



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO FIN DE GRADO

BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la biocompatibilidad *in vitro* de materiales para uso biomédico

Alumno: Montejo Insausti, Unai

Fecha: Junio 2021

Directoras

Ana Alonso Varona

Miren Josu Omaetxebarria Ibarra

Curso Académico

2020/21

ÍNDICE

RESUMEN.....	iv
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1. OBJETIVOS	3
2. DESARROLLO.....	4
2.1. MATERIALES Y MÉTODOS	4
2.1.1. Materiales analizados	4
2.1.2. Cultivos celulares	4
2.1.3. Cuantificación de viabilidad celular.....	5
2.1.4. Obtención de medios extractivos	6
2.1.5. Ensayos de citotoxicidad.....	6
2.1.6. Ensayos de adhesión	7
2.1.7. Análisis estadístico.....	8
2.2. RESULTADOS.....	10
2.2.1. Establecimiento de las condiciones de cultivo para los ensayos de citotoxicidad.....	10
2.2.2. Análisis de la citotoxicidad de los materiales	11
2.2.3. Ensayos de adhesión y SEM	15
2.3. DISCUSIÓN	18
3. CONCLUSIÓN.....	21
4. AGRADECIMIENTOS	21
5. BIBLIOGRAFÍA.....	22

RESUMEN

El incremento de la expectativa de vida de la población conlleva un aumento en la demanda de terapias encaminadas a corregir el deterioro de órganos y tejidos; sin embargo, las soluciones hoy en día siguen estando limitadas al trasplante de estos. La escasez de donantes y el riesgo de padecer rechazo inmunológico frente al trasplante han obligado a desarrollar alternativas terapéuticas basadas en la ingeniería tisular (Shafiee & Atala, 2017). Un “constructo” de ingeniería tisular incluye células, biomateriales y señales químicas o físicas reguladoras de la función celular (Bakhshandeh *et al.*, 2017). Por esta razón, actualmente existe una gran demanda de biomateriales para estas aplicaciones, siendo el principal requisito que deben cumplir, su carácter biocompatible.

En este trabajo, utilizando una línea celular de fibroblastos de ratón, se ha estudiado la biocompatibilidad *in vitro* de cinco nuevos derivados del poliuretano, mediante la evaluación de su citotoxicidad y su capacidad para constituir un sustrato de adhesión celular.

Para ello, por una parte, se cuantificó la proliferación celular de cultivos realizados en medio extractivo obtenido de cada uno de los materiales a lo largo de 72 h y, por otra, se realizaron cultivos directamente sobre muestras de los materiales y se evaluó la adhesión y proliferación celular mediante microscopía electrónica de barrido.

Dos de los cinco materiales han demostrado una buena biocompatibilidad *in vitro* al no mostrar indicios de citotoxicidad para la línea celular utilizada, además de permitir la adhesión, migración y proliferación de las células sobre el material con gran eficacia. Este estudio abre camino a la futura evaluación de la biocompatibilidad *in vivo* de estos materiales y sienta las bases para su futura aplicación en ingeniería tisular y biomedicina.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El incremento de la expectativa de vida de la población se asocia con un aumento de las enfermedades crónicas y, en consecuencia, con un aumento en la demanda de terapias encaminadas a corregir el deterioro de órganos y tejidos. Aunque la extirpación de un órgano dañado más allá de lo reparable puede salvar la vida a un paciente, es necesario restaurar su funcionalidad de alguna forma. Para realizar esta sustitución, los cirujanos han trasplantado órganos y tejidos, e incluso fabricado prótesis artificiales. Sin embargo, la reducida disponibilidad de tejidos y órganos procedentes de donantes constituye una limitación que ha promovido la búsqueda de otras estrategias terapéuticas para la reparación/regeneración de tejidos y órganos dañados (Shafiee & Atala, 2017).

Con el objetivo de dar respuesta a esta limitación, surge la ingeniería tisular, definida como “*un campo interdisciplinar que aplica los fundamentos de la ingeniería y de las ciencias de la salud para el desarrollo de sustitutos biológicos que restablecen, mantienen o mejoran funciones tisulares*”, de acuerdo con Langer y Vacanti (1993). Esta disciplina, que se enmarca en el área de la medicina regenerativa, es el paso lógico en la sustitución de órganos y tejidos dañados, pretendiendo reducir las listas de espera de pacientes para trasplantes, a la vez que se minimiza el riesgo de rechazo inmunológico (Langer & Vacanti, 1993; Shafiee & Atala, 2017).

La estrategia de ingeniería tisular predominante se basa en la creación de un tejido o “constructo” *ex vivo* y su posterior implantación en el organismo vivo (Bakhshandeh *et al.*, 2017; Langer & Vacanti, 1993; Shafiee & Atala, 2017). Esta técnica consiste en: *i*) la obtención y cultivo *in vitro* de células funcionalmente equivalentes a las del tejido a reparar; *ii*) el diseño de un andamio o *scaffold*, que constituye un equivalente de matriz extracelular, sirviendo de soporte para la proliferación y organización celular, y *iii*) la incorporación de un conjunto de señales químicas y/o mecánicas necesarias para inducir la proliferación y la diferenciación celular (Bakhshandeh *et al.*, 2017).

Los modelos propuestos de ingeniería tisular utilizan diversas fuentes de células, desde las células madre embrionarias (ESCs) hasta las células madre adultas o ASCs, siendo

estas últimas las más utilizadas en ingeniería tisular, por su facilidad de obtención y mayor seguridad (Bakhshandeh *et al.*, 2017).

El soporte o *scaffold* necesario para alojar las células debe cumplir una serie de requisitos, entre los que destaca permitir la proliferación, adhesión y diferenciación de las células del tejido a regenerar, carecer de citotoxicidad, tener propiedades físicas y químicas parecidas o compatibles con la matriz extracelular del tejido a regenerar, etc. (Gilbert Triplett & Budinskaya, 2017; Jafari *et al.*, 2017). El cumplimiento de estos requisitos depende en gran medida de las propiedades químicas y topológicas del biomaterial empleado, así como de su método de fabricación (Abdulghani & Mitchell, 2019; Bakhshandeh *et al.*, 2017).

En este contexto, un biomaterial es un material de origen natural (matriz extracelular descelularizada, colágeno, fibrina, etc.) o sintético (poliuretano, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc.), adecuado para entrar en contacto con un tejido vivo sin causar ninguna reacción adversa (Bhat & Kumar, 2013). Por tanto, el principal requisito que debe cumplir un material para su utilización en ingeniería tisular es su carácter biocompatible, que Williams (2008) define como “*la capacidad de llevar a cabo una función terapéutica deseada sin causar efectos indeseables locales o sistémicos*”. Evidentemente, la biocompatibilidad engloba muchos aspectos de un material, tanto físicos, como químicos, además de depender, en última instancia, de su forma de aplicación, ambiente, y tipo de células con las que esté en contacto (de Moraes Porto, 2012; Williams, 2008).

Entre los posibles materiales a utilizar, los polímeros sintéticos tienen la ventaja de ser fáciles de producir a gran escala con un gran nivel de control; sin embargo, su falta de bioactividad limita su aplicación en ingeniería tisular (Abbasian *et al.*, 2019; Wendels & Avérous, 2021). Por esta razón, para imitar las características de la matriz extracelular y mejorar su utilidad como *scaffold*, es habitual combinar polímeros sintéticos entre sí, integrar moléculas bioactivas en su composición o modificar su superficie mediante métodos químicos, aprovechando la facilidad de modificación que presenta esta clase de biomateriales (Abbasian *et al.*, 2019; Abdulghani & Mitchell, 2019; Bakhshandeh *et al.*, 2017; Jafari *et al.*, 2017; Wendels & Avérous, 2021).

Un gran ejemplo de la gran diversidad de derivados que se pueden obtener mediante los métodos de modificación mencionados previamente son los poliuretanos. Esta clase de polímeros se puede sintetizar con una biocompatibilidad y propiedades a medida, modificando las proporciones de los segmentos flexibles, los rígidos y de los extensores de cadena (Hao *et al.*, 2016). También es posible añadir elementos bioactivos en la propia estructura del polímero para lograr efectos antimicrobianos, antiinflamatorios, de señalización química... o incorporar nanopartículas y nanofibras para producir *nanocomposites* con propiedades mecánicas o antibacterianas superiores (Wendels & Avérous, 2021). Sin embargo, posibles trazas de los disolventes orgánicos utilizados en su fabricación pueden ocasionar citotoxicidad o desencadenar una respuesta inflamatoria. Por esta razón, se han desarrollado los poliuretanos basados en agua (*Waterborne polyurethanes, WBPU*), en los que se utiliza agua como disolvente principal (Hao *et al.*, 2016).

Debido a la gran demanda de nuevos biomateriales y a la tasa a la que se producen nuevos derivados, resulta imprescindible evaluar su biocompatibilidad de una forma rápida y consistente. Aunque la forma de evaluación ideal son los ensayos *in vivo* por su mayor similitud con un escenario real, los estudios de la biocompatibilidad *in vitro* siguen siendo un paso previo imprescindible para detectar posibles componentes citotóxicos en el material o evaluar características concretas, además de ser rápidos y sencillos de llevar a cabo (de Moraes Porto, 2012). De hecho, existen estándares internacionales, como la ISO 10993 de la *International Organization for Standardization* (2009, 2012), que regulan las condiciones en las que deben realizarse los ensayos necesarios para determinar la biocompatibilidad de un material.

1.1. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es evaluar la biocompatibilidad *in vitro* de los materiales denominados PU1, PU2, PU3, NCPU y GOPU, de diseño reciente. El estudio de la biocompatibilidad *in vitro* incluye: *i*) la determinación de la posible citotoxicidad de cada material sobre la línea celular de fibroblastos murinos L-929 cultivados en medios extractivos obtenidos a partir de los diferentes materiales y *ii*) la evaluación de la capacidad de adhesión de dichas células a la superficie de los materiales mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

2. DESARROLLO

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1. Materiales analizados

Los materiales analizados fueron sintetizados y cedidos por el Grupo de Investigación de Procesos de Biorrefinería del Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente, de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Todos los materiales fueron prensados en forma de film.

Los materiales PU1 y PU2 son poliuretanos convencionales sintetizados usando E82 como macrodiol, diisocianato de hexametileno y, como extensor de cadena, 1,3-propanodiol en el caso de PU1 y 2,5-Bis(hidroxiometil)furano en el caso de PU2.

PU3 es un poliuretano basado en agua sintetizado a partir de Priplast 3192® como macrodiol, diisocianato de isoforona y etilendiamina como extensor de cadena.

Por último, se analizaron dos *nanocomposites* basados en poliuretano, NCPU y GOPU, con una composición similar a la de PU3, con la diferencia de que NCPU se reforzó con nanofibras de celulosa carboxilada, mientras que a GOPU se le añadió óxido de grafeno reducido y extracto de salvia.

2.1.2. Cultivos celulares

2.1.2.1. Condiciones de cultivo.

Las células empleadas en todos los ensayos de este trabajo fueron fibroblastos de ratón L-929 (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos), recomendados por la norma ISO 10993-5 (2009).

El cultivo de las células se realizó a una temperatura de 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂ y humedad a saturación en todos los casos.

La propagación de las células se realizó en frascos de 75 cm² (Sarstedt, Alemania) empleando medio MEM (*Minimum Essential Medium*, Gibco®, Estados Unidos), que contiene sales de Earle y 2 mM de L-Glutamina, suplementado con un 1 % de aminoácidos no esenciales (Gibco®, Estados Unidos), 1 mM de piruvato sódico

(Gibco®, Estados Unidos), 100 U/ml de penicilina y estreptomina (Lonza, Bélgica) y 10 % de suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum, FBS*, Biochrom, Alemania).

Se realizaron subcultivos al 80 % de confluencia. La recolección de las células se llevó a cabo mediante incubación con Tripsina-EDTA al 0,05 % (Gibco®, Estados Unidos) y centrifugación a 1500 rpm.

2.1.2.2. Establecimiento de las condiciones para las cinéticas de proliferación celular

Con el objetivo de determinar la densidad celular óptima a sembrar para los ensayos de citotoxicidad, se realizó un ensayo preliminar de siembra de concentraciones crecientes de células. Así, se sembraron 2×10^3 , 4×10^3 , 6×10^3 y 8×10^3 células/pocillo en 100 μ L de medio completo en placa de 96 pocillos (*C. C. Standard*, Sarstedt, Alemania) y se incubaron durante 24 h a 37°C con el objetivo de permitir la adhesión celular y la adaptación de las células al cultivo. Se emplearon 3 réplicas para cada densidad celular y tiempo y también se utilizaron 3 pocillos adicionales con 100 μ L de medio sin células como blanco, para poder normalizar posteriormente los valores de absorbancia. Tras la incubación, se cuantificó la viabilidad celular para obtener el valor de referencia de las 0 h y se realizaron sucesivas mediciones a las 24, 48 y 72 h posteriores.

2.1.3. Cuantificación de viabilidad celular

Para cuantificar la viabilidad celular en placa de 96 pocillos, se empleó el método colorimétrico PrestoBlue® (*Molecular Probes*, Life Technologies, Reino Unido) basado en la resazurina, un colorante que penetra en las células viables. Enzimas en el citoplasma y en las mitocondrias reducen la resazurina, de color azul ($\lambda=600$ nm), a resorufina, de color rojo ($\lambda=570$ nm) (Gonzalez y Tarloff, 2001). Esta conversión se puede cuantificar espectrofotométricamente y es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo.

El reactivo se añadió en una proporción 1:10 del volumen de medio en el pocillo y se incubó durante 2-4 h a 37 °C y en oscuridad. La medida de absorbancia se realizó a $\lambda = 570$ y $\lambda = 600$ nm en un lector de placas Biotek HT Synergy (Estados Unidos).

2.1.4. Obtención de medios extractivos

Se prepararon medios extractivos de cada material cumpliendo con el estándar ISO 10993-12 (2012) que especifica la metodología de preparación de las muestras para la evaluación de su citotoxicidad.

Así, al tratarse de films con un grosor inferior a 0,5 mm, se cortaron fragmentos 6 cm² de cada material (ISO, 2012) y se esterilizaron durante 30 minutos bajo luz UV en una cabina de flujo laminar (*Bio48*, Faster, Italia). Después, se introdujo el material esterilizado en un tubo de 50 mL que contenía 1 mL de medio de cultivo completo y se incubó a 37°C durante 24 h, obteniendo, así, el medio extractivo de cada material.

2.1.5. Ensayos de citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad de los materiales se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en la ISO 10993-5 (2009), utilizando los medios extractivos obtenidos a partir de cada uno de los materiales.

En placas de 96 pocillos, se sembraron 4x10³ células/pocillo en 100 µL de medio completo. Al igual que en el Apartado 2.1.2.2, se emplearon 3 réplicas para cada tratamiento y tiempo y 3 pocillos adicionales con medio sin células como blanco. Tras la siembra, las placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

Después de la incubación, se realizó la primera medición de la viabilidad (0 h) para determinar la densidad celular inicial, previa al tratamiento. A continuación, se eliminó el medio de los pocillos y se sustituyó por 100 µL del medio extractivo obtenido a partir de cada uno de los materiales. Alternativamente, se aplicaron los medios de control: *i*) control positivo, correspondiente a medio suplementado con 10 % dimetilsulfóxido (*DMSO*, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), para obtener el valor de la máxima respuesta tóxica posible en el cultivo, o *ii*) control negativo, consistente en medio de cultivo estándar, que corresponde a las condiciones de cultivo normales y constituye la referencia de la máxima capacidad proliferativa de las células.

La evaluación de la viabilidad celular se llevó a cabo a las 24, 48 y 72 h siguientes utilizando la sonda Presto Blue®, siguiendo la metodología descrita en el Apartado 2.1.3.

2.1.6. Ensayos de adhesión

Se utilizaron fragmentos de 0,5 x 0,5 cm de cada material, esterilizados mediante exposición a luz UV durante 30 min. Los fragmentos se colocaron en una placa de 24 pocillos de baja adhesión (*Ultra low attachment*, Corning, Estados Unidos). A continuación, se añadieron 500 µL de medio de cultivo a cada muestra y se incubaron durante 2 h para que los materiales alcanzaran el grado de humedad necesario antes de la siembra celular. Transcurrido el período de pre-humedecimiento, se eliminó el medio de cada pocillo y se sembraron 5×10^4 células en 15 µL sobre cada fragmento de material, exceptuando uno, que se utilizó como control. Adicionalmente, se añadieron 500 µL de tampón salino fosfato estéril (*Phosphate Buffered Saline, PBS*, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a los pocillos vacíos adyacentes con el objetivo de mantener un ambiente de humedad a saturación en la placa. Tras 2 h, una vez adheridas las células a la superficie del material, se añadieron 500 µL de medio en cada pocillo.

Transcurridas 24, 48 y 72 h desde la siembra, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las muestras con PBS y se procesaron para su análisis mediante microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy, SEM*). Así, las muestras se transfirieron a una placa de 24 pocillos (*C. C. Standard*, Sarstedt, Alemania) para su fijación, que se realizó con glutaraldehído al 2 % en tampón fosfato Sorensen 0,1 M a pH 7,4 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y durante 1 h a temperatura ambiente.

Transcurrido ese tiempo, las muestras se lavaron tres veces durante 10 minutos con tampón Sorensen y se postfijaron con 1 % OsO_4 durante 1 h a 4°C y en oscuridad. Después, se realizaron otros tres lavados de 10 minutos con tampón Sorensen, se deshidrataron con un gradiente de etanol del 30 al 100 %, 10 minutos en cada uno y se desecaron con hexametildisilazano durante 10 minutos. Con el objetivo de incrementar la conductividad de las muestras, se colocaron sobre un soporte de microscopio utilizando cemento conductor y se recubrieron de oro en una atmósfera de argón.

Finalmente, las muestras se visualizaron y fotografiaron en un microscopio SEM Hitachi S-4800 (Japón) utilizando un voltaje de 5 kV, y realizando capturas de imágenes a 300x, 1000x y 3500x aumentos.

2.1.7. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos y cálculos de estadística, se utilizó Microsoft Office Excel® 2019 (Estados Unidos).

Los datos de absorbancia (U.A.) obtenidos mediante el método PrestoBlue® se procesaron de acuerdo con el fabricante: en primer lugar, se restó la absorbancia de la longitud de onda de referencia (600 nm) a la absorbancia experimental medida a 570 nm para cada pocillo. Después, se restó la media de la absorbancia de los blancos a la absorbancia de cada pocillo para normalizar los valores. Finalmente, la absorbancia de cada muestra, indicadora de la viabilidad, se expresó mediante la media aritmética de las réplicas y su desviación estándar muestral ($\bar{X} \pm S$) representadas con relación al tiempo.

$$Viabilidad (\%) = \frac{A_M}{\bar{A}_C} \cdot 100 \quad (1)$$

Además, en el caso de los ensayos de citotoxicidad, los valores de absorbancia de las muestras tratadas con medio extractivo se relativizaron a sus respectivos controles negativos mediante la Ecuación (1), donde A_M es la absorbancia de un pocillo tratado con medio extractivo de material y \bar{A}_C es la media de la absorbancia del control negativo en el mismo tiempo. Posteriormente, se representó la media aritmética del porcentaje de viabilidad (%) de las réplicas y su desviación estándar muestral ($\bar{X} \pm S$) para cada material y tiempo.

Finalmente, con el objetivo de determinar si los resultados de viabilidad celular eran significativamente superiores al 70 % del valor correspondiente al control negativo, se creó un grupo de muestras “Límite” multiplicando los valores de absorbancia (U.A.) del control negativo por 0,7 y, posteriormente, realizando una prueba *t* de Student para determinar la significancia de la diferencia entre las medias de las muestras “Límite” y “Material”.

$$t = \frac{\bar{A}_M - \bar{A}_L}{S_{ML} \cdot \sqrt{\frac{2}{n}}} \quad (2)$$

$$S_{ML} = \sqrt{\frac{1}{2}(S_M^2 + S_L^2)} \quad (3)$$

Asumiendo tamaños de muestra y varianzas iguales, el estadístico t se calculó según la Ecuación (2) para cada material y tiempo, donde \bar{A}_M es la media de las absorbancias de los pocillos tratados con el material, \bar{A}_L es la media de la muestra “Límite”, n es el número de muestras y S_{ML} es la desviación estándar combinada de ambas muestras, calculada mediante la Ecuación (3), donde S_M es la desviación estándar de la muestra “Material” y S_L , la de la muestra “Límite”.

Finalmente, se obtuvo el valor p para $2n - 2$ grados de libertad (mismo tamaño de muestra, igual varianza), mediante la distribución t de una cola, debido a que se quiere determinar la significancia de la diferencia entre las medias en una sola dirección. La significancia estadística se estableció a $p < 0,05$.

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Establecimiento de las condiciones de cultivo para los ensayos de citotoxicidad

En primer lugar, para determinar la densidad celular más adecuada en los ensayos de proliferación celular, se sembraron 2×10^3 , 4×10^3 , 6×10^3 y 8×10^3 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se analizó la cinética proliferativa a lo largo de 72 h:

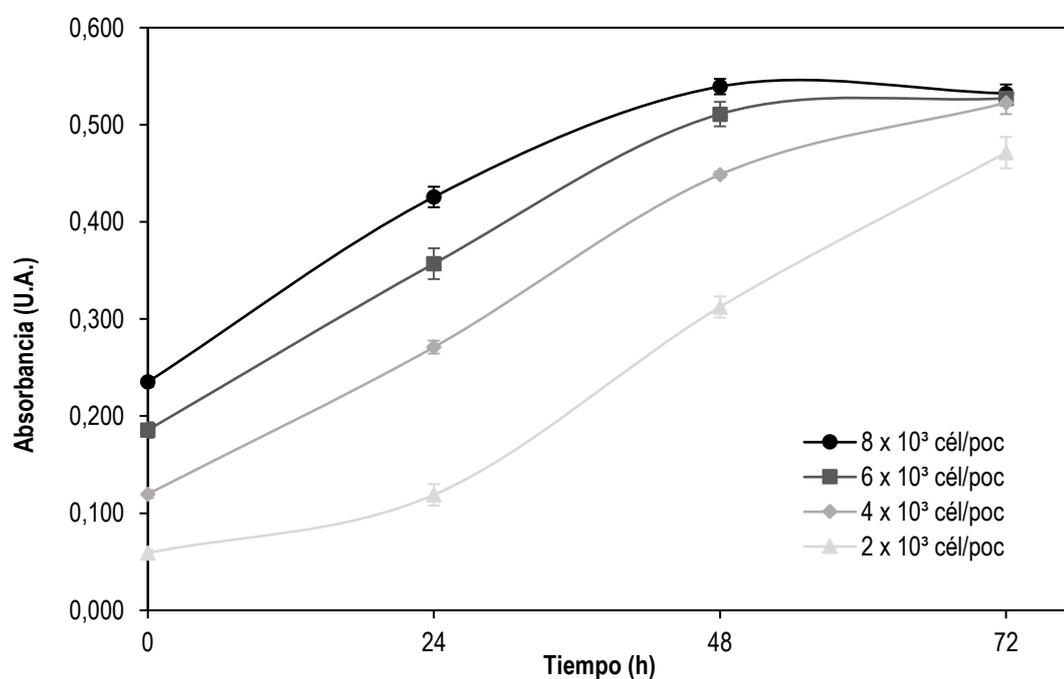


Figura 1. Ensayo de proliferación de fibroblastos L-929. Se muestra la evolución de la absorbancia (U.A.) en relación al tiempo (h), medida en muestras sembradas con 2×10^3 , 4×10^3 , 6×10^3 y 8×10^3 células/pocillo ($n=3$ por cada densidad celular). Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar.

Como puede observarse en la **Figura 1**, los valores de absorbancia obtenidos, indicadores de la viabilidad celular, aumentaron de forma proporcional a la densidad celular sembrada y al tiempo de cultivo transcurrido.

Así, la absorbancia de los pocillos correspondientes a las concentraciones de 6×10^3 y 8×10^3 células/pocillo crece exponencialmente durante las primeras 24-48 h, pero el

cultivo alcanza la fase estacionaria a partir de las 48 h. De hecho, el número de células se reduce ligeramente a partir de ese momento en el caso de la densidad de 8×10^3 células/pocillo, probablemente debido a una inhibición por contacto de la proliferación. En el otro extremo, las muestras sembradas con 2×10^3 células/pocillo apenas proliferan durante las primeras 24 h (fase *lag* prolongada), pero a las 72 h siguen proliferando sin haber alcanzado la fase de meseta del cultivo.

En el caso de la densidad de 4×10^3 células/pocillo, los cultivos mostraron actividad proliferativa desde el inicio hasta el final del ensayo. Por esta razón, se seleccionó esta densidad de siembra para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad.

2.2.2. Análisis de la citotoxicidad de los materiales

El estudio de la proliferación celular permite determinar el posible efecto citotóxico de un material, o elementos derivados de él, sobre una población celular en condiciones de cultivo *in vitro*. En este ensayo se analizó la viabilidad de los fibroblastos L-929 cultivados en medio extractivo procedente de diversos materiales.

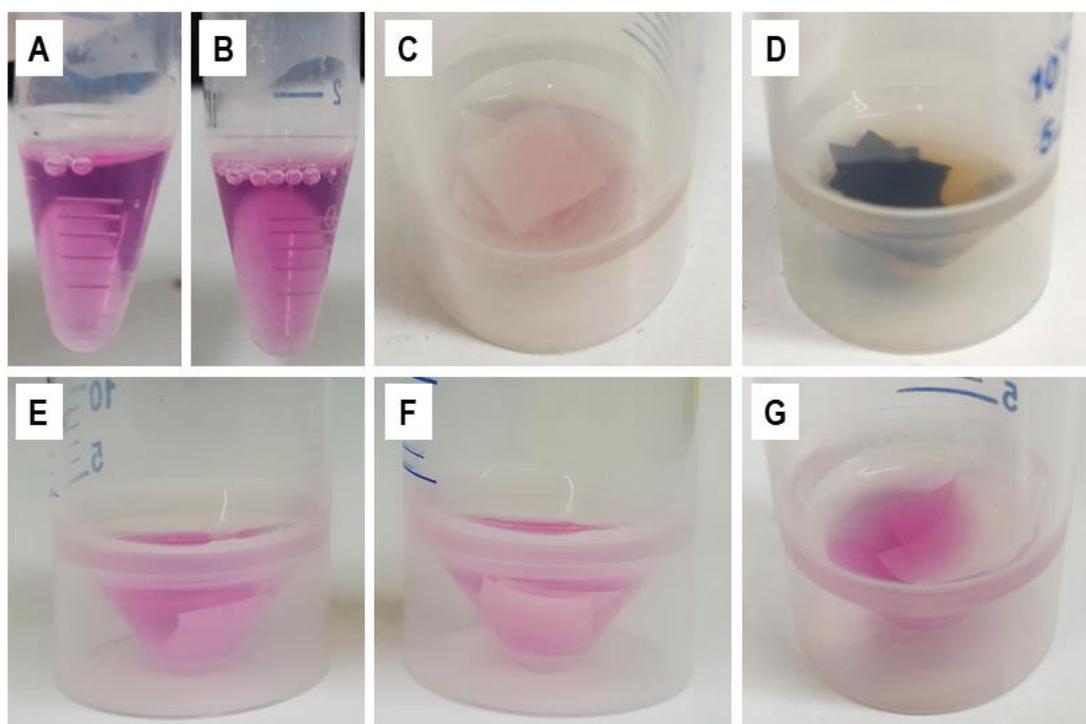


Figura 2. Imágenes de los medios extractivos tras la incubación de los materiales en medio de cultivo durante 24 h a 37°C. (A) Control positivo; (B) Control negativo; (C) NCPU; (D) GOPU; (E) PU1; (F) PU2; (G) PU3.

Como puede observarse en la **Figura 2**, todos los materiales analizados tienen forma de film y muestran un color blanco o ligeramente amarillento a excepción de GOPU, identificado por el color negro que le proporciona el grafeno presente entre sus componentes (**Figura 2**).

Los medios extractivos de los materiales PU1, PU2 y PU3 mantuvieron el color habitual del rojo fenol (**Figura 2**) utilizado como indicador de pH en el medio de cultivo. Estos medios extractivos, al igual que los medios de control, mantuvieron el color rojo-morado correspondiente al pH neutro. Sin embargo, los medios extractivos de NCPU y GOPU se tornaron de color amarillo (**Figura 2**), especialmente intenso en el caso de GOPU, lo que indica que el pH del medio era inferior al valor 6,8.

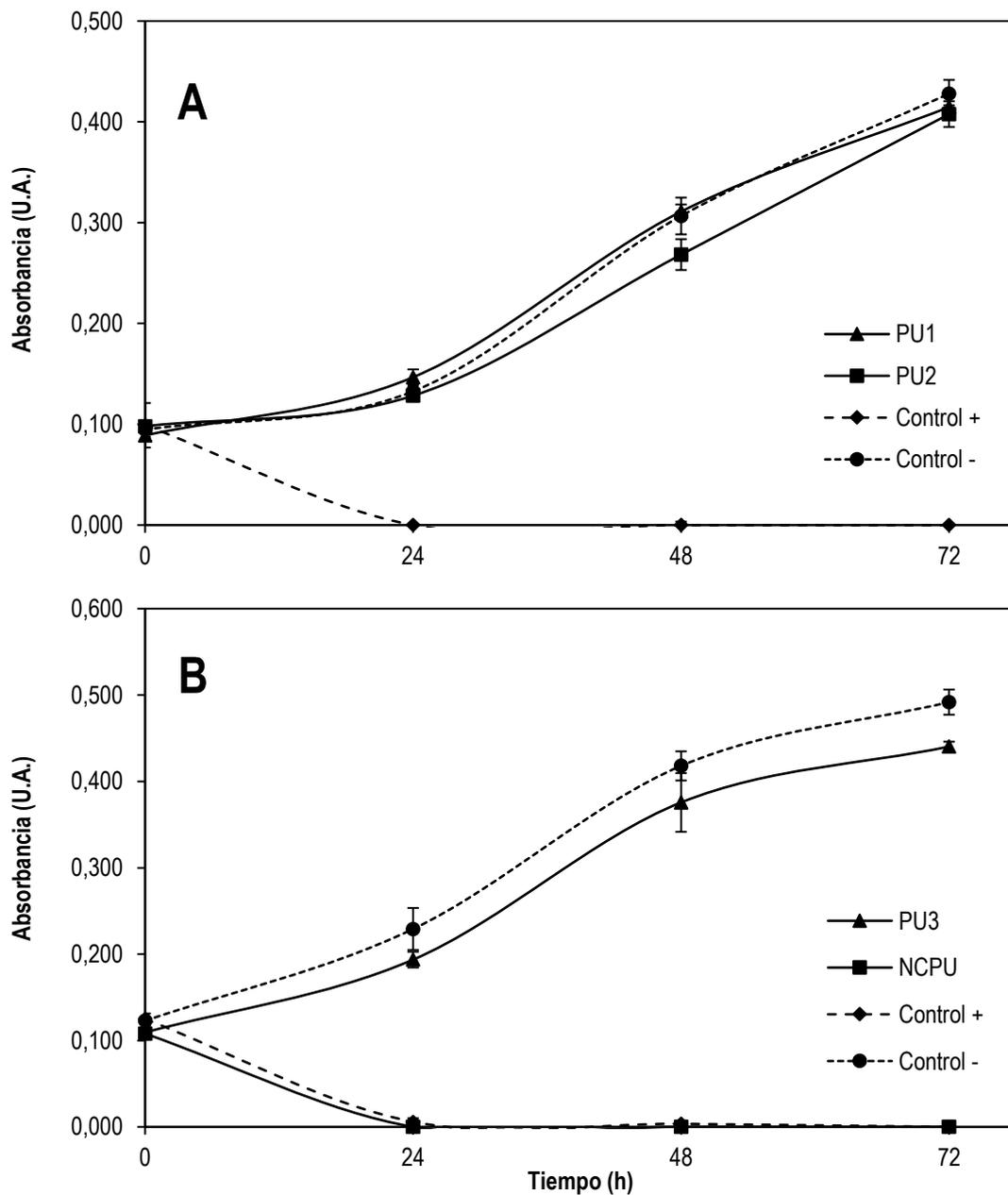


Figura 3. Viabilidad celular de los cultivos tratados con medio extractivo procedente de los diferentes materiales. Las gráficas muestran las curvas de proliferación expresada como valores de absorbancia (U.A.) en relación al tiempo (h) ($\bar{X} \pm S$) (n=3 por cada tratamiento). (A) PU1 y PU2; (B) PU3 y NCPU.

Como puede observarse en la **Figura 3**, las células tratadas con los medios extractivos de los materiales PU1, PU2 y PU3 mostraron una cinética proliferativa similar a la del control negativo (medio de cultivo estándar), superponiéndose las curvas casi completamente en el caso de PU1 (**Figura 3**). Por el contrario, la viabilidad de la

población celular tratada con NCPU (**Figura 3**) se redujo hasta alcanzar los niveles equivalentes a los obtenidos en el control positivo (máxima toxicidad posible del cultivo).

Por último, en relación al material GOPU, la aplicación del reactivo PrestoBlue® a los pocillos que contenían su medio extractivo ocasionó un cambio inmediato en el color del medio, adoptando una coloración roja intensa, lo que indicó que se había producido una alteración química del reactivo, imposibilitando la cuantificación de la viabilidad. La observación de los cultivos mediante el microscopio de contraste de fases confirmó la destrucción de las células incluso antes de las 24 h de cultivo, debido a la toxicidad del medio extractivo obtenido a partir del material.

Teniendo en cuenta que la norma ISO 10993-5 (2009) establece que un material es citotóxico si la viabilidad de las células tiene un valor inferior al 70% del valor obtenido en el control negativo, procedimos a relativizar los valores de absorbancia de las muestras a sus respectivos controles negativos, obteniendo un porcentaje de viabilidad que permite determinar de forma objetiva si supera en todos los tiempos el límite de aceptación establecido por la norma y, además, comparar la citotoxicidad de los materiales a distintos tiempos y entre sí.

En la **Figura 4** se recoge el porcentaje de viabilidad relativizado respecto al control negativo de los materiales PU1, PU2, PU3 y NCPU. No se han incluido los datos relativos al GOPU porque la viabilidad de las células tratadas con este material no se pudo cuantificar.

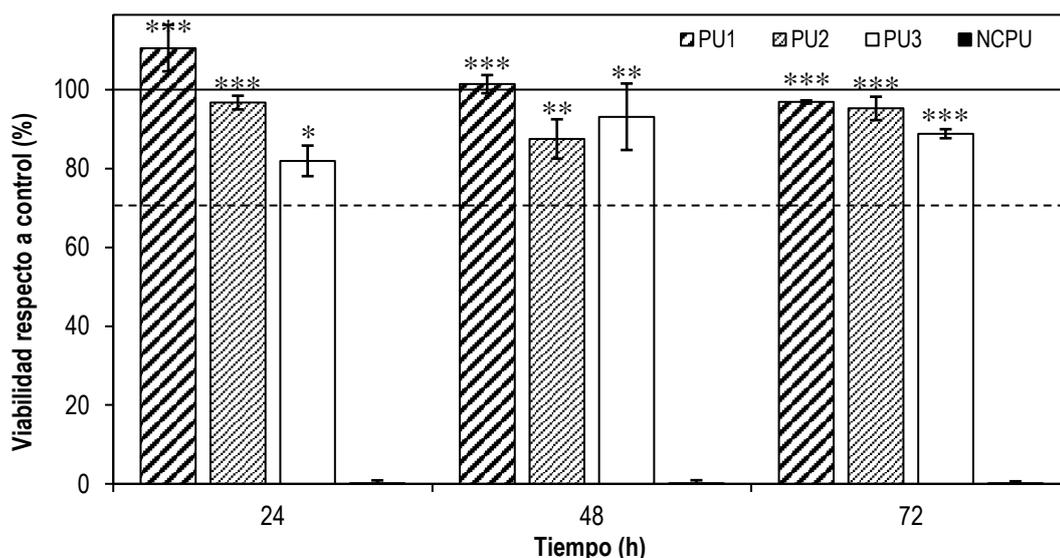


Figura 4. Porcentaje de viabilidad celular con respecto al control negativo de células tratadas con medios extractivos de los materiales analizados, en relación al tiempo. Valores expresados como $\bar{X} \pm S$. La línea continua al 100 % indica una proliferación igual a la del control negativo (máximo crecimiento), y la discontinua al 70 % indica el límite de aceptación marcado por la normativa ISO 10993-5 (2009) para que un material pueda considerarse no citotóxico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

Exceptuando los materiales NCPU y GOPU, que ocasionaron una toxicidad próxima al 100%, el resto de los materiales utilizados muestran porcentajes de viabilidad significativamente superiores al umbral del 70 % del control negativo en todos los tiempos ($p < 0,0005$ para PU1, $p < 0,005$ para PU2 y $p < 0,05$ para PU3), indicado por la norma ISO 10993-5 (2009).

2.2.3. Ensayos de adhesión y SEM

Con el objetivo de estudiar la capacidad de adhesión y proliferación de las células sobre la superficie de los materiales, se llevó a cabo un ensayo de adhesión celular mediante SEM utilizando los materiales PU1 y PU2 debido a que son los que obtuvieron mejores resultados en los ensayos de citotoxicidad y a que su proceso de síntesis permite la obtención rápida y económicamente asumible de las muestras.

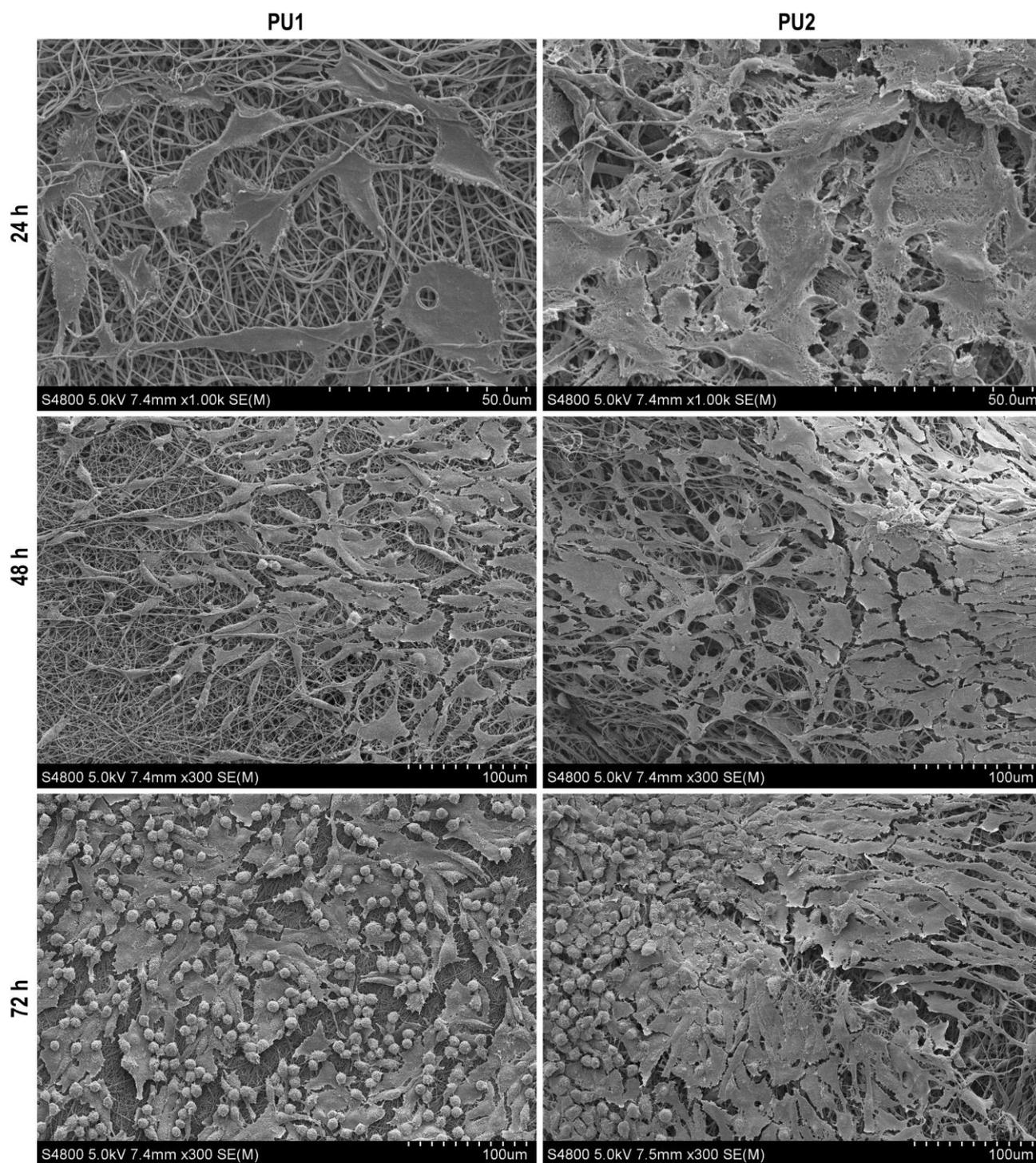


Figura 5. Ensayo de adhesión. Micrografías obtenidas mediante SEM a 5 kV de células cultivadas sobre los materiales PU1 y PU2 durante 24, 48 y 72 h a 1000x (24 h) y 300x aumentos (48 y 72 h).

La **Figura 5** muestra micrografías de los materiales colonizados por las células (x300 y x1000 aumentos) en las que se observa que los fibroblastos L-929 se han adherido a la superficie de ambos materiales (PU1 y PU2). Los fibroblastos muestran la morfología habitual de este tipo celular en cultivo, consistiendo en un cuerpo fusiforme con numerosas extensiones citoplasmáticas. En las imágenes tomadas a diferentes tiempos de cultivo se aprecia un incremento de la densidad celular relacionado con el tiempo transcurrido desde la siembra de las células. Este incremento de la densidad es consecuencia de la actividad proliferativa desarrollada por las células. Como puede evidenciarse en las imágenes tomadas a las 72 h de cultivo, gran parte de las células adoptan una morfología esférica, indicativa de encontrarse en proceso de división. La **Figura 6**, tomada a x3500 aumentos, permite identificar (flechas) los puntos de adhesión de la célula al material, así como, la estructura física del PU2, constituida por una densa malla tridimensional de fibras con un grosor aproximado de 1 μm .

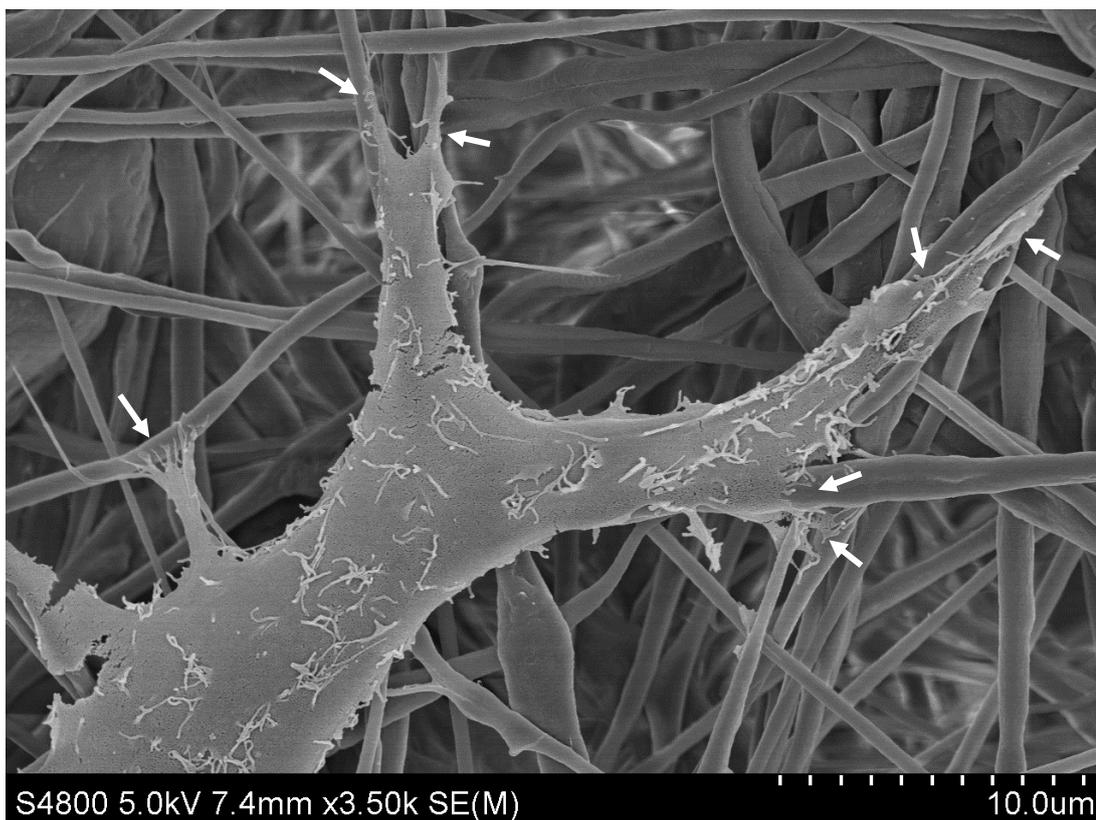


Figura 6. Detalle de un fibroblasto adherido a la superficie del material PU2. Imagen de SEM a 3500x aumentos, obtenida 72 h tras la siembra, donde se señalan los puntos de adhesión (flechas).

2.3. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado la biocompatibilidad *in vitro* de cinco poliuretanos, debido a la demanda creciente de biomateriales que hay en este momento para su uso en biomedicina. Para ello, se ha evaluado *i)* su citotoxicidad mediante la cuantificación de la proliferación celular en medios extractivos de los materiales y *ii)* su capacidad de constituir un sustrato de adhesión celular.

Para establecer las condiciones de experimentación, se realizó un ensayo preliminar de proliferación utilizando densidades crecientes de fibroblastos L-929. Los resultados obtenidos mostraron claras diferencias entre las cinéticas de proliferación de las muestras sembradas a distintas densidades celulares. La densidad de 4×10^3 células/pocillo, tuvo un crecimiento exponencial desde el primer tiempo analizado, y se mantuvo la proliferación sin llegar a la fase estacionaria hasta las 72 h, lo cual demuestra que el cultivo no alcanza la confluencia (**Figura 1**). Estas condiciones son idóneas para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad, razón por la cual se sembraron las células a la densidad de 4×10^3 células/pocillo, coincidiendo con la densidad de siembra utilizada en trabajos previos (Fernández-D'Arlas *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2020; Urbina *et al.*, 2019).

En el diseño de estos ensayos, siguiendo la norma ISO-10993 parte 5 (2009) y parte 12 (2012), se incluyeron un control de máxima viabilidad posible de la población celular (control negativo) y otro de máxima citotoxicidad (control positivo). Ambos controles se comportaron como cabía esperar, coincidiendo con los resultados de Silva y cols. (2020) y Urbina y cols. (2019) en ensayos con similares condiciones experimentales. Así, el control negativo (medio de cultivo estándar) mostró siempre una viabilidad superior a la del resto de las muestras, mientras que la población celular del control positivo careció de viabilidad debido al potente efecto citotóxico del DMSO incorporado al medio de cultivo (**Figura 3**).

También cabe destacar que los valores de absorbancia de las cinéticas de proliferación de los controles negativos son homogéneos entre los distintos ensayos realizados y también con respecto a la muestra sembrada con 4×10^3 células/pocillo en el primer ensayo de proliferación (**Figura 1, Figura 3**).

Por tanto, estos resultados permiten afirmar que el diseño experimental empleado es idóneo.

En cuanto a los medios extractivos obtenidos de cada uno de los materiales (**Figura 2**), tanto los controles como el medio en contacto con PU1, PU2 y PU3 mostraban el aspecto habitual del medio MEM, que contiene rojo fenol, un indicador de pH que es rojo-morado a pH neutro. Sin embargo, los medios extractivos de NCPU y GOPU adoptaron un intenso color amarillo, que se atribuye a una repentina acidificación del medio causada por la liberación de sustancias de los materiales, ya que el rojo fenol es amarillo por debajo de pH 6,8. Esto explicaría la baja viabilidad celular observada para estos materiales, ya que la mayoría de células animales no son viables a pH bajo (Kruse *et al.*, 2017). Además, el color rojo adoptado por las muestras tratadas con el material GOPU tras la adición del reactivo PrestoBlue®, también puede deberse al pH bajo, ya que la resazurina también es un indicador de pH y se vuelve de color rosa-rojizo por debajo de pH 3,8 (Sobhy *et al.*, 2019).

En el caso de NCPU, es muy probable que la acidificación del medio haya sido causada por la celulosa carboxilada que contiene el material, como fue descrito por Novotna y colaboradores (2013). Sin embargo, el pH no tiene por qué ser el único factor causante de la citotoxicidad, y es posible que también hayan contribuido residuos de reactivos o catalizadores que no se hayan eliminado completamente durante el lavado del material, como suele ser habitual en otros poliuretanos, como apuntan Wendels y Avérous (2021).

Respecto a los cultivos tratados con el medio extractivo obtenido de los materiales PU1, PU2 y PU3, estos mostraron una viabilidad celular similar a la del control negativo; concretamente, el porcentaje de viabilidad con relación al control negativo fue significativamente superior al 70 % para los tres materiales (del 96,9 %, 95,2 % y 88,8 % a las 72 h para PU1, PU2 y PU3, respectivamente), valor que determina el límite de aceptación establecido por la ISO 10993-5 (2009). De hecho, las células tratadas con PU1 y PU2 mostraron una proliferación muy similar al control negativo, especialmente en el caso de PU1 (**Figura 3**). Este resultado indica que los componentes del material liberados al medio de cultivo carecen de efectos tóxicos significativos sobre las células, como con la gran cantidad de poliuretanos

biocompatibles descritos en la literatura (Wendels & Avérous, 2021) y coincide con los favorables resultados de biocompatibilidad obtenidos por Fernández-D'Arlas y cols. (2015) y Miao y cols. (2012) con poliuretanos de similar composición.

Finalmente, las micrografías de SEM obtenidas de los fibroblastos cultivados sobre los materiales PU1 y PU2 muestran un gran número de células adheridas con una morfología similar a la que presentan los fibroblastos cultivados sobre soportes inertes, demostrando su capacidad de constituir un sustrato de adhesión celular (**Figura 5**). Esto se le atribuye a la estructura microfibrosa de ambos materiales, que proporciona una gran área superficial disponible para la adhesión, además de propiedades químicas favorables como una hidrofiliidad adecuada (Wendels & Avérous, 2021), coincidiendo con los resultados de Fernández-D'Arlas y colaboradores (2015).

También habría que mencionar que se pueden observar pequeñas grietas en las células en las imágenes de SEM, especialmente en la **Figura 6**. Estos artefactos se pueden deber a un proceso de deshidratación más agresivo de lo ideal y son habituales cuando se trabaja con un gran número de muestras, aunque no tienen ninguna relevancia sobre los resultados obtenidos.

3. CONCLUSIÓN

No cabe duda de que el futuro de la medicina pasa por la ingeniería tisular, y aunque en los últimos años se han dado grandes avances, aún sigue habiendo grandes retos por superar y una gran falta de biomateriales adecuados para esta aplicación tan exigente. Con esta motivación, el objetivo de este trabajo de fin de grado ha sido el estudio de la biocompatibilidad *in vitro* de cinco nuevos poliuretanos, tomando como pilares su baja citotoxicidad y su capacidad de constituir un sustrato para la adhesión celular. Dos de ellos, PU1 y PU2, han demostrado una citotoxicidad nula para fibroblastos L-929, y no solo eso, sino que las células también han podido adherirse, proliferar y migrar sobre ambos materiales con gran eficacia.

A pesar del gran número de ventajas que presentan los poliuretanos, sus productos de degradación y su posible toxicidad aún no están bien caracterizados (Wendels & Avérous, 2021), lo que puede provocar problemas *in vivo* y a largo plazo, aspectos que han quedado fuera del ámbito de este estudio y que se deberán investigar.

En conclusión, se puede considerar que PU1 y PU2 son materiales prometedores que han mostrado una excelente biocompatibilidad *in vitro* a corto plazo, sentando las bases para su posible uso futuro en ingeniería tisular y biomedicina.

4. AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su agradecimiento al Grupo de Investigación de Procesos de Biorrefinería del Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente de la UPV/EHU por ceder los materiales utilizados en este estudio, a los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la UPV/EHU por la asistencia prestada con la preparación y fotografía de las muestras de microscopía electrónica, Ana Alonso por su acogida en el Laboratorio de Ingeniería Tisular y ayuda con la revisión del trabajo, y a Sheila Olza por su instrucción en el laboratorio.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasian, M., Massoumi, B., Mohammad-Rezaei, R., Samadian, H., & Jaymand, M. (2019). Scaffolding polymeric biomaterials: Are naturally occurring biological macromolecules more appropriate for tissue engineering? *International Journal of Biological Macromolecules*, *134*, 673–694. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.197
- Abdulghani, S., & Mitchell, G. R. (2019). Biomaterials for in situ tissue regeneration: A review. *Biomolecules*, *9*(11), 750. DOI: 10.3390/biom9110750
- Bakhshandeh, B., Zarrintaj, P., Oftadeh, M. O., Keramati, F., Fouladiha, H., Sohrabi-jahromi, S., & Ziraksaz, Z. (2017). Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *33*(2), 144–172. DOI: 10.1080/02648725.2018.1430464
- Bhat, S., & Kumar, A. (2013). Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter*, *3*(3), e24717. DOI: 10.4161/biom.24717
- de Moraes Porto, I. C. C. (2012). Polymer Biocompatibility. En De Souza Gomes, A. (Ed.), *Polymerization*. InTech. DOI: 10.5772/47786
- Fernández-D'Arlas, B., Alonso-Varona, A., Palomares, T., Corcuera, M. A., & Eceiza, A. (2015). Studies on the morphology, properties and biocompatibility of aliphatic diisocyanate-polycarbonate polyurethanes. *Polymer Degradation and Stability*, *122*, 153–160. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.10.023
- Gilbert Triplett, R., & Budinskaya, O. (2017). New Frontiers in Biomaterials. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, *29*(1), 105–115. DOI: 10.1016/j.coms.2016.08.011
- Gonzalez, R. J., & Tarloff, J. B. (2001). Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicology in Vitro*, *15*(3), 257–259. DOI: 10.1016/S0887-2333(01)00014-5
- Hao, H., Shao, J., Deng, Y., He, S., Luo, F., Wu, Y., Li, J., Tan, H., Li, J., & Fu, Q. (2016). Synthesis and characterization of biodegradable lysine-based waterborne polyurethane for soft tissue engineering applications. *Biomaterials Science*, *4*(11), 1682–1690. DOI: 10.1039/c6bm00588h

International Organization for Standardization. (2009). *Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity* (Nº de estándar ISO 10993-5:2009). <https://www.iso.org/standard/36406.html>

International Organization for Standardization. (2012). *Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials*. (Nº de estándar ISO 10993-12:2012). <https://www.iso.org/standard/53468.html>

Jafari, M., Paknejad, Z., Rad, M. R., Motamedian, S. R., Eghbal, M. J., Nadjmi, N., & Khojasteh, A. (2017). Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 105(2), 431–459. DOI: 10.1002/jbm.b.33547

Kruse, C. R., Singh, M., Targosinski, S., Sinha, I., Sørensen, J. A., Eriksson, E., & Nuutila, K. (2017). The effect of pH on cell viability, cell migration, cell proliferation, wound closure, and wound reepithelialization: In vitro and in vivo study. *Wound Repair and Regeneration*, 25(2), 260–269. DOI: 10.1111/wrr.12526

Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–926. DOI: 10.1126/science.8493529

Miao, S., Sun, L., Wang, P., Liu, R., Su, Z., & Zhang, S. (2012). Soybean oil-based polyurethane networks as candidate biomaterials: Synthesis and biocompatibility. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(10), 1165–1174. DOI: 10.1002/ejlt.201200050

Novotna, K., Havelka, P., Sopuch, T., Kolarova, K., Vosmanska, V., Lisa, V., Svorcik, V., & Bacakova, L. (2013). Cellulose-based materials as scaffolds for tissue engineering. *Cellulose*, 20(5), 2263–2278. DOI: 10.1007/s10570-013-0006-4

Shafiee, A., & Atala, A. (2017). Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annual Review of Medicine*, 68, 29–40. DOI: 10.1146/annurev-med-102715-092331

Silva, N. H. C. S., Garrido-Pascual, P., Moreirinha, C., Almeida, A., Palomares, T., Alonso-Varona, A., Vilela, C., & Freire, C. S. R. (2020). Multifunctional nanofibrous patches composed of nanocellulose and lysozyme nanofibers for cutaneous wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 1198–1210. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.249

- Sobhy, A., Faheem, E., & Gafar, S. M. (2019). Dosimetric studies and chemical kinetics of Resazurin dye and its possible use as radiation dosimeter. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 319(1), 101–107. DOI: 10.1007/s10967-018-6294-2
- Urbina, L., Alonso-Varona, A., Saralegi, A., Palomares, T., Eceiza, A., Corcuera, M. Á., & Retegi, A. (2019). Hybrid and biocompatible cellulose/polyurethane nanocomposites with water-activated shape memory properties. *Carbohydrate Polymers*, 216, 86–96. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.04.010
- Wendels, S., & Avérous, L. (2021). Biobased polyurethanes for biomedical applications. *Bioactive Materials*, 6(4), 1083–1106. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2020.10.002
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941–2953. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023