la colonización celular fueron los scaffolds de policarbonato, seguidos respectivamente por los de PLLA poroso, colágeno y PLLA fibroso. Por tanto, no se puede determinar que los scaffolds bidimensionales (policarbonato y colágeno) y los tridimensionales (PLLA poroso y fibroso) presenten una ventaja clara unos sobre otros
- De entre todas las condiciones de cultivo evaluadas, el tratamiento de los scaffolds mediante plasma se demostró como el más eficaz de cara a mejorar la colonización celular de éstos.

d) Siembra de chips microfluídicos con scaffold interno

- Tanto el chips con scaffolds de PLLA poroso como el que contenía los de PLLA fibroso fueron colonizados con éxito por nuestras células MG63 en todos los canales que poseían.
- Las células demostraron tener más facilidad para internalizarse, y por tanto colonizar homogéneamente, en los scaffolds de PLLA poroso.
- Por el contrario, los scaffolds de PLLA fibroso ofrecieron un mayor resistencia a la internalización limitando la colonización celular a los bordes del scaffold, una localización más precaria y donde es fácil que las células se vean arrastradas.

CONCLUSIONS

a) Cell resistance to culture in Opti-MEM

- All the cell lines tested (MG63, HUVEC and U251) were able to survive, without any appreciable increase in cell death, an incubation period of 24h in Opti-MEM serum-free media.
- While MG63 and U251 cell lines were able to maintain a high rate of growth, HUVEC remained unchanged without any variation on its confluency degree.

b) Transfection lentiviral

- All of the three factors studied: protamine concentration, lentiviral load dilution and cell type influenced significantly the efficiency of transfection process.
- The influence due to the viral load dilution is only appreciable between the most concentrated one 1:2 and the following, without any perceptible difference in dilutions of 1:4 ratio or higher, presenting all of them almost identical transfection ratios.
- Protamine effectively increases the efficiency of the transfection process when added to the medium at a concentration of 5 µg/mL, higher concentrations being ineffective or even counterproductive in some cases.
- The cell type was also a factor of interest due to the different sensitivity showed by MG63 and U251 cells regarding to the protamina concentration, being the first ones more sensitive to its presence in the media.

c) Cell colonization rate in different types of scaffolds

- Among all the scaffolds tested, those that allowed greater success in cell colonization were the PC ones, followed respectively by porous PLLA, collagen and fibrous PLLA scaffolds. Therefore, it cannot be determined that two-dimensional scaffolds (polycarbonate and collagen) and three dimensional (porous and fibrous PLLA) have a clear advantage over one another.
- Of all culture conditions tested, the treatment by plasma scaffolds was proved as the most effective one, with increases over 5% in cell colonization rate. Collagen and methocel enriched media also increased this rate, improving it a 1,94% and 3,8% respectively.

d) Cell colonization in microfluidic chips with internal scaffolds

- Both chips with PLLA porous scaffolds and those containing the fibrous PLLA were successfully colonized by MG63 cells possessed in all the internal chambers.
- The cells proved to be more easily internalized and homogeneously colonize the internal chamber in those that contained the porous PLLA scaffolds.
- On the contrary, the PLLA fibrous scaffolds offered a greater resistance to cellular internalization, limiting the cell colonization to the edges of the scaffold, a more precarious location where it is easier for the cells to be drawn away and lost when introducing the media.

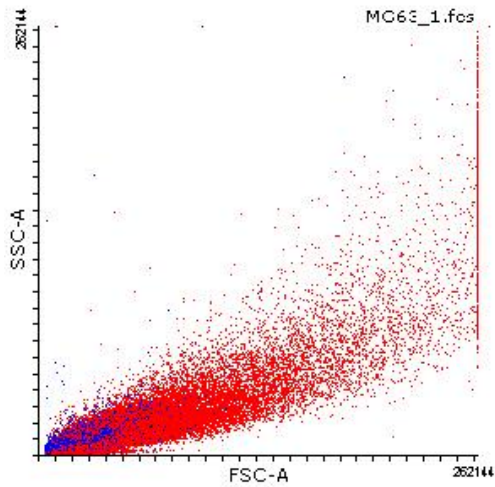
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. S.Halldorsson, E.Lucumi, R.Gómez-Sjöberg, Ronan M.T. Fleming. **Biosensors and Bioelectronics** 63 (2015) 218-231.

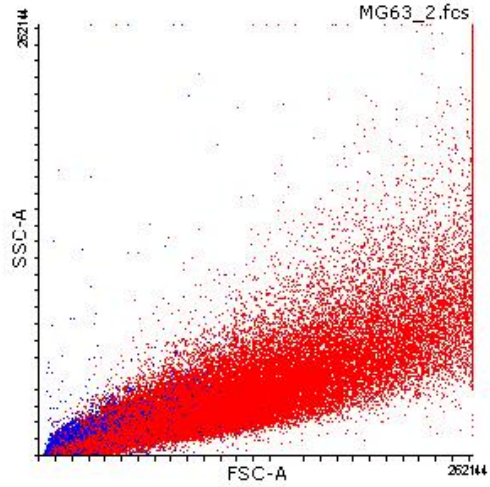
2. On-chip CO₂ control for microfluidic cell culture. Samuel P. Forry, Laurie E. Locascio. **Lab Chip** 11 (2011) 4041-4046.
3. The origins and the future of microfluidics. George M. Whitesides. **Nature** 442 (2006) 368-373
4. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Fergal J. O'Brien. **Materials Today** 14 (2011) 88-95
5. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. B.P.Chan, K.W.Leong. **European Spine Journal** 17 (2008) 467-479
6. Controlling stem cell-mediated bone regeneration through tailored mechanical properties of collagen scaffolds. Hongli Sun, Feng Zhu, Qingang Hu, P.H. Krebsbach. **Elsevier** 35 (2014) 1176-1184
7. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. E.Vigna, L.Naldini. **J Gene Med** 2 (2000) 308-316
8. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. J.Lannutti, D.Reneker, T.Ma, D.Tomasko, D.Farson. **Next Generation Biomaterials** 27 (2007) 504-509
9. Integration of Endothelial Cells in Multicellular Spheroids Prevents Apoptosis and Induces Differentiation. Thomas Korff, Hellmut G.Augustine. **J Cell Biol.** 143 (1998) 1341-1352
10. Surface modification of polystyrene dishes using plasma techniques to enhance cell adhesion and proliferation. Y. Sasai, N. Matsuzaki, S. Kondo, Y. Yamauchi, M. Kuzuya. **International Plasma Chemistry Society** (2009)

8. ANEXOS

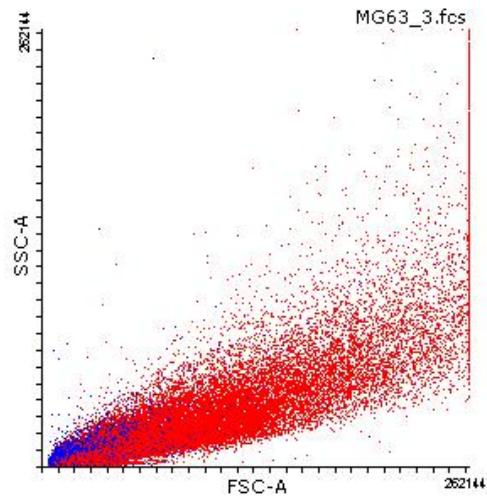
ANEXO 1: RESULTADOS DEL CITÓMETRO EN CÉLULAS MG63



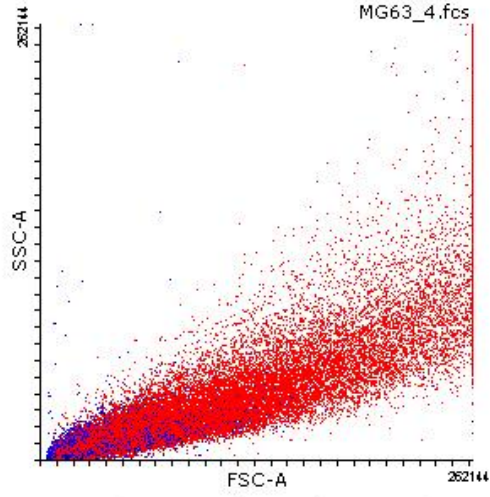
	Events	% of Vis
All events	53.309	100,00
Red	35.670	66,91
Blue	16.568	31,08



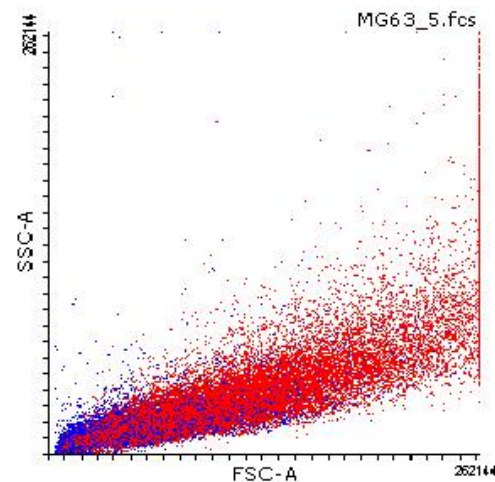
	Events	% of Vis
All events	100.404	100,00
Red	85.768	85,42
Blue	14.057	14,00



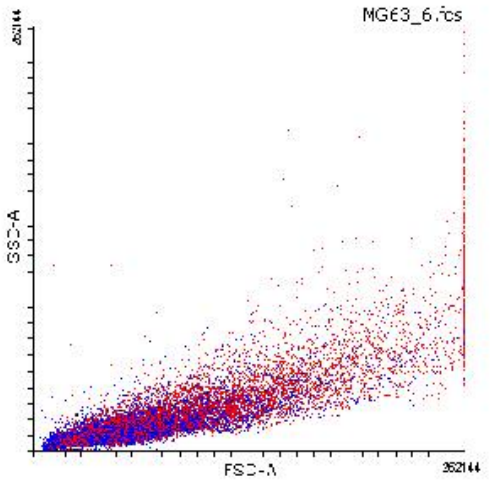
	Events	% of Vis
All events	50.518	100,00
Red	38.978	77,16
Blue	11.251	22,27



	Events	% of Vis
All events	48.236	100,00
Red	39.110	81,08
Blue	8.446	17,51

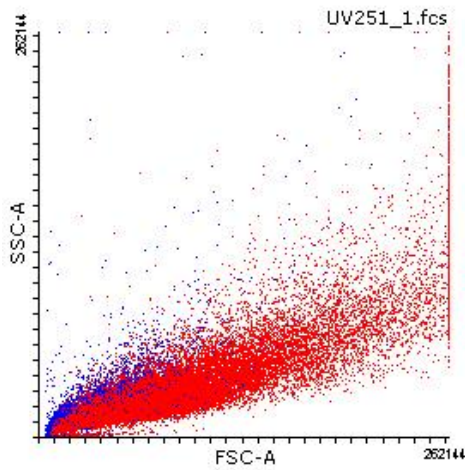


	Events	% of Vis
All events	40.658	100,00
Red	29.363	72,22
Blue	10.996	27,05

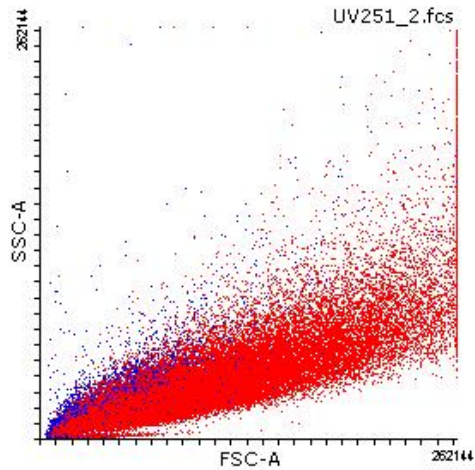


	Events	% of Vis
All events	16.303	100,00
Red	8.343	51,17
Blue	7.734	47,44

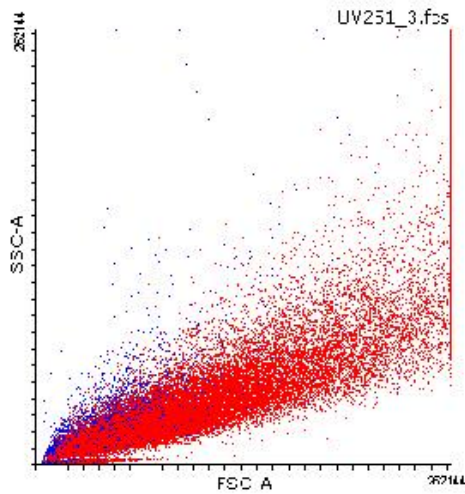
ANEXO 2: RESULTADOS DEL CITÓMETRO EN CÉLULAS U251



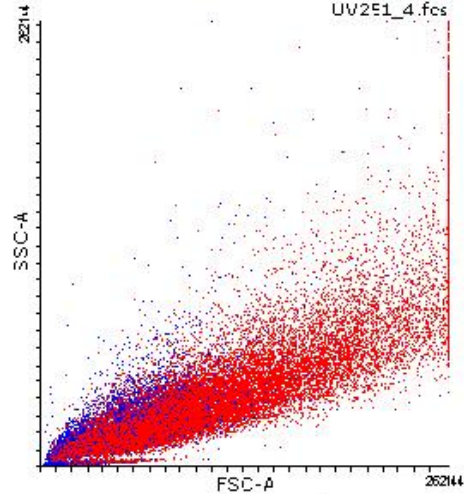
	Events	% of Vis
All events	38.526	100,00
Red	34.730	90,15
Blue	3.785	9,82



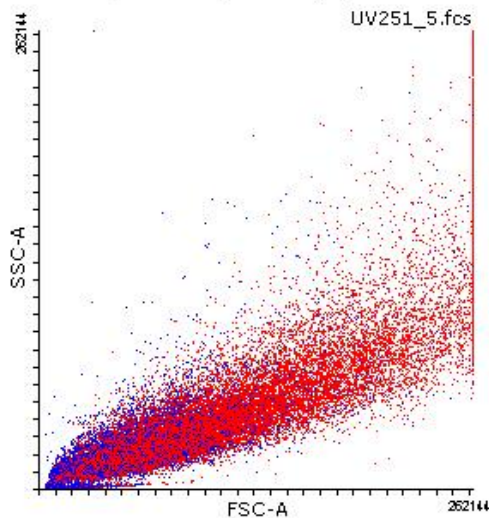
	Events	% of Vis
All events	82.384	100,00
Red	75.169	91,24
Blue	6.832	8,29



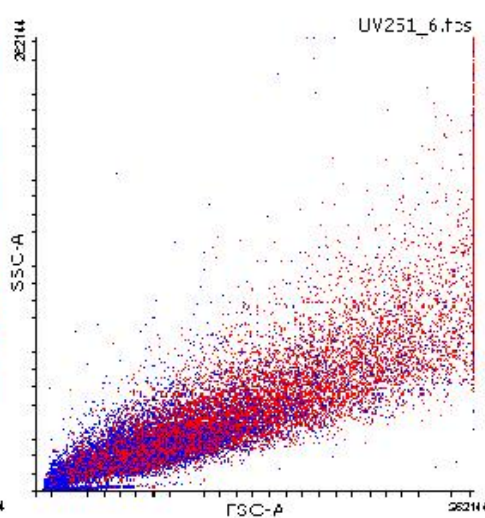
	Events	% of Vis
All events	39.772	100,00
Red	35.937	90,36
Blue	3.751	9,43



	Events	% of Vis
All events	40.196	100,00
Red	33.072	82,28
Blue	6.895	17,15



	Events	% of Vis
All events	39.415	100,00
Red	27.741	70,38
Blue	11.377	28,86



	Events	% of Vis
All events	31.657	100,00
Red	16.959	53,57
Blue	14.294	45,15

ANEXO 3: LISTA DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA EMPLEADAS

Scaffold: Andamio para el crecimiento celular

GFP: Green Fluorescent Protein

PC: Policarbonato

DMEM: Basal Medium Eagle Modification

Methocel: Methylcellulose

EGM: Endothelial cell Growth Medium

PBS: Phosphate-buffered saline