(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 659 567**

(51) Int. CI.:

A61L 27/52	(2006.01)	***C08G 65/32***	(2006.01)
C25B 3/00	(2006.01)	***C12N 11/04***	(2006.01)
C25B 3/10	(2006.01)	***C12P 7/18***	(2006.01)
C25B 9/12	(2006.01)	***C25B 11/02***	(2006.01)
C08J 3/075	(2006.01)	***C25B 11/04***	(2006.01)
C08G 65/02	(2006.01)		
C08G 65/04	(2006.01)		
C08G 65/06	(2006.01)		
C08G 65/08	(2006.01)		
C08G 65/26	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2014 PCT/EP2014/070827**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15044431**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2014 E 14793024 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 3049122**

(54) Título: **Superficie de estructuras poliméricas modificadas electroquímicamente, en particular hidrogeles PEG para penetración celular potenciada**

(30) Prioridad:

29.09.2013 EP 13186561
01.10.2013 EP 13186965

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2018

(73) Titular/es:

UNIVERSITÄT ZÜRICH (50.0%)
Prorektorat MNW Rämistrasse 71
8006 Zürich, CH y
ETH ZÜRICH (50.0%)

(72) Inventor/es:

MILLERET, VINCENT;
SIMONA, BENJAMIN R.;
VÖRÖS, JÁNOS y
EHRBAR, MARTIN

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Superficie de estructuras poliméricas modificadas electroquímicamente, en particular hidrogeles PEG para penetración celular potenciada

Memoria descriptiva

La invención se refiere a una estructura de polímero, a un método para generar dicha estructura, a un dispositivo, en particular para recibir dicha estructura, y a otros aspectos.

Durante las últimas décadas se han desarrollado enormemente hidrogeles sintéticos y naturales para emular la matriz extracelular natural (MEC) [1]. La capacidad para controlar independientemente las propiedades físicas y químicas de los hidrogeles hace que estas plataformas de cultivo celular sean capaces de soportar el crecimiento y la diferenciación de una amplia gama de tipos de células y tejidos [2]. Al controlar espacialmente la incorporación de moléculas bioactivas, es posible abordar la compleja y heterogénea arquitectura de los tejidos humanos y crear así mejores miméticos de tejido [3], [4], [4c]. Dados los prolongados tiempos de incubación de reactivo y las extensas etapas de lavado, la producción de dichos geles con un patrón determinado puede durar hasta varios días [3-4]. Durante este tiempo, pueden tener lugar interacciones no deseables entre las moléculas bioactivas solubles (utilizadas para crear el patrón) y las células cultivadas en el hidrogel, afectándolas posiblemente de manera incontrolada.

Una estrategia para superar las alteraciones celulares incontroladas y no deseadas durante estos procedimientos consiste en sembrar las células después de la fabricación de andamios y patrones. Sin embargo, las células sembradas sobre la superficie de un hidrogel no invaden la matriz, o lo hacen escasamente [3, 5]. Este fenómeno tiene lugar también para hidrogeles optimizados para ser permisivos con las células embebidas, lo que indica que la frontera de la superficie representa una barrera para la invasión celular de la masa. Las estrategias actuales para potenciar la penetración celular consisten principalmente en alterar las propiedades de la masa de los hidrogeles incorporando macroporos a través de diversas técnicas [5-6].

Sobre la base de lo expuesto, el problema que subyace bajo la presente invención es por tanto proporcionar una estructura de polímero mejorada, en particular un hidrogel, que potencie de forma particular la penetración celular sin afectar a las propiedades de la masa.

Dicho problema se resuelve con una estructura de polímero que tiene las características de la reivindicación 1. Las realizaciones de la invención se afirman en las reivindicaciones más adelante y/o se describen a continuación.

De acuerdo con la reivindicación 1, se divulga una estructura de polímero que comprende al menos un polímero, en el que dicha estructura comprende un volumen, una superficie que delimita dicho volumen, p.ej., al menos en un lado del volumen, y en la que dicho polímero comprende una pluralidad de cadenas de polímero conectadas por uniones caracterizadas por una densidad de unión, en la que dicha densidad de unión (es decir, la densidad de dichas uniones es el número de uniones por volumen) aumenta en particular de forma monótona, más particularmente de forma estrictamente monótona y, en particular de forma continua desde la superficie hacia el volumen (o masa) de la estructura de polímero, de manera que se forma/está presente un gradiente de densidad de unión (la dirección del gradiente puede ser normal para dicha superficie). Por tanto, la densidad de unión, en particular no se forma como una etapa, sino que aumenta gradualmente desde un valor mínimo hasta un valor máximo a lo largo de una distancia desde la superficie, siendo dicha distancia al menos 1 µm de longitud, en particular al menos 100 µm de longitud, en particular al menos 150 µm de longitud, en particular al menos 200 µm de longitud, en particular al menos 250 µm de longitud. De acuerdo con una realización, la forma/curso funcional de la densidad de unión creciente puede ser una entre: exponencial, sigmoide o lineal. También son posibles otras formas. Dado el hecho de que la densidad de unión es cero en la superficie y aumenta en dirección a la masa (volumen), la estructura de polímero comprende una superficie blanda y una rigidez que aumenta en dirección a la masa.

En particular una unión o reacción de unión se refiere en particular a la unión química, en particular a través de la formación de un enlace covalente entre dos compuestos químicos, en particular un primer y un segundo compuesto (p.ej., cadena de polímero) que comprende una primera fracción (que pertenece al primer compuesto) y una segunda fracción (que pertenece al segundo compuesto) entre los cuales se establece la unión y, en particular la unión covalente.

En particular dicha superficie es una superficie exterior (p.ej., una superficie orientada al exterior) que es una superficie libre (es decir, no está en contacto con una pared del recipiente en el que se puede disponer la estructura de polímero, véase más adelante).

Ventajosamente, dicho gradiente modificado (p.ej. electroquímicamente) en una superficie de polímero (en particular un hidrogel) permite que la célula penetre espontáneamente en el polímero/hidrogel, mientras que la célula sembrada en un gel polimerizado convencionalmente forma una capa de células en dos dimensiones.

Especialmente en campo de la fabricación de aditivos, el control de las fronteras del gel es crucial para evitar la formación de barreras físicas entre elementos ensamblados.

De acuerdo con una realización de la estructura de polímero de acuerdo con la invención, la densidad de unión es 0 % en la superficie (es decir, no existen uniones en la superficie) y alcanza una densidad de unión máxima (que corresponde a la densidad de unión de la masa y por tanto se denomina densidad aparente) en el volumen (que también se nombra como masa), en la que, en particular la densidad de unión alcanza el máximo a una distancia desde la superficie comprendida entre 1 µm y 1000 µm. De acuerdo con una realización, dicha distancia se encuentra preferentemente entre 50 µm y 150 µm.

Asimismo, de acuerdo con una realización de la estructura de polímero de acuerdo con la invención, el polímero es un polímero de origen natural, en particular uno entre los siguientes polímeros: fibrina, alginato, quitosano o un polímero sintético (es decir, un polímero que no es de origen natural, incluyendo también polímeros de origen natural modificados), en particular uno entre los siguientes polímeros: polietilen glicol (PEG), ácido poliláctico, SU-8. Asimismo, el polímero puede ser cualquier polímero que consiste o que incluye una combinación de monómeros, p.ej., dopamina, grupos que contienen amina como lisina, catecoles, grupos que contienen fosfato, grupos que contienen tiol, grupos que contienen alcohol, ésteres activos y cualquier polímero o dendrímero que contiene cualquiera de los grupos mencionados (p.ej., Hybrane, Boltorn).

Asimismo, de acuerdo con una realización de la estructura de polímero de acuerdo con la invención, la estructura de polímero es una estructura de polímero compuesta (mezcla) que comprende una pluralidad de diferentes polímeros, en la que cada uno de los polímeros comprende un gradiente de densidad de unión, en la que los gradientes de densidad de unión se extienden en diferentes direcciones y/o diferentes distancias/longitudes.

Asimismo, de acuerdo con una realización de la estructura de polímero de acuerdo con la invención, el volumen comprende uno de los siguientes: una forma esférica, una forma cilíndrica, una forma cúbica, una forma de paralelepípedo.

Asimismo, de acuerdo con una realización de la estructura de polímero de acuerdo con la invención, dichas cadenas de polímero comprenden o están formadas como polietilen glicol (PEG), en particular PEG con un peso molar dentro del intervalo de 4000 Da a 100000 Da, en particular 40000 Da y en la que, en particular dicho PEG es un PEG sin ramificar o ramificado, en el que, en particular el PEG ramificado comprende en particular 2, 3, 4 u 8 ramificaciones.

Asimismo, de acuerdo con una realización de la estructura de polímero de acuerdo con la invención, dicha estructura comprende células (p.ej., una unidad básica estructural, funcional y/o biológica de un organismo), en particular embebida en dicha estructura de polímero. En particular estas células están embebidas en la estructura de polímero durante la formación de dicha estructura de polímero.

Asimismo, de acuerdo con una realización de la estructura de polímero de acuerdo con la invención, dicha estructura de polímero es un hidrogel.

De acuerdo con un aspecto más de la presente invención, un implante comprende una estructura de polímero de acuerdo con la invención. En particular el implante está diseñado para su uso en un animal, en el que el implante está diseñado para potenciar la penetración de la célula desde el organismo del animal en la estructura de polímero del implante.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se divulga una membrana, siendo dicha membrana permeable para las células, en particular implementada en un material impermeable a las células, en el que la membrana comprende una estructura de polímero de acuerdo con la invención. Las células depositadas sobre la superficie del material impermeable y del material permeable se desplazarán a través del material a través de la región permeable solamente. La presencia del gradiente en un lado de la membrana permite la penetración direccional de las células a través del material (véase también las Fig. 19 a 26).

En particular la membrana puede separar dos compartimentos y puede comprender al menos una región permeable que tiene una superficie y una masa/volumen (p.ej. tal como se ha descrito). La superficie puede comprender un gradiente de densidad de unión (p.ej. tal como se ha descrito), tal que las células pueden desplazarse a través de dicha superficie desde un compartimento a otro compartimento. La membrana puede comprender varias de estas regiones permeables. La membrana también puede comprender al menos dos regiones permeables que tienen cada una de ellas una superficie con un gradiente de acuerdo con la invención, en el que una superficie está orientada hacia uno de los compartimentos y la otra superficie está orientada hacia el otro compartimento. De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se divulga un método de acuerdo con la reivindicación 8, en concreto un método para embeber células en una matriz (p.ej., una estructura de polímero), comprendiendo dicho método las etapas de:

- proporcionar una estructura de polímero de acuerdo con la invención,

- sembrar células en la superficie de dicha superficie de dicha estructura de polímero para que, en particular las células penetren en el volumen de la estructura de polímero, en particular debido a dicho gradiente de densidad de unión.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se divulga un método para generar una estructura de polímero de acuerdo con la reivindicación 9. De acuerdo con ello, el método para generar una estructura de polímero que comprende un volumen, una superficie y un gradiente de densidad de unión, en particular de acuerdo con la invención, comprende las etapas de:

- proporcionar un polímero que comprende una pluralidad de cadenas de polímero, en la que cada una de las cadenas de polímero comprende una fracción (en particular las fracciones de dos cadenas de polímero pueden ser iguales o diferentes entre sí).
- generar la estructura de polímero conectando las cadenas de polímero a través de una reacción de unión entre las fracciones de dichas cadenas de polímero (en particular la reacción de unión puede tener lugar directamente entre las fracciones o puede tener lugar indirectamente a través de un reticulador) de manera que se forme el gradiente de densidad de unión, en el que aumenta la densidad de unión (es decir, la densidad de dichas uniones) , en particular de forma monótona, en particular estrictamente de forma monótona y, en particular de forma continua, desde la superficie hacia el volumen de la estructura de polímero, de manera que se forma/está presente un gradiente de densidad de unión.

De acuerdo con una realización del método de acuerdo con la invención para generar una estructura de polímero, dicha reacción de unión es controlada aplicando uno entre: una corriente eléctrica, radiación o por adición de un compuesto capaz de unir dichas fracciones, en particular un reticulador que une dichas fracciones.

Asimismo, de acuerdo con una realización del método de acuerdo con la invención para generar una estructura de polímero, dichas cadenas de polímero se proporcionan por polimerización de monómeros (en particular en el contexto de la presente invención, polimerización se refiere a un proceso de reacción de moléculas de monómero en una reacción química para formar cadenas de polímero o redes tridimensionales), en la que dichos monómeros comprenden una de dichas fracciones.

Asimismo, de acuerdo con una realización del método de acuerdo con la invención para generar una estructura de polímero, se proporciona dicho polímero en una solución y es controlada dicha reacción de unión por el pH de dicha solución, en la que, en particular para controlar dicho pH, se aplica una corriente que induce a la electrolisis a dicha solución utilizando un primer electrodo que cubre dicha superficie de la estructura de polímero al menos parcial o completamente. Preferentemente, se utiliza una densidad de corriente que oscila entre 10nA/ mm^2 y 1 µA/ mm^2. Esto significa en particular que se ajusta el flujo de corriente para obtener la densidad de corriente deseada que se ajusta a la escala de la superficie del electrodo de trabajo (p.ej., primer electrodo o segundo electrodo). De acuerdo con una realización de la presente invención, una densidad de corriente preferente se encuentra dentro del intervalo de 0,05 µA/mm^2 a 0,15 µA/mm^2, en particular de 0,075 µA/mm^2 a 0,0125 µA/mm^2, y en particular equivale esencialmente a 0,1 µA/mm^2.

El primer electrodo puede asumir una polarización anódica o una polarización catódica, que lo convierte en un ánodo o un cátodo. Un segundo electrodo podría asumir la polaridad contraria a la del primer electrodo.

Asimismo, de acuerdo con una realización del método de acuerdo con la invención para generar una estructura de polímero, dicha reacción de unión se lleva a cabo o se cataliza mediante una enzima, en particular transglutaminasa, más en particular un factor XIIIa (descrito por un Número UniProt: P00488) o un precursor de la misma. Los números UniProt se refieren a los números de acceso de la base de datos UniProt.

En particular las fracciones de reacción de dos cadenas de polímero son acilo (primera fracción), en particular una amida, y una amina (segunda fracción).

En particular dichas primera fracción y segunda fracción consisten en un péptido que comprende dichos acilo/amida o dicha amida.

En particular la enzima está presente en dicha estructura de polímero, en particular por adición de la enzima a la estructura y/o solución.

En particular la actividad enzimática de dicha enzima es controlada, en particular es inhibida alterando dicho pH de la solución localmente, en la que, en particular dicha enzima convierte dichas fracciones de dichas cadenas de polímero por medio de la formación de un enlace covalente entre dichas fracciones.

En particular para controlar dicho pH, se aplica a dicha solución una corriente que induce la electrolisis utilizando un primer electrodo que cubre dicha superficie de la estructura de polímero al menos en parte o completamente (véase lo anterior).

Asimismo, de acuerdo con una realización del método de acuerdo con la invención, para generar una estructura de polímero, dichas cadenas de polímero comprenden o están formadas de polietilen glicol (PEG), en particular PEG con un peso molar dentro del intervalo de 4000 Da a 100000 Da, en particular 40000 Da. En particular dicho PEG es PEG sin ramificar o ramificado, en el que, en particula, el PEG ramificado comprende en particular 2, 3, 4 u ocho ramificaciones.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se divulga una estructura de polímero de acuerdo con la reivindicación 18, en concreto, una estructura de polímero formada por al menos un primer polímero, en la que dicha estructura comprende un volumen y una superficie (p.ej., que delimita dicho volumen, p.ej. al menos en un lado, consúltese lo anterior), en la que dicho polímero comprende una pluralidad de cadenas de polímero conectadas por uniones caracterizadas por una densidad de unión, en la que aumenta dicha densidad de unión (es decir, la densidad de dichas uniones, véase lo anterior), en particular de forma monótona, en particular de forma estrictamente monótona y, en particular de forma continua desde la superficie del volumen (masa) de la estructura de polímero, de tal manera que se forma/está presente un gradiente de densidad de unión, en el que se genera la estructura de polímero utilizando el método de acuerdo con la invención para generar una estructura de polímero. Se describe un dispositivo, comprendiendo dicho dispositivo:

- un recipiente para una estructura de polímero, y
- en particular la propia estructura de polímero, en particular la estructura de polímero de acuerdo con la invención, estructura de polímero que está contenida en dicho recipiente, en el que la estructura de polímero comprende un gradiente de densidad de unión.

De acuerdo con una realización del dispositivo de acuerdo con la invención, el dispositivo comprende un primer y un segundo electrodo para controlar dicho pH en dicha solución aplicando a dicha solución una corriente que induce la electrolisis. En particular el primer y/o segundo electrodo está revestido con PLL-g-PEG.

En particular el recipiente está fabricado con polidimetil siloxano (PDMS). Asimismo, en particular el recipiente comprende una pared circunferencial que se extiende desde el fondo del recipiente de manera que la pared y el fondo delimitan una cámara para recibir la estructura de polímero o la solución que comprende los precursores de la estructura de polímero o hidrogel.

En particular el recipiente comprende un lado abierto de manera que la estructura de polímero o la solución que comprende los precursores de la estructura de polímero o hidrogel en la cámara comprende una superficie (p.ej. orientada hacia arriba).

En particular el primer electrodo está diseñado para entrar en contacto con dicha superficie. El volumen de la estructura de polímero /solución (aparte de la superficie) está delimitado por el recipiente (es decir, por la pared y el fondo del recipiente). En particular el primer electrodo está diseñado para cubrir la primera superficie, al menos en porciones, en particular completamente.

En particular el segundo electrodo (p.ej., contra-electrodo) sobresale hacia la cámara a través de un rebaje en la pared del recipiente. En particular el segundo electrodo se extiende a lo largo del fondo del recipiente y está enfrentado al primer electrodo. Mientras que el primer electrodo puede comprender una superficie plana bidimensional para entrar en contacto con la estructura de polímero o la solución que comprende los precursores de la estructura de polímero o hidrogel, el segundo electrodo puede tener una forma longitudinal (p.ej. conductor alargado /filiforme).

Por medio de los electrodos, se puede conseguir el cambio local del pH de la solución aplicando a la solución una corriente eléctrica a través de dichos electrodos de manera que se induce la electrolisis de la solución. Dicha electrolisis inducida por tensión tiene como resultado una disminución del pH local en la interfaz electrodo anódico-solución y en un aumento del pH local en la interfaz electrodo catódico-tampón.

La magnitud de la región alrededor de cada electrodo en la que se puede inhibir, confinar o promover la unión, reticulación /polimerización de los precursores depende de la densidad de corriente aplicada, el pH y la capacidad del tampón de la solución de precursor en proximidad con un electrodo.

Asimismo, de acuerdo con una realización del dispositivo de acuerdo con la invención, el recipiente puede comprender una pared que tiene dos porciones circunferenciales, en la que una primera porción rodea la cámara para recibir la estructura de polímero / solución, y en la que una segunda porción de la pared rodea otra cámara para recibir un fluido, en particular soluciones salinas, soluciones de tampón, una solución quimo-atrayente, una solución con factor de crecimiento, una suspensión de células o una mezcla de las mismas y otra solución a la que son sensibles las funciones de las células). En particular el segundo electrodo (o primer electrodo) puede estar dispuesto (desplazable) en un primer y un segundo rebaje de dicha pared, rebajes que están enfrentados entre sí, de manera que el segundo electrodo se extiende a través de la cámara y cierra dichos rebajes, y en particular sobresale fuera del recipiente, en el que el segundo rebaje está en conexión fluida con la otra cámara, de manera que – cuando se retira el segundo electrodo de dicho segundo rebaje, el fluido guardado en la otra cámara puede fluir a través de

dicho segundo rebaje hacia la primera cámara, en concreto hacia un canal de la estructura de polímero /hidrogel que se forma con la ayuda del segundo electrodo. En particular la segunda porción de la pared comprende un tercer rebaje que está alineado con el segundo rebaje (y en particular el primer rebaje) de manera que el segundo rebaje puede cerrarse insertando un medio de cierre (p.ej. un bastoncillo) en el segundo rebaje a través del tercer rebaje. En esta realización, las dos cámaras están también delimitadas cada una de ellas por un fondo desde el que se extienden dichas porciones de la pared, en el que el fondo de la primera cámara puede comprender un contra-electrodo (primer electrodo o segundo electrodo) o puede estar formado como contra-electrodo.

Asimismo, de acuerdo con una realización del dispositivo de acuerdo con la invención. El recipiente puede comprender una pluralidad de cámaras que reciben la estructura de polímero /solución, de manera que se pueden realizar experimentos de alto rendimiento utilizando el dispositivo.

De acuerdo con una realización del dispositivo de acuerdo con la invención, la estructura de polímero comprende un gradiente de densidad de unión en una superficie de la estructura de polímero que no está en contacto con el recipiente.

Asimismo, de acuerdo con una realización del dispositivo de acuerdo con la invención, la estructura de polímero comprende un canal en la estructura de polímero (p.ej., generado tal como se ha descrito), en particular que cruza la estructura, y un gradiente de densidad de unión en una interfaz (es decir, una superficie interior de la estructura) entre la estructura de polímero y el diámetro interior de dicho canal. Dicho gradiente puede estar presente en toda la interfaz entre el diámetro interior y la masa o solamente en un segmento o región de dicha interfaz. El gradiente puede ser normal para la interfaz (superficie) de manera que, en particular la densidad de unión sea mínima o cero en la interfaz y aumente hacia la masa (p.ej., tal como se ha descrito). Por tanto, la interfaz es blanda al mismo tiempo que aumenta la rigidez de la estructura hacia la masa que rodea el diámetro interior del canal.

Asimismo, de acuerdo con una realización del dispositivo de acuerdo con la invención, el polímero comprende una superficie que comprende al menos un rebaje (p.ej., fosas, pocillos, invaginaciones y otras formas complejas) y un gradiente de densidad de unión en dicha superficie en el emplazamiento de al menos un rebaje.

Asimismo, de acuerdo con una realización del dispositivo de acuerdo con la invención, se depositan células, en particular esferoides, micro-tejidos u otras formas de agregados de células, en al menos un rebaje para promover su invasión de la estructura polimérica.

Otros aspectos de la presente invención se señalan a continuación como artículos
Un aspecto de la invención de acuerdo con el

Artículo 1 se refiere a un gradiente de densidad en un polímero que se extiende desde la superficie en la que la densidad es 0 % (gradientes de densidad interfacial) hacia la masa alcanzando la densidad de reticulación máxima de 100 % en un intervalo de distancia entre 1 y 1000 µm.
Artículo 2: El gradiente de densidad de acuerdo con artículo 1, en el que el gradiente está formado electroquímicamente utilizando fotoquímica o utilizando difusión de un reticulador.
Artículo 3: El gradiente de densidad (interfacial) de acuerdo con el artículo 1 o 2 que se utiliza para potenciar la penetración celular en la masa del polímero, en particular de células sembradas sobre la superficie del polímero.
Artículo 4: La gradiente de densidad de uno de los artículos 1 a 3, en la que el polímero es natural (p.ej., fibrina, alginato, quitosano, etc.) o sintético (polietilen glicol, ácido poliláctico, SU-8 y otros).
Artículo 5: Una estructura polimérica compuesta (mezcla) caracterizada por gradientes de densidad de diferentes componentes que se extienden a lo largo de diferentes direcciones y diferentes longitudes, en particular de acuerdo con uno de los artículos 1 a 4.
Artículo 6: Un dispositivo que se caracteriza por un recipiente para una estructura de polímero (fabricado en cualquier forma y fabricada con plásticos o metales) y una estructura de polímero contenida en dicho recipiente caracterizado por un gradiente de densidad interfacial, en particular de acuerdo con uno de los artículos 1 a 4, en un lado del polímero que no está en contacto con el contenedor.
Artículo 7: Un dispositivo que se caracteriza por un recipiente para una estructura de polímero (fabricada en cualquier forma y fabricada con cualquier plástico o metal) y una estructura de polímero contenida en dicho recipiente caracterizado por un canal que cruza dicha estructura de polímero y que se caracteriza por un gradiente de densidad en la interfaz entre la estructura de polímero y partes o todo el diámetro interior del canal.
Artículo 8: Un dispositivo que se caracteriza por un recipiente para una estructura de polímero (fabricado en cualquier forma y fabricado con cualquier plástico o metal) y una estructura de polímero contenida en dicho recipiente caracterizado por una superficie que presenta fosas, pocillos, invaginaciones y otras formas complejas y que se caracteriza por un gradiente de densidad en partes o en toda la superficie de dichas formas complejas.
Artículo 9: Un dispositivo descrito en el artículo 8, en el que se depositan células (p.ej., células endoteliales, células madre mesenquimales y/u otras células), esferoides compuestos de uno o más de estos tipos de células, micro-tejidos y otras formas de agregados de células, en dichas fosas, pocillos o invaginaciones para promover su invasión de la estructura polimérica.

Artículo 10: Una estructura de polímero de forma esférica, semiesférica, cilíndrica, elipsoidal, piramidal, cúbica, cuboide o prismática caracterizada por uno o más gradientes de densidad en uno o más de los lados de dicha estructura o en parte de la superficie de dicha estructura.

Artículo 11: Una estructura de polímero descrita en el artículo 10 para su implantación en el cuerpo de animales para potenciar la penetración de células desde el cuerpo de dicho animal hacia la estructura de polímero.

Artículo 12: Una estructura de polímero descrita en el artículo 10 para su uso como membrana permeable para células implementadas en un material impermeable a las células.

Artículo 13: Cualquiera de las estructuras de polímero descritas, en donde están embebidas las células durante la formación de dicha estructura de polímero.

A continuación, se describirán otras características, realizaciones y ejemplos de la presente invención haciendo referencia a las figuras. En las que:

La Figura 1 muestra de forma esquemática una representación de la preparación experimental. Cámaras de PDMS de aproximadamente 50 µl de un dispositivo de acuerdo con la invención que alojan el contra-electrodo (segundo electrodo) en el que se vertieron los precursores de hidrogel; y en el que se situó un electrodo de trabajo plano (primer electrodo) durante la polimerización;

La Figura 2 muestra una representación esquemática de la producción de fronteras hidrogel: se dejan polimerizar los controles de manera convencional (aire-hidrogel) o se cubren con un ánodo en el que durante la polimerización no se impone corriente, se impone una densidad de corriente baja (0,1 µA/mm^2) o una alta (1 µA/mm^2)

La Figura 3 muestra perfiles de intensidad con fluorescencia de fronteras de hidrogel marcadas con FITC preparadas al aire o cubiertas con un electrodo sin corriente o con densidades de corriente que oscilan entre 0,1 y 1 µA/mm^2; y

La Figura 4 muestra las imágenes confocales de fluorescencia representativas correspondientes de las fronteras de hidrogeles marcadas con FITC;

La Figura 5 muestra la caracterización mecánica de la frontera de hidrogel. Las mediciones de fuerza-desplazamiento adquiridas por espectroscopia de fuerza coloidal de superficies de hidrogel al aire-, sin corriente, 0,1 µA/mm^2- y 1 µA/mm^2;

La Figura 6 muestra la infiltración de células en la superficie de hidrogel modificada al cabo de 1 día (a, d, g, j) y a los 3 días (b, e, h, k) tras la siembra de células en la parte superior de las superficies modificadas. Se produjeron superficies de hidrogel en ausencia de electrodos (a y b), o cubiertas con un ánodo, sin imponer ninguna corriente (d y e) o aplicando 0,1 µA/ mm^2 (g y h) y 1 µA/mm^2 (j y k);

La Figura 7 muestra la infiltración de células que se cuantificó al cabo de 1 día y a los 3 días de la siembra, analizando la fracción de células en diferentes profundidades del hidrogel (c, f, i, l). Se presentan los promedios y las desviaciones típicas (n=3);

La Figura 8 muestra la modificación de una interfaz hidrogel-hidrogel. Para emular la fabricación de aditivo, se vertió gel que contenía células en la parte superior de los hidrogeles con superficies modificadas: aire (izquierda) y 1 µA/mm^2 (derecha);

La Figura 9 presenta la infiltración de células desde la parte superior del gel hacia el fondo del hidrogel que se cuantificó el día 3, analizando la fracción de células a diferentes profundidades en el hidrogel del fondo;

La Figura 10 muestra reconstrucciones 3D de stacks (stacks de 100 x 5 µm) adquiridos por LSCM de las construcciones que contienen un hidrogel de fondo con una superficie modificada (102) (verde) un segundo gel (101) (rojo) que contiene células (100) (blanco); en c) la superficie del hidrogel de fondo no se modificó, mientras que en d) se aplicó 1 µA/mm^2 durante la polimerización;

La Figura 11 muestra la perturbación del hidrogel cuando se retira el electrodo de metal cuando no se aplica corriente. La representación esquemática y la fotografía del fenómeno experimental: se coloca un electrodo en la parte superior de la cámara durante la polimerización y la evaluación de la perturbación del gel tras la retirada del electrodo: cuando no se aplicó corriente el hidrogel perturbado permaneció sobre el electrodo (a) en cambio, no quedó hidrogel cuando se aplicaron las corrientes anódicas sobre el electrodo (b). Cuando se revistieron los electrodos con PLL-g-PEG, se pudo impedir la adhesión de gel a la superficie (c), que no fue el caso cuando se utilizaron superficies de Teflon (d).

La Figura 12: muestra microesferas en la superficie de hidrogel de 1 µA/mm^2. Se vertieron microesferas fluorescentes de 3 µm y 20 µm de diámetro (Fluoresbrite Plain YG, Polyscience Inc.) sobre la superficie de hidrogel y se dejaron sedimentar durante 1 hora y se llevó el seguimiento de su distribución adquiriendo Z-stacks

de 150 µm de espesor de la superficie de hidrogel utilizando un microscopio de barrido láser confocal SP5 (Leica, Alemania).

La Figura 13 muestra una caracterización mecánica de la sección transversal del hidrogel, en particular una representación esquemática de la preparación experimental: se cortaron los hidrogeles preparados tal como se ha descrito perpendicularmente con respecto a la superficie y se voltearon (el corte se presenta hacia arriba). Se vertieron perlas de 50 µm (200) en las secciones y se utilizaron para sondear las propiedades mecánicas del hidrogel en diferentes posiciones;

Figs. 14 - 15 muestran las curvas de fuerza-desplazamiento representativas adquiridas sobre el hidrogel en volumen (al menos 500 µm desde la superficie) confirman que hidrogel al aire y el hidrogel 0,1 µA/mm^2 tienen propiedades mecánicas en volumen similares (b). Al comparar el volumen y las curvas de fuerza superficial-desplazamiento, se confirmó que el hidrogel sin corriente tiene unas propiedades mecánicas homogéneas (c), mientras que el hidrogel al aire tiene una superficie más rígida en comparación con el volumen (d), y el hidrogel 0,1 µA/mm^2 una superficie más blanda en comparación el volumen (e);

La Figura 16 muestra el desplazamiento de células dentro del hidrogel. Se embebieron MSC en hidrogeles TG-PEG (concentración final: 0,5 x 10^6 ml-1). Para los ensayos de desplazamiento, se seleccionaron tres posiciones aleatorias utilizando un microscopio invertido (Leica DMI6000 B) equipado con un foco motorizado y fases, se adquirieron imágenes cada 20 minutos durante 24 horas. Se llevó un rastreo del desplazamiento de células durante 24 horas utilizando el plugin de seguimiento manual de Image J. 30 células rastreadas tuvieron un desplazamiento promedio de 226 ± 44 µm en 24 horas.

La Figura 17 muestra células sembradas en hidrogeles más blandos. Se sembraron MSC de médula ósea humana en geles PEG preparados convencionalmente (en ausencia de electrodo durante la polimerización) con densidades de PEG más bajas (respectivamente 0,8 %, 1,1 %, 1,4 % y 1,7 %). a), c), e) y g) son una reconstrucción 3D de stacks de 250 µm de espesor (que consisten en 50 imágenes adquiridas cada 5 µm, a excepción de un 1,7 % para las cuales se adquirieron 125 imágenes cada 2 µm) adquiridas por LSCM, 3 días después de la siembra: Las células formaron una capa 2D sobre el gel independientemente de la rigidez. La morfología de la célula (vista superior, columna derecha) demuestra que las células respondían a la rigidez del gel extendiéndose más en los geles más rígidos, tal como se demostró en estudios anteriores [20];

La Figura 18 muestra un dispositivo de acuerdo con la invención que comprende varias cámaras para recibir la estructura de polímero /hidrogel de acuerdo con la invención; y

Las Figuras 19-26 muestran realizaciones (posibles geometrías) de estructuras de polímero de acuerdo con la invención que tienen, p.ej., rebajes, canales (p.ej., micro-canales), etc. así como realizaciones de estructuras de polímero que tienen la forma p.ej., de una esfera, etc.; y

La Figura 27 muestra otra realización del dispositivo de acuerdo con la invención que permite la generación de un canal en la estructura de polímero /hidrogel de acuerdo con la invención.

La presente invención describe cómo modular electroquímicamente una superficie de hidrogel de PEG 3 para formar gradientes de densidad crecientes hacia la masa (volumen) 2. Anteriormente, se había mostrado la posibilidad de inhibir localmente la reacción de reticulación enzimática de hidrogeles PEG en la proximidad de los electrodos explotando el gradiente ácido en la interfaz ánodo-líquido generada tras la electrolisis de agua [7].

Al colocar un electrodo anodizado 21 en la superficie 3 de la solución de precursor PEG durante la polimerización, es posible producir hidrogeles 1 con un gradiente de densidad superficial. En primer lugar, se utilizó microscopia de barrido láser confocal para describir cualitativamente los gradientes de densidad. A continuación, se caracterizaron las propiedades mecánicas de las superficies de hidrogel por espectroscopia de fuerza de sonda coloidal. Finalmente, se demostró la penetración potenciada de células madre mesenquimales (MSC) de médula ósea humana desde la superficie del hidrogel electroquímicamente modulado en la masa utilizando microscopia de barrido láser confocal.

Para llevar a cabo todos los experimentos descritos en el presente documento, se diseñaron dispositivos 50 que comprendían un molde (recipiente) 40 de polidimetilsiloxano (PDMS) especial que alojaba el contra-electrodo de platino (segundo electrodo) 22 y en el que se echó la solución de precursor de PEG (consúltese la FIg.1). El recipiente 40 comprende una pared circunferencial 41 que rodea la cámara 43 que delimita por el fondo 42.

Los monómeros de PEG utilizados aquí contenían sustratos peptídicos anteriormente descritos, que hacen posible la reticulación de PEG por transglutaminación (en adelante, se los denominará TG-PEG) [8]. Se cubrió la cámara 43 del contenedor 40 con un electrodo de oro plano (primer electrodo) 21 durante la polimerización (véase Figura 1) que se anodizó con diferentes densidades de corriente para inhibir localmente la polimerización enzimática de TG-PEG (muestras a las que se hace referencia como hidrogel 0,1µA/mm^2 e hidrogel 1µA mm^2). Como primer control, se preparó el gel 1 en ausencia del electrodo 21, tal como se hace convencionalmente (en adelante, se denominará

hidrogel al aire). Para tener prevista la posible evaporación de agua en la superficie del gel, se cubrieron los precursores de gel con una superficie de oro sin imponer ninguna corriente eléctrica durante la polimerización (en adelante, se hará referencia a ellos como hidrogel sin corriente, véase la Figura 2). Dada la fuerte adhesión del hidrogel PEG a oro y Teflon, la separación de cualquiera de estas superficies tras la polimerización tuvo como resultado la perturbación del gel (véase Figura 11 a y d). Se revistió la superficie de oro (p.ej., la superficie del primer electrodo 21) con una capa de PLL-g-PEG para reducir drásticamente la adhesión de hidrogeles PEG 1 (véase Figura 11 c). Se inhibió la adhesión la adhesión porque las cadenas de PEG que se extendían desde la superficie de oro no contenían el sustrato de reticulación peptídico y por lo tanto actuaron como una película inerte. El revestimiento de la superficie del ánodo no fue necesaria porque la polimerización inhibida en su proximidad es suficiente para eliminar el problema de adhesión, tal como se ha mostrado anteriormente (Figura 11b y [7]).

Para caracterizar las superficies de hidrogel modificadas electroquímicamente 3, se mezclaron sustratos Lys marcados con FITC (Lys-FITC) con precursores de hidrogel TG-PEG. Dado que el colorante fluorescente se incorpora covalentemente en la matriz TG-PEG a través de las mismas reacciones de reticulación, la señal de fluorescencia es indicativa de la densidad de reticulación [9]. Se inspeccionaron secciones cortadas perpendicularmente con respecto a la superficie de hidrogel 3 por microscopia de fluorescencia confocal. Las fronteras de superficie producidas en presencia de corrientes anódicas presentaron un gradiente de intensidad. En particular la distancia desde la superficie en la que la intensidad de fluorescencia alcanzó un nivel estable aumentó de 250 µm (hidrogel 0,1 µA/ mm^2) a 500 µm (hidrogel 1 µA/ mm^2) (véase Figuras 3 y 4). Estas observaciones se correlacionan con un estudio anterior en el que se describe que la polimerización de gel es inhibida en la interfaz ánodo-líquido dependiendo de la corriente, debido al gradiente ácido mayor producido con corrientes anódicas crecientes [7]. El hidrogel sin corriente se caracterizó por una intensidad de señal homogénea en todo el espesor del gel, mientras que el hidrogel al aire tuvo un máximo de fluorescencia en los primeros 50 µm próximos a la superficie. El aumento de densidad de reticulación interfacial se debió presumiblemente a la evaporación de agua durante la polimerización y el consecuente aumento local de la concentración de monómero.

Dado que las mediciones de fluorescencia únicamente proporcionan un buen examen de los cambios de reticulación dentro de la muestra; se utilizó espectroscopia de fuerza de sonda coloidal para comparar la rigidez de diferentes superficies de hidrogel (véase Figura 5). Para llevar a cabo estas mediciones, se dispersaron microesferas de 50 µm 200 en la superficie de los hidrogeles 1 y se controló que las microesferas permanecían en la superficie y no se hundían en el gel (véase Figura 12). Utilizando un voladizo sin punta FluidFM®, que es un voladizo de AFM caracterizado por un canal microfluido incorporado, se aproximó una microesfera deseada y, después de haber aplicado una presión negativa para fijar la microesfera en la punta del voladizo, se presionó hacia dentro del gel 1. Este método permite la adquisición de cada una de las curvas fuerza-distancia con un coloide nuevo, evitando así los efectos de la historia derivados de la sonda [10]. La Figura 5 muestra las curvas de fuerza-distancia adquiridas al sondear la superficie superior de los hidrogeles presionando la microesfera hacia dentro del gel. El hidrogel al aire presentó la superficie más rígida: se obtuvo la fuerza máxima medible (0,8 µN) a una penetración de aproximadamente 3,5 µm solamente. El hidrogel sin corriente presentó una superficie más blanda en comparación con el hidrogel al aire, que alcanzó 0,8 µN con una penetración comprendida entre 15 y 17 µm. Esta observación es coherente con el examen de microscopía de fluorescencia, que reveló la presencia de una cubierta de densidad de reticulación superior en el hidrogel al aire. Las superficies de los hidrogeles preparados electroquímicamente fueron considerablemente más blandas. En particular las curvas de fuerza-distancia del hidrogel 0,1 µA/ mm^2 alcanzaron entre 0,05 y 0,13 µN en el máximo desplazamiento de piezo actuadores (50 µm) y para el hidrogel 1 µA/ mm^2 se midieron las fuerzas siempre por debajo de 0,05 µN a 50 µm. La blandura de la superficie del gel pareció aumentar al aumentar las corrientes.

Para examinar en qué medida estaba relacionada la rigidez de la superficie (3) con la rigidez de la masa (2), se seccionaron los geles 1 perpendicularmente con respecto a la superficie 3 y se sondearon las secciones lo más próximas a la superficie y a al menos 500 µm de distancia de ella (masa) (véase Figura 13). La rigidez medida en las secciones fue sistemáticamente menor que la rigidez observada en la Figura 5, siendo lo más probable que se debiera a que la superficie sondeada estaba en contacto directo con la cuchilla de cortado, que introdujo grietas y otros elementos. No obstante, la preparación equivalente de las secciones permitió confirmar una serie de importantes observaciones. Se midieron las curvas fuerza-distancia comparables de la masa del hidrogel 0,1 µA/ mm^2 y el hidrogel al aire, lo que indica que la modificación de la superficie electroquímica no afectó a las propiedades de la masa de la matriz (Figura 14 b). Por otra parte, este experimento confirmó que el hidrogel sin corriente era homogéneo en cuanto a la rigidez (Figura 15 c), que el hidrogel al aire presentó una superficie más rígida que la masa (Figura 14 d) y que el hidrogel 0,1 µA/ mm^2 tenía una superficie más blanda que la masa (Figura 15 e).

Una vez caracterizadas las superficies de hidrogel, se evaluó la capacidad de las células 100 sembradas sobre ellos de penetrar en la masa del hidrogel 2. En particular se sembraron MSC de médula ósea humana en la parte superior de las superficies del gel modificado y se evaluó la distribución de las células dentro de los primeros 150 µm del hidrogel al cabo de 1 día y de 3 días de cultivo utilizando microscopia de barrido láser confocal (véase Figs. 6 y 7). Previamente, se había demostrado que la formulación de gel seleccionada para este estudio soportaba el desplazamiento de células embebidas [11] y se confirmó para las condiciones de cultivo utilizadas en este punto (véase Figura 16). Las células sembradas tanto en el hidrogel al aire como el hidrogel sin corriente crecieron en 2 D

formando una monocapa y por tanto, quedaron casi exclusivamente localizadas en los primeros 50 µm al cabo de 1 día y de 3 días (véase Figura 6a, b, d, e y Figura 7c, f). Cuando se colocaron sobre las superficies de hidrogel modificadas electroquímicamente, las células pudieron penetrar en el gel. Asimismo, la profundidad de penetración aumentó al aumentar la densidad de la corriente. En particular pudieron penetrar más de 150 µm en los geles preparados con la máxima densidad de corriente al cabo de 1 día ya (Figura 6j y figura 7 l). La distribución celular al cabo de 3 días fue bastante homogénea dentro de los primeros 150 µm desde la superficie del gel (véase Figura 6k y Figura 7 l).

Estos resultados demuestran que un gradiente de densidad de reticulación creciente desde la superficie 3 hacia la masa 2 del hidrogel 1 potenció la penetración celular de las células sembradas en las superficies. La reducción homogénea de la rigidez de los geles no fue suficiente para potenciar la penetración celular. De hecho, incluso geles más blandos que fueron producidos (0,8 % PEG) no permitieron la penetración celular desde la superficie en la masa del hidrogel al cabo de 3 días (Figura 17). Se sabe que las células se mueven a lo largo de los gradientes de densidad desde las regiones blandas a las rígidas, a través de un fenómeno denominado durotaxis [12], así como en hidrogeles 3D [13]. Anseth y sus colaboradores han producido hidrogeles de PEG con regiones blandas y rígidas con una interfaz nítida. Cabe destacar que, si bien las células fueron móviles a pesar de la rigidez de los hidrogeles, las células no pudieron desplazarse desde la región blanda a la rígida y en cambio pudieron desplazarse hacia atrás o alinearse a lo largo de la interfaz [14]. Esto indica que un aumento gradual de la rigidez, no brusco, favorece la durotaxis.

La permeabilidad del hidrogel a las células o el tejido supone un importante reto para el desarrollo de andamios funcionales para ingeniería de tejidos y se han explorado otras estrategias. Por ejemplo, Wylie, et al., han observado que sobre hidrogeles sintéticos funcionalizados con RGD similares, la infiltración de células precursoras nerviosas estaba muy limitada, no excediendo 20 µm al cabo de 14 días. Los autores han mejorado la penetración celular a hasta 85 µm al cabo de 2 semanas creando un gradiente de SHH (Sonic HdegeHog) que se extiende desde la superficie hacia la masa del hidrogel utilizando fotoilustración (photopatterning). Este enfoque es muy elegante, aunque requiere períodos de tiempo de fabricación más prolongados [3]. El uso de diferentes células, condiciones de cultivo y matrices no permite una comparación directa de los resultados. Una serie de investigadores han buscado otras formas de resolver los problemas de infiltración y han desarrollado estrategias de fabricación de andamios para mejorar la infiltración celular o de tejido creando macro-poros en los hidrogeles (revisado en [15]). Si bien se ha demostrado que la inclusión de macroporos es eficaz para mejorar la infiltración de células o tejido en una serie de hidrogeles tanto naturales, es decir colágeno [6a], gelatina [6b], como hidrogeles sintéticos, es decir poli(etilen glicol) (PEG) [5, 6c], todas estas técnicas, no obstante, alteran las propiedades de la masa de las construcciones y no proporcionan un control espacial, o escaso con respecto a la micro-arquitectura fabricada [16].

El tratamiento posterior del sembrado de células no es el único caso durante el cual las fronteras de hidrogel pueden presentar una barrera. Las construcciones producidas por fabricación de aditivos se caracterizan por interfaces entre elementos añadidos de forma individual. Si bien, se ha demostrado repetidas veces que los componentes de matriz y las células se podían depositar de forma precisa formando construcciones heterogéneamente organizadas y viables que se asemejaban a tejidos nativos [17], has ahora, se había descuidado básicamente la interfaz entre los elementos ensamblados y se sigue sin abordar la cuestión de cómo las células se sensibilizan y responden a dicha interfaz. Bordeleau et al. están entre los pocos que han abordado esta cuestión; los autores polimerizaron sucesivamente geles de colágeno que contenían células variando la densidad unos encima de otros y demostraron que las células no se desplazaban desde un gel blando a uno más rígido y tan solo podían desplazarse desde un gel rígido a uno más blando en casos muy raros [18]. Esta observación indica que también para la fabricación de aditivos, la frontera del gel representa una barrera para la invasión de células, que conduce potencialmente a la compartimentación de elementos añadidos individualmente. El enfoque descrito en este trabajo también podría ser beneficioso para dichas aplicaciones.

Para investigar la interfaz entre dos geles, se produjeron un hidrogel al aire y un hidrogel 1 µA/ mm^2 en cuya parte superior se polimerizó un gel marcado con Alexa 561 que contenía MSC (véase Figura 8). Al cabo de 3 días de cultivo, las células no pudieron cruzar la interfaz del hidrogel al aire, mientras que las células invadieron el gel modificado electroquímicamente (véase Figura 9 y figura 10 c). Los investigadores han demostrado que la fabricación de aditivos es muy prometedora y hasta qué punto puede ser crítica la interfaz entre los elementos añadidos. En el presente documento, se propone una estrategia para modificar dichas interfaces para reducir la compartimentación de células.

En conclusión, al controlar electroquímicamente la reticulación enzimática de la superficie del hidrogel se pueden producir gradientes de densidad que potencian la permeabilidad celular en la masa del hidrogel. Los gradientes superficiales generados electroquímicamente son muy prometedores para permitir la siembra de células tópica sobre hidrogeles procesados y el desplazamiento celular a través de la interfaz o hidrogeles adyacentes fabricados por adición.

Otros ejemplos

Preparación de bastidores de PDMS (recipiente del dispositivo de acuerdo con la invención). Se fabricaron bastidores de polidimetil siloxano (PDMS) del siguiente modo: se mezclaron un elastómero de silicio y el agente de curado (Sylgard 184, Dow Corning Corporation, Estados Unidos) (10:1 en masa) a 2000 rpm durante 3 min en una mezcladora ARE-250 (Thinky Corporation, Japón). A continuación, se vertió la mezcla en moldes de poli(metacrilato de metilo) (PMMA), en donde se colocó un alambre de acero inoxidable de 500 µm de diámetro para crear orificios para el futuro contra-electrodo. A continuación, se desgasificó la mezcla durante 30 minutos en una cámara de vacío y se horneó durante 4 horas a 60 ºC. Se retiraron el alambre de acero inoxidable y las formas de PDSM de los moldes de PMMA aclarados con isopropanol (IPA) y agua MilliQ.

Preparación de hidrogeles TG-PEG: Se prepararon hidrogeles de TG-PEG sensibles a metaloproteasa (MMP) tal como se ha descrito anteriormente [19]. Brevemente, se mezclaron precursores de PEG de ocho ramificaciones que contenían aceptor péptidos glutamina de sustrato pendiente de factor XIIIa (n-PEG-Gln) o donador de lisina con un engarce sensible a MMP adicional (Lys sensible a n-PEGMMP) estequiométricamente (contenido en masa en seco final 1,7 %) en tampón Tris (TBS, 50 mM, pH 7,6) que contenía 50 mM cloruro cálcico. Se añadieron Lys-FITC, Gln-Alexa 561, Gln-RGD o combinaciones a la solución de precursor antes del inicio de la reticulación con 10 U/ml FXIIIa activado con trombina y se mezcló vigorosamente.

Control electroquímico de polimerización de TG-PEG. Se vertió inmediatamente la mezcla de precursores en el bastidor de PDMS que alojaba un alambre de platino (0,5 mm de diámetro, Alfa Aesar, Ward Hill, Estados Unidos) utilizado como electrodo auxiliar. Se utilizaron discos de cobalto y cromo (15 mm de diámetro y 0,8 mm de espesor) evaporado 10 nm de cromo y 200 nm de oro como electrodo de trabajo para colocarlo en la parte superior de la cámara de PDMS. Se permitió que progresara la polimerización de TG-PEG durante 8 minutos en presencia de una corriente cc aplicada en modo galvanostático. La densidad de corriente fue 100 nA/ mm^2 o 1 µA/ mm^2.

Cultivo de células: se cultivaron MSC de médula ósea humana en medio esencial mínimo alfa (MEMalfa, Gibco Life Technologies, cat. no. 22571-020) suplementado con 10 % (v/v) suero bovino fetal (FCS, Gibco Life Technologies, cat. no. 10500), 1 % (v/v) solución de penicilina/estreptomicina (Gibco Life Technologies, cat. no. 15140-122), 5 ng/ml FGF-2 (Peprotech, cat. no. 100-18B) y 50 nM PDGF (Peprotech, cat. no. 100-14B).

Penetración de gel: Se sembraron MSC en las superficies de hidrogel y se mantuvieron en cultivo durante 1 o 3 días. En cada punto temporal, se fijaron las células con muestras con 4 % paraformaldehído, se aclararon tres veces y se mantuvieron en PBS hasta la tinción.

Penetración a través de la interfaz gel-gel: Se diluyeron las suspensiones de células en el medio correspondiente y se añadieron a la solución de TG-PEG completa (que contenía Gln-Alexa 561). Se vertieron los geles que contenían células en la parte superior de los hidrogeles producidos con una superficie modificada y se colocó la construcción ensamblada en cultivo durante 1 o 3 días. En cada punto temporal, se fijaron las células con muestres con 4 % de paraformaldehído, se aclararon tres veces y se mantuvieron en PBS hasta la tinción.

Microscopia de barrido láser confocal en hidrogeles: Se llevó a cabo la permeabilización durante 30 minutos a temperatura ambiente con 0,1 % Triton X-100 en PBS seguido de 2 etapas de lavado con PBS. Para la tinción con f-actina, se incubaron las muestras durante toda la noche a 4 ℃ con ftaloína marcada con Alexa 633 (Sond as moleculares, cat. no. A22284). A continuación, se lavaron las muestras 3 veces con PBS antes del análisis por microscopia de barrido láser confocal. Se obtuvieron imágenes de los hidrogeles TG-PEG y las células utilizando un microscopio de barrido láser confocal SP5 (Leica, Alemania). Se analizaron al menos 3 muestras para cada una de las condiciones y se adquirieron 3 regiones por muestra.

Cuantificación de la infiltración: Se reconstruyeron stacks (125 x 2 µm) adquiridos por LSCM en 3D y se llevó a cabo una proyección lateral. Se utilizó el canal FITC para determinar la superficie de gel y se utilizó el canal alexa-633 para determinar la posición de las células en la sección transversal. Se aplicó un umbral a las imágenes del canal alexa-633 que se limpiaron a continuación (eliminación de ruidos) y segmentadas en regiones de 25 µm de espesor desde la superficie del gel. Se cuantificó la cantidad de pixeles positivos en cada región como representación del número de células. Se calculó la relación de células en cada sección como un porcentaje de la cantidad total de células en la muestra. Los valores representan los valores medios ± la desviación típica en al menos 3 andamios por punto temporal, en el que se analizaron al menos 3 regiones.

Los dispositivos de acuerdo con la invención utilizados para recibir la estructura de polímero /hidrogel que se produce puede adoptar diversas formas y configuraciones.

De acuerdo con la Figura 18, un recipiente 40 de dicho dispositivo puede comprender una pluralidad de cámaras 43, p.ej. con una forma idéntica para la paralelización masiva de los experimentos. Las cámaras 43 pueden estar separadas por pocillos 44. En este punto, la superficie libre (superior) 3 de la superficie de polímero 1 generada en las cámaras individuales 43, tal como se han descrito puede presentar el gradiente de densidad de unión para que

se genere la superficie blanda 3 al mismo tiempo que aumenta la rigidez de la estructura 1 (y el gradiente de densidad de unión) hacia la masa/volumen 2 de la estructura 1.

De acuerdo con las Figuras 19 a 26, la estructura de polímero contenida en el recipiente puede presentar uno o varios rebajes (fosas, pocillos, etc.)

La Figura 19 muestra una disposición de una estructura de polímero en forma de un (polímero)-membrana de hidrogel 10 caracterizado por compartimentos permeables y/o impermeables A, B (en donde la membrana 10 separa dichos compartimentos A, B) para el desplazamiento direccional de células 100 (103) desde una superficie 3 (3 a) a otra superficie 3 a (3). El espesor h puede encontrarse en el intervalo de 100 µm a varios centímetros. La longitud L y el ancho pueden encontrarse en el intervalo comprendido entre 100 µm y varios centímetros. La longitud y el ancho de la región impermeable s y de la región permeable d pueden ser iguales o diferentes y puede encontrarse en el intervalo de 1 µm a varios centímetros.

La Figura 20 muestra un rebaje 30 en la forma de un canal (p.ej., micro-canal) 30 creado a través de un hidrogel 1 con una porción de la superficie interior 3 de la estructura de polímero 1 en contacto con el diámetro interior 31 caracterizado por un gradiente (densidad de unión) (es decir, dicha superficie 3 forma una interfaz entre el diámetro interior 31 y la estructura de polímero 1). Las células 100 perfundidas a través de dicho canal 30 invadirán la masa del hidrogel 2 desde esta región solamente. El diámetro del micro-canal 30 puede encontrarse en el intervalo de 10 µm a varios centímetros. El intervalo más interesante es de 10 µm a 1000 µm. La longitud L del canal 30 puede encontrarse en el intervalo de 100 µm a varios centímetros.

La Figura 21 muestra rebajes 30 en forma de pocillos (p.ej., pocillos rectangulares), en particular micro-pocillos, criptas o invaginaciones en un hidrogel 1 utilizado para dispensar células 100 o agregados de células 100. Las células 100 pueden invadir la masa 2 del hidrogel 1 solamente desde las criptas o los pocillos 3 caracterizados por el gradiente de densidad en la superficie 3 (que forma, p.ej., el fondo del correspondiente pocillo 30), en el que la densidad de unión es mínima o cero en la superficie 3 y aumenta hacia su máximo en la masa/volumen 2. El pocillo 30 puede ser de cualquier forma (cúbica, cuboide, piramidal, cilíndrica, semiesférica, elipsoidal o prismática), representada en el presente documento como cuboide (es decir, la sección transversal rectangular). La profundidad d, ancho w y longitud del pocillo 30 pueden encontrarse en el intervalo de 10 µm y varios milímetros. La separación entre los pocillos s puede encontrarse en el intervalo de 10 µm y varios milímetros. El espesor H, la longitud L y el ancho del hidrogel (estructura de polímero) 1 puede encontrarse en el intervalo de 100 µm y varios centímetros.

La Figura 22 muestra una estructura de polímero (p.ej., hidrogel) 1 que comprende rebajes 30 en la forma de pocillos (p.ej., micropocillos), criptas o invaginaciones en el hidrogel 1 utilizado para dispensar células 100 o agregados de células 100. Las células 100 pueden invadir la masa 2 del hidrogel 1 solamente desde las criptas o pocillos 30 caracterizados por el gradiente de densidad en la superficie 3 que delimita el rebaje correspondiente (pocillo) 30. También en este caso, el pocillo 30 puede presentar cualquier forma (cúbica, cuboide, piramidal, cilíndrica, semiesférica, elipsoidal y prismática), representada en el presente documento como piramidal. La profundidad d, el ancho w y la longitud del pocillo 30 pueden encontrarse en el intervalo de 10 µm y varios milímetros. La separación s entre los pocillos 30 puede encontrarse en el intervalo de 10 µm y varios milímetros. El espesor H, la longitud L y el ancho del hidrogel 1 pueden encontrarse en el intervalo de 100 µm y varios centímetros. El ángulo α del pocillo piramidal puede variar entre 10°y 180 °.

La Figura 23 muestra los rebajes (p.ej., micro-pocillos) 30, criptas o invaginaciones en un hidrogel 1 utilizado para dispensar células 100 o agregados celulares 100. Las células 100 pueden invadir la masa 2 del hidrogel 1 solamente desde las criptas o los pocillos 30 caracterizados por el gradiente (densidad de unión) en la superficie 3 que delimita el pocillo 30. También en este caso, el pocillo 30 puede presentar cualquier forma (cúbica, cuboide, piramidal, cilíndrica, semiesférica, elipsoidal y prismática), representada en el presente documento como semiesférica o elipsoidal. La profundidad d y el radio r del pocillo 30 pueden encontrarse en el intervalo de 10 µm a varios milímetros. La separación s entre los pocillos 30 puede encontrarse en el intervalo de 10 µm y varios milímetros. El espesor H, la longitud L y el ancho del hidrogel 1(estructura de polímero) puede encontrarse en el intervalo de 100 µm y varios centímetros.

La Figura 24 muestra una estructura de polímero 1 en la forma de un revestimiento de hidrogel (el espesor d puede variar entre 10 µm y varios milímetros) de un cuerpo (p.ej., un implante o un dispositivo de cualquier forma y tamaño) caracterizado por un gradiente de densidad en la superficie 3 para promover la infiltración de células 3D de las células 100 en el revestimiento y/o evitar la dispersión de las células en 2D sobre la superficie 3. La dispersión celular 2D en la superficie 3 de un cuerpo 5 está entre las primeras etapas de la respuesta a un cuerpo extraño y por tanto este revestimiento podría prevenir la respuesta a un cuerpo extraño.

La Figura 25 muestra otra estructura de polímero 10 en forma de una membrana de hidrogel (el espesor d puede variar entre 10 µm y varios milímetros) que separa dos compartimentos líquidos L1, y L2, y que permite la invasión direccional de células 100 en la membrana 10 desde uno o ambos compartimentos L1 y L2.

La Figura 26 muestra estructuras de polímero 1 (cuerpos de hidrogel) de cualquier forma (esférica, semiesférica, cilíndrica, elipsoidal, piramidal, cúbica, cuboide y prismática), en el presente documento representada como esférica, cúbica, piramidal y cilíndrica caracterizada por un gradiente de densidad que aumenta hacia el centro del correspondiente cuerpo 1 y estando presente dicho gradiente en una o más caras (superficies) del correspondiente cuerpo 1. Estos cuerpos 1 pueden implantarse, p.ej., como implantes en animales y promover la infiltración de células dentro de la masa del implante.

En particular en las realizaciones que se muestran en las Figs. 20 a 23, el electrodo de trabajo (p.ej. un primer o segundo electrodo) para generar el correspondiente gradiente de densidad de unión se incorporará en una cabeza metálica de la forma del correspondiente rebaje 30. El contra-electrodo (p.ej., un segundo o primer electrodo) puede disponerse en la estructura de polímero (es decir, en la cámara) tal como se ha descrito también.

Asimismo, tal como se muestra en la Fig. 27, el recipiente 40 puede comprender una pared 41 que tiene dos porciones circunferenciales 41a, 41b, en la que la primera porción 41a rodea la cámara 43 para recibir la estructura de polímero/solución y en la que la segunda porción 41b de la pared 41 rodea otra cámara 45 para recibir un fluido F, en particular soluciones salinas, soluciones de tampón, una solución de quimio-atrayente, una solución de factor de crecimiento, una suspensión de células o una mezcla de los mismos y otra solución que induce respuestas en funciones celulares). En el presente documento, el primer electrodo 21 (o segundo electrodo) está dispuesto de forma desplazable en un primer y un segundo rebaje 401, 402 en dicha pared 41, rebajes 401, 402 que están enfrentados entre sí, de manera que el primer electrodo 21 se extiende a través de la cámara 43 y cierra dichos rebajes 401, 402. En particular el primer electrodo 21 sobresale del recipiente 40 (p.ej. para moverlo manualmente). Asimismo, el segundo rebaje 402 está en conexión fluida con la otra cámara 45, de manera que cuando se retira el primer electrodo 21 de dicho segundo rebaje 402, puede fluir un fluido F (p.ej. una solución de quimio-atrayente, una solución de factor de crecimiento, una suspensión de células o una mezcla de los mismos y otra solución que induce respuestas en las funciones celulares) almacenada en la otra cámara 45 a través de dicho segundo rebaje 402 hacia la (primera) cámara 43, en concreto hacia un canal 30 de la estructura de polímero 1/hidrogel que se está formando con la ayuda de los electrodos 21, 22. Esta segunda porción de la pared 41b comprende un tercer rebaje 403 que está alineado con el segundo rebaje 402 (y p.ej., también con el primer rebaje 401), de manera que el segundo rebaje 402 puede cerrarse insertando un medio de cierre (p.ej., un bastoncillo o un pasador) 60 en el segundo rebaje 402 a través del tercer rebaje 403. Asimismo, las dos cámaras 43, 45 están cada una de ellas delimitada en el lado inferior por un fondo 42 desde el que se extienden dichas porciones 41a, 41b de la pared 41, en el que el fondo 42 de la primera cámara 43 puede comprender un contra-electrodo (segundo electrodo o primer electrodo) 22 o puede estar formado como un contra-electrodo 22. Por medio de un recipiente 40 de acuerdo con la Fig. 27, se puede generar una estructura de polímero 1 que comprende un canal 30 en la estructura de polímero 1, en particular que cruza la estructura 1, y un gradiente de densidad de unión en la interfaz 3 entre la estructura de polímero 1 y el diámetro interior 31 de dicho canal 30. Dicho canal 30 puede cargarse con un fluido F, p.ej. tal como se ha descrito.

Referencias

[1] a) M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, Nat Biotech 2005, 23, 47; b) N. Tirelli, M. P. Lutolf, A. Napoli, J. A. Hubbell, Reviews in Molecular Biotechnology 2002, 90, 3; c) M. V. Tsurkan, K. Chwalek, S. Prokoph, A. Zieris, K. R. Levental, U. Freudenberg, C. Werner, Advanced Materials 2013, 25, 2606.

[2] J. Patterson, M. M. Martino, J. A. Hubbell, Mater Today 2010, 13, 14.

[3] R. G. Wylie, S. Ahsan, Y. Aizawa, K. L. Maxwell, C. M. Morshead, M. S. Shoichet, Nature materials 2011, 10, 799.

[4] a) D. R. Griffin, J. Borrajo, A. Soon, G. F. Acosta- Velez, V. Oshita, N. Darling, J. Mack, T. Barker, M. L. Iruela-Arispe, T. Segura, Chembiochem : a European journal of chemical biology 2014, 15, 233; b) W. M. Gramlich, I. L. Kim, J. A. Burdick, Biomaterials 2013, 34, 9803; c) K. A. Mosiewicz, L. Kolb, A. J. van der Vlies, M. M. Martino, P. S. Lienemann, J. A. Hubbell, M. Ehrbar, M. P. Lutolf, Nature materials 2013, 12, 1072; d) C. A. DeForest, K. S. Anseth, Angewandte Chemie 2012, 51, 1816; e) J. C. Hoffmann, J. L. West, Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro 2013, 5, 817.

[5] Y. C. Chiu, J. C. Larson, A. Isom, Jr., E. M. Brey, Tissue Eng Part C Methods 2010, 16, 905.

[6] a) X. Wu, L. Black, G. Santacana-Laffitte, C. W. Patrick, Jr., J Biomed Mater Res A 2007, 81, 59; b) F. Zhang, C. He, L. Cao, W. Feng, H. Wang, X. Mo, J. Wang, Int J Biol Macromol 2011, 48, 474; c) P. B. Welzel, M. Grimmer, C. Renneberg, L. Naujox, S. Zschoche, U. Freudenberg, C. Werner, Biomacromolecules 2012, 13, 2349.

[7] V. Milleret, B. R. Simona, P. S. Lienemann, J. Voros, M. Ehrbar, Advanced healthcare materials 2014, 3, 508.

[8] M. Ehrbar, S. C. Rizzi, R. Hlushchuk, V. Djonov, A. H. Zisch, J. A. Hubbell, F. E. Weber, M. P. Lutolf, Biomaterials 2007, 28, 3856.

[9] M. Ehrbar, A. Sala, P. Lienemann, A. Ranga, K. Mosiewicz, A. Bittermann, S. C. Rizzi, F. E. Weber, M. P. Lutolf, Biophysical Journal 2011, 100, 284.

[10] P. Dorig, D. Ossola, A. M. Truong, M. Graf, F. Stauffer, J. Voros, T. Zambelli, Biophys J 2013, 105, 463.

[11] M. Ehrbar, A. Sala, P. Lienemann, A. Ranga, K. Mosiewicz, A. Bittermann, S. C. Rizzi, F. E. Weber, M. P. Lutolf, Biophys J 2011, 100, 284.

[12] C. M. Lo, Y. L. Wang, Mol Biol Cell 1999, 10, 259a.

[13] E. Hadjipanayi, V. Mudera, R. A. Brown, Cell motility and the cytoskeleton 2009, 66, 121.

[14] S. P. Singh, M. P. Schwartz, J. Y. Lee, B. D. Fairbanks, K. S. Anseth, Biomaterials science 2014, 2, 1024.

[15] N. Annabi, J. W. Nichol, X. Zhong, C. Ji, S. Koshy, A. Khademhosseini, F. Dehghani, Tissue Eng Part B Rev 2010, 16, 371.

[16] M. P. Cuchiara, A. C. Allen, T. M. Chen, J. S. Miller, J. L. West, Biomaterials 2010, 31, 5491.

[17] a) M. Verhulsel, M. Vignes, S. Descroix, L. Malaquin, D. M. Vignjevic, J. L. Viovy, Biomaterials 2014, 35, 1816; b) F. P. W. Melchels, M. A. N. Domingos, T. J. Klein, J. Malda, P. J. Bartolo, D. W. Hutmacher, Prog Polym Sci 2012, 37, 1079.

[18] F. Bordeleau, L. N. Tang, C. A. Reinhart-King, Phys Biol 2013, 10.

[19] M. Ehrbar, S. C. Rizzi, R. G. Schoenmakers, B. S. Miguel, J. A. Hubbell, F. E. Weber, M. P. Lutolf, Biomacromolecules 2007, 8, 3000.

[20] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, Cell 2006, 126, 677.

REIVINDICACIONES

1. Una estructura de polímero (1) formada por al menos un polímero, en donde dicha estructura (1) comprende un volumen (2) y una superficie (3), en donde dicho polímero comprende una pluralidad de cadenas de polímero conectadas por uniones, **caracterizada por** una densidad de unión, en donde dicha densidad de unión aumenta, en particular de forma monótona, desde la superficie (3) en el volumen (2) de la estructura de polímero (1) y dicha estructura de polímero (1) es penetrable a lo largo de dicha densidad de unión creciente por células sembradas sobre dicha superficie (3) y **caracterizada por que** la densidad de unión es mínima, en particular cero, en la superficie (3) y alcanza un máximo en el volumen (2), en donde, en particular la densidad de unión alcanza dicho máximo a una distancia desde la superficie (3) comprendida entre 1 µm y 1000 µm.

2. La estructura de polímero de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** el polímero es un polímero natural, en particular uno entre los siguientes polímeros: fibrina, alginato, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, heparina o un polímero sintético, en particular uno entre los siguientes polímeros: polietilen glicol (PEG), ácido poliláctico, SU-8; o cualquier polímero que consiste o que incluye una combinación de monómeros, p.ej., de dopamina, grupos que contienen amina como lisina, catecoles, grupos que contienen fosfato, grupos que contienen tiol, grupos que contienen alcohol, ésteres activos y cualquier dendrímero que contenga cualquiera de dichos grupos.

3. La estructura de polímero de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la estructura de polímero (1) es una estructura de polímero compuesta que comprende una pluralidad de diferentes polímeros, en la que cada polímero comprende un gradiente de densidad de unión, extendiéndose el gradiente de densidad de unión en diferentes direcciones y/o a diferentes distancias.

4. La estructura de polímero de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la estructura de polímero (1) o el volumen (2) comprenden una de las siguientes formas: esférica, semiesférica, cilíndrica, elipsoidal, piramidal, cúbica, cuboide y prismática.

5. La estructura de polímero de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** dichas cadenas de polímero comprenden polietilen glicol (PEG).

6. La estructura de polímero de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la estructura de polímero (1) comprende células (100), en particular embebidas en dicha estructura de polímero (1), en particular embebidas durante la formación de dicha estructura de polímero (1).

7. La estructura de polímero de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** dicha estructura de polímero (1) es un hidrogel.

8. Un método para embeber células (100) en una estructura de polímero (1), comprendiendo dicho método las etapas de:

- proporcionar una estructura de polímero (1) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7,
- sembrar células (100) sobre dicha superficie (3) de dicha estructura de polímero (1), en particular de tal modo que las células (100) penetran en el volumen (2) de la estructura de polímero (1), en particular debido a dicho gradiente de densidad de unión.

9. Método para generar una estructura de polímero (1) que comprende un volumen (2), una superficie (3) y un gradiente de densidad de unión de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas de:

- proporcionar un polímero que comprende un pluralidad de cadenas de polímero, en donde cada cadena de polímero comprende una fracción,
- conectar las cadenas de polímero por reacción de unión entre las fracciones de dichas cadenas de polímero, tal que se forma un gradiente de densidad de unión, aumentando dicha densidad de unión, en particular de forma monótona desde la superficie (3) hacia el volumen (2) de la estructura de polímero (1).

10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** dicha reacción de unión es controlada aplicando uno entre: una corriente eléctrica, radiación o la adición de un compuesto capaz de unir dichas fracciones, en particular un reticulador que une dichas fracciones.

11. Método de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, **caracterizado por que** dichas cadenas de polímero se proporcionan por polimerización de monómeros, comprendiendo cada uno de dichos monómeros una de dichas fracciones.

12. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizado por que** dicho polímero se proporciona en una solución y dicha reacción de unión es controlada por el pH de dicha solución, en donde, en particular para controlar dicho pH, se aplica una corriente que induce electrolisis a dicha solución utilizando un

primer electrodo (21) que cubre dicha superficie (3) de la estructura de polímero (1) al menos en parte, y en particular completamente.

13. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, **caracterizado por que** dicha reacción de unión se lleva a cabo mediante una enzima, en donde, en particular la actividad enzimática de dicha enzima es controlada, en particular inhibida, alterando localmente dicho pH de la solución, convirtiendo, en particular dicha enzima dichas fracciones de dichas cadenas de polímero por medio de la formación de un enlace covalente entre dichas fracciones.

14. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, **caracterizado por que** dichas cadenas de polímero comprenden polietien glicol (PEG).

Fig. 1

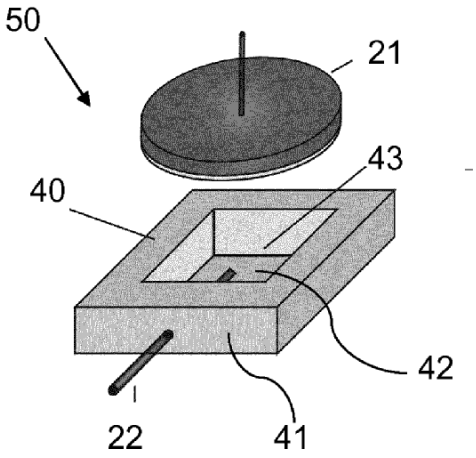

50
21
43
40
42
22
41

Fig. 2

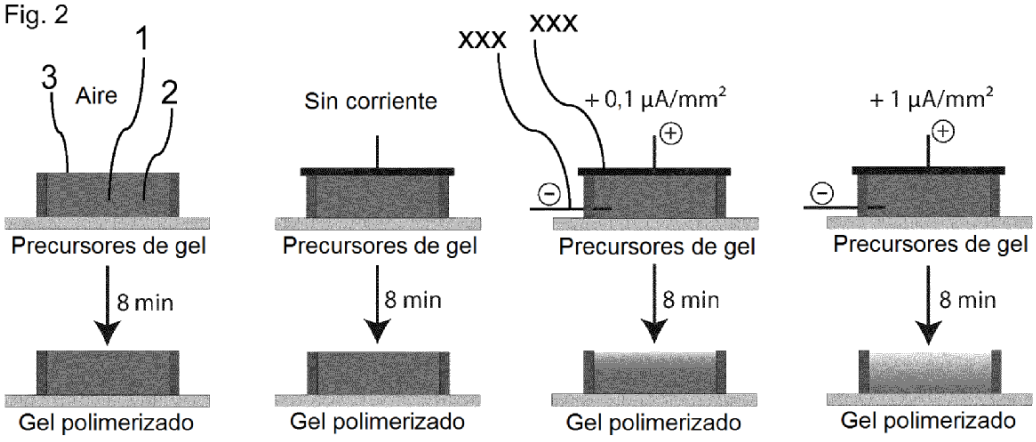

1
3
Aire
2
Precursores de gel
8 min
Gel polimerizado
Sin corriente
Precursores de gel
8 min
Gel polimerizado
xxx
xxx
+ 0,1 µA/mm²
Precursores de gel
8 min
Gel polimerizado
+ 1 µA/mm²
Precursores de gel
8 min
Gel polimerizado

Fig. 3

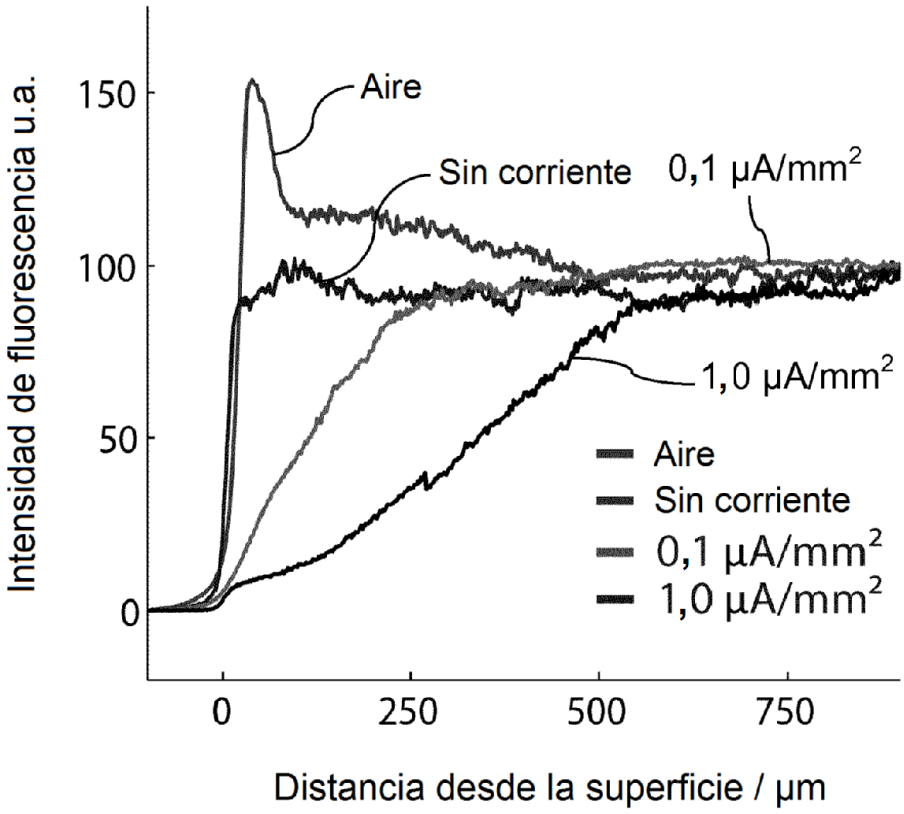

Intensidad de fluorescencia u.a.
150
100
50
0
0
250
500
750
Distancia desde la superficie / µm
Aire
Sin corriente
0,1 µA/mm²
1,0 µA/mm²
Aire
Sin corriente
0,1 µA/mm²
1,0 µA/mm²

Fig. 4

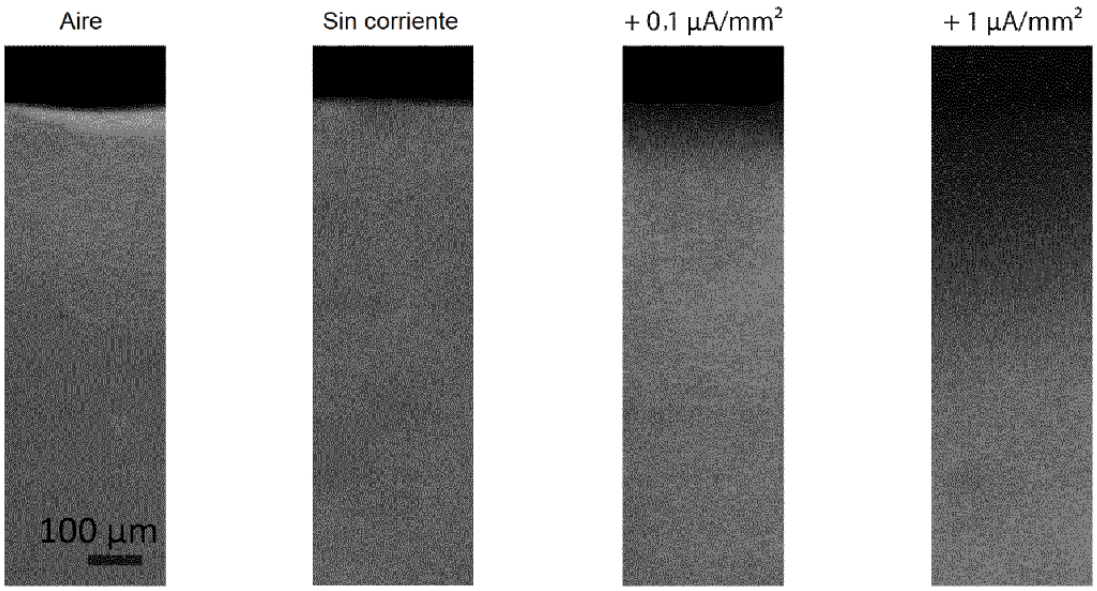

Aire
Sin corriente
+ 0,1 µA/mm²
+ 1 µA/mm²
100 µm

Fig. 5

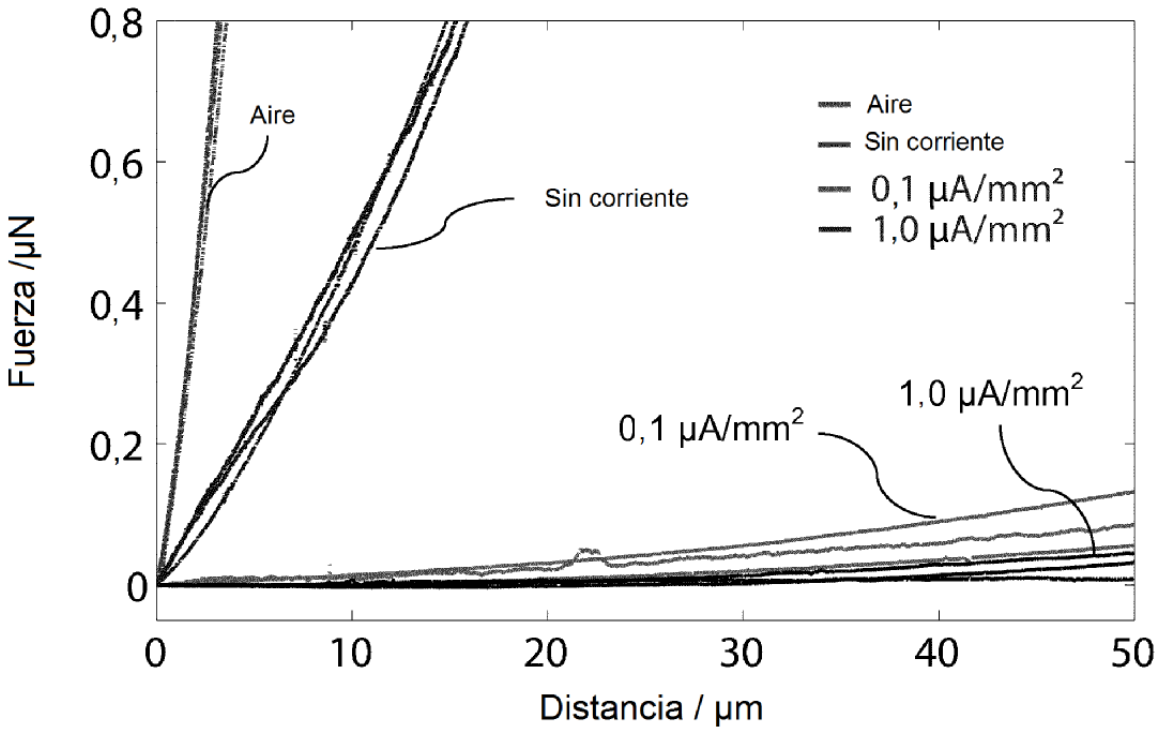

0,8
0,6
0,4
0,2
0
Fuerza /µN
0
10
20
30
40
50
Distancia / µm
Aire
Sin corriente
Aire
Sin corriente
0,1 µA/mm²
1,0 µA/mm²
0,1 µA/mm²
1,0 µA/mm²

Fig. 6

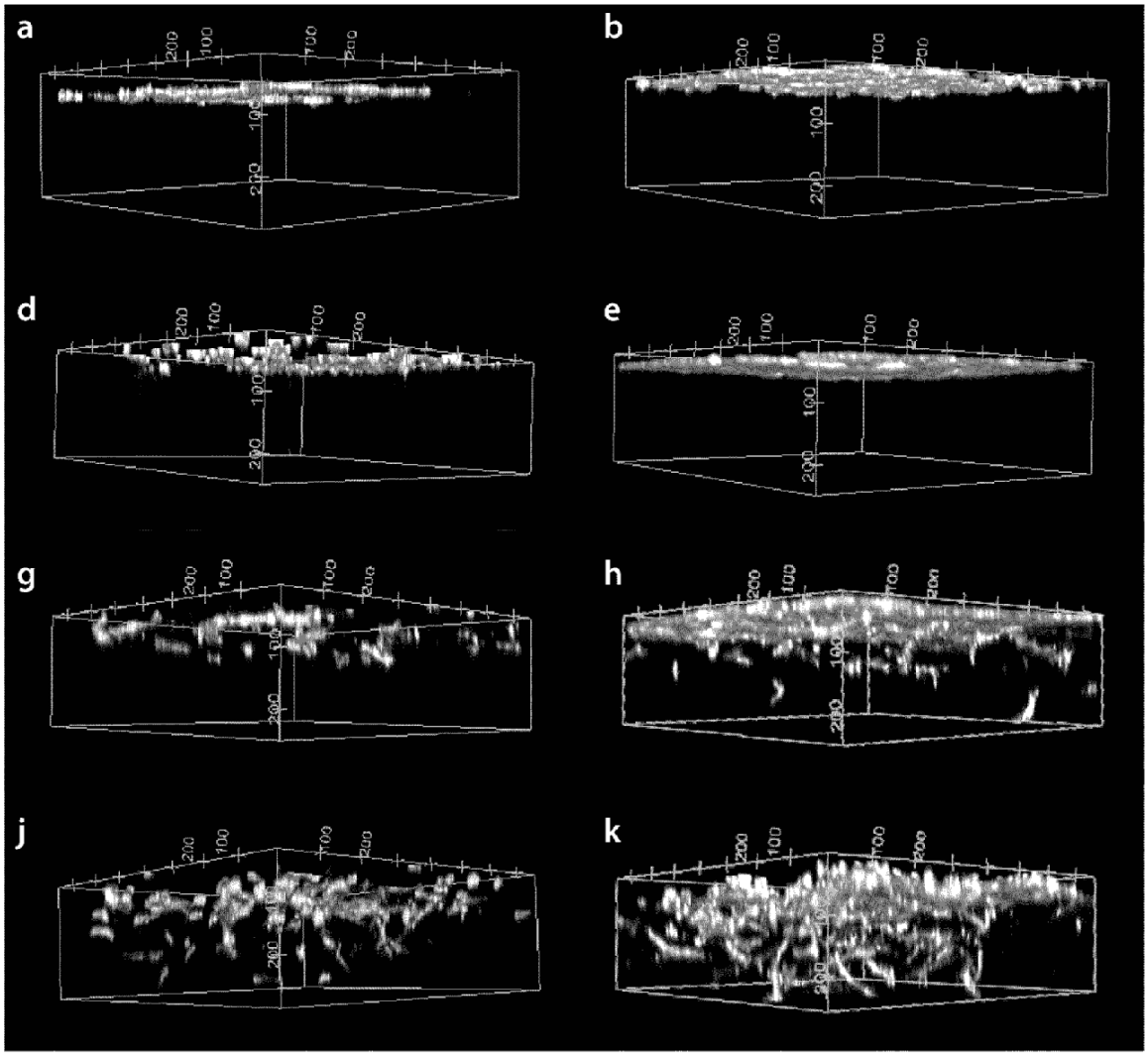


Fig. 7

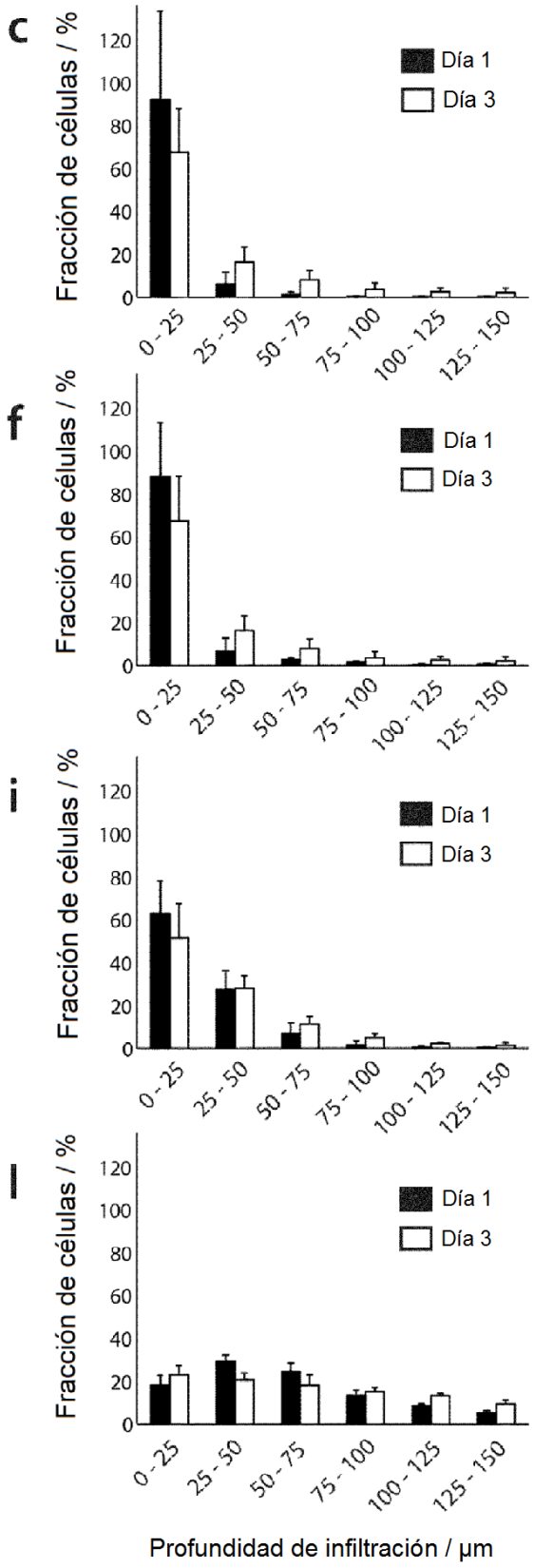

c
f
i
l
Fracción de células / %
120
100
80
60
40
20
0
Día 1
Día 3
0 - 25
25 - 50
50 - 75
75 - 100
100 - 125
125 - 150
Profundidad de infiltración / µm

Fig. 8

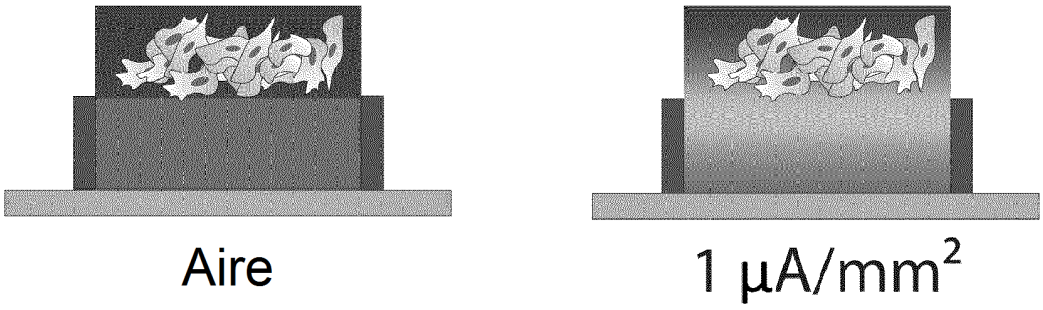

Aire
1 µA/mm²

Fig. 9

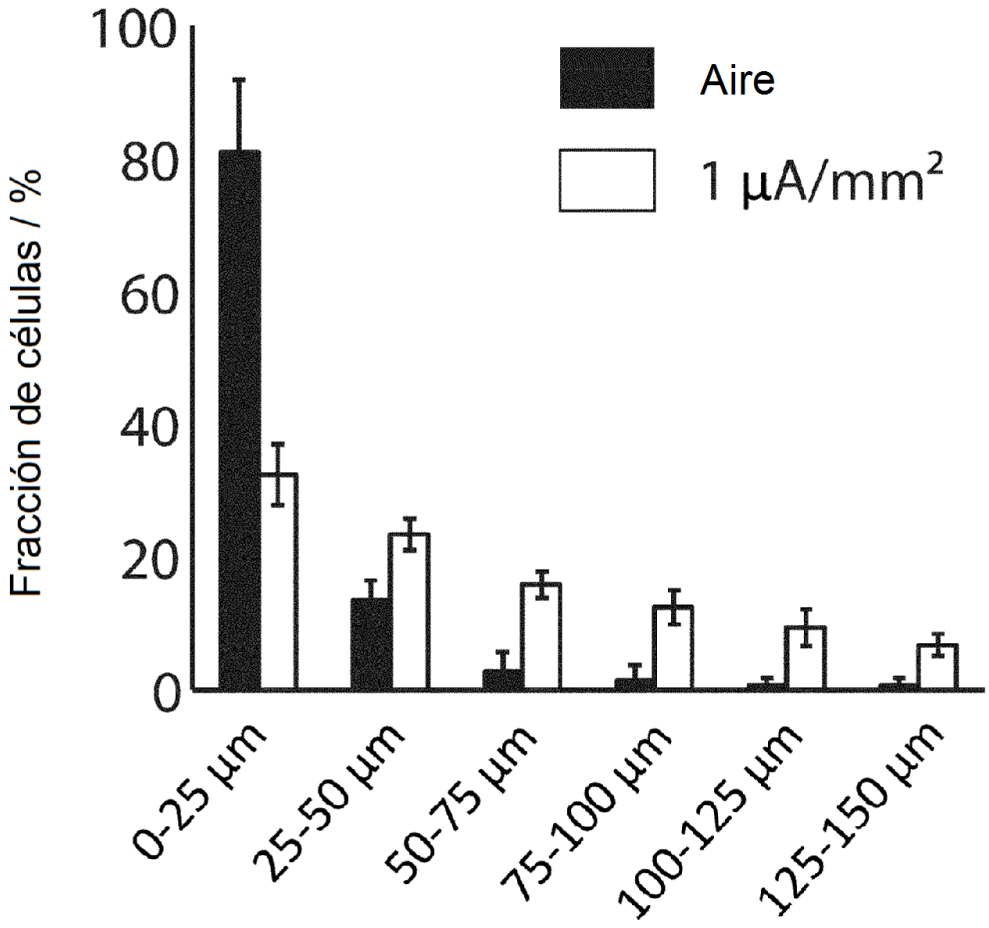

100
80
60
40
20
0
Fracción de células / %
Aire
1 µA/mm²
0-25 µm
25-50 µm
50-75 µm
75-100 µm
100-125 µm
125-150 µm

Fig. 10

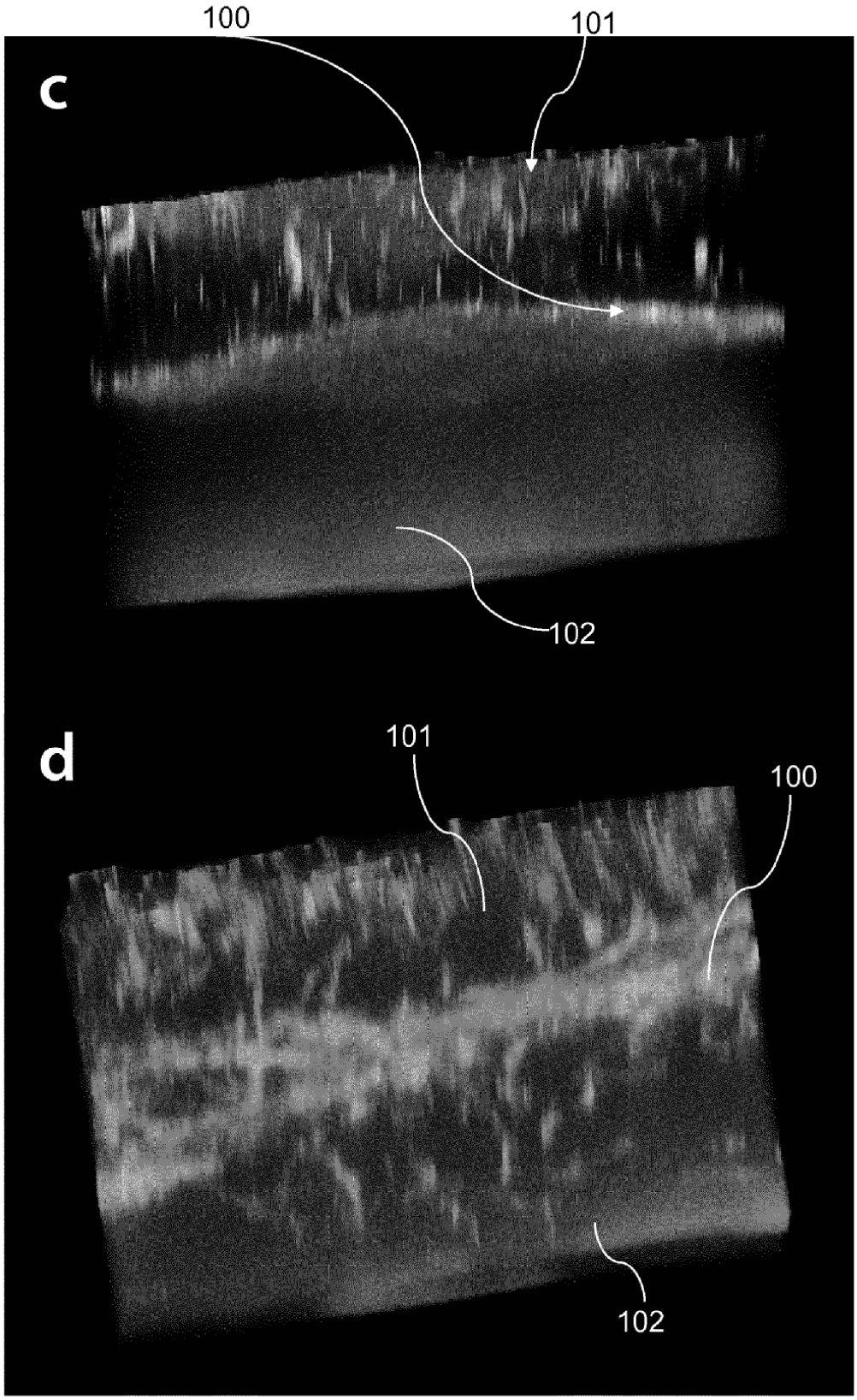


Fig. 11

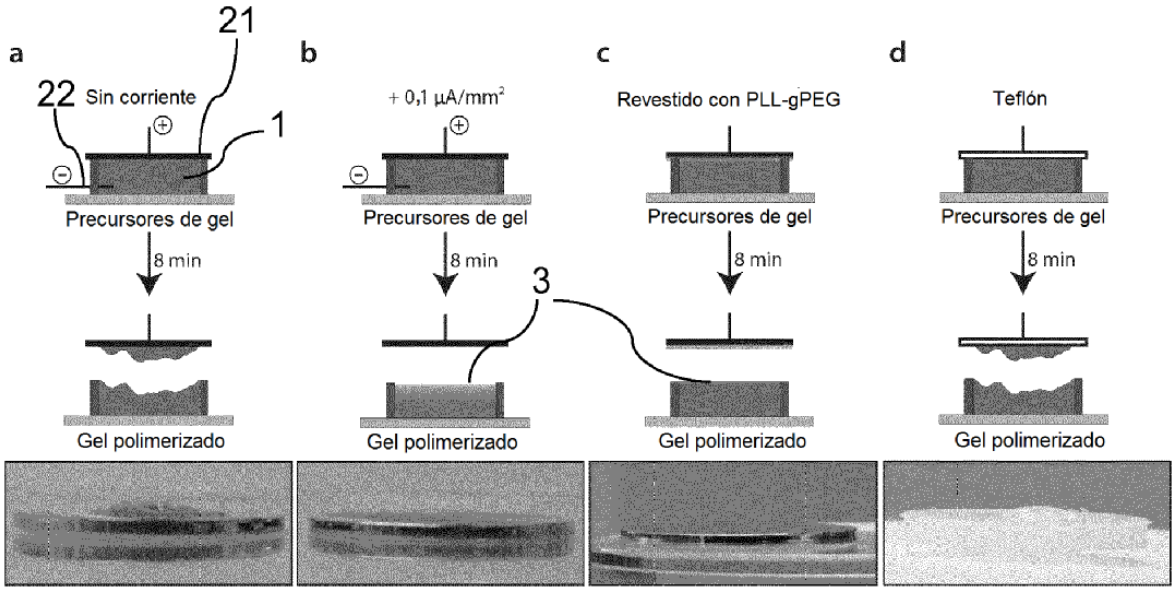

a
b
c
d
21
22
Sin corriente
1
+ 0,1 µA/mm²
Revestido con PLL-gPEG
Teflón
Precursores de gel
8 min
3
Gel polimerizado

Fig. 12

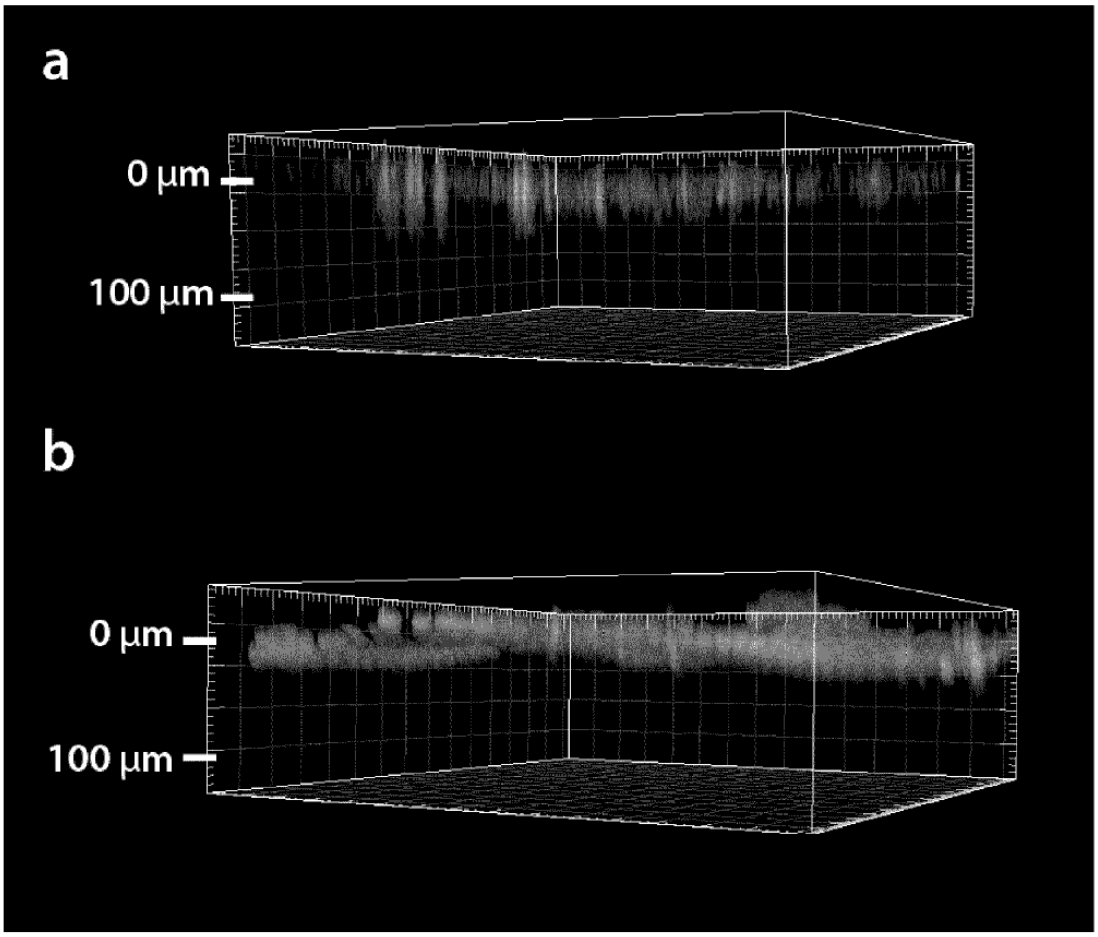

a
0 µm
100 µm
b
0 µm
100 µm

Fig. 13

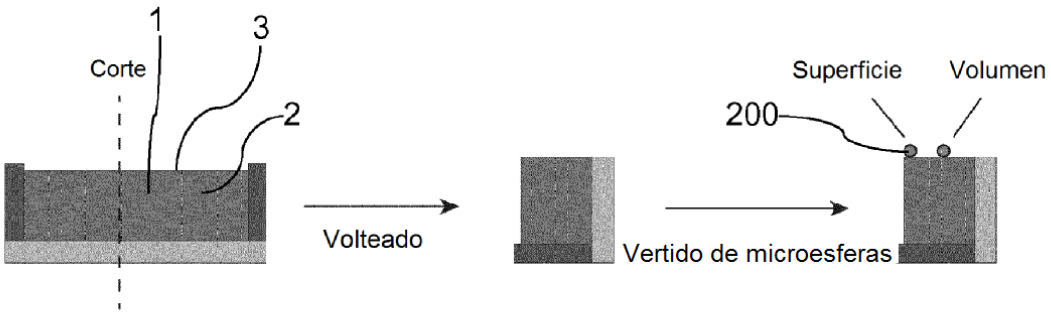

1
3
Corte
2
Volteado
Superficie
Volumen
200
Vertido de microesferas

Fig. 14

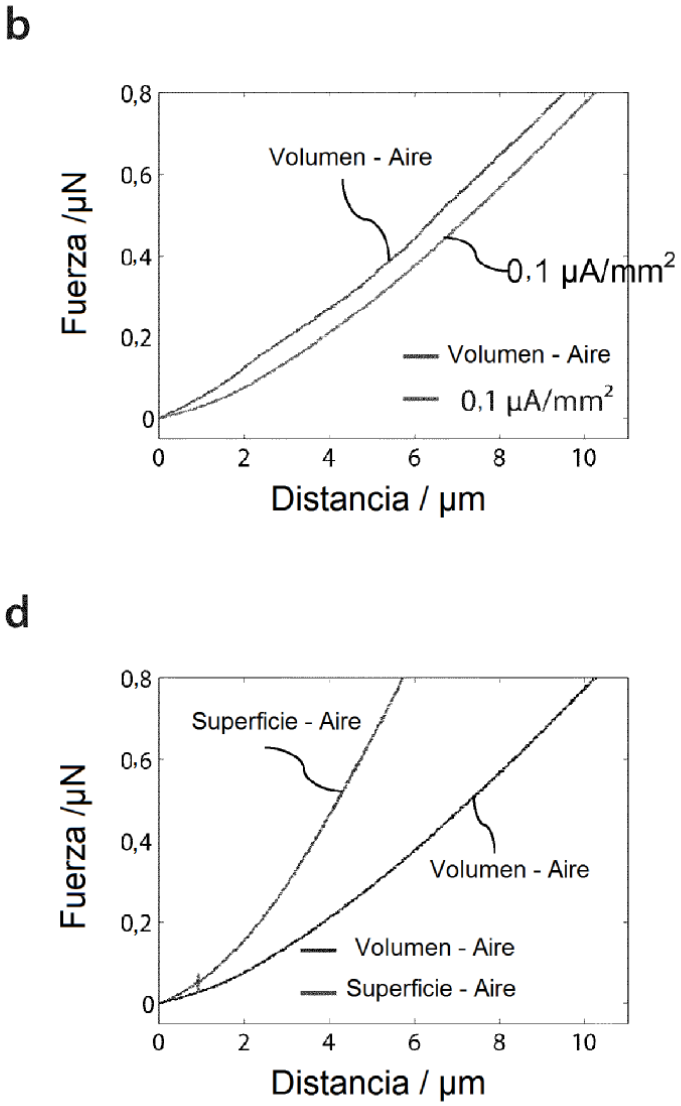

b
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Fuerza /µN
Volumen - Aire
0,1 µA/mm²
Volumen - Aire
0,1 µA/mm²
0
2
4
6
8
10
Distancia / µm
d
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Fuerza /µN
Superficie - Aire
Volumen - Aire
Volumen - Aire
Superficie - Aire
0
2
4
6
8
10
Distancia / µm

Fig. 15

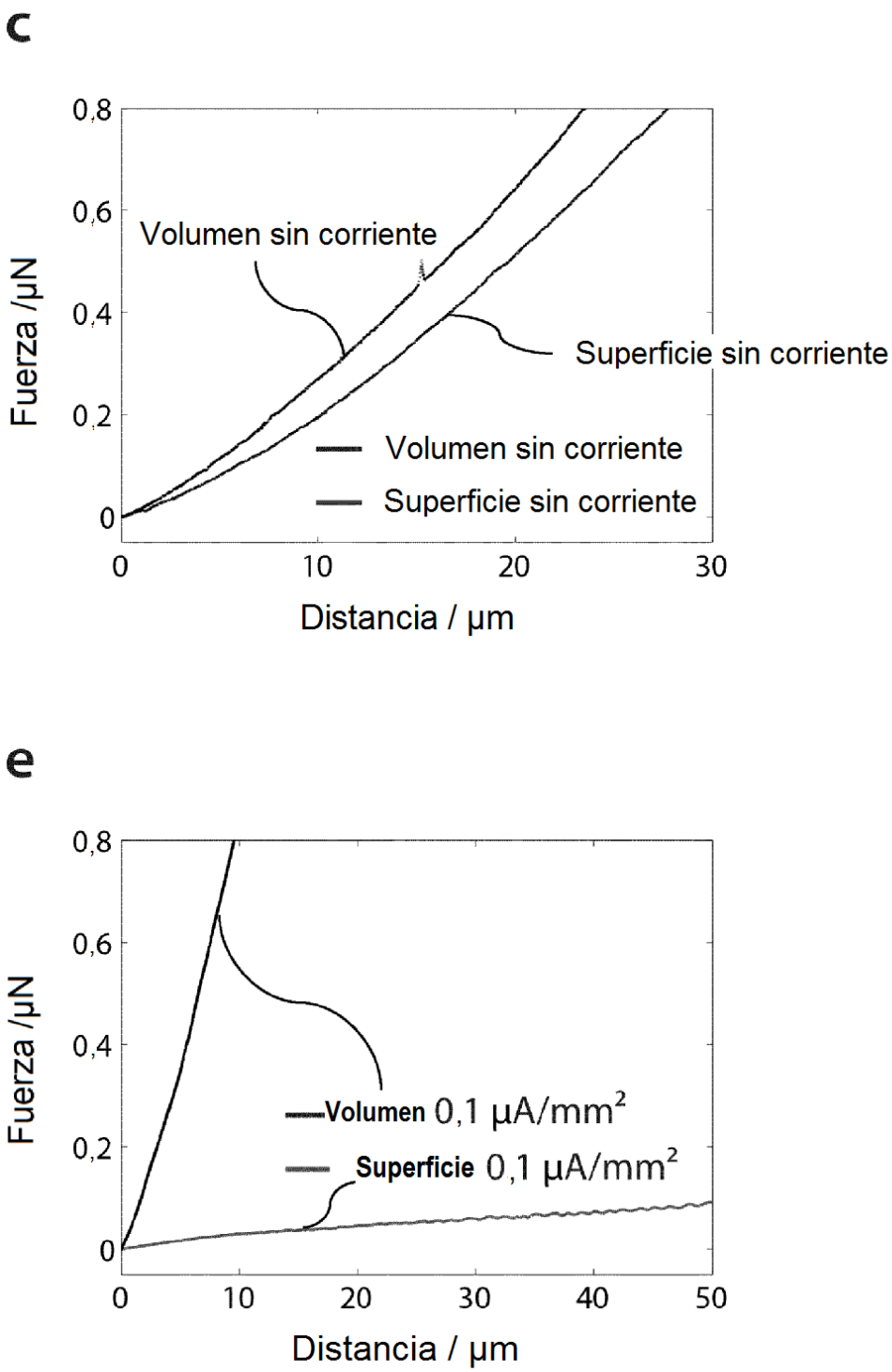

c
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Fuerza /µN
Volumen sin corriente
Superficie sin corriente
Volumen sin corriente
Superficie sin corriente
0
10
20
30
Distancia / µm
e
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Fuerza /µN
Volumen 0,1 µA/mm²
Superficie 0,1 µA/mm²
0
10
20
30
40
50
Distancia / µm

Fig. 16

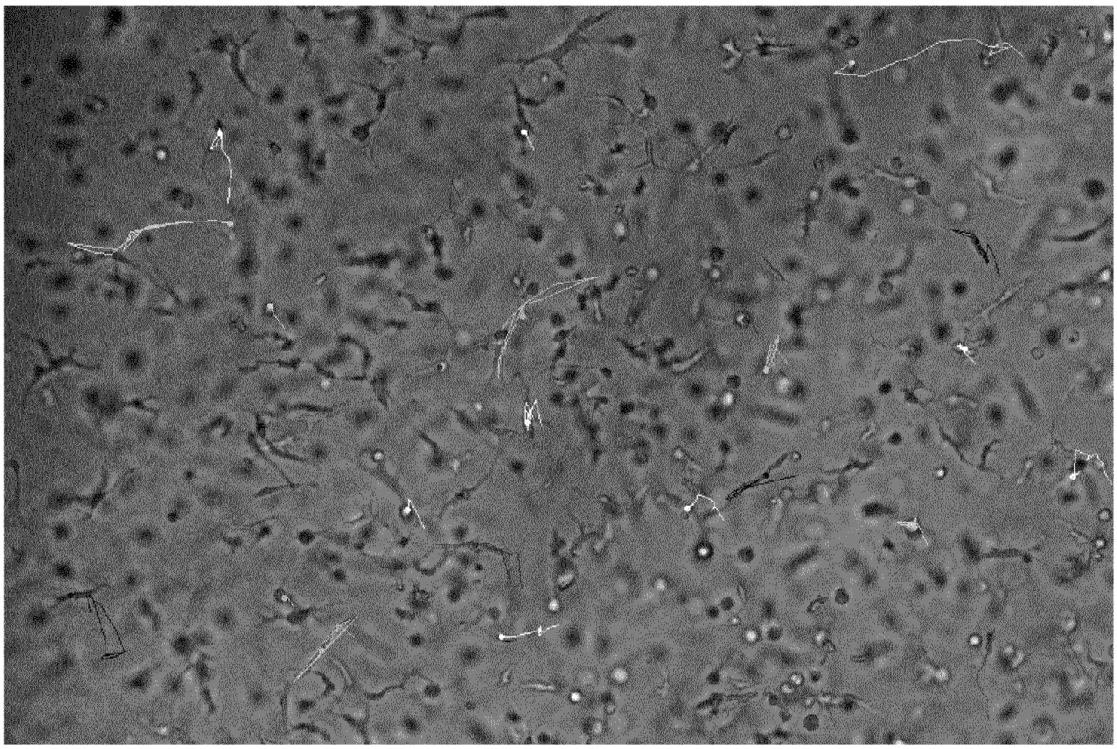


Fig. 17

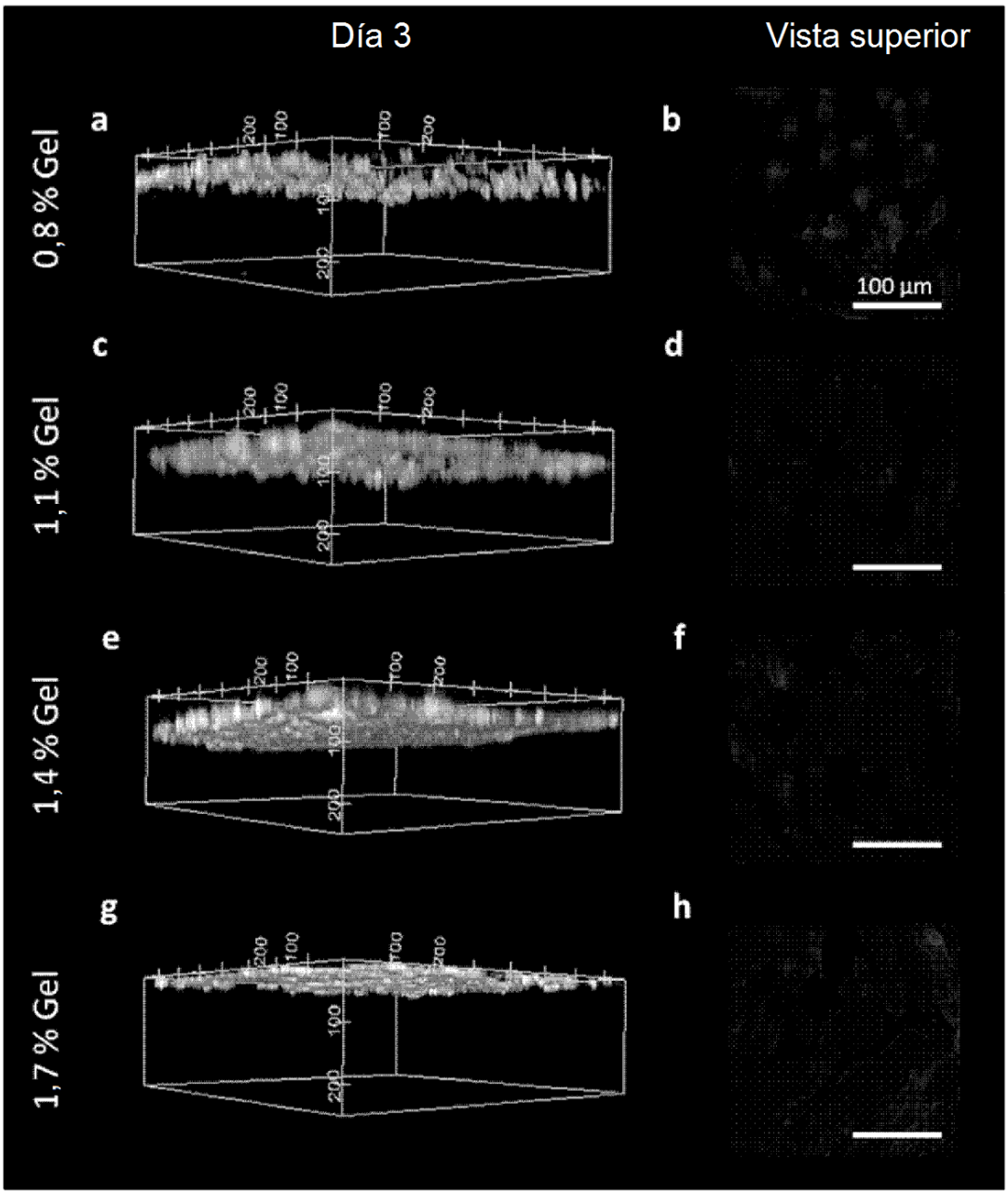

Día 3
Vista superior
0,8 % Gel
1,1 % Gel
1,4 % Gel
1,7 % Gel
a
b
c
d
e
f
g
h
100 µm

Fig. 18

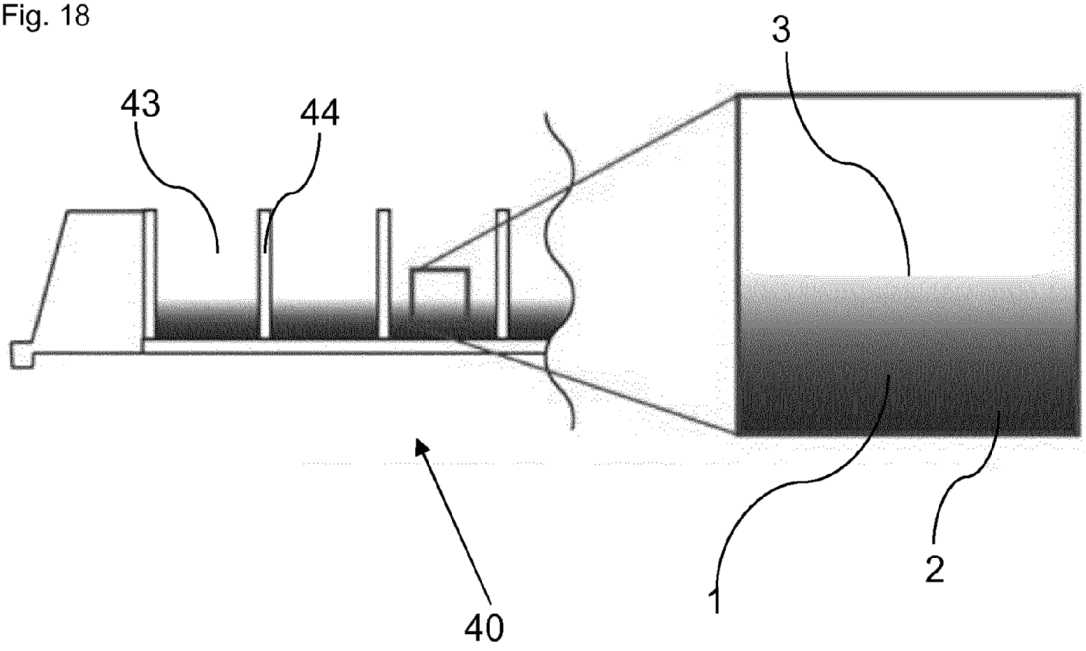


Fig. 19

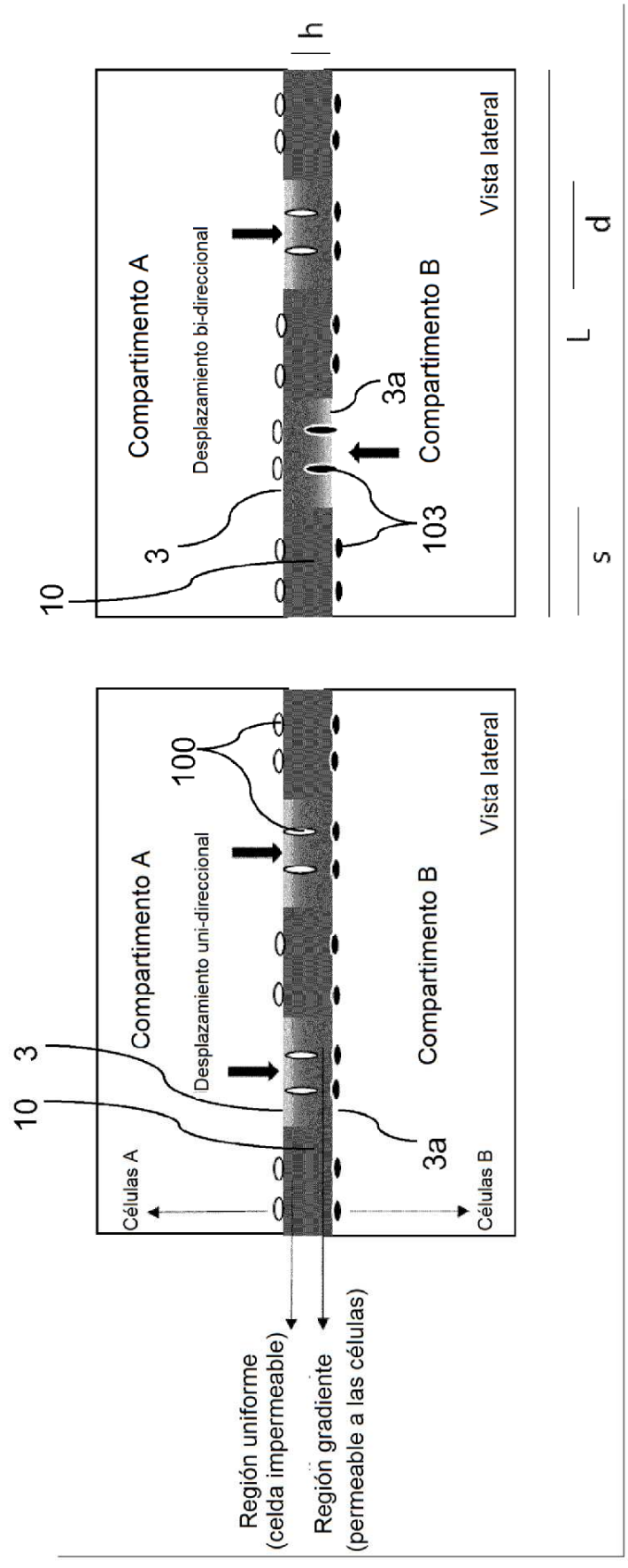

h
Compartimento A
Desplazamiento bi-direccional
Vista lateral
3
10
3a
Compartimento B
103
L
d
s
100
Compartimento A
Desplazamiento uni-direccional
Compartimento B
Vista lateral
3
10
3a
Células A
Células B
Región uniforme
(celda impermeable)
Región gradiente
(permeable a las células)

Fig. 20

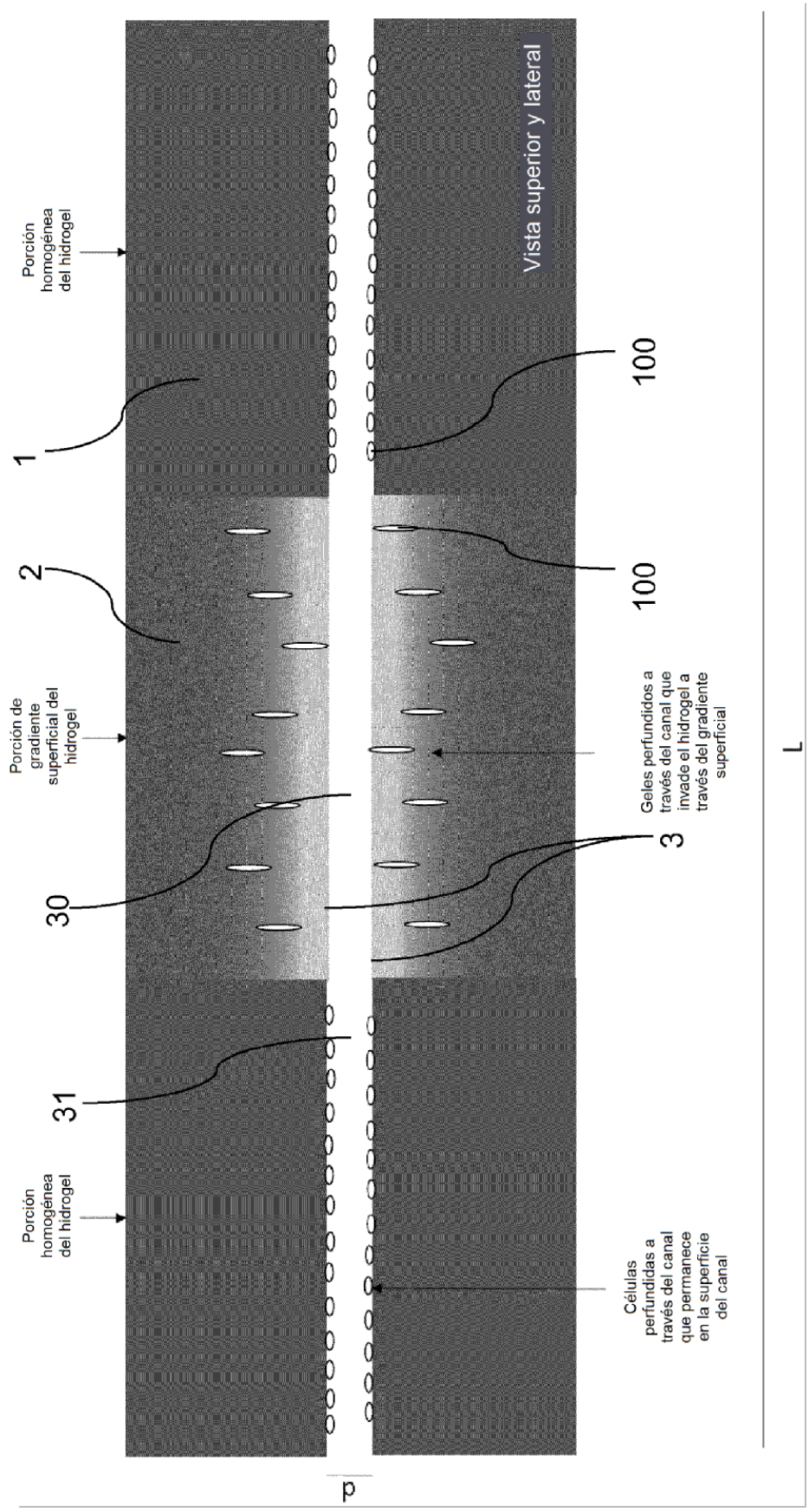

Vista superior y lateral
Porción homogénea del hidrogel
1
100
2
100
Porción de gradiente superficial del hidrogel
30
Geles perfundidos a través del canal que invade el hidrogel a través del gradiente superficial
3
L
31
Porción homogénea del hidrogel
Células perfundidas a través del canal que permanece en la superficie del canal
p

Fig. 21

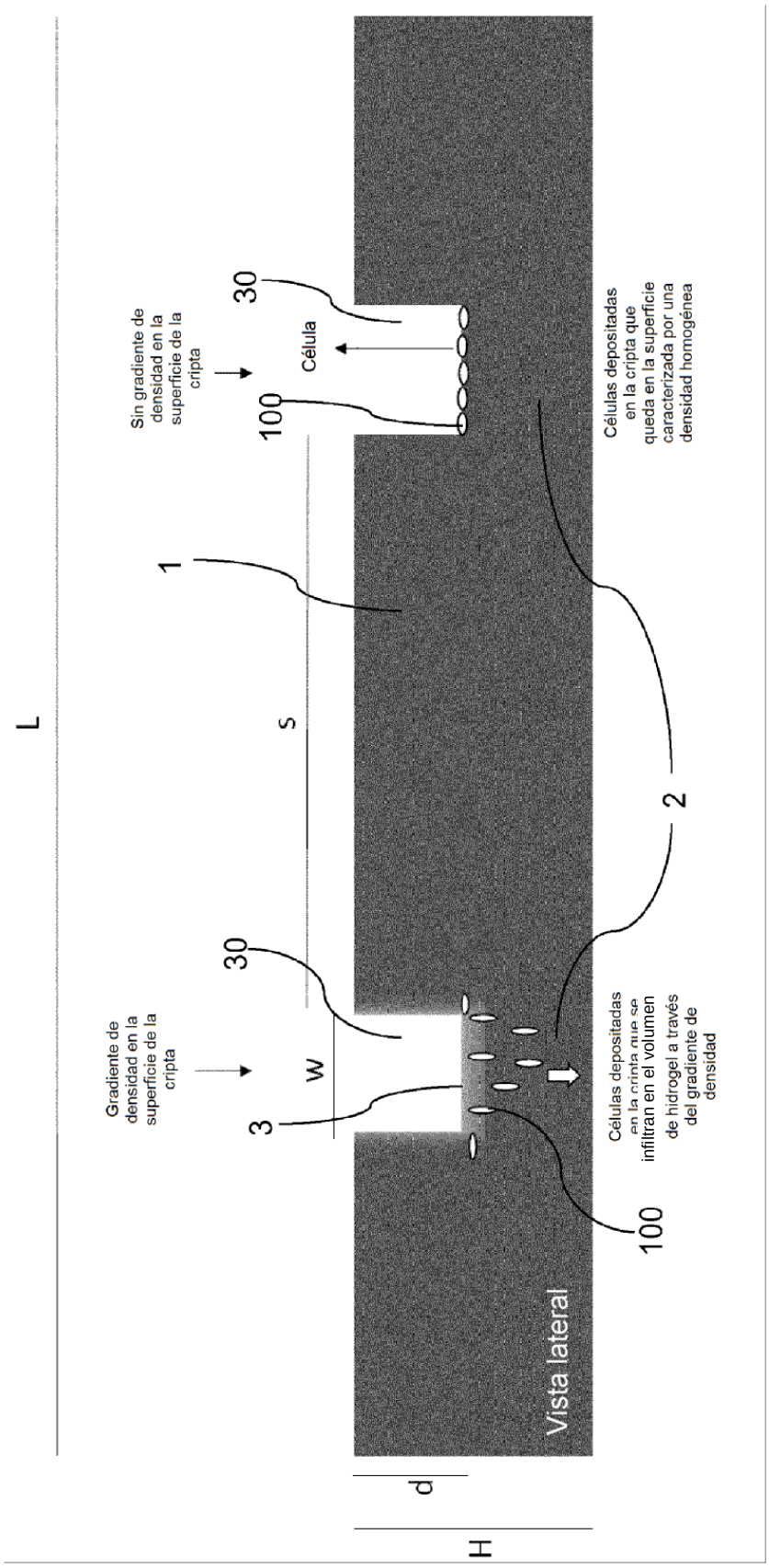

L
Sin gradiente de densidad en la superficie de la cripta
30
Célula
100
1
s
Células depositadas en la cripta que queda en la superficie caracterizada por una densidad homogénea
2
Gradiente de densidad en la superficie de la cripta
30
3
w
Células depositadas en la cripta que se infiltran en el volumen de hidrogel a través del gradiente de densidad
100
Vista lateral
d
H

Fig. 22

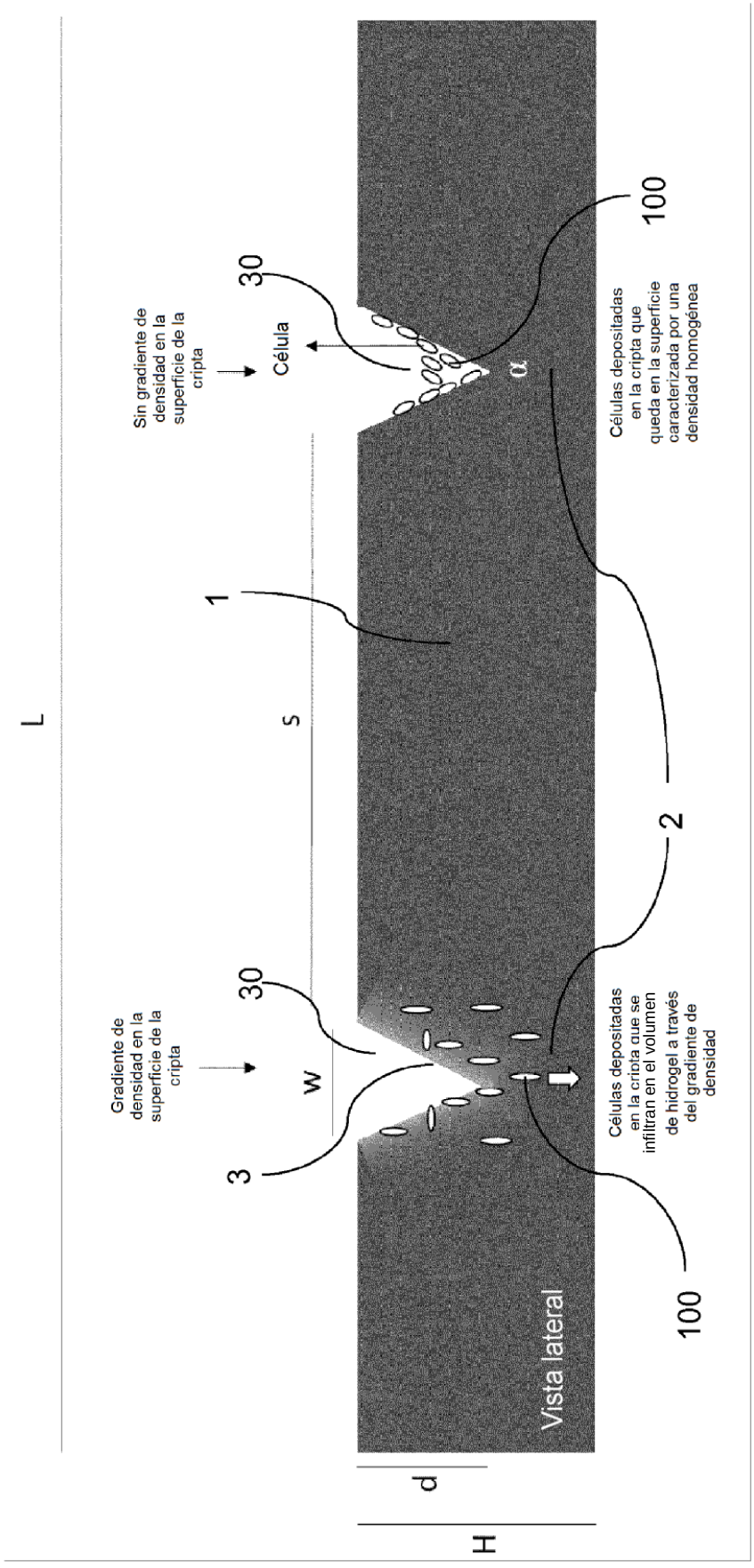

Vista lateral
L
H
d
s
w
α
1
2
3
30
30
100
100
Célula
Sin gradiente de densidad en la superficie de la cripta
Gradiente de densidad en la superficie de la cripta
Células depositadas en la cripta que queda en la superficie caracterizada por una densidad homogénea
Células depositadas en la criota que se infiltran en el volumen de hidrogel a través del gradiente de densidad

Fig. 23

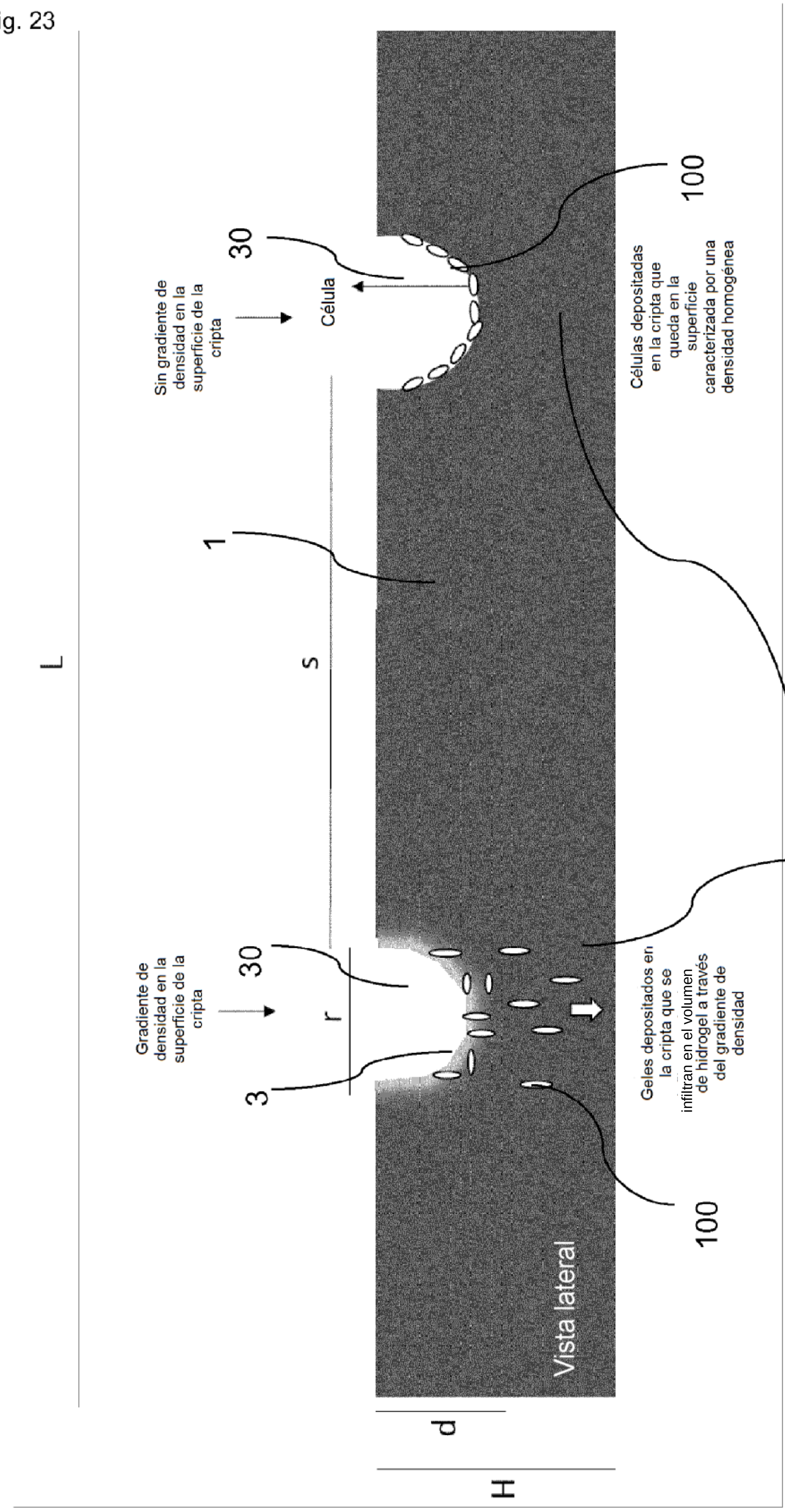

Sin gradiente de densidad en la superficie de la cripta
Célula
30
100
Células depositadas en la cripta que queda en la superficie caracterizada por una densidad homogénea
1
L
s
2
Gradiente de densidad en la superficie de la cripta
30
r
3
Geles depositados en la cripta que se infiltran en el volumen de hidrogel a través del gradiente de densidad
100
Vista lateral
d
H

Fig. 24

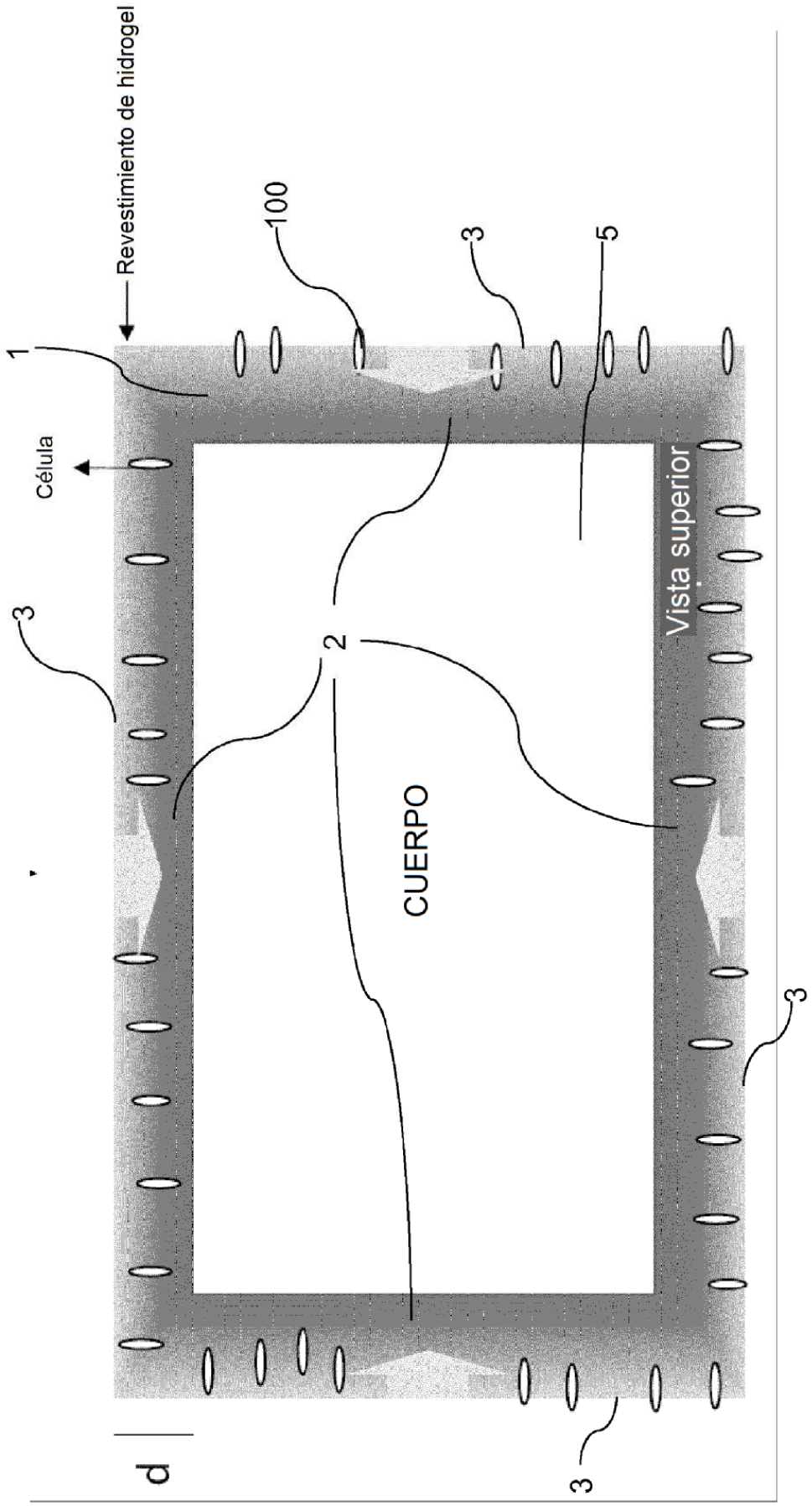

Revestimiento de hidrogel
100
3
5
1
Célula
3
2
CUERPO
Vista superior
3
3
d

Fig. 25

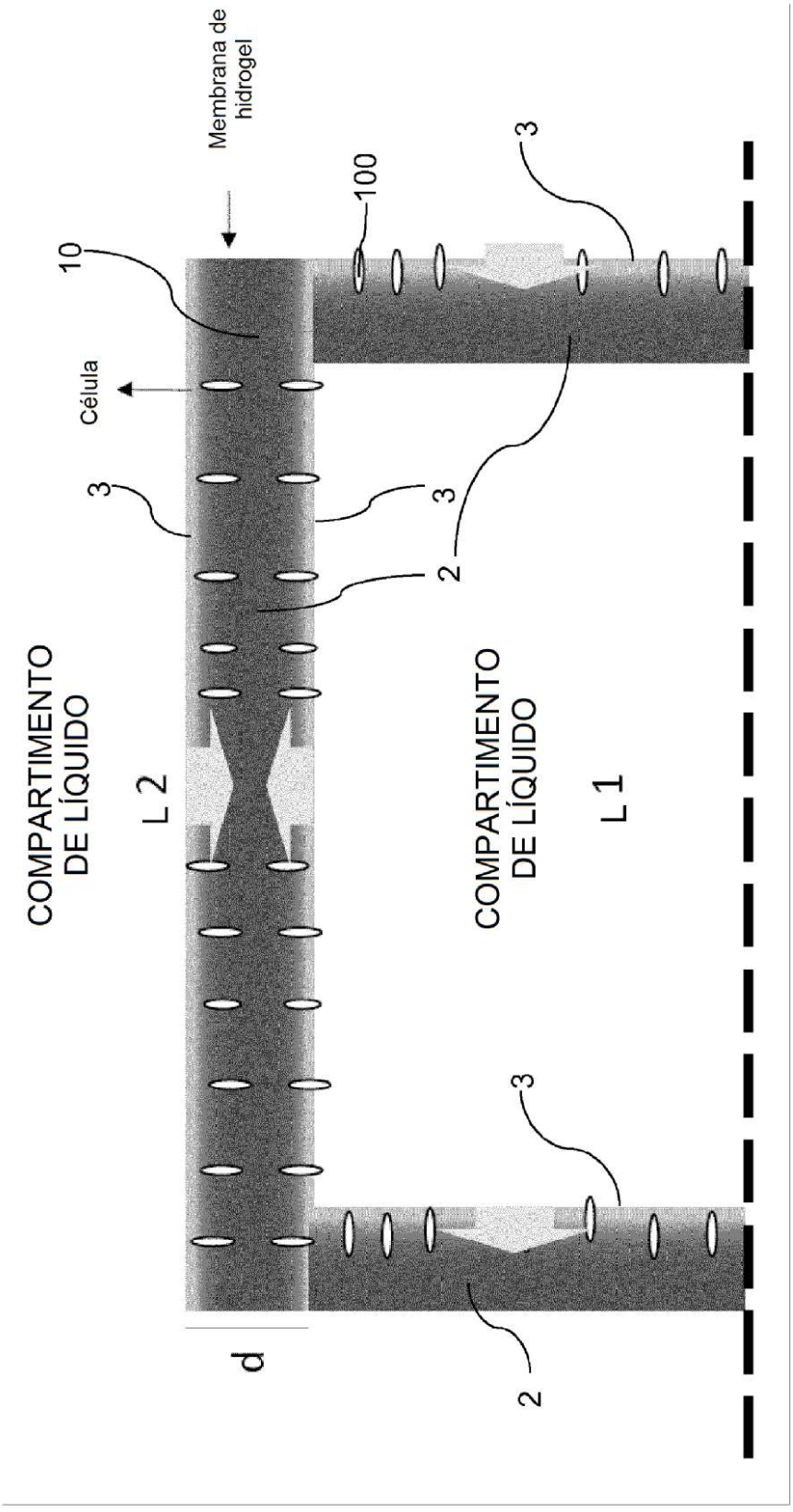

Membrana de hidrogel
100
3
10
Célula
3
3
2
COMPARTIMENTO DE LÍQUIDO
L 2
COMPARTIMENTO DE LÍQUIDO
L 1
3
2
d

Fig. 26

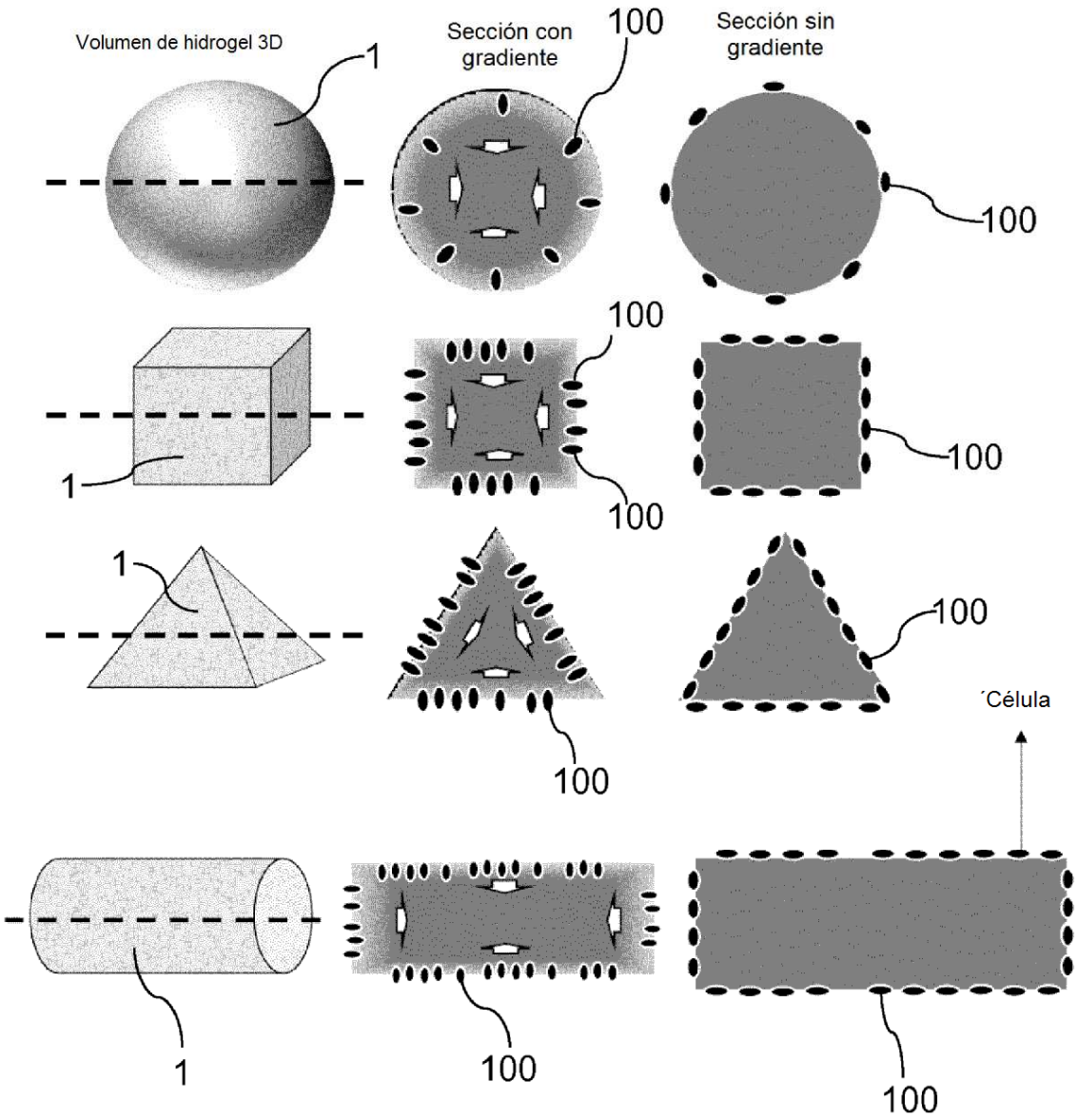
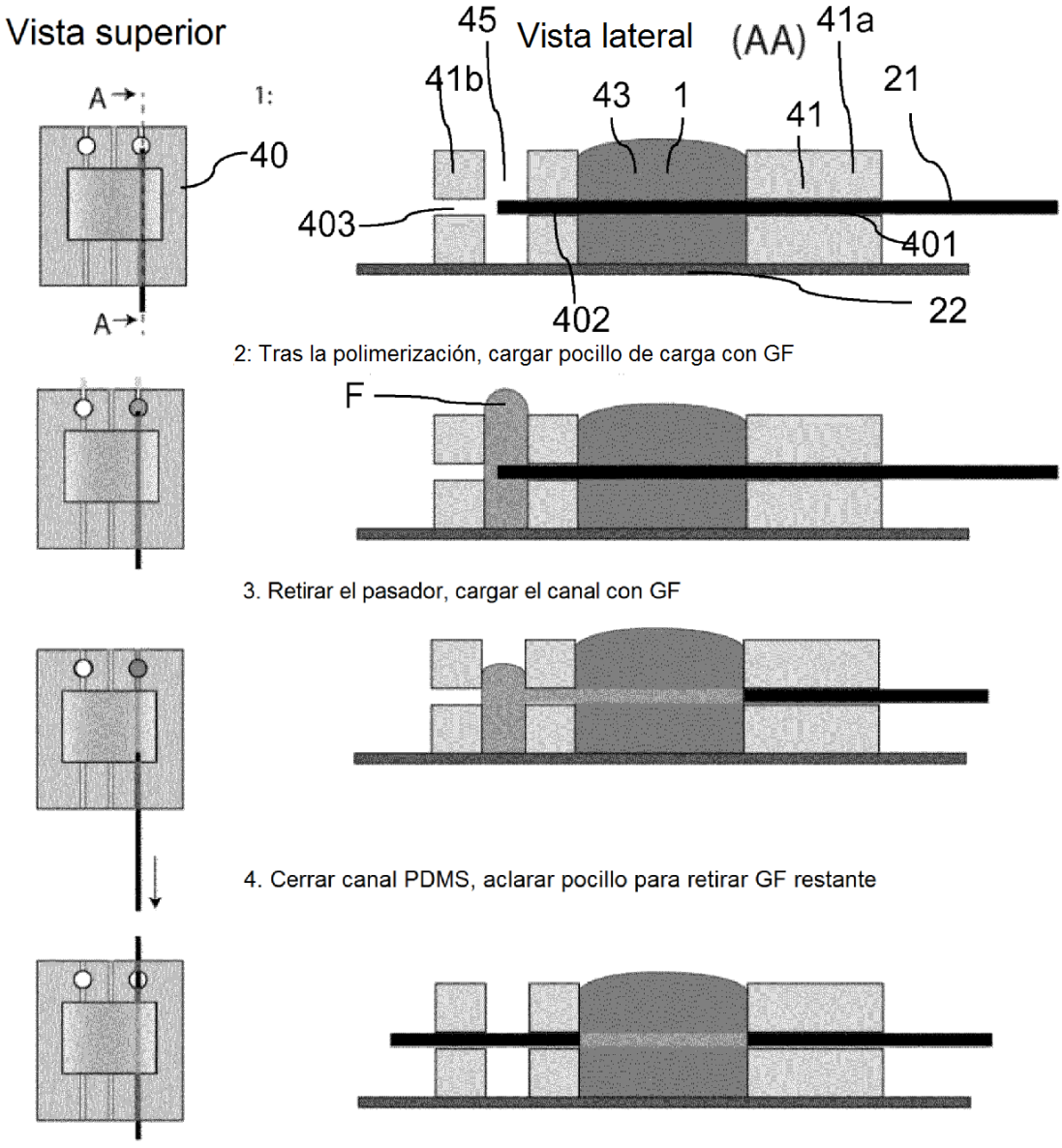

Volumen de hidrogel 3D
Sección con gradiente
Sección sin gradiente
1
100
100
100
100
1
100
1
100
100
´Célula
1
100
100

Fig. 27


Vista superior
A
1:
40
A
45
Vista lateral
(AA)
41a
41b
43
1
41
21
403
401
402
22
2: Tras la polimerización, cargar pocillo de carga con GF
F
3. Retirar el pasador, cargar el canal con GF
4. Cerrar canal PDMS, aclarar pocillo para retirar GF restante