



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**Mallas macroporosas bioestables con  
aplicación en implantes protésicos  
y trasplante de células**

Tesis presentada por

**Carmen María Antolinos Turpín**

para optar al título de Doctor

por la Universitat Politècnica de València

Dirigida por:

**Dr. José Luis Gómez Ribelles**

**Dr. José Antonio Gómez Tejedor**

**Marzo, 2015**



**A mi familia, y mis tres estrellas,**

**Mario, Valle y Vera**

**por quererme tanto**



## **Agradecimientos**

El trabajo de la presente tesis doctoral ha sido parcialmente financiado entre los años 2010 y 2012 por el Ministerio de Economía y Competitividad, a través del contrato de investigación entre el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la UPV y VISSUM Corporation, “Desarrollo de una prótesis de córnea humanizada autóloga” enmarcado en el proyecto “Customized Eye Care-Oftalmología personalizada” CEYEC CENIT-Sol 00028336 del CEDETI, y en el 2014 a través del proyecto “Estimulación mecánica local de células mesenquimales de cara a su diferenciación osteogénica y condrogénica en medicina regenerativa”, del Programa Estatal de I+D+i Orientada a Retos de la Sociedad, del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica MINECO- MAT2013-46467-C4-1-R.

Quiero expresar de una manera especial mi agradecimiento y admiración a mis directores de tesis, José Luis Gómez Ribelles y José Antonio Gómez Tejedor, quienes por su constante confianza, creencia en mí desde el primer momento, dedicación, valiosos consejos, paciencia, gran sentido del humor y su apoyo incondicional, me han ayudado en este trabajo. Muchas Gracias.

Agradecer a todos mis compañeros del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, Miriam L., María, Amparo G., Manu, Patxi, Cristina, Miriam H., Marco, Virginia, Pepe, Harmony, Cristina G.,... por su ayuda, buenos consejos y su amistad dentro y fuera del laboratorio.

Especialmente dar las gracias, a mi grupo de “Fagocitosis Tardía”, Alex, Haik, Keila, Sara, Irene, Silvia, Rosa... por esos momentos compartidos, confianzas que hemos disfrutado y alegrándome cada día con sus conversaciones, por animarme y comprenderme...y a Ximo por toda la ayuda y el cariño que me ha prestado en estos años. A todas las personas que han pasado por el laboratorio todos estos años, Andrea, Clara, Luis Andrés, Ena,... por su gran amistad y grandes vivencias compartidas. A mis amigos por su apoyo, comprensión, y por estar ahí en todo momento animándome a seguir adelante.

Además agradecer la gran atención recibida por el personal de los Servicios de la Universitat Politècnica de Valencia, de Microscopía electrónica, microscopía Confocal del Departamento de Ingeniería Nuclear y microscopía Confocal del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, especialmente a Marisol por su gran ayuda y sonrisa.

Finalmente, un agradecimiento inmenso y de todo corazón a mis padres por su amor, comprensión, y en especial a mi madre por su gran dedicación y ayuda; a mis hermanos, Alberto, Héctor, Silvia y David, por su apoyo incondicional, su ánimo constante, y todos los momentos vividos y que nos quedan...y a mis sobrinos, Mario, Valle y Vera, por ser esas estrellas que me alumbran y me hacen sacar mi mejor sonrisa.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>I</b>
<b>RESUM.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>XIII</b>
1.1 INGENIERIA TISULAR.....	3
1.1.1 <i>Soportes estructurales poliméricos.....</i>	9
1.2 MEDICINA REGENERATIVA EN CÓRNEA Y CARTÍLAGO ARTICULAR.....	21
1.2.1 <i>Características de la córnea. ....</i>	21
1.2.2 <i>Estrategias para la reparación-restauración corneal. ....</i>	27
1.2.3 <i>Queratoprótesis, otras estrategias de reparación corneal.....</i>	29
1.2.4 <i>Ingeniería tisular en cartílago .....</i>	44
1.3 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES. ....	50
1.4 ADHESIÓN CELULAR Y FIJACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS SUSTRATOS.....	55
<b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS .....</b>	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
3.1 SÍNTESIS DE LOS MATERIALES .....	65
3.1.1 <i>Obtención de láminas no porosas de copolímeros de PEA .....</i>	65
3.1.2 <i>Obtención de membranas macroporosas colapsadas de copolímeros de PEA .....</i>	68
3.1.3 <i>Obtención de soportes macroporosos no colapsados de copolímero de PEA-HEA10 .....</i>	78

3.2 TÉCNICAS EXPERIMENTALES DE CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES.....	79
3.2.1 <i>Angulo de contacto del agua (WCA)</i> .....	79
3.2.2 <i>Ensayo de absorción de agua</i> .....	80
3.2.3 <i>Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)</i> .....	80
3.2.4 <i>Caracterización microestructural</i> .....	81
3.2.5 <i>Determinación de la porosidad</i> .....	82
3.2.6 <i>Medidas de propiedades mecánicas</i> .....	83
3.2.7 <i>Determinación de características de los materiales inmersos en medio de cultivo celular</i> .....	87
3.3 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA EN LOS MATERIALES.....	87
3.3.1 <i>Cultivo a tiempo corto en membranas colapsadas de copolímeros de PEA</i> .....	92
3.3.2 <i>Cultivo a tiempos largos en membranas colapsadas de copolímeros de PEA</i> .....	93
3.3.3 <i>Ensayo bioquímico</i> .....	95
3.3.4 <i>Ensayos inmunohistoquímicos</i> .....	96
3.3.5 <i>Análisis de imágenes a través de microscopía de fluorescencia</i> .....	101
3.3.6 <i>Distribución tridimensional y cuantificación celular a través de microscopía Confocal de fluorescencia</i> .....	102

3.4	PROTOTIPO DE PRÓTESIS DE CÓRNEA.....	104
3.4.1	<i>Diseño y obtención de la prótesis de córnea .....</i>	104
3.4.2	<i>Caracterización estructural de la prótesis de córnea.....</i>	114
3.5	BIOFUNCIONALIZACIÓN DE COPOLÍMEROS DE PEA.....	114
3.5.1	<i>Preparación superficial de los materiales con proteínas.....</i>	115
3.5.2	<i>Cuantificación de recubrimientos de proteínas a través de inmunoadsorción enzimática (ELISA).....</i>	118
3.6	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE CÉLULAS ADULTAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO EN LOS MATERIALES.....	121
3.6.1	<i>Colonización celular en redes de copolímeros de PEA.....</i>	122
3.6.2	<i>Estudio de viabilidad celular .....</i>	123
3.6.3	<i>Implantación de membranas macroporosas en las córneas de conejos.....</i>	124
3.6.4	<i>Observación postquirúrgica, evaluación clínica e histológica de los implantes .....</i>	126
3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	128
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>131</b>
4.1	PROPIEDADES DE LAS LÁMINAS NO POROSAS .....	134
4.1.1	<i>Caracterización del grado de hinchamiento y grado de humectabilidad de las superficies de los materiales.....</i>	134
4.1.2	<i>Evaluación de la homogeneidad de los copolímeros a escala nanométrica: Separación de fases .....</i>	136

4.1.3 Comportamiento de los materiales inmersos en medio de cultivo celular.....	138
4.2 PROPIEDADES DE LOS SOPORTES MACROPOROSOS NO COLAPSADOS	143
4.2.1 Morfología.....	143
4.2.2 Propiedades mecánicas de los soportes secos y en inmersión .....	148
4.3 ESTUDIO DE RESPUESTA BIOLÓGICA DE MEMBRANAS MACROPOROSAS CON DISTINTO GRADO DE HIDROFILICIDAD. ....	153
4.3.1 Análisis morfológico .....	154
4.3.2 Eficiencia de siembra y adhesión celular.....	157
4.3.3 Proliferación celular.....	162
4.3.4 Evaluación de las propiedades de los implantes macroporosos para el modelo de córnea de conejo. ....	169
4.4 PRÓTESIS DE CORNEA.....	179
4.5 OPTIMIZACIÓN DE LA ARQUITECTURA DE PORO Y REPUESTA BIOLÓGICA DE MEMBRANAS MACROPOROSAS COMO PORTADORAS BIOESTABLES DE CÉLULAS.....	183
4.5.1 Microestructura y porosidad.....	187
4.5.2 Propiedades mecánicas .....	195
4.5.3 Eficiencia de siembra y adhesión celular.....	202
4.5.4 Proliferación celular.....	210

4.6 ESTUDIO DE ADSORCIÓN E INJERTO DE FIBRONECTINA (FN) SOBRE LÁMINAS NO POROSAS DE COPOLÍMEROS DE PEA .....	237
4.6.1 Adsorción y adhesión covalente de FN.....	238
4.7 BIOINTEGRACIÓN DE COPOLÍMEROS MACROPOROSOS COLAPSADOS COMO IMPLANTES PARA CÓRNEA EN MODELO ANIMAL .....	245
4.7.1 Eficiencia de la Biofuncionalización y colonización de h-ADAS en láminas no porosas.....	248
4.7.2 Eficiencia de los recubrimientos en membranas macroporosas colapsadas.....	255
4.7.3 Evaluación clínica de las membranas macroporosas implantadas en la córnea .....	256
4.7.4 Análisis histológico y evaluación de la presencia de h-ADASCs en las córneas.....	261
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>269</b>
<b>GLOSARIO.....</b>	<b>275</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>281</b>



## Resumen

Esta tesis se ha centrado principalmente en la síntesis y caracterización de polímeros bioestables macroporosos de la familia de los poli acrilatos, para su aplicación en medicina regenerativa. Los soportes desarrollados en este trabajo pueden tener distintas aplicaciones en terapias que requieren el trasplante al organismo de células. Concretamente en el anillo de la prótesis de córnea, anclaje de prótesis de hueso, cartílago articular y en forma de apósito para el trasplante de células madre para regeneración de piel o el tratamiento de úlceras corneales o bucales.

Con este propósito, inicialmente se han preparado diferentes series de copolímeros de poli acrilato de etilo (PEA) en forma de láminas no porosas a través de polimerización por vía radical, con propiedades físico-químicas diferentes y controladas. A fin de conocer algunas de las propiedades físicas y térmicas que puedan afectar a la adsorción de las proteínas, determinando diferencias entre las distintas propiedades superficiales (topografía, química y energía superficial) y la consecuente adhesión celular, se realizó una caracterización de las distintas láminas obtenidas, determinando el grado de humectabilidad, de hinchamiento y la presencia de separación de fases en el material, a través de la medida de ángulo de contacto (WCA), absorción de agua y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), respectivamente.

Posteriormente se han desarrollado membranas finas porosas con propiedades estructurales y mecánicas adecuadas que permitan la colonización y proliferación celular en el interior de la red y su biostabilidad en el cuerpo humano. Para obtener la membrana de poros bien interconectados que cumpla con los requisitos necesarios para su utilización en implantes protésicos y trasplante de células, se diseñó una variante del método que combina la técnica de las plantillas para producir los macroporos y el colapso de poros anisotrópico para obtener las membranas delgadas. Se analizó el procesamiento, microestructura y propiedades mecánicas de las distintas membranas sintetizadas, a través de la microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía Confocal laser de Barrido, ensayos de tensión deformación y resistencia al desgarro, teniendo como resultado una malla tridimensional porosa, fina y resistente.

Se realizaron dos caracterizaciones biológicas sembrando *in vitro* células mesenquimales de médula ósea sobre los materiales de copolímeros de poli acrilato de etilo con distinto grado de hidrofiliidad y con diferentes densidades de entrecruzamiento, analizando la eficiencia de la siembra, viabilidad y proliferación celular. Mediante microscopía de fluorescencia se observó la morfología y el tipo de adhesión celular a tiempos cortos de cultivo que presentan los distintos copolímeros, y a través de microscopía Confocal de fluorescencia la capacidad de proliferación celular a tiempos largos de cultivo, observándose inicialmente una buena adhesión celular en las láminas porosas frente a sus respectivas membranas. Para tiempos de cultivo mayores las células fueron capaces de adherirse y expandirse en

todas las membranas, además de mostrar una alta proliferación en superficie tras 21 días de cultivo.

Por otra parte, se desarrolló un prototipo de prótesis de córnea siguiendo un modelo tipo core-skirt, partiendo de un anillo de anclaje de poli acrilato de etilo con estructura porosa y flexible, en cuyo centro se polimeriza la lente de poli metacrilato de metilo (PMMA) rígida y transparente, generando como resultado la integración de ambos componentes en una única pieza

Finalmente y en colaboración con otros grupos de investigación, por un lado se ha evaluado la adsorción o el injerto de la fibronectina (FN) y la respuesta biológica posterior sobre láminas no porosa de copolímeros de poli acrilato de etilo. Además, se ha analizado la influencia de las propiedades de los materiales poliméricos en la adhesión de la fibronectina y su conformación por la exposición de algunos motivos de adhesión celular que interactúan con las integrinas. Los motivos de adhesión bajo estudio y que se cuantificaron a través del inmunoensayo enzimático ELISA, fueron las secuencias de arginina-glicina-ácido aspártico, RGD, y el dominio de adhesión FNIII<sub>7-10</sub>. Se ha mostrado la importancia de la presencia de una pequeña fracción de grupos funcionales en la superficie de un sustrato polimérico sobre la adsorción de proteínas y exposición de los motivos de adhesión que las células pueden reconocer; por otro lado se ha profundizado en el estudio de la aplicación de las membranas, previa siembra con células mesenquimales derivadas de tejido adiposo, de cara a utilizarse como soporte macroporoso en una prótesis de córnea demostrando su comportamiento en un modelo animal.



## Resum

Aquesta tesi s'ha centrat principalment en la síntesi i caracterització de polímers bioestables macroporosos de la família dels poliacrilats, per a la seua aplicació en medicina regenerativa. Els suports desenvolupats en aquest treball poden tenir diferents aplicacions en teràpies que requereixen el trasplantament a l'organisme de cèl·lules. Concretament en l'anell de la pròtesi de còrnia, ancoratge de pròtesi d'os, cartílag articular i en forma d'apòsit per al trasplantament de cèl·lules mare per a regeneració de pell o el tractament d'úlceres corniales o bucals.

Amb aquest propòsit, inicialment s'han preparat diferents sèries de copolímers de poliacrilat d'etil (PEA) en forma de làmines no poroses a través de polimerització per via radical, amb propietats fisicoquímiques diferents i controlades. A fi de conèixer algunes de les propietats físiques i tèrmiques que pugen afectar a l'adsorció de les proteïnes, determinant diferències entre les diferents propietats superficials (topografia, química i energia superficial) i la consegüent adhesió cel·lular, es va realitzar una caracterització de les diferents làmines obtingudes, determinant el grau de humectabilitat, d'inflament i la presència de separació de fases en el material, a través de la mesura d'angle de contacte (WCA), absorció d'aigua i Calorimetria Diferencial d'Escombratge (DSC), respectivament.

Posteriorment s'han desenvolupat membranes fines poroses amb propietats estructurals i mecàniques adequades que permeten la colonització i proliferació cel·lular a l'interior de la xarxa i la seua bioestabilitat en el cos humà. Per a obtenir la membrana de porus ben interconnectats que complisca amb els requisits necessaris per a la seua utilització en implants protètics i trasplantament de cèl·lules, es va dissenyar una variant del mètode que combina la tècnica de les plantilles per a produir els macroporus i el col·lapse de porus anisotròpics per a obtenir les membranes primes. Es va analitzar el processament, microestructura i propietats mecàniques de les diferents membranes sintetitzades, a través de la microscòpia electrònica d'escombratge (SEM), microscòpia Confocal làser d'Escombratge, assajos de tensió deformació i resistència a l'esquinçament, tenint com resultat una malla tridimensional porosa, fina i resistent.

Es van realitzar dues caracteritzacions biològiques semblant *in vitro* cèl·lules mesenquimals de medul·la òssia sobre els materials de copolímers de poliacrilat d'etil amb diferent grau de hidrofilicitat i amb diferents densitats d'entrecreuament, analitzant l'eficiència de la sembra, viabilitat i proliferació cel·lular. Mitjançant microscòpia de fluorescència es va observar la morfologia i el tipus d'adhesió cel·lular a temps curts de cultiu que presenten els diferents copolímers, i mitjançant microscòpia Confocal de fluorescència la capacitat de proliferació cel·lular a temps llargs de cultiu, observant-se inicialment una bona adhesió cel·lular en les làmines poroses enfront de les seues respectives membranes. Per a temps de cultiu majors les cèl·lules van ser capaces d'adherir-se i expandir-se en totes les

membranes, a més de mostrar una alta proliferació en superfície després de 21 dies de cultiu.

D'altra banda, es va desenvolupar un prototip de pròtesi de còrnia seguint un model tipus *core-skirt*, partint d'un anell d'ancoratge de poliacrilat d'etil amb estructura porosa i flexible, en el centre de la qual es polimeritza la lent de polimetacrilat de metil (PMMA) rígida i transparent, generant com resultat la integració de tots dos components en una única peça.

Finalment i en col·laboració amb altres grups de recerca, d'una banda s'ha avaluat l'adsorció o l'empelt de la fibronectina (FN) i la resposta biològica posterior sobre làmines no porosa de copolímers de poliacrilat d'etil. A més, s'ha analitzat la influència de les propietats dels materials polimèrics en l'adhesió de la fibronectina i la seua conformació per l'exposició d'alguns motius d'adhesió cel·lular que interactuen amb les integrines. Els motius d'adhesió sota estudi i que es van quantificar a través del immunoassaigs enzimàtic ELISA, van ser les seqüències de arginina-glicina-àcid aspàrtic, RGD, i el domini d'adhesió FNIII<sub>7-10</sub>. S'ha mostrat la importància de la presència d'una petita fracció de grups funcionals en la superfície d'un substrat polimèric sobre l'adsorció de proteïnes i exposició dels motius d'adhesió que les cèl·lules poden reconèixer; d'altra banda s'ha aprofundit en l'estudi de l'aplicació de les membranes, prèvia sembra amb cèl·lules mesenquimals derivades de teixit adipós, de cara a utilitzar-se com a suport macroporos en una pròtesi de còrnia demostrant el seu comportament en un model animal.



## **Abstract**

This thesis has focused mainly on the synthesis and characterization of biostable macroporous polymers from the family of polyacrylates, for application in regenerative medicine. Scaffolds and membranes developed in this work can have different applications in regenerative medicine that require the transplantation of cells to the organism. In particular, ring of cornea prosthesis, anchorage of bone prosthesis, articular cartilage, and dressing for stem cell transplantation on skin regeneration or treatment of corneal and mouth ulcers.

For this purpose, initially poly (ethyl acrylate) (PEA) copolymers films, with different and controlled physicochemical properties were prepared through via radical polymerization. In order to know some of the physical and thermal properties that might affect the proteins adsorption, determining differences between surface properties (topography, chemistry and surface energy) and subsequent cell adhesion, a characterization of the obtained films was performed, by finding the degree of wettability, swelling and the presence of phase separation in the material, by measuring the contact angle (WCA), water absorption and differential scanning calorimetry (DSC), respectively.

Subsequently, thin porous membranes with suitable structural and mechanical properties that allow cell colonization and proliferation inside the network and biostables in the human body were developed. To obtain the membranes with well interconnected pores that reach the requirements to be used in prosthetic implants and trans-

plants of cells, a method combining the template technique and the anisotropic pores collapse was designed.

Processing method, microstructure and mechanical properties of the synthesized membranes was analyzed, through scanning electron microscopy (SEM), scanning confocal laser microscopy, stress-strain experiments in tension and tearing strength measurements, yielding a thin and strong three-dimensional porous membrane.

Two biological characterizations were performed by seeding bone marrow mesenchymal stem cells on poly (ethyl acrylate) copolymers with different hydrophilicity degrees and different cross-linking densities. Seeding efficiency, cell viability and proliferation was analyzed. Morphology and cell adhesion type at short times culture was observed by fluorescence microscopy, and cell proliferation capacity a long times culture by Confocal fluorescence microscopy. A good initial cell adhesion in the porous thin membranes compare to their respective membranes was observed. For larger time culture the cells were able to adhere and expand over all porous membranes, and in addition they exhibited high proliferation in surface after 21 days of culture.

Moreover, corneal prosthesis prototype following a core-skirt type model was developed. Starting from an anchorage ring with flexible and porous structure of poly (ethyl acrylate), in which center a rigid and transparent lens of poly (methyl methacrylate) (PMMA) was polymerized, generating the integration of both components on a single piece.

Finally, in collaboration with other research groups, the adhered fibronectin (FN) by adsorption or grafting and its biological response on films of poly (ethyl acrylate) copolymers was evaluated. Furthermore, the influence of the properties of polymeric materials in fibronectin adhesion and its conformation by exposure of some cell adhesive motifs that interact with integrin's was analyzed. The adhesive motifs under study and quantified by enzyme-linked immunosorbent assay ELISA, were the arginine-glycine-aspartic acid sequences, RGD, and FNIII<sub>7-10</sub> adhesion domain. The importance of the presence of a small fraction of functional groups at the surface of a polymeric substrate on protein adsorption and exhibition of adhesion motifs that cells can recognize has been shown. On the other hand, the application of the membranes, after being seeded with adipose-derived mesenchymal stem cells, in order to be used as a macroporous support in a corneal prosthesis has been studied, and their behavior in an animal model has been demonstrated.



## **Capítulo 1. Introducción**



## 1.1 Ingeniería Tisular.

Aunque la ingeniería tisular (o de tejidos), fue un término acuñado formalmente a finales de los años ochenta<sup>1</sup>, no fue hasta años más tarde, cuando desarrolló un concepto más amplio en la publicación de un artículo de Langer y Vacanti en 1993<sup>2</sup>. Este artículo de revisión da una definición de uso común de la ingeniería tisular como, “un campo interdisciplinar que aplica los principios de ingeniería y ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen y mejoran la función de un tejido o de un órgano entero”<sup>2</sup>.

La creciente demanda de órganos y tejidos para trasplante y la imposibilidad de satisfacer esta necesidad usando fuentes autogénicas (del huésped) o alogénicas (de la misma especie), ha conducido al rápido desarrollo de la ingeniería tisular como una alternativa<sup>3</sup>.

La ingeniería tisular tiene como objetivo sustituir o facilitar la regeneración de tejido dañado o enfermo, mediante la aplicación de una combinación de biomateriales, células y moléculas bioactivas<sup>2</sup>, es decir, desarrollar sustitutos biológicos funcionales que reemplacen o restauren los tejidos dañados por enfermedades o lesiones, empleando los principios de la biología celular, ciencia de los materiales e Ingeniería biomédica<sup>4-6</sup>.

Además, la pérdida o el fallo de un órgano o tejido, o los rechazos y dislocaciones con los tejidos circundantes de las prótesis convencionales<sup>7</sup>, son los problemas más frecuentes y costosos a los que se enfrenta actualmente la asistencia sanitaria, y que se ha tratado de resolver a través de diferentes enfoques, que abarcan principalmente, los trasplantes, prótesis, injertos autólogos y regeneración de tejidos.

A pesar de los inconvenientes que se están encontrando, se ha de destacar que durante los últimos 50 años, uno de los principales logros de la medicina regenerativa moderna, ha sido poder restaurar o mejorar la función de algunos tejidos y órganos lesionados, por enfermedades o traumatismos, con la cirugía de trasplante a partir de órganos y tejidos extraídos de donantes. En la actualidad, estas técnicas han comenzado a ser no sólo complementadas, sino incluso sustituidas exitosamente mediante la utilización de técnicas de ingeniería tisular, ciencia que con sus técnicas basadas en el cultivo de células *in vitro* están haciendo posible la producción de tejidos, que sustituyan a los lesionados, abriendo también la posibilidad de fabricar nuevos órganos. A partir de un pequeño fragmento de tejido, se puede lograr restaurar la funcionalidad parcial o total de los tejidos u órganos dañados, como lo ejemplifican los logros alcanzados con los cultivos de piel, córnea, cartílago, hueso, músculo, tejido nervioso y tejido glandular, entre otros. En estos momentos, la medicina regenerativa emplea técnicas de ingeniería tisular para resolver muchas enfermedades y procesos degenerativos que sufren tanto tejidos como órganos.

Es por tanto, que la medicina regenerativa en base a la ingeniería tisular, actúa como esa área interdisciplinar, que se esfuerza por reparar la estructura y función de los tejidos y órganos dañados, mediante sistemas de ingeniería avanzada basados en materiales<sup>8</sup>, sin la necesidad de terapias suplementarias las cuales hacen al tratamiento más caro a largo plazo<sup>9</sup>. Estos materiales se emplean para desarrollar sustratos o estructuras de soporte con características apropiadas que proporcionan forma a la zona que se quiere regenerar o reemplazar y un entorno adecuado permitiendo la adhesión y proliferación celular, además de facilitar la distribución de sus señales moleculares al entorno<sup>10</sup>, permitiendo que las células desarrollen sus funciones, para la producción de nueva matriz extracelular (MEC)<sup>11</sup>, conduciendo de este modo a un proceso regenerativo o de reemplazo. Así pues, estos sustratos están diseñados de acuerdo a las características biológicas, y necesidades mecánicas del tejido u órgano a reparar.

Las estructuras de soporte o andamios utilizados en las diferentes terapias regenerativas o de implante, se asocian con la característica de un sustrato que interactúa con el cuerpo humano, considerándose como un biomaterial, ya que posee la capacidad de estar en contacto con tejidos del cuerpo humano<sup>12</sup>, y desarrollar una función biológica específica sin causar daño alguno o algún tipo de rechazo biológico<sup>13</sup>. Es decir, dado que los biomateriales son cuerpos extraños que se implantan en el organismo para servir de estructura de soporte, se ha de esperar que desempeñen su función provocando un beneficio celular o una respuesta adecuada en la situación que se

requiere, sin generar efectos negativos en el organismo de carácter local o sistémico<sup>13</sup>.

Los biomateriales se caracterizan de una manera más común como aquellos materiales utilizados para la construcción de órganos artificiales, rehabilitación de dispositivos o implantes para reemplazar los tejidos naturales del cuerpo. El concepto se extiende a los materiales utilizados en sistemas de administración de fármacos, biosensores o dispositivos que operan fuera del cuerpo, pero en comunicación con él, como por ejemplo, los sistemas artificiales del corazón<sup>14</sup>. Los biomateriales utilizados en el campo de la medicina regenerativa y la implantología para la regeneración, fijación o la sustitución de tejido enfermo incluyen sistemas de ciertos materiales como los metales, cerámicas y polímeros<sup>14</sup>, que son utilizados en la reconstrucción de huesos, articulaciones, córneas, reemplazo de los dientes, etc. Los biomateriales poliméricos, si se comparan con los biomateriales de estructura metálica o naturaleza cerámica, presentan muchas más posibilidades para satisfacer las expectativas que se plantea la medicina regenerativa, debido principalmente a su característica de biodegradabilidad, además de la alta variedad de compuestos diferentes de los que se dispone, y que pueden ser adaptados a funciones concretas con características bien definidas, con posibilidad de fabricación con diferentes técnicas y conformaciones. Dentro de este extenso grupo de materiales, se pueden clasificar de acuerdo a su origen natural o sintético, o de acuerdo con su aplicación (ver Tabla 1.1).

En algunos casos, la función de los biomateriales poliméricos es temporal por su capacidad de degradación (materiales biodegradables), y en otros casos permanente (materiales bioestables), siendo estos últimos los biomateriales en los que se centra esta tesis.

Los polímeros naturales, aunque en general presentan propiedades mecánicas reducidas, tienen la ventaja del reconocimiento biológico que permite la adhesión y función celular. Por otro lado, los polímeros sintéticos son materiales reproducibles micro-estructuralmente, poseen propiedades mecánicas aceptables, muchos de ellos son biológicamente inertes, y en algunos casos hidrolíticamente biodegradables, lo cual los hacen adaptables a muchas necesidades de la medicina regenerativa<sup>15</sup>.

En los últimos años, el progreso en muchos campos diferentes ha allanado el camino a la creación de biomateriales o dispositivos innovadores para mejorar los tratamientos existentes y desarrollar otros nuevos para una mayor calidad de vida. En la creación de los nuevos dispositivos, se ha de tener en cuenta los tres pilares básicos sobre los que se sustenta la ingeniería tisular y que son, el soporte estructural que guía el crecimiento tisular, las células a implantar, y el microambiente celular con las rutas de señalización adecuadas<sup>2,7</sup>. Es evidente, por lo tanto, que la elección del soporte estructural, es crucial para que las células se comporten de la manera requerida en la producción de tejidos y órganos, de la forma y tamaño deseado<sup>16</sup>.

**Tabla 1.1.** Algunos polímeros de origen natural o sintético comúnmente usados en aplicaciones biomédicas.

<b>Polímero</b>	<b>Aplicación</b>
<b><i>Origen natural</i></b>	
Colágeno	Matrices de reparación ortopédica, del nervio y del cartílago, válvulas cardíacas, injertos vasculares y regeneración de la piel...
Ácido Hialurónico	Matrices de reparación ortopédica, sustitutos en oftalmología, vehículos de liberación de fármacos...
Elastina	Regeneración de la piel...
Fibrina	Productos hemostáticos, sellantes de tejido, oftalmología...
Quitosano	Apósito para heridas, suturas, lentes de contacto, vendajes, sistemas de liberación controlada...
Alginato	Apósito para heridas, encapsulación y liberación de fármacos...
<b><i>Origen sintético</i></b>	
Poliacrilato de etilo	Aplicaciones cartílago, sistemas neuronales ...
Poli-2-hidroxietilacrilato	Lentes de contacto, prótesis corneales, aplicaciones cartílago...
polimetilmetacrilato	Cementos óseos, lentes de contacto intraoculares, implantes dentales...
polietilenglicol	Rellenos farmacéuticos, apósitos para heridas...
Ácido poliláctico	Mallas y suturas reabsorbibles, regeneración cartílago...
Poli- $\epsilon$ -caprolactona	Dispositivos de administración de fármacos, suturas, formación de cartílago

### 1.1.1 Soportes estructurales poliméricos.

La matriz extracelular en los tejidos nativos, es el medio de integración fisiológico en el que se encuentran inmersas las células, y realiza un gran número de funciones; proporciona soporte estructural a la célula, contribuye a las propiedades mecánicas de los tejidos y proporciona el ambiente físico y químico adecuado para un tipo celular<sup>17</sup>. Actualmente, los soportes estructurales artificiales que despiertan un gran interés, son los denominados soportes porosos (“scaffolds” en inglés), que representan soportes tridimensionales (porosos) que pretenden emular o mimetizar, en la medida de lo posible, las funciones de la matriz extracelular natural de un tejido en particular. Entre las características cruciales para resolver los requerimientos en la obtención de los soportes porosos, considerados hasta ahora como biomateriales, para su aplicación en Ingeniería tisular, debemos considerar principalmente y entre otras, la arquitectura, la biodegradabilidad o bioestabilidad, la biocompatibilidad, la bioactividad, las propiedades mecánicas y la fabricación<sup>17,18</sup>.

La **arquitectura** del soporte poroso juega un papel esencial; por un lado debe presentar una porosidad, un tamaño de poro y una escala de interconexión de poros adecuada, de manera, que permita el transporte o intercambio de los nutrientes y residuos, y al mismo tiempo la adhesión, integración y migración celular, y vascularización del tejido en su caso, sin que ello afecte a la estabilidad mecánica de la estructura<sup>19–22</sup>.

La **biodegradabilidad** de los soportes es una característica importante, no sólo para la restauración de la función de los tejidos, sino también para su regeneración. Los soportes porosos biodegradables, deben poseer una velocidad de degradación tal, que sean bioadsorbidos en un periodo de tiempo determinado, permitiendo que las células generen la nueva matriz extracelular en el espacio inicialmente ocupado por los soportes, y los productos resultantes de la degradación deben ser no tóxicos y metabolizables por el organismo<sup>23</sup>.

Por otro lado, existe la posibilidad de implantar soportes porosos permanentes que deben ser **bioestables** y que induzcan a la biointegración del mismo (soporte poroso) en el tejido circundante, además de favorecer la viabilidad de las células en él, promoviendo al organismo a generar un tejido viable y funcional alojado en el soporte estructural. Por tanto, deben mantenerse estables frente a la degradación física y/o química, en cualquiera de las situaciones y cambios a los que pueda verse sometido el soporte dentro del organismo durante toda su vida útil<sup>24</sup>. La bioestabilidad se ha de tratar con precaución ya que, la mayoría de los polímeros considerados como bioestables, se degradan a largo plazo debido a las “agresivas” condiciones fisiológicas del organismo humano. Los procesos de degradación pueden ser de carácter físico, iniciados por la hinchazón y la fragilidad gracias a la elución de materiales plastificantes, o de carácter químico<sup>25-27</sup>.

Otra de las características que hace exitoso al soporte en su implantación en el cuerpo humano es la **biocompatibilidad**<sup>12</sup>, definida como “la capacidad de un material de tener junto con un huésped una respuesta apropiada en una aplicación específica”<sup>12,13</sup>. Esto implica, que los soportes deben ser compatibles con los componentes celulares, integrarse fácilmente, y no provocar rechazo inmunológico en el organismo receptor, además de que las células deben ser capaces de adherirse, proliferar, y diferenciarse en el soporte tridimensional, tanto en el cultivo *in vitro*, como en la implantación *in vivo*. Por lo tanto, es necesario adaptar las superficies expuestas, soporte-tejido, de cara a sus características, químicas, físicas, biológicas y morfológicas<sup>14</sup>.

La **bioactividad** de los soportes macroporosos debe proporcionar señales físicas o biológicas que permitan la interacción con los componentes celulares para la regulación de la actividad celular.

Asimismo, los materiales deben poseer **propiedades mecánicas** apropiadas, de manera que los soportes tengan estabilidad estructural y mecánica, tanto en el proceso de implantación, como en el proceso de remodelación tisular o durante el mantenimiento de la prótesis<sup>28</sup>, a la par que coincidan con las del tejido, o que sean suficientes para proteger a las células de los daños por la compresión o fuerzas de tracción, sin inhibir las especificaciones de la biomecánica apropiada.

Por otra parte, la resistencia mecánica es un factor importante a tener en cuenta en el diseño de los soportes, como caso particular de aplicación, en los sistemas de suministro de fármacos, en los que se requiere de soportes que equilibren la función mecánica de manera temporal con el transporte de biofactores, fármacos en este caso, para ayudar en la entrega de los mismos, y la regeneración de los tejidos <sup>29</sup>.

Por otro lado hay que tener en cuenta las técnicas de **fabricación**, que deben permitir obtener soportes con una variedad de formas y tamaños, con características homogéneas, reproducibles a gran escala, y cuyo coste de producción debe ser comercialmente viable<sup>28</sup>, entre otras características.

Teniendo estos requisitos en mente, con el objetivo de mimetizar la matriz extracelular, se fabrican soportes porosos poliméricos que proporcionan resistencia mecánica, de porosidad interconectada con suficiente área superficial, superficie química modificable y propiedades geométricas, que permiten dirigir la regeneración del tejido o la biointegración del implante<sup>18</sup>. Aunque existen varios tipos de estructuras dentro de los soportes porosos poliméricos utilizados en medicina regenerativa, las que mayor interés suscitan en el desarrollo de la presente tesis son, los hidrogeles y esponjas porosas o soportes macroporosos, los cuales se describen a continuación.

Los *hidrogeles* son redes tridimensionales compuestas por cadenas flexibles de polímeros, capaces de absorber grandes cantidades de agua sin disolverse<sup>30</sup>, o perder su integridad estructural debido a los enlaces físicos o químicos que permiten su formación<sup>31</sup>. El agua absorbida facilita el transporte de gases y nutrientes, y confiere al material propiedades superficiales similares a las del tejido vivo. Durante el proceso de hinchado, aumentan su volumen y adquieren una consistencia blanda y elástica, pero mantienen su forma al alcanzar el equilibrio físico-químico con su entorno<sup>32,33</sup>. Tomando en cuenta estas propiedades, en combinación con el hecho de que la mayoría de ellos son biocompatibles, y que pueden sintetizarse en forma de esponjas con porosidades variables (micro y macro estructuras), los hidrogeles son atractivos para numerosas aplicaciones en medicina<sup>32,34-39</sup> como son, dispositivos para la administración controlada de fármacos<sup>40</sup>, soportes porosos para tejidos, geles de acrilatos para obtener lentes de contacto y prótesis corneales<sup>39,41,42</sup>, etc. Para estas y otras aplicaciones, son representativos entre muchos hidrogeles, los polímeros acrílicos hidrófilos, poli hidroxietil acrilato (PHEA) y el poli hidroxietil metacrilato (PHEMA), ya que sus propiedades de hidratación atribuidas a los grupos funcionales hidroxilo<sup>43,44</sup> en la cadena lateral, los hacen interesantes en diferentes aplicaciones<sup>45-49</sup>.

Un factor importante a considerar, además de no presentar buenas propiedades mecánicas, es la mala adhesión de las proteínas y de las células producida por la superficie hidrófila. Un intento importante para solventar la pobre adhesión y resistencia mecánica que tienen

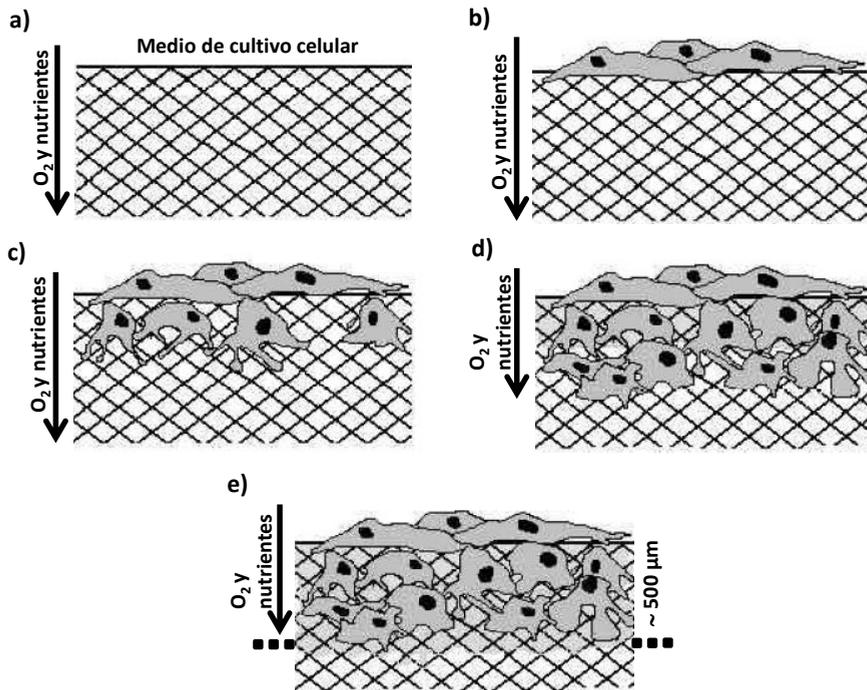
los hidrogeles y en especial el PHEA, debido a su alta hidrofiliidad, ha sido la introducción de un segundo componente con carácter hidrófobo, para la formación de copolímeros con estructura de soporte macroporoso, o redes poliméricas interpenetradas (IPNs)<sup>36,37</sup>. La influencia de la proporción hidrófila-hidrófoba en la adhesión celular, es importante y ha sido objeto de varios estudios<sup>37,50,51</sup>, llegando a concluir que el mejor comportamiento celular se encuentra en los copolímeros hidrófobos que contienen una pequeña cantidad de componente hidrófilo (no excede del 20-30%)<sup>51</sup>.

Los *soportes macroporosos*, como su nombre indica son estructuras tridimensionales, con carácter de matriz altamente porosa, y propiedades físicas que dependen de dicha porosidad. Estos soportes, encuentran diversas aplicaciones en el campo de la medicina debido a su estructura, ya sea con carácter biodegradable o bioestable, siendo estas últimas las que suscitan interés en esta tesis. Entre estas aplicaciones, podemos destacar las utilizadas como portadores bioestables de células, que encuentran aplicación en la biointegración de implantes protésicos, y como fuente natural de factores de crecimiento en diferentes terapias regenerativas<sup>52,53</sup>. En algunas de estas aplicaciones, se requieren soportes porosos en forma de membranas macroporosas flexibles y muy delgadas. Este es el caso del anillo de anclaje de una prótesis de córnea, que ha de ser un material fino y bioestable<sup>42,53-63</sup>, donde la lente sintética queda rodeada por un material macroporoso (anillo de anclaje), que es invadido por el tejido huésped, y de esta manera la prótesis queda fija de

manera permanente; o cuando las células han de ser aisladas del sistema inmunológico del organismo para evitar el rechazo, como en la implantación de células pancreáticas  $\beta$  responsables de la producción de insulina, o aplicaciones donde el tejido regenerado debe soportar considerables esfuerzos mecánicos, como es el caso de prótesis de discos intervertebrales o en cementos óseos. En otros casos, se requiere un parche bioestable también portador de células, sistemas que mantengan las células alojadas, como vendas y apósitos, que pueda presionar sobre el tejido para inducir un efecto paracrino a través de la entrega continua de factores de crecimiento, pudiendo encontrar aplicación en la curación de heridas, y la regeneración de la piel o de la córnea<sup>64-73</sup>. La arquitectura de poro de estas membranas debe ser bastante particular para ajustarse de manera simultánea a los requisitos de elevada porosidad, interconectividad de los poros, y el tamaño de poro adecuado para la incursión celular, pequeño espesor y resistencia mecánica; aunque algunos de estos requisitos parecen contradictorios entre sí.

Para la fabricación de los soportes macroporosos, existen diversas técnicas, como son: método de plantillas o “templates”, método de evaporación del solvente-eliminación de partículas (“solvent casting-particle leaching”), electrohilado (“electrospinning”), extracción en frío de solvente (“freeze-extraction”) técnica de liofilización (“freeze drying” o “gelation”), etc<sup>74,75</sup>. Los soportes macroporosos actuales, fabricados a través de técnicas convencionales, son generalmente esponjas tridimensionales de polímeros, o copolímeros naturales o sintéticos.

En el caso de requerir soportes macroporosos en forma de membranas finas y porosas en las distintas aplicaciones de ingeniería tisular, en primera instancia se utilizan las técnicas convencionales para producir los soportes macroporosos (comentadas anteriormente) tales como, la técnica de las plantillas o de lixiviación de partículas<sup>76-84</sup> con tamaños de poro del orden de varias decenas de micras, donde se producen soportes macroporosos que se disgregan cuando se corta para producir membranas porosas, con espesores del orden de magnitud del tamaño de los poros. Las técnicas de extracción en frío de solvente o liofilización<sup>83,85-91</sup>, producen materiales con elevada porosidad que los hace muy débiles bajo la forma de películas delgadas. El electrohilado<sup>92-97</sup>, permite la producción de entramados muy finos y muy resistentes, sin embargo, los espacios entre las nanofibras no permiten la invasión celular. Así observamos que, ninguna de estas técnicas hace frente al requerimiento de obtención de membranas finas y porosas, por lo que se hace necesario la combinación de algunas técnicas o la modificación de determinados parámetros de procesamiento para adaptarlos a las necesidades requeridas. Además, en el caso de algunos soportes macroporosos obtenidos por técnicas convencionales, nos encontramos que las células no reconocen este tipo de superficies, y lo más importante, que no pueden migrar más de 500µm de la superficie en profundidad. La falta de suministro de oxígeno y nutrientes rige esta profundidad (ver Figura 1.1).



**Figura 1.1** Diagrama esquemático que muestra las limitaciones de difusión de los soportes macroporosos: a) soporte macroporoso con estructura de poro abierto para las células. El oxígeno y los nutrientes se suministran desde el medio de cultivo celular, b) siembra de células en el soporte macroporoso, c) las células comienzan a proliferar y migrar en los poros del soporte macroporoso, d) las células colonizan completamente los poros y comienzan a establecer su propia matriz extracelular y e) la capa superior de células consume la mayor parte del oxígeno y nutrientes, además de limitar la difusión de estos componentes, lo que reduce la cantidad disponible para las células pioneras que van migrando profundamente en el soporte macroporoso. Finalmente, la migración celular se detiene debido a la falta de suministro de oxígeno y nutrientes. La capa de células que pueden sobrevivir con la difusión de oxígeno y nutrientes del medio como máximo sólo puede profundizar  $500\mu m$ . Figura adaptada<sup>16</sup>.

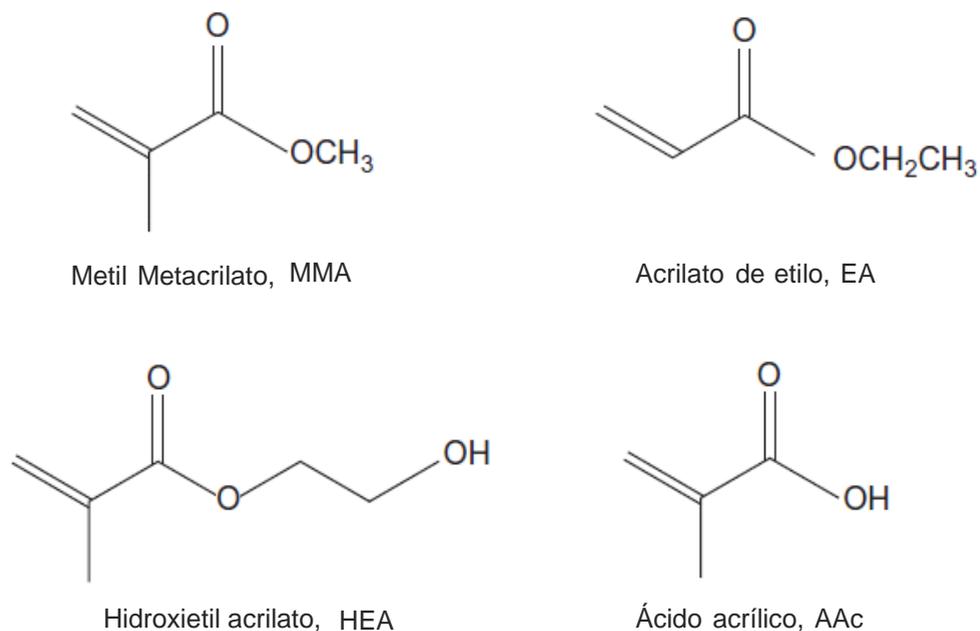
Hay que crear estrategias de fabricación, que mejoren el diseño actual de dichos soportes macroporosos, mediante el control de parámetros de la arquitectura porosa tales como el tamaño de poro, la porosidad y la distribución de poros, de modo que se pueda aumentar el transporte de masa de oxígeno y nutrientes en el interior del soporte, y apoyar el crecimiento celular en esa región. Esto es así, ya que se ha comprobado que las características estructurales del soporte macroporoso, como el tamaño y la densidad de poro, determinan el comportamiento celular<sup>98,99</sup>, haciendo necesario controlar la micro y macroestructura de éste mediante el proceso de fabricación<sup>100</sup>. En algunas aplicaciones por ejemplo, si se desea mejorar la adhesión y la migración de las células en los soportes, se requieren soportes microporosos<sup>101–103</sup>.

Por tanto, podemos asumir que para que estos soportes poliméricos, ya sean hidrogeles o soportes macroporosos, consigan un mayor grado de éxito en las distintas aplicaciones en que se los requieren en medicina, hay que tener en cuenta en su diseño, que algunas propiedades de estos soportes porosos, comentadas a continuación, afectan a la respuesta biológica de las células sembradas en sus poros, y a su interacción con el tejido vivo<sup>12</sup>. *Características superficiales de carácter químico* (en particular, el equilibrio hidrófilo- hidrófobo en el material sintético) y *físico* (tal como topografía, rugosidad...) que en gran medida influyen en la fijación y la proliferación de las células, y como ejemplo además, son requisitos clave en el caso de implantes de vasos sanguíneos para reducir al máximo la trombogenicidad.

*Propiedades mecánicas de soporte*, en particular la rigidez, que influyen en la diferenciación celular y en el caso de los implantes que se dedican para la sustitución de tejido óseo, dicha propiedad es fundamental ya que deben soportar cargas elevadas. La *arquitectura del poro* (forma, tamaño e interconectividad), como se ha comentado anteriormente, es esencial para garantizar el crecimiento, la diferenciación y la viabilidad de las células, y además el soporte debe ser permeable a los nutrientes y los desechos de las células, propiedades requeridas en prótesis corneales o implantes de cartílago, entre otros.

Con las consideraciones citadas anteriormente, y teniendo en cuenta ciertas aplicaciones en medicina regenerativa, se optó por estudiar en esta tesis, una familia de soportes poliméricos o copolímeros, que cumpliesen con dichos requerimientos: los polímeros de la serie de los poliacrilatos, derivados del ácido acrílico, sus ésteres y derivados. Los **acrilatos** y **sus ésteres** son líquidos incoloros, inflamables y volátiles que polimerizan con facilidad<sup>104</sup>, son resistentes a aguas salinas, jabones y detergentes, propiedad que se ve incrementada cuando se encuentran copolimerizados y tienen múltiples aplicaciones en diversas industrias. Además son muy estables frente a la esterilización gamma<sup>105</sup> y se caracterizan por su transparencia, resistencia a la rotura y elasticidad. Estas propiedades, que los hacen viables en muchas aplicaciones de la industria, también los convierten, teniendo en cuenta algunas de estas propiedades, en buenos candidatos para aplicaciones en medicina regenerativa, comentadas a continuación.

Entre los más destacados de los poliacrilatos y polimetacrilatos, y en estructura de soporte poroso, que son objeto de esta tesis doctoral encontramos, el poli *acrilato de etilo* (PEA), poli *metacrilato de metilo* o poli *metil metacrilato* (PMMA), poli *hidroxietil acrilato* o poli*acrilato de 2- Hidroxietil*, poli *ácido acrílico* (PAAc) y poli *ácido metacrílico* (PMAAc). Las correspondientes unidades monoméricas se muestran en la Figura 1.2.



**Figura 1.2** Estructura química de algunos monómeros de acrilatos utilizados en esta Tesis. Figura adaptada<sup>106</sup>.

Debido a la buena compatibilidad con el tejido humano y el abanico de propiedades que presentan, todos ellos encuentran diversas aplicaciones médicas entre las que se destacan: aplicaciones oftalmológicas como tratamientos oculares, lentes intraoculares, córneas artificiales<sup>107-115</sup>; prótesis odontológicas<sup>116-118</sup>; en cirugía ortopédica como cemento óseo<sup>119</sup>, fijación de implantes y remodelación del hueso perdido<sup>120</sup> o prótesis de cartílago<sup>37</sup>; aplicaciones neuro regenerativas<sup>121,122</sup>; etc..

## **1.2 Medicina regenerativa en córnea y cartílago articular.**

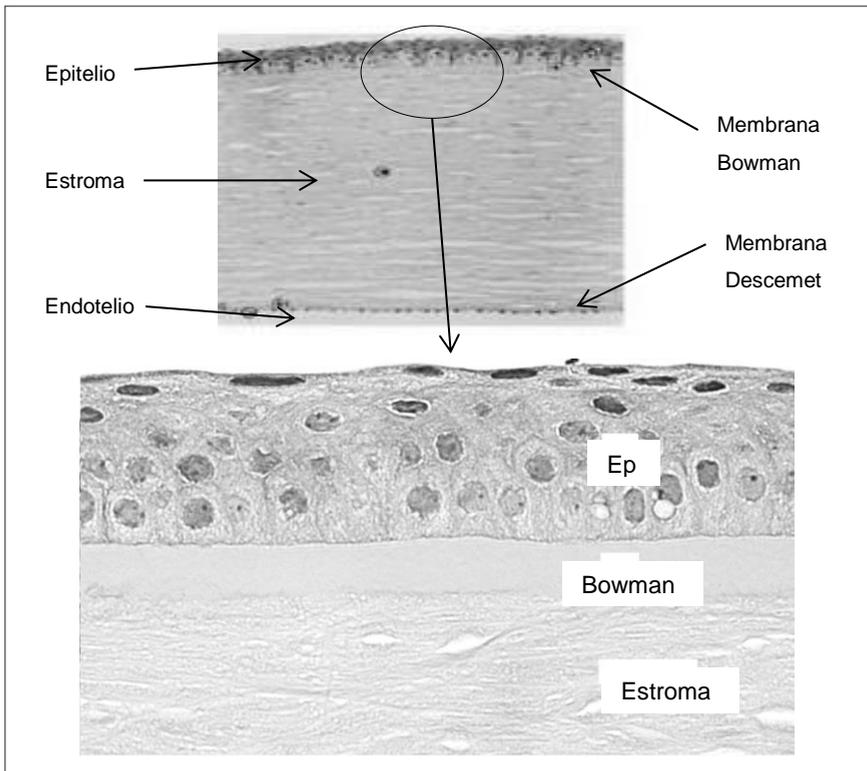
Para el éxito en el diseño de una terapia efectiva en medicina regenerativa, se hace necesario conocer tanto la estructura, como la composición y la función del tejido u órgano receptor. Además se ha de conocer por un lado la capacidad de crecimiento de los tejidos a reparar o restauración de la función de los mismos mediante implantes, para conocer sus necesidades en relación a los requerimientos de los soportes estructurales necesarios, y por otro lado la biocompatibilidad y biointegración de los mismos.

### **1.2.1 Características de la córnea.**

La córnea es una estructura ocular (membrana transparente) que se encuentra en la zona externa del ojo (parte frontal de la pared exterior del ojo), cubriendo el iris, la pupila y la cámara anterior.

Entre sus funciones se destaca, su actuación como una barrera física y óptica, que protege la parte intraocular (estructura interna) del ojo de la radiación ultravioleta, previene de la invasión de microbios, polvo, gérmenes y de otras partículas<sup>123-126</sup>, y permite la refracción (enfoque de luz sobre la retina) y transmisión de la luz contribuyendo en gran medida al poder de enfoque del ojo. La refracción y transmisión de la luz por parte de la córnea es posible gracias a sus propiedades de avascularidad y transparencia<sup>127</sup>.

Esta estructura ocular, se compone de tres capas celulares, desde la superficie del ojo al interior del mismo (ver figura 1.3); el epitelio corneal, Ep, (50-100 $\mu$ m), el estroma corneal (~500 $\mu$ m) y el endotelio corneal (~5 $\mu$ m), y que a su vez están separados por dos membranas, la membrana de Bowman, (~12 $\mu$ m), y la membrana de Descemet (4-10 $\mu$ m). El epitelio principalmente contiene tres tipos de células que se organizan entre cinco y siete capas, proporcionándole la mayor parte de las funciones de barrera de protección de la córnea. El estroma es la parte más gruesa y más fuerte de la córnea, que se compone principalmente de agua y fibrillas de colágeno, con queratocitos situados dentro de una red de fibrillas. El endotelio, es una única capa de células que actúa como barrera permeable irrigada por el humor acuoso, que permite la nutrición de las capas más externas de la córnea sin que exista vascularización<sup>128</sup>.



**Figura 1.3** Corte histológico de la córnea. Figura adaptada<sup>129</sup>.

Dada su localización en el ojo, la córnea es una zona susceptible de daños externos como, quemaduras químicas, traumas, daños en intervenciones quirúrgicas, etc., así como de infecciones, que pueden provocar un daño permanente en el tejido o una opacificación de la misma<sup>130</sup>. Cualquier daño o opacificación del órgano tiene como resultado el deterioro de la visión o ceguera<sup>131</sup>.

Las lesiones o enfermedades de la córnea son la segunda causa de ceguera y afecta a alrededor de 10 millones de personas en el mundo<sup>3</sup>. Aunque las lentes de contacto (discos curvos de plástico delgado, que están diseñados para cubrir la córnea y que se adhieren a la superficie del ojo debido a la tensión superficial) se suelen considerar como una opción para la corrección del error refractivo, también juegan un importante papel terapéutico después de un traumatismo, cirugía y en el tratamiento de enfermedades oculares<sup>132-135</sup>.

En el campo de la terapia ocular, que engloba tratamientos terapéuticos para una variedad de patologías corneales, el suministro de fármacos supone una tarea difícil. Debido a las limitaciones fisiológicas y anatómicas del ojo, es difícil obtener la concentración terapéutica correcta de un fármaco en el sitio de acción necesario. Esto ha llevado a los médicos a explorar nuevos sistemas de liberación ocular (terapia ocular de liberación), tales como, geles que trabajan in situ, nanopartículas y liposomas. Una forma nueva y exitosa, ideada como vehículos de administración de fármacos (liberación de antibióticos, medicamentos anti-inflamatorios y otras moléculas que tienen el potencial de disminuir las complicaciones de algunas patologías corneales), son las lentes de contacto o lentes intraoculares<sup>132,136-140</sup> además de los dispositivos de filtración de glaucoma y agentes de taponamiento<sup>141</sup>. Los materiales más utilizados y examinados para la fabricación de las lentes de contacto intraoculares o de los recubrimientos de las mismas lentes (para evitar la modificación directa del material de la lente sin interferir con sus propiedades ópticas), que sirven de sistemas de liberación de fármacos, son los acrílicos y los

hidrogeles<sup>129</sup>. Otra aplicación de las lentes de contacto para tratar patologías corneales, es el caso de los defectos epiteliales persistentes (DEP)<sup>142,143</sup>. Las lentes de contacto que se utilizan para el tratamiento de los DEP son: lentes convencionales de hidrogel blandas<sup>48,144,145</sup>, lentes de hidrogel de silicona suave<sup>146</sup>, lentes de contacto rígidas permeables al gas<sup>147</sup> y lentes de contacto escleral<sup>148</sup>.

Generalmente, cuando se requiere intervención quirúrgica para reparar la función corneal, se recurre al trasplante de tejido corneal humano o queratoplastia, dado el éxito de la intervención, en buena medida favorecido por el hecho de ser un tejido avascular. Sin embargo, la queratoplastia tiene diversos inconvenientes, y en algunos casos es inviable. Los principales problemas de la queratoplastia son el posible rechazo inmunológico, la variabilidad en la calidad de las córneas donantes, la escasez de donantes de córneas, la imposibilidad de aplicarla en casos de quemaduras químicas, condiciones patológicas específicas como es el caso de la presión intraocular anormal, es decir, glaucoma, o inflamación ocular en curso, pacientes con síndrome de Stevens-Johnson o casos de rechazo inmunológico constante, así como el conflicto religioso respecto a los trasplantes en algunas culturas<sup>130,149</sup>. Por tanto, la medicina regenerativa remarca la necesidad de desarrollar prótesis corneales, que restauren la función de la córnea de manera permanente, y es aquí donde entra en juego la ingeniería tisular de la córnea.

Aunque existen diversas alternativas al trasplante de córnea humana, en los apartados siguientes sólo se desarrollan algunas de ellas. Unas estrategias tienen como objetivo restaurar la función, pero no reparar el tejido, es decir, reemplazar el tejido corneal dañado y enfermo para restaurar la visión, como es el caso de las prótesis totalmente sintéticas o queratoprótesis (KPros) y KPros con recubrimiento biológico; otras estrategias hacen uso de materiales biológicos para reparar el tejido, como sustitutos corneales obtenidos mediante cultivo *in vitro* o implantes biomiméticos de colágeno, y en otras la finalidad es regenerar el tejido corneal si no se encuentra muy dañado, y restaurar la función a largo plazo, como es el caso de soportes tridimensionales (“scaffolds”) biodegradables para la liberación de fármacos o de células madre corneales<sup>150,151</sup>. Además estos implantes corneales pueden corregir los errores de refracción del ojo, y como tales pueden llegar a ser alternativas a las gafas, lentes de contacto o procedimientos de cirugía láser.

Los materiales sintéticos utilizados en estos dispositivos, ya sean de reemplazo o de corrección, presentan un conjunto de requisitos que requiere una comprensión de los tejidos, el impacto de los procesos quirúrgicos y la cicatrización de heridas, la ciencia de los materiales y el diseño óptico.

### 1.2.2 Estrategias para la reparación-restauración corneal.

Este tipo de terapias, se dirige a la reparación de la función corneal, a través de la combinación de materiales poliméricos naturales o materiales biológicos<sup>150</sup>. En general, existen tres enfoques para este tipo de estrategia de la ingeniería tisular de la córnea; la siembra de células directamente sobre una superficie o gel que puede ser reorganizado por las células; la siembra de células sobre un sustrato donde secretan su propia matriz extracelular; y la utilización de un sustrato o soporte tridimensional preformado, que permita la integración de alguna de las células progenitoras pre-sembradas o de células huésped en crecimiento.

Así pues, dado que el colágeno tipo I es el biopolímero dominante en la córnea humana<sup>152</sup> (70% peso seco), con la aparición de la tecnología recombinante, se ha investigado sobre la obtención de implantes corneales fabricados a partir de colágeno humano recombinante. Para hacer posible la sutura de estos geles se han incrementado sus propiedades mecánicas mediante entrecruzamiento, copolimerización y formación de IPNs. Esta estrategia aporta numerosas ventajas frente a otras, ya que permite la regeneración de la córnea, promueve la adhesión y proliferación celular mejor que los polímeros sintéticos, realiza la función de transmisión de la luz de manera eficaz, y evita la transmisión de enfermedades al ser recombinante. Un ejemplo de ello es el modelo desarrollado por el grupo de Griffith y Fagerholm et al.<sup>153-155</sup>, que han conseguido matrices de colágeno humano recombinante tipo I o tipo III entrecruzado con 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil) carbodiimida / N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS), para las que se han realizado ensayos clínicos en humanos<sup>156</sup>. De dicho estudio, destacar los resultados tras 6 meses de seguimiento, que muestran regeneración del epitelio corneal, del estroma y los primeros signos de regeneración nerviosa, que no causan reacciones adversas y que se pueden utilizar como injertos temporales, aunque se requiere un seguimiento a largo plazo para determinar si pueden ser utilizadas como sustitutos corneales<sup>157</sup>.

También es posible implantar estromas descelularizados de otras especies y sembrados previamente. Este es el caso de matrices corneales porcinas descelularizadas mediante dodecilsulfato<sup>158</sup>, que muestran propiedades mecánicas y biocompatibilidad similares a las de la córnea de los conejos en los que se ha implantado. Al descelularizar, teóricamente se evita el rechazo inmunológico. Otro método, es la utilización de la membrana amniótica como soporte corneal, como sustrato para cultivar células corneales y trasplantarla en el ojo dañado<sup>159</sup>. Al formar parte de la placenta suele ser inmunológicamente inerte y no produce rechazo.

En aquellos casos en los que se encuentra dañada una de las capas de la córnea, es posible cultivar tejidos e injertarlos. Por ejemplo, se pueden cultivar células en superficies de materiales, que responden a cambios de temperatura y, así obtener, láminas de tejido epitelial para trasplantar. No obstante, el cultivo de tejidos tiene como inconvenientes, el coste económico y temporal para obtener material trasplantable<sup>160</sup>.

### 1.2.3 Queratoprótesis, otras estrategias de reparación corneal

Las córneas artificiales o queratoprótesis se utilizan para restaurar la agudeza visual funcional en ojos con enfermedad corneal grave y opacidad que no presentan un buen pronóstico para realizarles el trasplante de córnea estándar, y con menor frecuencia, aliviar el dolor en condiciones tales como la queratopatía. Además, no necesitan terapias inmunosupresoras, normalmente requeridas en el caso de tejido donante humano. Los requisitos de los materiales para queratoprótesis<sup>108,123,131,161-163</sup>, que se detallan en párrafos posteriores, son similares en muchos aspectos a las de los insertos corneales: incrustaciones o recubrimientos.

El primer modelo de córnea artificial, fue propuesto por Guillaume Pellier de Quensgsy en 1789; era un dispositivo que consistía en una lente de cristal con bordes de plata, con posibilidad de anclaje a una membrana porosa<sup>123,161,164</sup>. Años más tarde, Nussbaum en 1853, experimentó en conejos con una prótesis de cristal con forma de botón, y Heusser en 1859 implantó en humanos una prótesis que se mantuvo un máximo de 3 meses<sup>161</sup>. En ambos casos, los implantes se extruyeron, pero estos primeros esfuerzos demostraron que podría ser posible reemplazar la córnea con un material sintético.

El interés en el desarrollo de KPros, disminuyó después del primer éxito de trasplante de córnea humana (tejido corneal), realizado de humano a humano a principios del siglo XX, en 1906, y donde se consiguió mantener transparente la córnea<sup>165</sup>.

A partir de ese momento, la técnica de la queratoplastia desvió la atención sobre la búsqueda de una prótesis corneal artificial. Sin embargo, con el tiempo quedó patente que la queratoplastia no era viable en todos los casos de reconstrucción corneal, por lo que apareció de nuevo un interés por el diseño de prótesis corneales artificiales que fueran bien aceptadas por el cuerpo humano, y permitieran restaurar la función corneal. El desarrollo de las KPros, no se produjo hasta la segunda mitad del siglo XX, utilizando en algunos de los diseños PMMA para la óptica, y adjuntada a ella un material biológico usado como una háptica, para aumentar la probabilidad de anclaje del dispositivo en la córnea. Algunos ejemplos de este tipo de KPros son las comentadas a continuación.

La *osteo-odonto-keratoprotesis*, inicialmente diseñada por Strampelli en 1963<sup>166</sup>, consistía en cementar un óptico de PMMA, a una lámina de la raíz de una pieza dental extraída del propio paciente, con el hueso circundante aserrado, e insertarlo en la mucosa bucal previamente a la implantación en la córnea, para la estabilización y recuperación de los daños de la lámina. Este dispositivo proporcionó buenos resultados en lo referente al mantenimiento de la prótesis, pero no permitió un buen control de las complicaciones biológicas<sup>167</sup>. Posteriormente, este diseño fue modificado por Falcinelli en 1987, mejorando la técnica quirúrgica de Strampelli, con un aumento de la capacidad de visión y la retención de la prótesis<sup>168-172</sup>. A pesar de que es una alternativa que genera buenos resultados, ya que posee una excelente integración con el tejido circundante sin generar rechazo inmunológico, y se mantiene bien en casos severos de super-

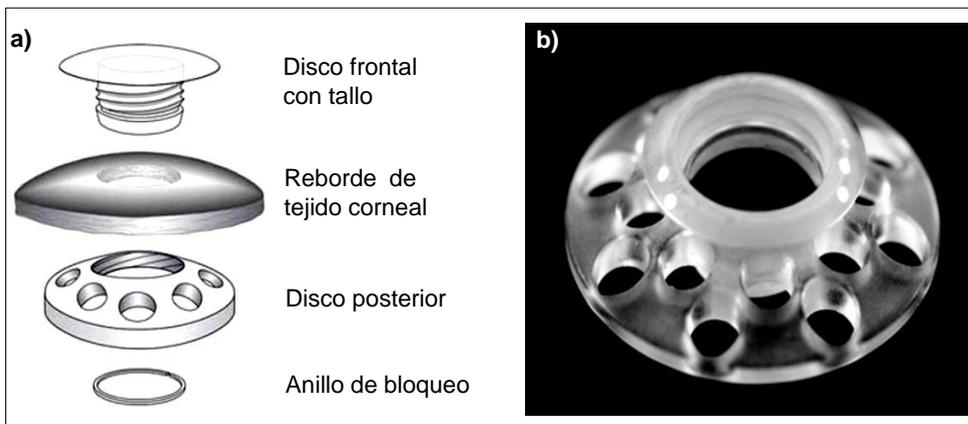
ficie ocular queratinizada (quemaduras químicas)<sup>173,174</sup>, presenta ciertos inconvenientes a destacar, ya que es una técnica cara y compleja que se realiza en dos intervenciones y en centros específicos, depende del historial clínico del paciente, en muchos casos se produce un incremento de la presión intraocular, en otros casos tiene lugar la exposición de la zona de anclaje con el tejido circundante, y se produce la resorción del hueso a largo plazo. Sin embargo, este tipo de KPro, es particularmente resistente en los casos de ojos severamente secos, y es considerado por muchos como la KPro elegida para la etapa final de ceguera corneal no susceptible de queratoplastia penetrante<sup>175,176</sup>.

En 1964 Cardona et al.<sup>177</sup> propusieron una prótesis artificial, con el método de implantación de las KPro intralamelares, basado en un bolsillo de dos solapas. Desarrollaron distintos modelos de prótesis y métodos de inserción, en los que básicamente la prótesis consistía en un cilindro, con un disco unido en su zona central o bien una prótesis en forma de seta, todo de PMMA. Sin embargo, este dispositivo, en algunos casos, provocaba erosión del tejido alrededor del disco, dada su rigidez, y necrosis aséptica, con la consiguiente extrusión. Además, era necesario buscar una mejor nutrición de los tejidos posteriores al disco de anclaje de la córnea (membrana porosa), de ahí que se propusiesen otros modelos con el plato perforado o membrana porosa de teflón siliconado<sup>178</sup>. El porcentaje de fallo de la prótesis se veía incrementado, cuando la córnea estaba muy dañada o era muy delgada, o cuando estaba muy vascularizada.

Una evaluación histológica relativamente reciente<sup>179</sup>, de un ojo implantado con un dispositivo de Cardona, mostró que el PMMA era un material adecuado para la zona óptica, y que había proporcionado una buena agudeza visual postoperatoria tras un periodo de implantación de 14 años. Sin embargo, la zona que comprende la membrana, se consideró estar predispuesta a la inflamación a largo plazo. En dicho estudio, se recomienda una cirugía menos complicada, y un dispositivo simple e inerte, con un reborde que posea una buena resistencia mecánica e integración biológica, para reducir las complicaciones postoperatorias<sup>179</sup>.

Un modelo de prótesis que posee bastante popularidad en el mercado, es la Boston KPro<sup>115,129</sup>, inicialmente conocida como la queratoprótesis de Dohlman-Doane, e implantada en pacientes desde 1974. Durante estos años se ha sometido a una serie de iteraciones de diseño, lo que ha llevado al desarrollo de las dos versiones disponibles actualmente, y que están dirigidas a la sustitución completa de la córnea, Tipo I y Tipo II. Ambos diseños requieren de la eliminación del cristalino del ojo del paciente, para permitir la implantación de la KPro. El dispositivo Tipo I, está diseñado para los pacientes con buena hidratación de la superficie ocular (ojos húmedos), y la Tipo II, es un dispositivo para personas con enfermedades en la superficie ocular, tales como ojos muy secos o el síndrome de Stevens-Johnson, y se implanta a través de un párpado cerrado<sup>180-182</sup>. El modelo Tipo I consiste en un disco frontal con un tallo, ambos de PMMA, y este último se une a otro disco posterior de diámetro mayor con grandes agujeros, diseño que produce menor daño corneal y

resulta más fácil para cirujanos más inexpertos, de manera que cuando se implanta queda un injerto de córnea entre ambos discos, trepanada en la zona central. La versión actual (Figura 1.4) incorpora un reborde de tejido corneal del donante que se coloca sobre el tallo de PMMA, se enrosca con el disco posterior, y se bloquea con un anillo de titanio para mejorar la fijación.



**Figura 1.4** Queratoprótesis de Boston: a) diagrama esquemático de KPro Tipo I y b) fotografía de KPro tipo I, con todos los componentes de PMMA. Figura adaptada<sup>183</sup>.

Esta KPro ha mostrado buenos resultados para muchos pacientes con enfermedades no autoinmunes, y aquellos con fallos anteriores de injerto que no tienen otros problemas oculares, aunque pueden cursar algunas complicaciones como inflamación, vitritis, glaucoma y la formación de la membrana retroprotésica, que pueden mejorar mediante ciertos tratamientos. En otro tipo de pacientes, con enfer-

medades asociadas al sistema inmunológico de la superficie corneal, se pueden desarrollar inflamaciones que conducen a necrosis, fusión del tejido corneal y finalmente a la extrusión<sup>184</sup>.

El modelo Tipo II es similar al Tipo I, con la salvedad de que el disco externo sobresale a través del párpado superior permanentemente cerrado, lo que permite usar este dispositivo en estadios avanzados de la enfermedad de ojo seco<sup>113</sup>. Este modelo de prótesis, proporciona buenos resultados en cuanto al tiempo de retención si se compara con otras KPros (unos 33.6 meses de media), y es apta para pacientes con alto riesgo de rechazo al trasplante. Aunque funciona bien en pacientes con quemaduras térmicas y trauma mecánico, en pacientes con quemaduras químicas los resultados no son tan buenos<sup>185,186</sup>. El principal problema que se presenta con este modelo al igual que la de Tipo I, es la formación de membrana retroprotésica, y la aparición de glaucoma, que implica pérdida de la visión y resistencia a tratamiento. Además, requiere de tratamiento crónico con antibióticos, corticosteroides y lentes de contacto terapéuticas para prevenir defectos epiteliales<sup>113,187</sup>.

Un tercer prototipo se creó con la concepción de mejorar la estabilidad mecánica a través de un anillo de titanio<sup>182</sup>.

El desarrollo de técnicas quirúrgicas y materiales con propiedades mejoradas, aumentó el éxito de las KPros desarrolladas a partir de la mitad del siglo XX, basadas en una parte central u óptica (núcleo sintético), que realiza la función de transmisión de la luz, y un disco de anclaje (membrana), rígido o flexible. El modelo que más logros

ha conseguido es el denominado dispositivo tipo *core-skirt*, que se compone de una parte central óptica (epitelizable), y un anillo soporte poroso (membrana porosa) en el que no crecen las células epiteliales conjuntivales, y proporciona un anclaje estable a través de la integración en el tejido huésped (biointegrable).

La mayoría de los anillos están diseñados para permitir la integración celular del tejido huésped, a través de fibroblastos en crecimiento, que promueven la deposición de la MEC (principalmente colágeno), para proporcionar un anclaje firme. En el diseño del anillo de anclaje, se han empleado diversos materiales, con la característica común de ser suficientemente resistentes, para permitir la colocación de la prótesis mediante sutura y a la presión ocular. En el diseño de la superficie anterior de la prótesis, tipo *core-skirt*, se ha de promover la epitelización, así como inhibir el crecimiento de las células epiteliales en la interfaz de estroma-implante. Además, la superficie posterior puede ser modificada para inhibir la adhesión y la proliferación celular, y evitar así la formación de membrana retroprotésica, que conduce a la opacificación corneal.

Los materiales utilizados en queratoprótesis, deben permitir la permeabilidad del oxígeno y de nutrientes para mantener los componentes celulares<sup>188</sup>, además de que los materiales sintéticos utilizados en el dispositivo, deben ser no inmunogénicos ni mutagénicos, para permitir la aceptación del injerto.

Estas KPros tipo *core-skirt*, están destinadas a reducir la tasa de complicaciones, vistas con las que se encuentran las que utilizan soportes biológicos (*osteo-odonto-keratoprostesis* entre otras), mediante la sustitución de dicho tejido biológico por membranas constituidas por polímeros blandos y microporosos, para ayudar a la integración de manera estable del dispositivo en la córnea huésped, como se ha comentado anteriormente. Se han desarrollado varias KPros con este tipo de diseño, unas con núcleos ópticos de PMMA que se adhieren a las membranas porosas, y otras versiones que utilizan hidrogeles blandos para crear la parte óptica, y las membranas se fusionan para formar dispositivos de una sola pieza.

Legeais et. al.<sup>189</sup>, diseñaron un modelo de dispositivo *core-skirt* ensayado en humanos, con dimensiones similares a la córnea normal. Inicialmente poseía una óptica de PMMA unida a una membrana de fluorocarbono microporosa, realizada a partir de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), y sobre la que se han hecho diversas modificaciones, en función de los resultados de su implantación en humanos, tanto en los materiales utilizados como en el diseño en sí<sup>163,190,191</sup>, obteniendo finalmente la *BioKpro III*<sup>68</sup>, con un núcleo de silicona de 5 mm de diámetro y 500  $\mu\text{m}$  de espesor, y una membrana opaca de PTFE de 10 mm de diámetro, 250  $\mu\text{m}$  de espesor y tamaño de poro de 80  $\mu\text{m}$ , ambos elementos unidos químicamente, aunque tampoco ha tenido éxito. Los resultados del estudio clínico pusieron de manifiesto, que las causas principales del fallo del dispositivo son la inflamación crónica y la pobre colonización de la membrana, que con-

llevan a la extrusión, a pesar de que se trató con sangre autóloga, para recubrirla con moléculas implicadas en la adhesión celular<sup>58</sup>.

Trinkaus Randall *et al.*<sup>192</sup>, desarrollaron una córnea artificial que se implantó en conejos, y se mantuvo estable durante un mínimo de 6 meses. Este dispositivo consistía en una pieza central de hidrogel polivinil alcohol, PVA, que hace la función óptica, y una membrana de microfibras de polibutileno y polipropileno en la proporción 80:20 respectivamente, que rodea la lente. El inconveniente que tenía era el tiempo que llevaba anclarlo en su sitio, y que no solía mantenerse estable en la córnea largos periodos de tiempo<sup>192</sup>.

En otro estudio, Trinkaus Randall *et al.*<sup>193</sup>, incorporaron la tecnología de liberación controlada en la membrana, para liberar factores de crecimiento, orientados a promover el anclaje, mediante el aumento de la fibroplasia. Además se probaron materiales alternativos para mejorar la función de la membrana<sup>194</sup>. Este trabajo, puso en evidencia la necesidad de crecimiento interno fibroso para el anclaje, y la necesidad de epitelización de la superficie anterior de una córnea sintética, pero en general no dio una solución a largo plazo para el diseño de la misma.

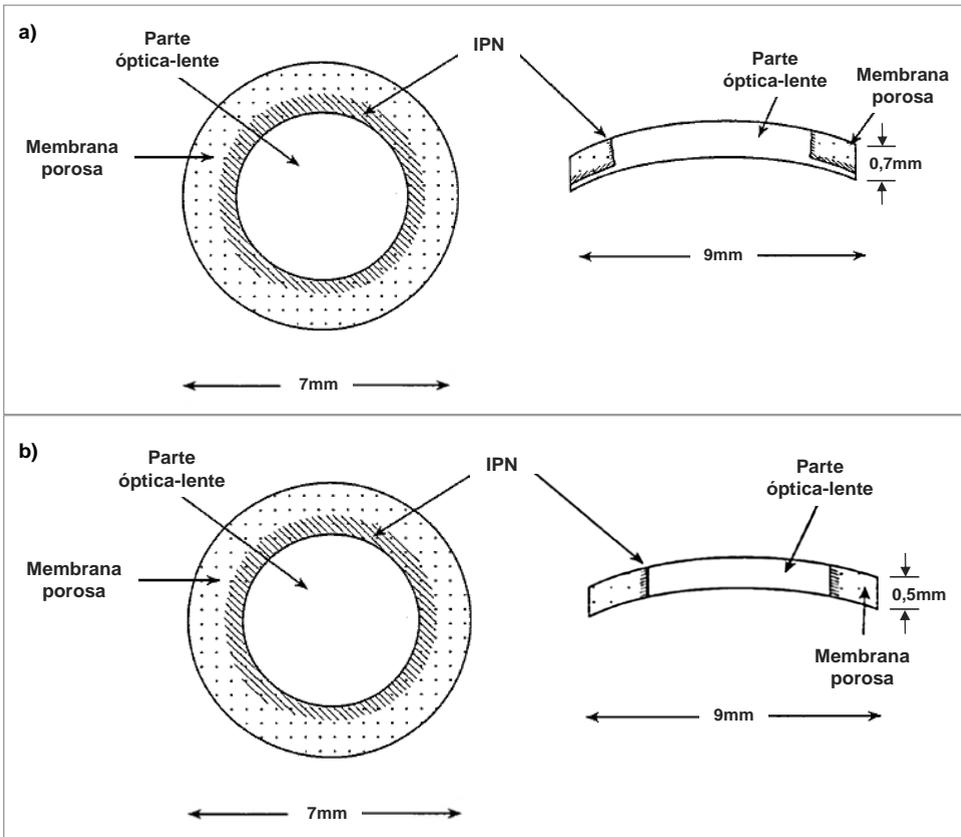
Otra prótesis tipo core-skirt, es la KPro Seoul Type, con un diseño de doble fijación<sup>195</sup>, compuesto por una óptica de PMMA, con superficie modificada con polietilenglicol, PEG, para reducir la adhesión celular, una membrana de poliuretano (PU) o polipropileno (PP), y hápticos de monofilamentos de PP, de manera que la membrana se ancla a la córnea, y los hápticos a la esclera de manera interna, para solven-

tar los problemas de fijación que suelen tener las KPros, y mejorar la estabilidad mecánica<sup>196</sup>. Estudios preliminares, sugirieron la utilización de una membrana porosa que podría permitir la integración biológica con el tejido corneal, por lo que inicialmente se fabricó la membrana con PTFE, pero ésta siempre acababa expuesta, debido a que no se integraba con los tejidos circundantes por su reducido tamaño de poro, y además el PTFE no ofrecía la posibilidad de crear membranas más porosas y con resistencia mecánica. Por ello, se cambió el material de la membrana por PU o PP, y para poder controlar el poro de las membranas, se fabricaron por el método de “solvent casting particulate-leaching”. El principal problema que presenta este tipo de prótesis es la extrusión de la membrana, aunque sí se comprobó que el diseño de doble fijación incrementa la estabilidad de la prótesis, si va acompañado de injerto. Por otro lado, tampoco se observa una recuperación notable de la agudeza visual, ya que al principio empieza siendo más elevada, pero con el tiempo disminuye considerablemente<sup>195,196</sup>.

Pintucci et al.<sup>197</sup>, propusieron una prótesis constituida por una membrana porosa y flexible de tejido fibroso Dacron (Polietileno tereftalato, PET), que ya tiene una amplia trayectoria en dispositivos cardiovasculares, fijada a una óptica de PMMA, que se insertaba en el ojo y se cubría con un injerto de mucosa oral, para una vez colonizada la membrana situar correctamente la lente, y exponer la prótesis. Sin embargo, no obtuvo buen resultado dado la complejidad de la intervención y las complicaciones asociadas, como la necrosis de la mucosa injertada y la extrusión, la formación de depósitos, endoftalmi-

tis, etc. Se han realizado algunas mejoras del dispositivo, centradas en la parte fibrosa (Dacron) para fomentar aún más el crecimiento interno de los fibroblastos del estroma<sup>198</sup>, y en la técnica quirúrgica utilizada para implantar el dispositivo, mejorando los resultados clínicos en pacientes con córneas vascularizadas<sup>199</sup>.

Uno de los modelos más importantes de tipo *core-skirt*, y que más éxito ha tenido en los ensayos clínicos, es la prótesis desarrollada por Chirila, con un nuevo concepto de diseño y enfoque de material, que implica la fusión en una sola pieza del núcleo óptico y la membrana, conocida como *AlphaCor*. La prótesis *AlphaCor*<sup>200</sup>, está formada por una membrana porosa de PHEMA, y una óptica del mismo material con la curvatura adecuada para la refracción de la luz, unidas mediante una IPN<sup>38,60</sup> o interfase entre la membrana porosa y la lente, formando un dispositivo de una única pieza flexible y biocompatible, de 7 mm de diámetro y 500  $\mu\text{m}$  de espesor, llamada KPro de Chirila Tipo I o *AlphaCor Tipo I*, (figura 1.5a). Este diseño permite la biointegración de la prótesis con el tejido circundante gracias al material poroso de la membrana<sup>201</sup>, evita la fuga de líquido intraocular y la entrada de patógenos, previene la separación de la membrana y lente y minimiza la tensión mecánica<sup>202</sup>. En los primeros experimentos, se modificó el método de polimerización para incrementar la resistencia mecánica de la membrana porosa, y se propuso un segundo modelo, KPro de Chirila Tipo II o *AlphaCor Tipo II* (figura 1.5b), que hiciese la prótesis menos dependiente de la integridad de la conjuntiva del ojo, y que facilitase la cirugía de implantación<sup>142,180</sup>.



**Figura 1.5** Las dos versiones de KPro de Chirila de PHEMA implantadas en pacientes humanos: a) diagrama de *AlphaCor Tipo I* y b) diagrama de *AlphaCor Tipo II*. Figura adaptada <sup>55,164</sup>.

Tras realizar ensayos en conejos, en 1998<sup>204</sup> la *AlphaCor* se aplicó en humanos, y los resultados fueron buenos en comparación con otras prótesis, aunque posee ciertos inconvenientes, y la retención de la prótesis no ocurre en la totalidad de los pacientes<sup>164,205</sup>.

Entre dichos inconvenientes se destacan, la deposición de partículas en fumadores y formación de depósitos de calcio, tras someter al paciente a determinados tratamientos con fármacos<sup>205-207</sup>, formación de membrana retroprotésica, daño estromal, o cierta susceptibilidad a desgarro del anillo durante la sutura<sup>205</sup>. Además, se llegó a la conclusión, de que no debe ser aplicada en casos que impliquen enfermedades severas de la superficie ocular, ojo seco, enfermedad de herpes simple, y enfermedades relacionadas con la cicatrización ocular o inflamación aguda, y la presión intraocular siempre debe ser controlada previamente a la implantación<sup>202</sup>. A pesar de estos inconvenientes, presenta ciertas ventajas sobre otras KPros, a destacar, su posición intralamelar, minimización del riesgo de desprendimiento de retina e infección intraocular, mínima cirugía invasiva requerida, la posibilidad de integración con los tejidos, y su reversibilidad en caso de fallo de la prótesis<sup>208</sup>.

Caldwell *et al.*, sintetizaron varios modelos *core-skirt* en los que la membrana era de Gore-Tex, y probaron con distintos materiales para la parte óptica<sup>209</sup>.

La *Stanford queratoprótesis* desarrollada por D. Myung *et al.*<sup>41,210</sup>, utiliza una técnica de modelado de fotolitografía para obtener un constructo de hidrogel, que consiste en una parte óptica hecha de una doble red de alto contenido en agua, y PEG/PAA, con una membrana interpenetrada y micro perforada de un hidrogel de PHEA, que ha sido aplicada en modelo de conejo, y cuyo objetivo era que fuese capaz de mantener el epitelio corneal en buen estado.

Se obtuvieron buenos resultados referente a los ensayos realizados de permeabilidad a glucosa, transparencia del hidrogel a lo largo del tiempo, y propiedades mecánicas<sup>211</sup> .

También existen KPros temporales, como la Aachen KPro<sup>212</sup>, desarrollada para facilitar la reconstrucción de ojos dañados severamente, en situaciones como el desprendimiento de retina y la hemorragia vítrea, debida a quemaduras severas, rechazo de trasplantes, etc. Además, su diseño ofrece una fácil manipulación y flexibilidad quirúrgica<sup>213,214</sup> .

Como se ha expuesto en el texto, las tecnologías para obtener las KPros han ido variando en sus enfoques y diseño, hasta que actualmente, los modelos disponibles de KPro (sustitutos corneales no biológicos) están dirigidas a la sustitución de la córnea central, por un núcleo con cualidades ópticas, hecho de un material transparente (generalmente de PMMA), rodeado por un segundo material con funciones de anclaje (anillo soporte) al tejido anfitrión (tejido estromal circundante), y sin relevancia óptica (soporte o membrana).

A pesar de los avances realizados en las distintas KPros, todos los diseños presentan importantes limitaciones: una alta incidencia de glaucoma, formación de membrana retroprotésica, fusión del estroma, extrusión del implante, siendo éste el que mayor inconvenientes presenta, etc.; con una tasa de supervivencia del injerto de menos del 75% a los dos años de implantarse, y pobres resultados visuales a largo plazo, debido a complicaciones relacionadas con el dispositivo<sup>215-217</sup> .

Por tanto, estos procedimientos sólo se usan para tratar casos severos de opacificación corneal bilateral con elevado riesgo de rechazo o fracaso, y cuando otras técnicas de trasplante no son adecuadas. Esta situación pone de relieve la necesidad de desarrollar nuevos biomateriales, para su uso como soportes para prótesis de córnea, lo que ampliaría y simplificaría las técnicas quirúrgicas que son las únicas opciones de tratamiento para algunos pacientes. Es por ello, que hoy en día se están centrado grandes esfuerzos en obtener un dispositivo de KPro no biológico, y en muchos casos teniendo en cuenta el modelo que más éxitos ha conseguido, *core-skirt*, y que cumpla con las necesidades expuestas, sobre todo en la permanencia en el cuerpo humano y su carácter universal, es decir, apta para todos aquellos casos en los que las condiciones del paciente no permitan un trasplante corneal.

En resumen de lo expuesto, y centrándose en una parte de esta tesis, las condiciones que se ha de tener en cuenta en el diseño de la KPro no biológica, y que genere buenos resultados, son las comentadas a continuación.

En lo referente a la parte óptica, por un lado, el material debe cumplir con la condición de ser epitelizable en la superficie anterior de la prótesis, para prevenir la infección y la extrusión del implante, y por otro lado, la superficie posterior debe inhibir la adhesión y la proliferación celular, y evitar así la formación de membrana retroprotésica, que conduce a la opacidad corneal. Además, debe tener un índice de refracción tan alto como sea posible, para reducir el espesor de la lente.

Por otro lado, se ha de perfeccionar sobre todo, la membrana porosa que actúa de anclaje, que a pesar de que permite el crecimiento celular, ha mostrado unas características que son críticas en el mantenimiento de la prótesis. Influye el diámetro, la interconectividad, la porosidad, las propiedades mecánicas, la flexibilidad, etc.<sup>192,194</sup>.

De la misma manera, la siembra de la prótesis previamente a la implantación, incrementa las probabilidades de éxito, ya que se produce una menor inflamación de la córnea, por la deposición previa de colágeno<sup>218</sup>. En esta línea, se han publicado numerosos estudios, en el que varias líneas celulares corneales se han empleado para la colonización de varios soportes, proporcionando resultados positivos con respecto a la adhesión y supervivencia celular *in vitro*<sup>131,149,219</sup>.

#### **1.2.4 Ingeniería tisular en cartílago**

Actualmente, se dispone de una literatura muy extensa, sobre todo trabajos de revisión, sobre ingeniería tisular de regeneración de cartílago y técnicas de ingeniería de cartílago<sup>220-226</sup>.

Quizás, el paso previo en el diseño de estrategias que plantearía la ingeniería tisular para la regeneración del cartílago articular, sería identificar cuáles son las razones por las que las terapias convencionales de reparación de cartílago, no inducen a la producción de cartílago hialino funcional en el sitio del defecto, para impulsar la reparación del cartílago articular dañado. Entre las posibles razones a destacar, por un lado, la fuente de células podría no ser la adecua-

da, aunque existan bastantes estudios *in vitro* sobre la condrogénesis de las células madre mesenquimales procedentes del hueso subcondral (bMSCs); quizás los factores de crecimiento o de señalización que llegan a las células del cartílago circundante no inducen la adecuada diferenciación condrogénica de las bMSCs; o tal vez, el entorno biomecánico no es el adecuado ya que al no tener inicialmente matriz extracelular, esta no transmite la correcta tensión a las células para iniciar la diferenciación condrogénica. El planteamiento que propone la ingeniería tisular para impulsar nuevas estrategias de regeneración del cartílago, se basa en tres pilares: el trasplante de células, un sistema de soporte tridimensional poroso y factores de señalización o de crecimiento, para hacer frente a la diferenciación de células.

Una de las estrategias es la implantación en el lugar del defecto de células, que presenten claros marcadores de condrocitos del cartílago hialino, de manera que se han de rediferenciar condrocitos, previamente expandidos en monocapa, o la diferenciación de células madre mesenquimales, MSCs. La inducción de la diferenciación se realiza *in vitro*, en medio de cultivo condrogénico y bajo condiciones adecuadas<sup>227-232</sup> entre las que se incluyen: estimulación mecánica mediante bioreactores que estimulen a las células sembradas en soportes porosos tridimensionales, hipoxia (falta de suministro de oxígeno), adecuada densidad celular, suministro de factores estimulantes como son los factores de crecimiento, entre otros. Y todo ello realizado en un entorno tridimensional, es decir, a través de un soporte tridimensional poroso (bioestables o biodegradables) como

vehículo para el trasplante de células (en el que se siembras las células).

Los soportes porosos proporcionan un entorno 3D donde las células pueden expandirse, rediferenciarse y sintetizar proteínas específicas de la MEC hialina. En estos casos, el soporte tridimensional puede jugar un papel importante en la ingeniería de tejido cartilaginoso, manteniendo la integridad mecánica, soportando cargas de compresión y cizalla, de tal modo que proporcione un entorno mecánico adecuado a las células. Por tanto, el entorno mecánico también es crucial para el crecimiento y desarrollo del tejido<sup>166</sup>, y para el destino celular<sup>233</sup>, y en particular el mantenimiento del fenotipo de los condrocitos y la secreción de MEC hialina que ha demostrado estar directamente relacionado con la estimulación mecánica<sup>234</sup>.

Por otra parte, el fenotipo de los condrocitos se puede perder durante la expansión en los cultivos monocapa<sup>235</sup>, pero también se ha observado la diferenciación de condrocitos desdiferenciados al regresar a un entorno 3D<sup>236</sup>.

En este contexto, se han probado diferentes materiales biodegradables para su utilización como soportes, entre los que se destacan, el PEG, el ácido poliláctico (PLA), la poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) y sus copolímeros, y que han demostrado poseer buenas cualidades respecto a la adhesión celular, la proliferación y la producción de matriz en una variedad de tipos celulares que incluyen los condrocitos y las células madre mesenquimales<sup>237-240</sup>.

Es de destacar las mezclas de materiales sintéticos con materiales naturales, combinando el uso de dos estructuras diferentes, generando soportes tridimensionales híbridos que poseen buenas propiedades mecánicas y permiten un mejor anclaje para las células<sup>241</sup>. Entre algunos de los ejemplos que podemos encontrar<sup>228,240,242-245</sup>, citar la investigación de Zhao et. al.<sup>246</sup> que encapsuló condrocitos en un gel de fibrina para inmediatamente depositar la mezcla sobre un soporte poroso de ácido poli-L-láctico (PLLA). Como resultados relevantes en dicha investigación, se obtuvo una buena correlación de biocompatibilidad y resistencia mecánica del soporte híbrido.

Otra de las estrategias de la regeneración del cartílago, se basa en la rediferenciación de las células *in vivo*, sin empleo de estimulación mecánica a través de bioreactores, y en la mayoría de los casos sin adición de factores de crecimiento, ya que se espera que lleguen de los tejidos adyacentes. Es el caso de la implantación de condrocitos autólogos directamente en el tejido dañado, previa expansión *in vitro* y sembrados en sustratos tridimensionales, tales como geles en los que las células se encapsulan<sup>247-249</sup>. En este caso, las células se suspenden en una solución que gelifica cuando se inyecta en el lugar del defecto, y así las células inician el proceso de regeneración en un entorno condrogénico similar al caracterizado en las técnicas *in vitro*. Otros tipos de sustratos tridimensionales utilizados en esta estrategia serían los soportes porosos biodegradables<sup>37,50,228,250,251</sup> o polímeros bioestables<sup>80,252-255</sup>, siendo estos últimos en los que se centra en esta tesis y que estarían destinados a implantes a largo plazo.

En este supuesto, la implantación a largo plazo de los biomateriales como el músculo o sustitutos óseos requiere un profundo conocimiento acerca de su comportamiento mecánico cuando se someten a un gran número de ciclos de carga. Hay una intensa literatura sobre el comportamiento de muchos implantes de prótesis, que incluyen pruebas de fatiga bajo diferentes perfiles de carga<sup>256-259</sup>. Estos estudios muestran que varios parámetros característicos del material responden a la relajación de la tensión dinámica o fluencia dinámica dependiendo de forma lineal con el logaritmo del tiempo, lo que permite la extrapolación de experimentos muy largos en el tiempo de un millón de ciclos de carga. Sin embargo el trabajo realizado con respecto a los soportes macroporosos poliméricos biointegrados, está casi ausente, aunque algunos trabajos recientes tratan con los ensayos de fatiga de los soportes macroporosos<sup>260,261</sup>.

Además se están desarrollando otras técnicas que combinan la microfractura del hueso subcondral con el implante de un soporte macroporoso bioestable con buenas propiedades de adhesión, proliferación y viabilidad celular<sup>37</sup>. Estos soportes bioestables pueden evitar la degeneración del cartílago regenerado, lo cual produce la pérdida de funcionalidad con el paso del tiempo que se encuentra frecuentemente en operaciones de microfractura.

Finalmente, la tercera estrategia corresponde a la implantación de soportes tridimensionales porosos acelulares directamente sobre el tejido dañado, con la consiguiente invasión de MSCs procedentes del hueso subcondral<sup>244,254,255</sup>.

En este sentido, se han realizado estudios en un modelo de conejo<sup>157,167</sup>, donde se ha formado una capa de cartílago hialino en la superficie del soporte poroso, perfectamente integrada en la superficie articular. Por otra parte la estructura porosa del soporte tridimensional se rellena completamente de tejido cartilaginoso. La presencia del soporte poroso asegura la funcionalidad del conjunto soporte-tejido regenerado e induce y mantiene la organización del cartílago hialino.

Se han utilizado diferentes modelos animales para probar los diferentes enfoques de la regeneración del cartílago articular. Entre ellos es a destacar, los que utilizan el modelo de conejo (más usuales los de Nueva Zelanda), en cuyos procesos de reparación producen resultados con relativa rapidez. Algunos estudios<sup>262,263</sup> han demostrado una mínima respuesta inmunológica cuando se les trasplantaban condrocitos alógenos a los conejos de tipo estándar. En los últimos años también se han estudiado el uso de scaffolds sembrados con condrocitos de conejo, que se implantan de forma subcutánea o en los defectos del cartílago, lo que demuestra la biocompatibilidad, la diferenciación y la expresión de genes específicos de los condrocitos<sup>240,264–266</sup>.

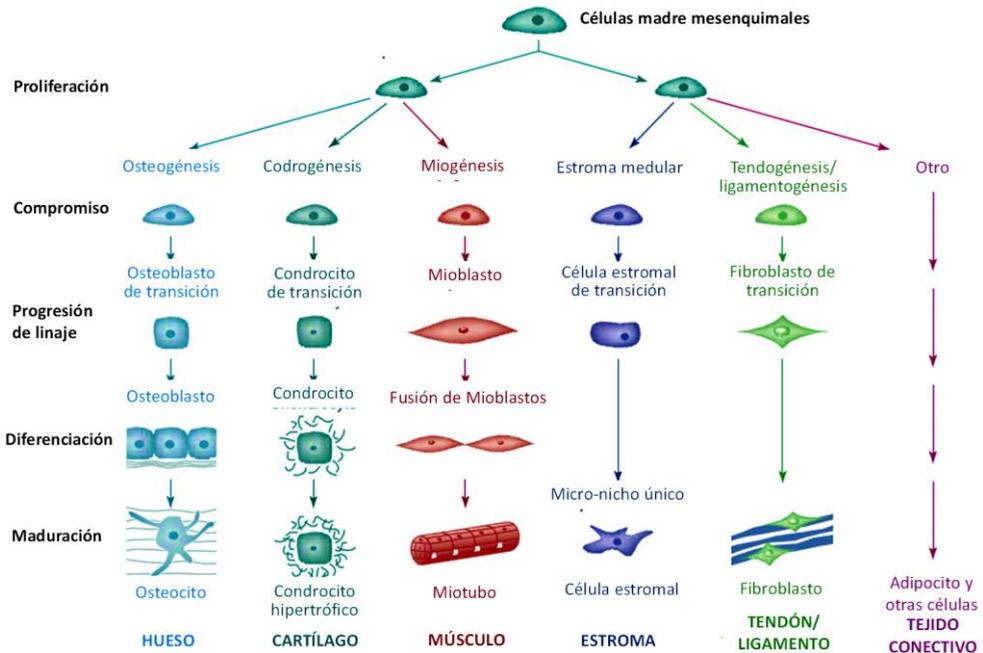
### 1.3 Células madre mesenquimales.

Las estrategias de ingeniería tisular aplicadas a medicina regenerativa, incluyen la utilización de soportes o biomateriales, factores de crecimiento y aporte de células. Un aspecto importante en las terapias para promover la regeneración o biointegración de implantes, es el componente celular.

El papel de las células, consiste en colonizar el soporte tridimensional, diferenciarse de manera adecuada si es el caso, y sintetizar una nueva MEC en los poros del soporte y en los espacios que este vaya dejando a medida que se degrade, o para facilitar la integración de una prótesis con los tejidos circundantes. Este proceso puede realizarse con diferentes estrategias, pero se ha de lograr de una manera reproducible y controlada; puede producirse directamente *in vivo* de manera que los soportes porosos, diseñados con propiedades físico-químicas específicas, puedan implantarse directamente en el tejido deseado o lugar a implantar, y colonizarse por células, o por el contrario, puede inducirse la expansión *in vitro* de células, extraídas o no del paciente, su siembra en dicho soporte poroso, con capacidad de dirigir la función celular<sup>267</sup>, para finalmente cuando madura ser implantado en el cuerpo para regeneración o como prótesis<sup>268</sup>.

Las células pueden integrarse en dos grupos: las células diferenciadas y las células troncales. Las células troncales o células madre, poseen la ventaja de su potencial a diferenciarse en diversos tipos celulares, capaces de sintetizar las matrices de distintos tejidos<sup>269</sup>, más concretamente, las células madre adultas o mesenquimales,

han adquirido gran importancia en el campo de la ingeniería tisular, tras su aislamiento de la médula ósea<sup>270,271</sup> y su descripción como células adherentes de morfología fibroblastoide (de fibroblasto), multipotenciales capaces de regenerarse y de diferenciarse *in vivo* o *in vitro* hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos<sup>219,270–273</sup> (ver Figura 1.6) y que además pueden multiplicarse *ex vivo*, manteniendo su estado de indiferenciación. Asimismo se caracterizan por su facilidad de aislamiento y expansión, multipotencia, adherencia al plástico y capacidad migratoria hacia zonas lesionadas. Su potencial diferenciador y auto renovador ha sido evaluado en distintos estudios<sup>274,275</sup>.



**Figura 1.6** Proceso de diferenciación de las células madre mesenquimales provenientes de la médula ósea en múltiples linajes mesodérmicos<sup>276</sup>.

Así pues, las MSCs derivadas de la médula ósea, pueden ser cultivadas en soportes macroporosos<sup>277</sup>, en medio de diferenciación, o expandidas, manteniendo su pluripotencialidad, para ser utilizadas en la regeneración de tejidos<sup>278</sup>, o para facilitar la integración de una prótesis con los tejidos circundantes.

Por otra parte, el componente celular del estroma corneal se compone principalmente de queratocitos, células mitóticamente quiescentes, con morfología plana y dendrítica, que secretan colágenos y proteoglicanos como el keratan sulfato<sup>279</sup>, dando lugar a la estructura transparente característica de la córnea. El uso de queratocitos humanos autólogos presenta importantes inconvenientes a destacar, como daños en la córnea del donante, bajo número de células, e ineficiente subcultivo de células<sup>219</sup>.

En los últimos años, la investigación se ha centrado en la búsqueda de una fuente de células extraoculares autólogas, que podrían utilizarse para ingeniería tisular de la córnea<sup>273,280</sup>.

Las células madre limbares son responsables de la renovación y reparación del epitelio corneal, y se localizan en la zona que hay entre la córnea y la conjuntiva bulbar, de manera que son capaces de migrar hasta las zonas dañadas. Por ello, se ha investigado sobre el cultivo de células madre limbares, para su utilización en regeneración de córnea<sup>281</sup>. Pero recientemente, se ha demostrado que las MSCs derivadas del tejido adiposo adulto, h-ADAS, son una fuente ideal de células madre, que se puede utilizar de forma autóloga, además de, su fácil accesibilidad a los tejidos y elevada eficiencia de

recuperación celular. Poseen el mismo potencial de diferenciación que las MSCs de la médula ósea, con lo que se pueden obtener MSCs en mayores cantidades y mediante métodos menos invasivos, para su uso en ingeniería tisular<sup>282,283</sup>. Además, las h-ADAS proporcionan la ventaja de que evitan los problemas éticos que presentan las células madre embrionarias. Estas células también han mostrado propiedades inmunomoduladoras en escenarios sinérgicos, alérgicos e incluso xenogénicos<sup>284–286</sup>.

En un estudio previo<sup>273</sup>, se encontró que las h-ADAS, trasplantadas en las córneas dañadas de conejos, fueron capaces de diferenciarse funcionalmente en queratocitos corneales adultos. Las h-ADAS también produjeron colágenos y proteoglicanos en el estroma corneal anfitrión; sin embargo, la producción de colágeno fue insuficiente para la restauración del espesor de la córnea y la transparencia.

Como parte del propósito de esta tesis, y comentado en el apartado anterior, las h-ADAS serán utilizadas para su diferenciación en células de la córnea, como queratocitos<sup>273</sup>, y así generar tejido funcional en el interior del soporte macroporoso que compone el sistema de anclaje de la prótesis de córnea, lo que facilitará la integración de éste en el tejido circundante.

La capacidad reparadora de las MSCs en tejidos lesionados, se ha atribuido en gran medida a su implantación y diferenciación celular<sup>287,288</sup>. Trabajos recientes, sugieren un mecanismo alternativo de reparación denominado efecto paracrino de las MSCs, que plantea el hecho de que tanto los factores de crecimiento, citoquinas y

moléculas de señalización secretadas por las MSCs, que estimulan al resto de las células locales, son suficientes para ejercer efectos terapéuticos al activar vías que promueven la angiogénesis y regeneración tisular, e inhibir ciertos problemas asociados como la fibrosis, apoptosis e inflamación<sup>289-293</sup>. Con resultados muy positivos se emplean estas células en quemados, y en lesiones cutáneas secundarias debidas a radioterapia, donde se ha podido constatar la regeneración epitelial. Estas aplicaciones clínicas están basadas en la plasticidad de las células mesenquimales y su potencial poder antiinflamatorio e inmunomodulador<sup>294-298</sup>. Se están realizando diferentes estudios para su utilización en la cicatrización de heridas entre otras, ya sea mediante una administración sistémica o por aplicación tópica en el sitio de la herida.

Por ello, se plantea en esta tesis, la idea de utilizar el efecto paracrino de las MSCs, de manera que se colocarían en el interior de una lámina-membrana porosa polimérica, para que liberen factores de crecimiento y ayuden a la reparación de úlceras corneales o en regenerar daños en los tejidos epiteliales, y en heridas de carácter crónico además aceleren la reparación del tejido, amortigüen los eventos inflamatorios y para reducir o eliminar la formación de cicatrices.

## 1.4 Adhesión celular y fijación de proteínas en los sustratos.

La adhesión celular en la superficie del material es el primer paso del proceso de regeneración o biointegración y juega un papel fundamental en el posterior crecimiento celular, diferenciación, viabilidad y expresión del fenotipo<sup>299</sup>.

En muchas aplicaciones de la ingeniería tisular, la adhesión celular en los biomateriales es crítica. La falta de lugares reconocibles por las células en los materiales (secuencia de péptidos que está preparada para ser reconocida por la célula) produce que éstas no se adhieran directamente a la superficie de los mismos. En muchos casos, esta problemática se solventa a través de un pretratamiento o acondicionamiento que permite funcionalizar la superficie de los soportes y así promover el proceso de adhesión celular, es decir, las células se adhieren a través de proteínas (mediadoras de la adhesión) adsorbidas en segundos en los soportes, a partir de fluidos fisiológicos *in vivo* o medios de cultivo *in vitro*. Por tanto, la adhesión celular y la posterior respuesta del material sintético están mediadas por la capa de proteínas que se adsorben en su superficie.

De hecho, las células cultivadas en un sustrato o en un implante sin acondicionamiento previo, no consiguen contacto directo con ninguno de ellos, pero sí interactúan con las proteínas que previamente se han adsorbido sobre su superficie<sup>300-302</sup>.

Las propiedades físico-químicas del material, incluyendo la topografía, estructura química y la energía superficial, modulan la adsorción de proteínas, el estado de las proteínas adsorbidas (conformación, densidad superficial y la fuerza de interacción de enlaces intramoleculares), el alcance de la respuesta celular y en ocasiones determina la biocompatibilidad del sistema<sup>303</sup>. En consecuencia, estas propiedades juegan un papel importante en la determinación del diseño del biomaterial<sup>300,304-308</sup>.

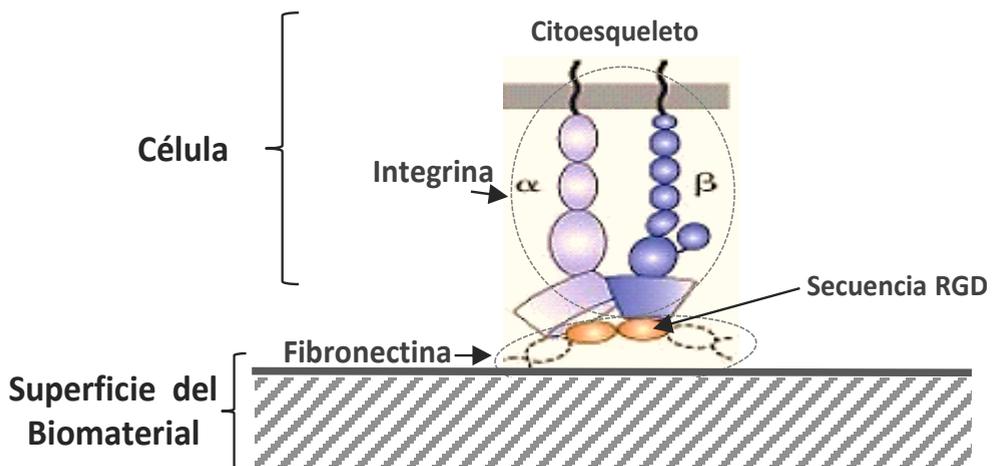
La comprensión de la interacción entre las proteínas y las superficies de los materiales es crítica, y el control de esta interacción es un factor importante a considerar en el diseño de superficies biocompatibles.

Por tanto, y teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, la adsorción de proteínas sobre la superficie de un biomaterial es un proceso complejo y dinámico. Este proceso está controlado por las condiciones del entorno, como por ejemplo el pH y la temperatura; las propiedades de la proteína, la distribución y la densidad superficial, entre otras; y las propiedades de la superficie del material<sup>300</sup>. Además, la cantidad y la conformación de las proteínas adsorbidas, afecta a diferentes funciones celulares, incluyendo la adhesión, la difusión, la migración y la diferenciación.

La adhesión celular a las proteínas adsorbidas, está mediada principalmente por los receptores de integrinas, siendo esta una familia de receptores transmembrana heterodiméricos, que se unen a las secuencias de adhesión presentes en diversas proteínas de la matriz

extracelular, incluyendo la fibronectina, vitronectina, laminina y colágeno<sup>309</sup>.

Las integrinas proporcionan los vínculos entre la matriz extracelular (proteínas), y el citoesqueleto de actina (célula)<sup>310</sup>, y desencadenan la respuesta celular posterior, es decir, por un lado, las integrinas se agrupan desarrollando un aglomerado de distintas proteínas, llamados adhesiones focales, las cuales anclan las células a la superficie del sustrato, y después regulan muchos aspectos de la actividad celular<sup>311</sup>, el proceso de adhesión o interacción célula-proteína-biomaterial (Figura 1.8).



**Figura 1.8** Esquema de la interacción célula-proteína y el biomaterial<sup>312</sup>.

Varios estudios han mostrado diversas respuestas celulares sobre sustratos con distintas químicas superficiales. De ellos, se obtuvo que la química superficial modificaba las cinéticas de adsorción y la estructura de la FN adsorbida<sup>313</sup>, modificando la presentación funcional del dominio de unión a integrina de la FN. De este modo, se altera la unión con la integrina y se promueve la resistencia a la adhesión celular<sup>314,315</sup>. También se ha estudiado la conformación de la FN sobre diferentes sustratos, entre ellos el PEA<sup>316-318</sup>, mostrando que dicho polímero inducía fibrilogenesis en ausencia de actividad celular. Se cree que este es el proceso que hace que el PEA posea un buen rendimiento tanto en cultivo monocapa como en tridimensional de diferentes tipos celulares, como las células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC), células epiteliales conjuntivales, fibroblastos, condrocitos y osteoblastos<sup>37,121,319</sup>.

El PEA es un polímero hidrófobo y la copolimerización con más comonomeros hidrófilos se ha utilizado para mejorar la humectabilidad<sup>37,50,51,319</sup>. Un cierto grado de humectabilidad y de hidrofiliidad, tal como se comentó anteriormente, son requisitos fundamentales para los materiales utilizados como soportes de cultivo celular, o vehículos para el trasplante de células que favorecen la siembra celular, especialmente en los soportes porosos tridimensionales, y la permeación del agua.

## **Capítulo 2. Objetivos**



La presente tesis tiene como objetivo principal el desarrollo de membranas finas porosas, bioestables basadas en los copolímeros de poli acrilato de etilo, que puedan ser empleadas para el trasplante al organismo de células en terapias de medicina regenerativa, concretamente en regeneración de tejidos epiteliales de piel, epitelio corneal o mucosa oral o bien como anillo de anclaje biointegrable de prótesis de córnea.

En todas estas aplicaciones, se trata de obtener un material fino y flexible, con la suficiente porosidad para ser sembrado con células o ser invadido por las células de tejido circundante y al mismo tiempo con suficiente resistencia mecánica para que pueda ser suturado o pueda resistir las sollicitaciones mecánicas a las que será sometido *in vivo*.

Con este fin, se ha desarrollado un método original para crear una arquitectura porosa, con poros interconectados y que forman una malla tridimensional, fina y resistente.

Por tanto, para alcanzar el objetivo propuesto, el estudio incluye inicialmente una caracterización morfológica y mecánica que permita asegurar la viabilidad de las membranas macroporosas de copolímeros de poli acrilato de etilo obtenidas. Para evaluar la respuesta biológica, el estudio se ha centrado en la siembra, previo recubrimiento con proteínas, sobre los distintos materiales de células mesenquimales de médula ósea o derivadas de tejido adiposo, además del análisis de la capacidad de penetración en los poros al sembrarlas en la superficie del material, de la viabilidad y la capacidad de proliferación en medio de cultivo en expansión.

Finalmente, el estudio de la respuesta *in vivo* se centra en la aplicación como anillo de anclaje de una prótesis de córnea. Se pretende demostrar que el material poroso en forma de membrana puede integrarse con la lente de una queratoprótesis formando una sola pieza, prototipo de prótesis de córnea que se ha desarrollado, y que implantada la membrana en un modelo de córnea de conejo no genera respuesta adversa y puede ser invadida por tejido corneal, de manera que las células alojadas en el interior de los poros desarrollen el fenotipo de los queratocitos del estroma corneal y sinteticen una matriz extracelular que forme un continuo con el estroma corneal. En membranas desarrolladas como implantes, se pretende observar el efecto de la pre-siembra con células mesenquimales de tejido adiposo.

## **Capítulo 3. Materiales y métodos**



En este capítulo se describen las técnicas experimentales utilizadas en la preparación y caracterización de la serie de copolímeros de PEA desarrollados. Inicialmente se sintetizaron redes de estos copolímeros en forma de láminas no porosas, se caracterizaron física y térmicamente, y se utilizaron como muestras controles en distintas caracterizaciones biológicas *in vitro* y en un estudio de biofuncionalización con proteínas. También, se fabricaron y caracterizaron física, morfológica y mecánicamente, una serie de soportes de copolímeros de PEA en forma de membranas macroporosas colapsadas, que han sido utilizadas también en las distintas caracterizaciones biológicas *in vitro* e *in vivo* y, en la obtención de un prototipo de prótesis de córnea. Finalmente, se prepararon soportes macroporosos no colapsados con distinto grado de entrecruzamiento cuya morfología y propiedades mecánicas fueron evaluadas.

### **3.1 Síntesis de los materiales**

#### **3.1.1 Obtención de láminas no porosas de copolímeros de PEA**

Se han preparado dos series de 7 redes de polímeros en forma de láminas no porosa, “films”, mediante polimerización radical de una solución de monómero de EA (Sigma-Aldrich, 99% de pureza), con HEA (Sigma-Aldrich 96% de pureza), AAc (Scharlab 99% de pureza), o MAAC (Scharlab 99% de pureza), utilizando un 1% en peso de etilenglicol dimetacrilato (EGDMA; Sigma-Aldrich 99% de pureza)

como agente entrecruzante y 0.5% en peso de benzoina (Scharlab 98% de pureza) como fotoiniciador de la reacción. Los monómeros se utilizaron tal como se recibieron, sin purificación adicional.

Una vez homogeneizadas las mezclas de los comonómeros en las proporciones deseadas (Tabla 3.1), junto con el entrecruzante e iniciador, se inyectaron en moldes transparentes formados por dos placas de vidrio separadas por un cable fino en una de las series de 1 mm y en la otra serie de 0.5 mm de diámetro y se polimerizaron a temperatura ambiente bajo luz ultravioleta (potencia de 8 W y distancia de 15 cm), UV, un mínimo de 12 horas. Las láminas producidas no poseen una conversión total del monómero, por lo que se les aplicó un tratamiento de post curado o post-polimerización térmica a 90°C durante 24 horas.

**Tabla 3.1** Composición de las redes de copolímeros.

Referencias	EA (% en peso)	HEA (% en peso)	AAc (% en peso)	MAAc (% en peso)
PEA	100	0	0	0
PEA-HEA10	90	10	0	0
PEA-HEA20	80	20	0	0
PEA-AAc10	90	0	10	0
PEA-AAc20	80	0	20	0
PEA-MAAc10	90	0	0	10
PEA-MAAc20	80	0	0	20

Tras la polimerización, las láminas se sumergieron en etanol absoluto hirviendo, realizando cambios de solvente cada 24 horas, completando 3 ciclos de lavados de 24 horas cada uno, para la extracción de las sustancias residuales de bajo peso molecular de las muestras en particular monómero no reaccionado y catalizadores.

Finalmente, las láminas se secaron a temperatura ambiente durante 48 horas, y vacío a la temperatura de 60°C hasta alcanzar peso constante, es decir, hasta la eliminación completa de solventes. Las láminas resultantes fueron de 0.5 o 1 mm de espesor según los ensayos a realizar.

Así mismo, siguiendo este mismo protocolo, se han sintetizado láminas no porosas con la disolución homogénea de los monómeros de EA y HEA en proporción 90/10 respectivamente, con distintos porcentajes de entrecruzante, 1%, 3% y 5% en peso de EGDMA, y 0.5% en peso de benzoina. Las láminas obtenidas presentaron un espesor final de 1mm. Para la identificación de estas muestras, se le asignó la siguiente nomenclatura: COP-1-np, COP-3-np y COP-5-np respectivamente.

Todas las láminas no porosas que se obtuvieron presentaban una superficie lisa y plana.

### **3.1.2 Obtención de membranas macroporosas colapsadas de copolímeros de PEA**

Se han preparado 2 series de redes de copolímeros de PEA, en forma de membranas macroporosas colapsadas utilizando la combinación de dos métodos: la técnica de plantillas<sup>77,80,253</sup>, obteniéndose el soporte macroporoso sin colapsar de poros interconectados, y la técnica de colapso de poro anisotrópico en una única dirección (transversal), para la obtención de membranas finas. Estas redes de membranas macroporosas obtenidas fueron de PEA, PEA-HEA10, y PEA-AAc10 para la primera serie y PEA, PEA-HEA10, PEA-HEA20 para la segunda serie.

Las plantillas se han preparado por la sinterización de microesferas de PMMA (Colacryl DP 300; Lucite International, Reino Unido) con diámetro entre 80 y 120  $\mu\text{m}$  (diámetro medio de 90  $\mu\text{m}$ , obtenido como tamaño aproximado de los poros del soporte macroporoso resultante). Las microesferas de porógeno se colocaron en un molde de metal (placa de acero), y se sometieron a sucesivas compresiones con determinados parámetros de procesado (ver Tabla 3.2), en una prensa de platos calientes (CUMIX TO-250/20), obteniéndose una plantilla en forma de lámina, de aproximadamente 2.3 mm de espesor en el caso de las preparadas para obtener las membranas de la primera serie, y de 2 mm de espesor para las de la segunda serie, ambas con una adecuada interconexión de las partículas de PMMA, y que nos sirve como base para obtener las membranas macroporosas. Debido a la transmisión de calor para obtener las planti-

llas de PMMA, se formó una capa de esferas fundida en su superficie, que se eliminó lijando con bisturí, para poder permitir la entrada de la solución de monómeros en la misma. Las mezclas de monómeros de diferentes composiciones, que contenían 1% en peso de EGDMA como agente entrecruzante, y 0.5% en peso de benzoina como fotoiniciador, se inyectaron en los huecos de la plantilla.

**Tabla 3.2** Parámetros de procesado en la obtención de la plantilla de PMMA

Referencias	Compresión I	Compresión II	Compresión III
Temperatura (°C)	150	150	150
Presión (bar)	100	100	200
Tiempo	8 minutos	4 minutos	25 segundos

Una vez colocadas las plantillas impregnadas con las distintas disoluciones de copolímeros en moldes transparentes (como los utilizados en la síntesis de las láminas no porosas, y cuya separación de placas se realiza en este caso con un hilo de 2.5 mm de diámetro), se introdujeron en la cámara de UV y se polimerizaron por vía radical a temperatura ambiente y bajo luz UV, durante un mínimo de 12 horas, tras las cuales se les realizó un post curado en estufa a 90°C durante 24 horas para la total conversión del monómero.

Tras el proceso de post curado, las plantillas se lavaron en un disolvente adecuado que en este caso fue la acetona, sumergiendo las muestras y manteniéndolas en agitación constante a temperatura ambiente, realizándose varios cambios de solvente, completando 4 lavados de 24 horas cada uno, para eliminar totalmente el porógeno, y obtener un soporte macroporoso sin colapsar de apariencia transparente, frágil y muy hinchado en acetona sobretodo en el caso de las redes que contenía el HEA.

En este momento, se comenzó con la técnica del colapso del poro, mediante la evaporación a vacío de la acetona que contienen las distintas redes, controlando el colapso de los poros hasta la etapa final (parada del colapso), donde se produjo un intercambio de acetona con agua de forma que se obtuvo una membrana macroporosa de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de espesor. Las membranas macroporosas obtenidas se secaron bajo campana, en recipiente cerrado (evitando así la deposición de partículas del ambiente sobre las membranas) y a temperatura ambiente, durante varios días hasta su total secado.

El procedimiento llevado a cabo del colapso del poro, hace novedosa esta metodología de obtención de mallas tridimensionales con poros interconectados. Este proceso se perfeccionó en el caso de las membranas de copolímeros de PEA-HEA10, tal y como se comenta a continuación.

Se han sintetizado membranas macroporosas colapsadas del copolímero de PEA-HEA10, con distintos porcentajes de entrecruzante. El protocolo seguido para su obtención ha sido similar al comentado anteriormente, con algunas variaciones en el mismo.

Como se va a explicar de manera más detallada en los siguientes párrafos, el primer paso en la síntesis de las membranas macroporosas colapsadas que se ha seguido en este caso, es la obtención de plantillas de sinterizado de esferas de PMMA, en las que se ha polimerizado con la disolución correspondiente, para generar un soporte tridimensional macroporoso no colapsado (soporte macroporoso de partida), con una estructura interconectada tridimensional de poros esféricos y abiertos. Estos soportes macroporosos de partida, se han cortado en láminas de diferentes espesores, para finalmente colapsarse a través de su hinchamiento en acetona, con posterior secado, y cambio de solvente por agua, hasta obtener las membranas macroporosas requeridas de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de espesor.

### ***Fabricación de las plantillas de PMMA***

Las plantillas se han preparado por la sinterización de microesferas de PMMA, siguiendo la técnica de plantilla expuesta anteriormente. Se han obtenido plantillas en forma de láminas de unos 2 mm de espesor, con interconexión adecuada de las partículas de PMMA, debido al proceso de sucesivas compresiones a 150°C, a las que se han sometido las microesferas en una prensa de platos calientes.

### ***Síntesis y obtención del soporte macroporoso de partida***

Las distintas redes de los copolímeros, se obtuvieron por polimerización in situ (polimerización a temperatura ambiente bajo luz ultravioleta, y post curado a 90°C durante 24 horas) de las mezclas de EA, y HEA en la proporción 90/10 en peso respectivamente, usando EGDMA como agente entrecruzante al 1, 3 y 5% en peso, y 0.5% en peso de benzoina como fotoiniciador, tras inyectarse en los huecos de la plantilla y colocarse en moldes transparentes (separación de placas con hilo de 2.5 mm de diámetro). Las placas poliméricas producidas, se lavaron en acetona para eliminar el porógeno, PMMA, y como resultado se obtuvieron soportes macroporosos transparentes, frágiles y muy hinchados en acetona.

Para conseguir el soporte macroporoso tridimensional de partida, de unas 1500µm de espesor, se realizó un intercambio de la acetona del interior de la red polimérica por agua. Este proceso, se llevó a cabo de manera paulatina, debido a las diferencias de hinchamiento del soporte macroporoso en los dos solventes, que provocarían una contracción muy rápida, derivando en una deformación irreversible del soporte, si se produce un intercambio rápido. Una vez finalizado el intercambio de solventes, el soporte macroporoso se dejó lavando en agua durante 24 horas, para la eliminación de cualquier resto de acetona.

El soporte lavado, de color blanco y de menor tamaño (1500µm de espesor) respecto a la plantilla polimerizada (2mm), se secó hasta la eliminación completa de agua; inicialmente, se realizó en un reci-

piente cerrado pero no sellado, y en condiciones ambientes durante 48 horas, y posteriormente se produjo a vacío y con temperatura (50°C), durante otras 48 horas. El proceso de secado debe ser total, de manera que los soportes puedan ser incluidos en parafina, para su posterior corte en láminas de distinto espesor, que serán colapsadas hasta la obtención de las membranas macroporosas deseadas.

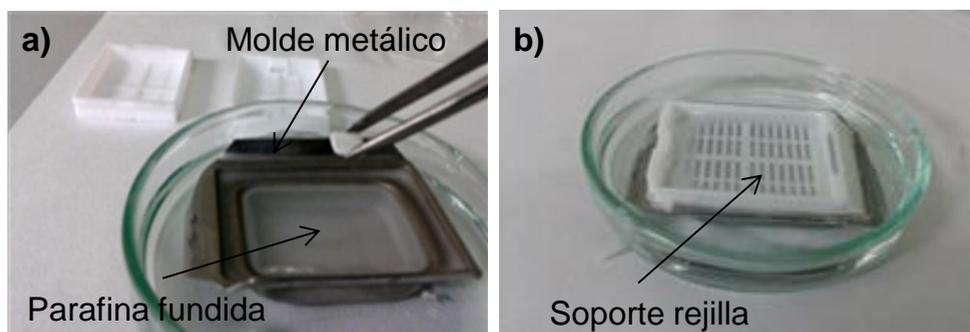
Para la identificación de este tipo de soporte macroporoso de partida, se le asignó la siguiente nomenclatura: COP-X, donde X es el porcentaje de entrecruzante (X=1, 3 y 5 porcentaje de EGDMA).

### ***Corte del soporte macroporoso de partida en láminas de distintos espesores***

Los distintos soportes tridimensionales macroporosos de partida, se cortaron en un micrótopo de rotación MICROM HM 350 SV, para obtener láminas con diferente grosor, 180 µm, 300 µm y 500 µm, siempre muy por debajo del espesor inicial (1500µm), con el objetivo de minimizar las zonas de solape de trabéculas tras el colapso del poro.

Para realizar el proceso de corte en micrótopo, inicialmente los soportes macroporosos se procesaron a la dimensión de 16x6 mm, y se incluyeron en parafina (Paraplast Plus (Tissue embedding medium). Tyco/Healthcare Group L.A) fundida durante 1 hora en condiciones de vacío, con extracción continua y temperatura controlada, para que la parafina penetrara al interior de la red macroporosa, y

podiera ser cortado a los distintos espesores. La temperatura del proceso debe ser la mínima necesaria para mantener la parafina fundida, en este caso 62-63°C, y así evitar su degradación. A continuación, se colocó la muestra embebida en parafina, en el fondo de un molde metálico del micrótom, que contenía parafina fundida (Figura 3.1a), y se dejó enfriar. Una vez enfriado el conjunto de parafina-muestra, se añadió nuevamente parafina fundida hasta enrase del molde, y se colocó el soporte-rejilla para micrótom (Figura 3.1b). Finalmente, cuando la muestra se había enfriado, inicialmente a temperatura ambiente y después en congelador a -20°C, para poder obtener un corte limpio y preciso, se desmoldó el conjunto soporte-rejilla-muestra del molde metálico, y se procedió a realizar los cortes de la muestra en el micrótom.



**Figura 3.1** (a) colocación de la muestra en el molde metálico, y (b) colocación del soporte rejilla y enfriamiento del conjunto parafina-muestra-rejilla.

Tras el corte del soporte de partida en láminas de diferentes espesores, se procedió a eliminar la parafina, y así poder colapsarlas. Pri-

mero, se hicieron dos lavados con xileno (Scharlab, mezcla de isómeros, grado de síntesis) para eliminar la parafina, de 24 horas cada uno, y finalmente, se produjo un intercambio de xileno por acetona, de manera paulatina, evitando así el pliegue de las muestras.

Las láminas que se obtuvieron, inmersas en acetona, son muy frágiles y finas, por lo que se manipularon con especial cuidado para prevenir daños que posteriormente pudieran repercutir en las distintas caracterizaciones a realizar.

### ***Procedimiento de colapso de las membranas macroporosas***

A partir de las láminas macroporosa obtenidas con 4 espesores de partida (1500  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$  y 180  $\mu\text{m}$ ), y para cada uno de los 3 tipos de porcentaje de entrecruzante, se procedió a colapsar todas ellas, por evaporación de la acetona que contiene la red y posterior parada del colapso a las 100 $\mu\text{m}$  de espesor aproximado, obteniéndose membranas macroporosas colapsadas, con una relación de colapso (R, cociente entre el espesor inicial de la membrana y el espesor final que siempre fue de 100  $\mu\text{m}$ ) de 15, 5, 3 y 1.8 respectivamente.

Las láminas hinchadas en acetona, se colocaron extendidas en un recipiente de teflón, para evitar que las muestras se pegaran, y se procedió a la evaporación de la acetona a temperatura ambiente, bajo campana, y tapadas pero no herméticamente. Durante este proceso de colapso, se fue comparando visualmente, la disminución del espesor de la lámina hinchada, con una galga de 100  $\mu\text{m}$  de es-

pesor, y cuando las láminas alcanzaron de manera aproximada las 100  $\mu\text{m}$  de espesor, se paró el colapso mediante la adición de una serie de diluciones acetona-agua (ac-ag) con distintas proporciones cada una (ac-ag 85/15, ac-ag 75/25, ac-ag 50/50, y ac-ag 25/75). La parada del colapso comenzó con la dilución de mayor contenido de acetona, y se continuó con diluciones con más volumen de agua cada vez. La incorporación de las distintas diluciones sobre las láminas se realizó en intervalos de 3 minutos entre ellas. Finalmente, se lavaron sólo con agua durante 10 minutos, para eliminar cualquier resto de acetona. Las membranas macroporosas obtenidas se dejaron secar bajo campana (en recipiente cerrado) varios días hasta su secado total.

En la obtención de las redes de membranas macroporosas colapsadas de PEA, PEA-HEA10, PEA-HEA20, y PEA-AAc10, inicialmente si se deja evaporar toda la acetona que contiene la lámina, la estructura no se sostiene y en algunas zonas, el poro se tapa completamente, solapándose unas trabéculas con otras. Este hecho, motivó la incorporación del nuevo proceso de parada de colapso, además de que en el último paso cuando las láminas prácticamente habían llegado al espesor de 100  $\mu\text{m}$ , en un primer intento se adicionó directamente agua sin haber añadido las diluciones de ac-ag, provocando una contracción acelerada, y pliegue de las láminas macroporosas, quedando arrugadas, de espesor superior a las 100 $\mu\text{m}$  y en algunos casos endurecidas.

Por tanto, cuanto mayor ha sido el número de diluciones ac-ag (4 en nuestro caso y con resultados óptimos), menos daño y contracción repentina sufrió la muestra.

La nomenclatura asignada a este tipo de membranas macroporosas colapsadas fue: COP-X-R, siendo X es el porcentaje de entrecruzante (X=1, 3 o 5 porcentaje de EGDMA), y R la relación de colapso (R=15, 5, 3 o 1.8).

Para los distintos ensayos y estudios a realizar sobre las muestras, se han seleccionado aquellas membranas macroporosas colapsadas cuyo espesor final se encontraba dentro del rango de 90-110  $\mu\text{m}$  y que no presentaban daños que pudieran afectar a los resultados, condiciones que cumplían la mayoría de las membranas obtenidas.

### ***Preparación y esterilización de los distintos materiales***

Las muestras obtenidas de las láminas no porosas y de las membranas macroporosas, sobre las que se realizaron las distintas caracterizaciones físicas, térmicas y mecánicas, no precisaron esterilización y se procesaron en forma de tiras con las dimensiones adecuadas que se requerían en cada uno de estos ensayos.

En el caso de las muestras destinadas a los distintos estudios biológicos *in vitro* e *in vivo* (láminas no porosas y membranas macroporosas), se acondicionaron y esterilizaron, de manera que, inicialmente se colocaron en una solución salina fosfatada de Dulbecco (Sigma-Aldrich), DPBS 1x, durante 48 horas, para comprobar la estabilidad

del material, es decir, por un lado comprobar que el material en el caso de que hinchasen en los procesos de cultivo cabría en los pocillos, y por otro que no sufrieran cambios estructurales en el proceso de hinchado (en los estudios biológicos *in vitro* e *in vivo*). Todas estas muestras, se troquelaron en discos de 5 mm de diámetro, y se lavaron en agua, con baño de ultrasonidos, para eliminar cualquier resto de suciedad derivada de la manipulación de las muestras, pudiendo interferir en los distintos estudios biológicos.

Finalmente se dejaron secar, se embolsaron a vacío, y se esterilizaron con radiación gamma a una dosis de 25 kGy.

### **3.1.3 Obtención de soportes macroporosos no colapsados de copolímero de PEA-HEA10**

Por último, se han sintetizado soportes macroporosos no colapsados con la misma disolución homogénea de los monómeros de EA y HEA en proporción 90/10 respectivamente, con distintos porcentajes de entrecruzante, 1%, 3% y 5% en peso de EGDMA, y 0.5% en peso de benzoina. Para ello se ha seguido el procedimiento de plantillas y de síntesis y obtención del soporte macroporoso de partida descrito anteriormente, sin realizar el proceso de colapso del poro. Para la identificación de este tipo de soporte macroporoso no colapsado, se le asignó la siguiente nomenclatura: PEA-HEA10-X, donde X es el porcentaje de entrecruzante (X=1, 3 y 5 porcentaje de EGDMA).

## 3.2 Técnicas experimentales de caracterización de los materiales

### 3.2.1 Angulo de contacto del agua (WCA)

Para caracterizar el grado de humectabilidad de las superficies de las siete redes de polímeros de PEA en forma de láminas no porosas y de las membranas macroporosas colapsadas de PEA, PEA-HEA10 y PEA-AAc10, se midió el ángulo de contacto del agua, que se define como el ángulo formado por una pequeña gota de agua en contacto con una superficie sólida, y que determina el carácter hidrófilo de la superficie.

Se empleó un dispositivo Dataphysics OCA 20 (Alemania), para determinar las diferencias en el WCA estático de los distintos copolímeros como consecuencia de la presencia de grupos hidroxilo o carboxilo en su superficie.

Los ensayos se realizaron en condiciones ambiente de temperatura y presión<sup>320</sup>. El volumen de la gota de agua depositada sobre la superficie de la lámina y la membrana fue de 10 $\mu$ L, y las mediciones se realizaron tras 10 segundos de contacto agua-sustrato, obteniéndose el promedio de seis medidas (3 réplicas por cada copolímero y dos mediciones por réplica).

### **3.2.2 Ensayo de absorción de agua**

Sobre las siete redes de copolímeros de PEA en forma de láminas no porosas, se realizó el ensayo de adsorción de agua a equilibrio por pesada, para determinar el grado de hinchamiento de las mismas. Las muestras de las láminas, se sumergieron en agua líquida a 37°C hasta alcanzar peso constante.

A través de la pesada de las muestras a diferentes tiempos de inmersión hasta equilibrio (10000 minutos), se determinó el contenido de agua en equilibrio ( $CA_{eq}$ ) expresado en base al polímero seco como:

$$CA_{eq} = \frac{w_{agua}}{w_{polimero\ seco}}$$

donde  $w_{agua}$  es el peso de la muestra tras cada tiempo de inmersión y  $w_{polimero\ seco}$  el peso de la muestra seca.

### **3.2.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

Para determinar si la distinta reactividad de los monómeros induce una separación de fases en la red de copolímero formada, se han realizado ensayos térmicos de DSC. El DSC es una técnica analítica en la que se mide el flujo de calor, entre la muestra y la referencia (material inerte), en función del tiempo y la temperatura, estando ambas expuestas a un ambiente controlado de temperatura, atmósfera y presión.

Los ensayos de DSC, se han realizado tanto en muestras de láminas no porosas secas como en muestras húmedas, utilizando un dispositivo Mettler-Toledo DSC 823E, trabajando bajo atmósfera de nitrógeno, y a velocidad de flujo de 600ml/min. Se pesaron muestras que variaban entre los 5 y los 10 mg de peso. Tanto las muestras secas como las muestras hinchadas en agua hasta equilibrio, se colocaron y cerraron herméticamente en recipientes de aluminio. Las muestras se sometieron a ciclos con un régimen de temperatura lineal, que fue de -60 a 150°C para las muestras secas, mientras que el rango de temperatura en los ciclos para las muestras húmedas fue desde -80 hasta temperatura ambiente; a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Para eliminar la historia térmica de las muestras, se realizaron dos ciclos de calentamiento, para cada lote de muestras, con un ciclo de enfriamiento a 40°C entre ambos.

De los termogramas de DSC obtenidos, y a partir de la temperatura del punto de inflexión, se han determinado las temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ), de cada una de las láminas no porosas.

### **3.2.4 Caracterización microestructural**

La microestructura y morfología superficial de todas las membranas macroporosas colapsadas y los soportes macroporosos no colapsados, se caracterizó a través del microscopio electrónico de barrido (SEM), utilizando el equipo JEOL JSM 6300 (Tokio, Japón), trabajando a un voltaje de aceleración de 10 kV y una distancia inicial de 15 mm.

Para hacer la superficie de las muestras conductoras, necesario para la observación de detalles de su topografía y microestructura, las muestras se metalizaron a través de la deposición de oro sobre su superficie en condiciones de vacío, durante 90 segundos en el caso de las membranas macroporosas colapsadas y durante 120 segundos en los soportes no colapsados, a través de un dispositivo de recubrimiento por bombardeo iónico, JFC 1100, JEOL (Tokio, Japón). Todas las muestras se procesaron en tiras de 5×5 mm.

Para el caso de las membranas macroporosas colapsadas, se analizó la profundidad y la interconexión de los poros, mediante microscopía Confocal de barrido, usando un microscopio Nikon C1 (Tokio, Japón), sin ningún tipo de preparación de las muestras.

### **3.2.5 Determinación de la porosidad**

La porosidad,  $\phi$ , de la plantilla de PMMA y de los soportes macroporosos de partida (no colapsados) se determinó a través de mediciones geométricas y volumétricas, de acuerdo con la ecuación<sup>321</sup>:

$$\phi = 1 - \frac{m/\rho}{t \cdot w \cdot l}$$

donde  $m$  es la masa de la plantilla de PMMA y/o soporte macroporoso,  $\rho$  es la densidad del polímero y  $t$ ,  $w$  y  $l$  son el espesor, la anchura y la longitud de la plantilla de PMMA y/o soporte macroporoso respectivamente.

Se calculó la media de seis mediciones, es decir, 2 réplicas por cada plantilla de PMMA y/o soporte macroporoso de partida, teniendo en cuenta que cada uno de los valores medidos para el cálculo de la porosidad se realizó en cuatro puntos distintos de la muestra, y cuatro repeticiones en el caso de los parámetros medidos, masa y densidad.

### **3.2.6 Medidas de propiedades mecánicas**

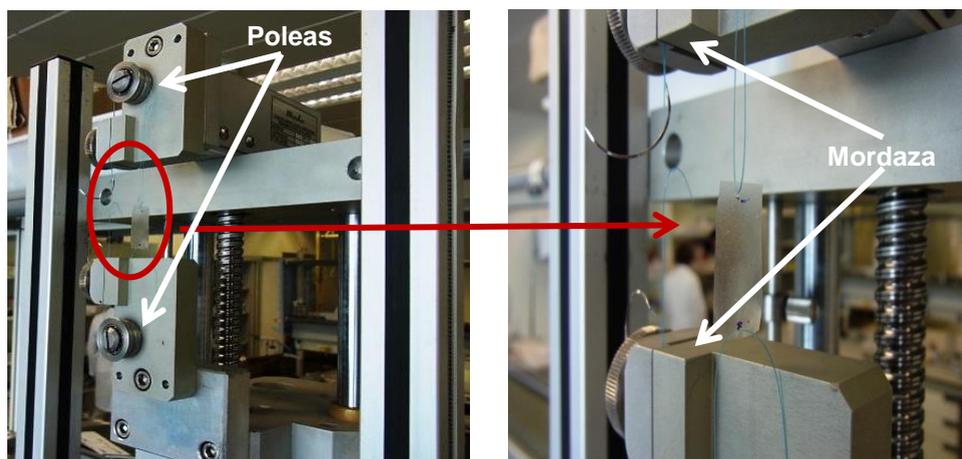
#### **Ensayo de resistencia al desgarro**

Se realizó el ensayo de resistencia al desgarro hasta la rotura de las muestras<sup>322</sup> sobre las membranas macroporosas colapsadas, utilizando una máquina de ensayos universal electromecánica Microtest, SCM 3000095 con un transductor de fuerza de 15 N.

Las membranas macroporosas colapsadas, con dimensiones  $30 \times 10 \times 0.1 \text{ mm}^3$ , se perforaron en ambos extremos a 5mm del mismo, utilizando una aguja quirúrgica. Se pasaron dos hilos de sutura (nylon 10/0) a través de los agujeros, de modo que la distancia entre hilos era de 20mm, y tras pasar los hilos por las poleas, se sujetaron mediante las mordazas, tal como se muestra en la Figura 3.2.

En el caso de las membranas macroporosas de PEA-HEA10 con distinto grado de entrecruzamiento, se pasaron dos hilos de cobre de 0.1 mm de diámetro a través de los agujeros, ya que su diámetro es el que más se aproxima al del hilo de sutura nylon 10/0 ( $\sim 0.05 \text{ mm}$ )<sup>204</sup>, que normalmente se utiliza en córnea. Se utilizó este hilo de

cobre en lugar del de sutura, dado que en muchas ocasiones el hilo de sutura de nylon utilizado para las otras membranas se rompía antes de llegar a completar el desgarramiento de la muestra. Se realizó un programa de velocidad de deformación a modo tracción, a una velocidad de 10mm/min, y se midió la máxima resistencia al desgarramiento hasta rotura de la muestra, es decir, la fuerza mínima necesaria para desgarrar totalmente la muestra. Los resultados fueron el promedio de cinco réplicas por tipo de membrana, y se expresan como el valor promedio con su respectiva desviación estándar (promedio $\pm$ SD).



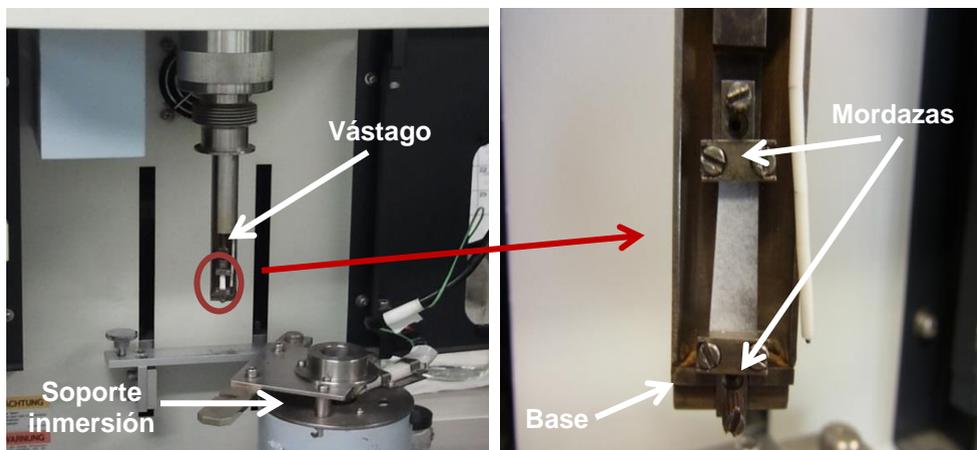
**Figura 3.2** Colocación de las membranas para el ensayo de resistencia al desgarramiento en la máquina de ensayos Microtest. Los hilos se sujetan a las mordazas tras pasar por las poleas. Con las condiciones de ensayo dispuestas, se va desplazando la mordaza inferior a una velocidad constante hasta la rotura total de la muestra.

### Ensayo de resistencia a tracción (tensión-deformación)

Se empleó un analizador termomecánico TMA-SS600 EXSTAR de Seiko (Japón), para realizar el ensayo de resistencia a la tracción sobre las muestras de las membranas macroporosas colapsadas con distinto grado de entrecruzamiento.

Las membranas con dimensiones de  $9 \times 5 \times 0.1 \text{ mm}^3$ , se sujetaron en ambos extremos con unas mordazas metálicas, dejando una distancia mínima aproximada de 5mm entre mordazas (Figura 3.3).

El ensayo a tracción se realizó a una velocidad constante de 20 mm/min, y aplicando una fuerza creciente hasta la fuerza máxima de 1000 mN. Los resultados fueron el promedio de 5 réplicas por tipo de membrana, y se expresan como el valor promedio con su respectiva desviación estándar (promedio  $\pm$  SD).



**Figura 3.3** Colocación de la membrana para el ensayo de tensión-deformación en el dispositivo TMA.

### **Ensayo de resistencia a compresión (tensión-deformación)**

Se realizó un ensayo de resistencia a la compresión en control por deformación sobre las muestras de los soportes macroporosos no colapsados con distinto grado de entrecruzamiento, y de 3 mm de diámetro, empleando un analizador termomecánico TMA-SS600 EXSTAR de Seiko (Japón) (Figura 3.3, cambiando las mordazas por el vástago).

El ensayo de compresión no confinada se realizó a temperatura ambiente tanto en seco como en inmersión de las muestras en agua, previamente sumergidas en agua hasta equilibrio.

Tras colocar la muestra sobre la base donde incide el vástago (Figura 3.3), inicialmente se aplicó a la muestra una pequeña deformación (del 2%) para adaptar la superficie del sustrato al vástago durante 15 minutos. A continuación, se le aplicó una carga hasta su deformación al 15% y se volvió a descargar de nuevo al 2%, completándose 1 ciclo. Este proceso de deformación se repitió hasta completar 4 ciclos de carga y descarga. El ensayo se realizó a una velocidad constante de 500  $\mu\text{m}/\text{min}$  en el tramo de adaptación de la muestra, y de 20  $\mu\text{m}/\text{min}$  en los 4 ciclos de carga-descarga. Los resultados fueron el promedio de 5 réplicas por tipo de sustrato, y se expresan como el valor promedio con su respectiva desviación estándar (promedio  $\pm$  SD).

### **3.2.7 Determinación de características de los materiales inmersos en medio de cultivo celular**

Sobre las siete redes de copolímeros de PEA en forma de láminas no porosas, se realizó una evaluación de algunas de las características que presentan tras su inmersión en medio de cultivo celular.

Inicialmente los diferentes biomateriales se liofilizaron y se esterilizaron. A continuación, se preincubaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (4,5 g/L D-Glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio, Fisher), DMEM, con un 10% de suero fetal bovino (Hyclone, Fisher) FBS, durante 24 h, para permitir la hidratación y estabilización de las muestras. Finalmente, se evaluaron las características de hidrofiliidad, pH, estabilidad, y transparencia.

### **3.3 Caracterización biológica de células madre mesenquimales de médula ósea en los materiales**

Se realizaron cultivos *in vitro* a corto y largo plazo, de MSCs de la médula ósea porcina sobre las membranas macroporosas colapsadas y láminas no porosas de los copolímeros de PEA con distinto grado de hidrofiliidad y distinto grado de entrecruzante.

Se desarrollaron análisis inmunohistoquímicos, para conocer las adhesiones focales en el proceso de adhesión, además se efectuó un análisis bioquímico para caracterizar la población de células que han

permanecido en los materiales, y estudios de proliferación celular en el cultivo a corto y largo plazo.

### ***Aislamiento de MSCs de médula ósea porcina***

El proceso de aislamiento de las MSCs de médula ósea porcina ha sido realizado por el personal del centro de bioingeniería del Trinity Center for Bioengineering de Dublín, Irlanda.

Las células se recogieron de la médula ósea del fémur de un espécimen porcino de 4 meses de edad. Bajo campana de flujo laminar, se eliminó la cabeza femoral y se recogió la médula ósea gelatinosa de la cavidad medular. La médula ósea del fémur, se resuspendió y homogeneizó en medio de expansión DMEM + 1% Glutamax (Gibco, Reino Unido) suplementado con un 10% de FBS (Gibco, Reino Unido), y 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina, P/S (100 unid/mL /100 mg/mL) (Gibco, Reino Unido). La suspensión celular obtenida se centrifugó durante 5 minutos a 650g, descartándose el sobrenadante. Este paso, se repitió una vez más después de volver a resuspender a las células. Del último paso, se obtuvo un sedimento que volvió a resuspenderse en medio de cultivo (DMEM + 1%Glutamax + 10% FBS +1% P/S), y se filtró, utilizando un filtro de nylon de 40  $\mu\text{m}$ . Las células se sembraron en flascos de cultivo de 75  $\text{cm}^2$  de superficie (T75) con  $4 \times 10^5$  células/ $\text{cm}^2$ , y se expandieron en cultivo monocapa hasta pase 1 con medio de cultivo (DMEM+ 1% Glutamax + 10% FBS +2% P/S), 5ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos recombinante humano, FGF2 (Eurobio), y 125  $\mu\text{g/mL}$  de

anfotericina B (Sigma Aldrich, España). Las células ( $2 \times 10^6$  células/mL) se concentraron y criopreservaron en medio de congelación (90% de FBS con 10% de sulfóxido de dimetilo) y en varios criotubos.

### ***Preparación de las células previo al cultivo celular***

Antes de la siembra, las células se descongelaron en un baño de agua a 37°C durante 1 minuto, se sembraron  $3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en un flascón de cultivo T75 y se expandieron con medio de cultivo (DMEM + 1% GlutamaX + 10% FBS +2% P/S) y 5ng/mL de FGF2, hasta pase 2 (se descongelaron 3 criotubos y de ellos se sembraron 12 flascos con  $3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>).

Las células en pase 2 se separaron y se suspendieron en suero libre DMEM + 1% GlutamaX enriquecido y suplementado con 1% de P/S en el caso del cultivo a tiempo corto (2 horas). En el cultivo a tiempos largos (1, 7, 14 y 21 días), se suspendieron en suero DMEM+ 1% de Glutamax enriquecido y suplementado con 1% de P/S y 10% de FBS. En ambos casos, una vez en confluencia, las células se tripsinizaron, y se contaron en una cámara de Neubauer, obteniéndose una concentración final de aproximadamente  $9 \times 10^4$  células/mL.

### ***Acondicionamiento del material***

Previamente al cultivo de los discos de material esterilizado (discos de 5 mm de diámetro), se les realizó un acondicionamiento depen-

diente del tipo de ensayo biológico a desarrollar, y en condiciones de esterilidad.

Inicialmente, los discos de las membranas macroporosa colapsadas se introdujeron en solución salina fosfatada de Dulbeco, DPBS 1x estéril a pH 7.4, forzando la entrada de la solución al interior de los materiales mediante vacío. Este paso se ha de realizar para facilitar la posterior entrada de medio de cultivo en las muestras, ya que la elevada porosidad del material, su alta hidrofiliidad y la mayor densidad del medio DMEM, no permitirían que todo el material quedase impregnado. Las muestras se almacenaron en nevera a 4°C toda la noche, y transcurridas aproximadamente unas 24 horas, se procedió a acondicionar los materiales mediante un recubrimiento de fibronectina (FN) para tiempo corto de cultivo, y acondicionamiento con FBS para los tiempos largos de cultivo.

#### *Coating-recubrimiento de FN*

Se realizó un coating de FN sobre las muestras para el ensayo de adhesión celular, a causa del corto periodo de incubación tras la siembra (2 horas), de manera que se intenta conseguir la mayor adhesión posible mediante el recubrimiento de FN, que hace de puente de unión entre el material y las células, y por tanto, incrementa el porcentaje de adhesión celular al ser reconocida por las células<sup>51,323</sup>. Las muestras se colocaron en viales, y fueron lavadas con disolución salina fosfatada, PBS a pH 7.4. Posteriormente, se introdujo en los viales medio DMEM con antibiótico P/S a una dilución 1:100 y con

FBS (Fisher), para permitir la adsorción de FN y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

Tras la incubación con el medio de cultivo, se añadieron a cada disco de material, 50 µL de una disolución de FN a concentración de 20µg/mL, y se volvieron a incubar durante 1 hora. Tras este periodo de incubación, se retiró la disolución, y se realizaron dos lavados con DPBS 1x para eliminar la proteína que no se había adherido al material.

#### *Adsorción de proteínas del suero FBS*

En el caso de las muestras que se utilizaron en el ensayo de proliferación celular, se llevó a cabo un acondicionamiento con FBS. Aunque, el FBS presenta una menor eficiencia en la adsorción de proteínas involucradas en las adhesiones focales, los tiempos largos de cultivo, permiten que la célula esté en reposo el tiempo suficiente como para adherirse al material, sin que se requiera de un recubrimiento proteico de elevada pureza, como es el caso de la disolución de FN. Los materiales colocados en viales, inicialmente se lavaron en DPBS 1x, y se acondicionaron con medio DMEM 4.5 g/L D-Glucosa, antibiótico P/S a una dilución 1:100 y suplementado con FBS al 10%. Las muestras se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, para permitir la adsorción de las proteínas del suero.

Después de realizar los dos tipos de acondicionamiento, FN y FBS, sobre las muestras, y retirar el exceso de medio, se realizó un acondicionamiento de las placas de cultivos. Sobre la base de los pocillos

de la placa de cultivo, se colocó una disolución de agarosa fundida al 1.5% con DPBs 1x, y se incubaron a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>, toda la noche. Tras la incubación, se colocaron las muestras, sobre el recubrimiento de agarosa, y se recubrieron con 100 µL de DPBs para volver a incubarse a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, hasta la realización de los cultivos programados.

### **3.3.1 Cultivo a tiempo corto en membranas colapsadas de copolímeros de PEA**

La finalidad de este estudio fue determinar la capacidad de las células a adherirse a las distintas superficies de los sustratos, examinar la formación de adhesiones focales, analizar la morfología celular en la fase de adhesión a las muestras, y conocer la eficacia del método de siembra. Como referencia o control, se realizó el cultivo celular en las mismas condiciones sobre las láminas no porosas. En total, se cultivaron 21 tipos distintos de material (3 membranas macroporosas y sus respectivas láminas no porosas de PEA con distinto grado de hidrofiliidad. Membranas macroporosas de PEA-HEA10, con 3 grados de entrecruzante, los distintos cortes y las correspondientes láminas no porosas) y 7 réplicas de cada tipo, de acuerdo con los ensayos que se realizaron.

Se sembraron las muestras (previo Coating de FN), mediante la adición al pocillo con el disco de material por pipeteo, de 200 µL de suspensión celular con una densidad de 50000 células/mL (10000 células/material) en medio de cultivo DMEM, con antibiótico P/S a

una dilución 1:100, suplementado con FBS al 10%, y 1% de Glutamax, y se incubaron estáticamente para permitir la sedimentación celular sobre los materiales en el incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Tras la incubación del material y retirada del medio, se prepararon las muestras según los ensayos posteriores a realizar.

Las muestras reservadas para el ensayo bioquímico se lavaron con DPBs 1x atemperado, se colocaron secas en tubos eppendorfs, y se congelaron a -80°C, hasta la realización del ensayo. En el caso de las muestras utilizadas para los ensayos inmunohistoquímicos, se realizaron dos lavados con DPBS 1x atemperado, y se fijaron con 200µL de disolución de paraformaldehído (formalina) al 10% y DPBs 1x, durante 1 hora a temperatura ambiente, a fin de evitar la degradación celular antes del estudio. Para mantenerlas conservadas antes de realizar los ensayos, las muestras se lavaron con DPBs 1x, se recubrieron con una disolución al 1% de azida en DPBs 1x, y se preservaron en nevera a 4°C, evitando así el crecimiento de microorganismos.

### **3.3.2 Cultivo a tiempos largos en membranas colapsadas de copolímeros de PEA**

El objetivo de este estudio de proliferación celular, fue la medida de la capacidad proliferativa de las células hacia el interior del material en condiciones de no diferenciación a los distintos tiempos de cultivo, y conocer la manera en que lo hacen, tanto a nivel superficial como en profundidad.

En total, se cultivaron 11 tipos distintos de material (3 membranas macroporosas y sus respectivas láminas no porosas de PEA con distinto grado de hidrofiliidad. Membranas macroporosas de PEA-HEA10 con el 3% de entrecruzante, los distintos cortes y la correspondiente lámina no porosa) en cada tiempo de cultivo y 7 réplicas de cada tipo, de acuerdo con los ensayos que se realizaron.

Se sembraron las muestras (previa adsorción de proteínas del suero PBS) siguiendo el mismo protocolo que en cultivo a tiempo corto descrito anteriormente. Transcurridas 24 horas, tiempo suficiente para que las células se encuentren adheridas al material, el medio de cultivo se cambió por otro que contenía el factor de crecimiento FGF2, que promueve la proliferación y evita la diferenciación<sup>324</sup> (DMEM 4.5 g/L D-Glucosa enriquecido con 1% de GlutamaX, antibiótico P/S a una dilución 1:100, FBS al 10% y 5 ng/mL de FGF2), excepto en el caso del cultivo a 1 día. Este medio de cultivo se fue cambiando cada 48 horas. Tras el cultivo del material y retirada del medio en el periodo de tiempo correspondiente (1, 7, 14 y 21 días), las muestras extraídas se prepararon siguiendo la misma metodología que en las muestras utilizadas en el cultivo a tiempo corto. Las muestras requeridas en los ensayos inmunohistoquímicos y de conteo celular, se fijaron con disolución de formalina al 10% durante 1 hora, y se conservaron a 4°C en disolución de azida al 1%. Las muestras para el ensayo bioquímico se conservaron en congelador a -80°C.

### 3.3.3 Ensayo bioquímico

Para la obtención de la estimación del número total de células que han permanecido en los discos de material, tanto en el estudio de adhesión celular, como en el de proliferación celular, se realizó un ensayo bioquímico de cuantificación de dsDNA total, mediante la digestión de las células que contiene el material cultivado, y la cuantificación por fluorescencia del DNA liberado.

La digestión se realiza con la enzima proteinasa-K, capaz de degradar la membrana celular y las proteínas asociadas al DNA, obteniéndose el DNA libre y desenrollado. El marcaje se realizó con el fluoróforo PicoGreen que se une específicamente a cadenas dobles y desenrolladas de DNA, y tiene su máximo de excitación a 480 nm, y el máximo de emisión a 520 nm. La cuantificación del número total de células sobre los materiales, se determinó, usando el kit y el reactivo de ensayos P7589 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen), como se ha procedido en trabajos anteriores<sup>245,325</sup>, y siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras requeridas para este ensayo fueron, 12 réplicas por cada tipo de muestra y extraídas en cada uno de los tiempos programados, 2 horas, 1, 7, 14 y 21 días, y para cada réplica se efectuó la medida por triplicado en tres pocillos diferentes.

Una vez extraídas del congelador a -80°C, donde permanecían almacenadas, las muestras se sonicaron en un vortex durante unos segundos, se centrifugaron a 11000 rpm durante 60 segundos para facilitar la extracción de DNA y posteriormente fueron digeridas con una solución de proteinasa-K (PCR grade, Roche) en DPBS 1x, a

una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con incubación a 60°C durante 16 horas. Esta reacción enzimática fue inactivada a 90°C durante 10 minutos<sup>229</sup>. Tras la digestión, los discos de las muestras se colocaron en una placa de 96 pocillos, donde se marcaron con una solución que contenía el fluoróforo, preparada a partir del kit Quant-iT Picogreen dsDNA (28.7  $\mu\text{L}$  de estándar de DNA, 100  $\mu\text{L}$  de buffer TE 1x y 71.3  $\mu\text{L}$  de Picogreen solution en dilución 1:200, que se coloca sobre los discos en último lugar para evitar que el fluoróforo se degrade por tiempo de exposición). Después de incubar durante 5 minutos, a temperatura ambiente y protegido de la luz, se midió la fluorescencia de las muestras a 520 nm con un espectrofotómetro multiplaca Victor 3.

Al conocer la dilución del DNA en la solución de digestión y en el pocillo, se pudo extrapolar la cantidad de DNA total que había en cada uno de los discos de material cultivado, es decir, la concentración de DNA se determinó con la curva patrón elaborada a partir de diferentes concentraciones del estándar de DNA contenido en el Kit.

### **3.3.4 Ensayos inmunohistoquímicos**

Se realizaron experimentos de inmunoadsorción para los dos estudios celulares, completándose con los ensayos de cuantificación de dsDNA total.

Para caracterizar los procesos de adhesión celular presentes en las muestras cultivadas, se evaluó la expresión de una proteína involu-

crada en el proceso de adhesión y formación de adhesiones focales, que es la vinculina<sup>326-328</sup> (desempeña la función de enlazar cualquier tipo de proteína transmembrana a la actina promoviendo la formación de las adhesiones focales).

La morfología celular se evaluó a través de la expresión del citoesqueleto de actina. Así, en el estudio de la adhesión celular, si las células están adheridas podremos observar adhesiones focales en la zona de la membrana celular o bien marcaje difuso más o menos cercano al núcleo, que se corresponde con la vinculina que está siendo sintetizada, y se desplaza a la membrana para la adhesión celular.

En el caso de todas las muestras cultivadas durante 2 horas se marcó la vinculina y el citoesqueleto de la célula, y para las muestras con distinto grado de entrecruzante cultivadas durante tiempos largos se marcó el Ki67, una proteína nuclear asociada a la proliferación celular, pudiéndose observar el marcaje del anticuerpo en el núcleo, que indica que las células están proliferando. También, para analizar la proliferación celular, se marcó el núcleo celular con tinción de 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y el citoesqueleto con Bodipy FL Phalloidin, faloidina (Invitrogen).

### ***Inmunotinción contra vinculina***

Se llevó a cabo la inmunotinción contra vinculina, siguiendo un protocolo estándar y sobre una de las caras de las muestras (que fue la

que se observó por microscopía), que habían sido cultivadas durante 2 horas y que se encontraban fijadas y conservadas en azida.

Tras varios lavados con DPBS 1x (con posterior retirada del lavado), se adicionó a las muestras 200  $\mu$ L de una solución de tampón de permeabilización, a pH 7.2 compuesta de sacarosa, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, hepes buffer y triton X-100, y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, buscando permeabilizar la membrana de la célula, de modo que permita la entrada de los anticuerpos. Nuevamente, tras retirar la solución permeabilizadora, se lavaron varias veces con DPBS 1x (con posterior retirada del lavado) y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con una disolución bloqueadora de DPBS 1x/albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich), BSA al 1%. Una vez, retirada la solución bloqueadora, y lavadas las muestras con una solución de DPBS 1x/Tween 20 (Sigma-Aldrich) al 0.05% (con posterior retirada del lavado), se añadió el anticuerpo primario contra vinculina de cerdo (Mouse anti-vinculin monoclonal antibody IgG, 7F9 clone (Millipore)) en una dilución 1:50 preparada con DPBS 1x/BSA al 1%, y se incubó toda la noche a la temperatura de 2-8°C. Tras eliminar el anticuerpo primario y varios lavados de las muestras con DPBS 1x/Tween 20 al 0.05% (con posterior retirada del lavado), se añadió el anticuerpo secundario (Cy3 conjugated rabbit antimouse IgG (Jackson research)) en una dilución 1:200 y Bodipy FL Phalloidin a dilución 1:20, preparadas junto al DPBS 1x/BSA al 1%, y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente protegido de la luz. Transcurrido este tiempo, se eliminó el anticuer-

po secundario, y se lavaron las muestras (2 veces) con DBS1x-Tween 20 al 0.05%, eliminando el anticuerpo no unido.

Finalmente, las muestras se montaron en porta muestras de microscopio y se les adicionó una gota de medio de montaje Vectashield con DAPI (ATOM) para teñir los núcleos de las células. Se sellaron las muestras con laca de uñas, Nail Polish (Electron Microscopy Sciences) y un cubre objetos, se dejaron secar unos minutos, para posteriormente visualizarse en el microscopio de fluorescencia.

### ***Inmunotinción contra Ki67***

El ensayo de inmunoadsorción contra Ki67 para los tiempos largos de cultivo, se llevó a cabo también con protocolo estándar y sobre una de las caras de la muestra (fijadas y conservadas en azida). El procedimiento seguido fue similar al del ensayo de inmunoadsorción contra vinculina en todos los pasos excepto en la composición del tampón de permeabilización, que en este ensayo fue solución de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) y DPBS 1x al 0.1%, y en las diluciones y disoluciones preparadas para los anticuerpos. El anticuerpo primario contra Ki67 (Rabbit anti-Ki67 polyclonal antibody IgG (Abcam)) se añadió en una dilución 1:25 preparada con DPBS1x-BSA al 1% y se incubó toda la noche a la temperatura de 2-8°C. El anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 goat antirabbit IgG, H+L (Invitrogen)) se añadió en una dilución 1:100 preparada con DPBS 1x-BSA al 1%-Tween 20 al 0.05%, y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Por último, tras varios lavados con DPBS 1x-Tween 20 al 0.05%, las

muestras se montaron con medio de montaje, Vectashield con DAPI, para su observación en el microscopio de fluorescencia.

En vista de los resultados que se obtuvieron con la inmunotinción contra Ki67, y que se comentarán en el capítulo de resultados, se decidió realizar una tinción Actina-Dapi, tiñendo las distintas muestras únicamente con DAPI y faloidina, para poder analizar la proliferación celular, tanto para el estudio del citoesqueleto a tiempos largos de cultivo como para la cuantificación celular.

### ***Tinción actina-DAPI***

La tinción actina-DAPI, de marcaje del citoesqueleto y núcleo respectivamente, para los tiempos largos de cultivo, se llevó a cabo también con protocolo estándar y sobre una de las caras de la muestra.

Después de cada uno de los tiempos de cultivo, fijadas y conservadas en azida las muestras, se les realizó varios lavados con DPBS 1x (con posterior retirada del lavado), y se les añadió 200  $\mu$ L de una solución de tampón de permeabilización, compuesta por Triton X-100 y DPBS 1x al 0.1%, y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. De nuevo, tras retirar la solución permeabilizadora, se lavaron varias veces con DPBS 1x (con posterior retirada del lavado), y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con 50  $\mu$ L de una disolución 1:200 de Bodipy FL Phalloidin/DPBS 1x. Tras retirarse la disolución de faloidina/DPBS 1x, las muestras se lavaron varias veces con DPBS 1x, y se prepararon para su observación en el mi-

croscopio de fluorescencia y Confocal de fluorescencia, de la misma forma que en las otras inmunotinciones; las muestras se montaron en porta muestras, se les adicionó una gota de medio de montaje Vectashield con DAPI, se sellaron con laca de uñas y un cubre objetos, y finalmente se dejaron secar unos minutos.

### **3.3.5 Análisis de imágenes a través de microscopía de fluorescencia**

El microscopio de fluorescencia es una variante del microscopio de luz UV, que permite analizar las características celulares mediante el marcaje con fluoróforos. Esta técnica se ha utilizado para la visualización de las muestras resultantes de los ensayos de inmunoadsorción, para la detección de adhesiones focales y citoesqueleto. No obstante, se tuvo en cuenta la limitación de la profundidad de campo y la resolución, por lo que sólo se vieron las células más superficiales. Si se dispone de varios filtros para iluminar la muestra con diferentes longitudes de onda según el filtro, se puede marcar la muestra con más de un fluoróforo.

Así, el marcaje con DAPI nos muestra la presencia de núcleos celulares, por su capacidad para unirse al DNA en regiones enriquecidas en adenina y timina, y su emisión de fluorescencia en la zona azul del espectro visible; la faloidina marcada, es una toxina de hongo, unida a un fluorocromo, que tiene la capacidad de unirse a los monómeros de actina e interferir en la despolimerización de los filamentos del citoesqueleto; y el uso de anticuerpos marcados (inmunofluo-

rescencia), nos permite detectar de forma específica proteínas concretas de la célula y analizar procesos celulares, previo diseño del anticuerpo específico para el antígeno.

Las muestras utilizadas en ambos estudios celulares resultantes de los distintos ensayos de inmunoadsorción, se han visualizado a través de un microscopio de Fluorescencia Nikon Eclipse 80i (Japón).

### **3.3.6 Distribución tridimensional y cuantificación celular a través de microscopía Confocal de fluorescencia**

El microscopio Confocal de fluorescencia es la forma más utilizada de microscopio Confocal en biología. La diferencia que presenta con respecto al microscopio de epifluorescencia, radica en su diseño que permite iluminar, con una longitud de onda determinada, un único punto de un plano concreto de una muestra fluorescente, y recoger la fluorescencia emitida únicamente por dicho punto, mediante la aplicación de pinholes. De esta forma, se barre la superficie de la muestra excitándola punto a punto, y en planos consecutivos, a intervalos de profundidad constantes, y finalmente se unifica la imagen por ordenador en base a los datos recogidos de cada spot iluminado. Esta modalidad de microscopio permite examinar muestras de mayor espesor que la profundidad de campo de la lente, proporcionando imágenes con mayor resolución, debido a la eliminación de todo el ruido de fondo que no corresponde a objetos situados dentro de la profundidad de campo, y ofrece la posibilidad de hacer reconstrucciones en 3D para el estudio de la distribución celular.

Para las muestras con distinto grado de hidrofiliidad, se ha utilizado esta técnica de microscopía, para el estudio de la capacidad de proliferación celular, y visualización a través de las reconstrucciones 3D, de la distribución y profundidad de penetración de las células en el interior del material en los tiempos de cultivo largos. A través de la inmunofluorescencia de la tinción nuclear con DAPI y del citoesqueleto celular con faloidina, se ha intentado establecer una relación con las distintas composiciones del material. Por ello, se ha utilizado un microscopio Confocal de fluorescencia, montado en un microscopio invertido Zeiss y software Nis-elements (Nikon), para visualizar los núcleos celulares con DAPI y su distribución superficial y/o de profundidad en el material. Las muestras con distinto grado de entrecruzante y cultivadas a tiempos largos, además de la visualización de la proliferación celular en superficie y en el interior del material (para establecer una relación con la estructura y la porosidad de la membrana) como se ha procedido con las muestras anteriores, se ha realizado un contaje celular a nivel de profundidad. En ambos casos, se han utilizado las muestras utilizadas en la tinción actina-DAPI, tras su visualización en el microscopio de fluorescencia y se analizaron planos o stacks consecutivos con una separación de 0.4  $\mu\text{m}$  de espesor, para la visualización de la distribución celular.

En el contaje celular sobre las membranas macroporosas con distinto grado de entrecruzamiento, se analizaron planos consecutivos con una separación de 1.5  $\mu\text{m}$  de espesor, desde la superficie sembrada del material hasta que no se detectan núcleos celulares.

Se visualizó una muestra por material, y se tomaron imágenes y cuantificaron núcleos en 4 zonas de la muestra. Se consideró superficie del material o profundidad 0  $\mu\text{m}$  el plano en el que se detectó el primer núcleo celular con su mayor intensidad, del mismo modo que se consideró que la célula estaba a una profundidad determinada, cuando su núcleo presentó la máxima intensidad en un plano concreto que estaba a una distancia determinada de la superficie.

### **3.4 Prototipo de prótesis de córnea**

En esta sección del capítulo, se va a desarrollar la metodología seguida en el diseño y desarrollo de un prototipo de prótesis de córnea o queratoprótesis, de partes integradas, y siguiendo un modelo tipo *core skirt*, que se compone de una parte central óptica que realiza la función de transmisión de la luz, y un anillo soporte poroso (membrana porosa) que proporciona un anclaje estable a través de la integración con el tejido huésped.

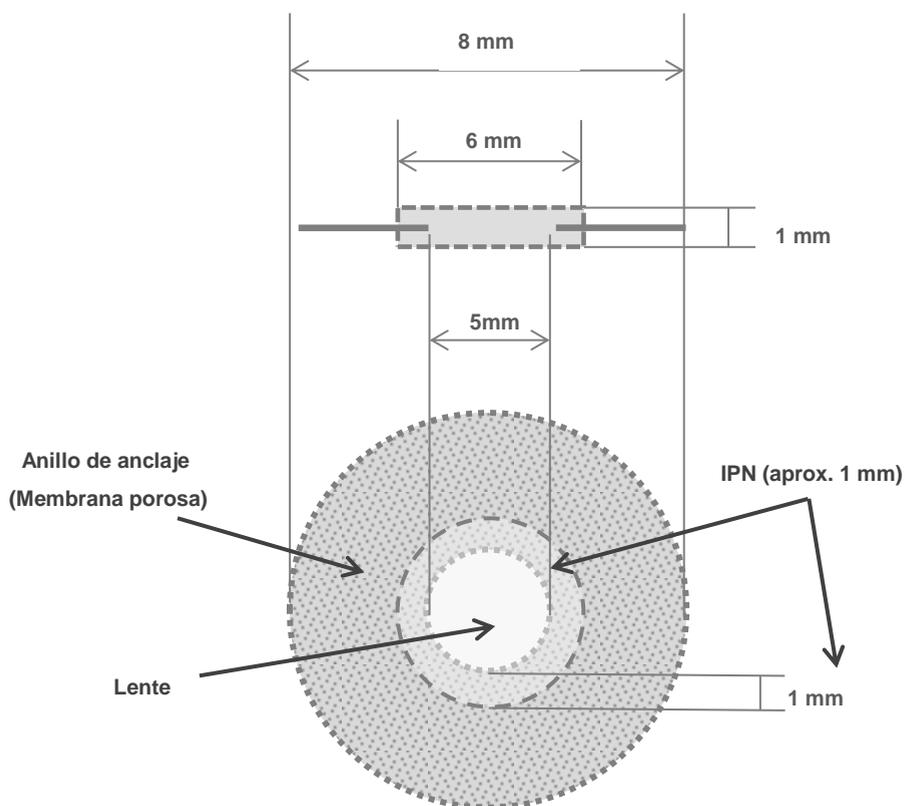
#### **3.4.1 Diseño y obtención de la prótesis de córnea**

El procedimiento que se va a exponer, permite la fabricación de la prótesis de córnea como la mostrada en la Figura 3.4. Lo que se pretende con este diseño, es la posibilidad de realizar el conjunto en una sola pieza en la que lente y anillo de anclaje formen una estructura continua que cambia gradualmente de un material flexible y po-

roso en el anillo, a un material rígido y transparente para formar la lente.

El modelo de prótesis de córnea que se describe se considera como una prueba de concepto en el que el molde de la lente es cilíndrico. Asimismo, la composición de la lente en este modelo es también una simplificación, el desarrollo de los materiales para lentes intraoculares ha permitido afinar enormemente la composición aun manteniendo la base de los polímeros utilizados en esta tesis. Las características y datos de la prótesis de córnea son las comentadas a continuación (Figura 3.4).

El material con el que se obtuvo la lente fue de PMMA con un espesor de 1 mm y 6 mm de diámetro. En el caso de la membrana macroporosa, fue PEA de 100  $\mu\text{m}$  de espesor, diámetro interior de 5 mm y diámetro exterior de 8 mm. La membrana macroporosa de PEA utilizada se fabricó siguiendo el primer método expuesto en el apartado 3.1.2, utilizando la combinación de la técnica de plantillas y la del colapso anisotrópico, obteniéndose el mismo tipo de estructura porosa que las sintetizadas en dicho apartado y que se exponen en el apartado 4.3.1. Se obtuvieron membranas macroporosas colapsadas de unas 100  $\mu\text{m}$  de espesor, y que fueron troqueladas a las dimensiones exigidas para el anillo de anclaje de las prótesis de córnea, comentadas anteriormente, con la variación del diámetro exterior que en este caso fue de unos 12 mm, para facilitar la manipulación de la misma.



**Figura 3.4** Diseño de la prótesis de córnea, siguiendo el modelo tipo core-skirt.

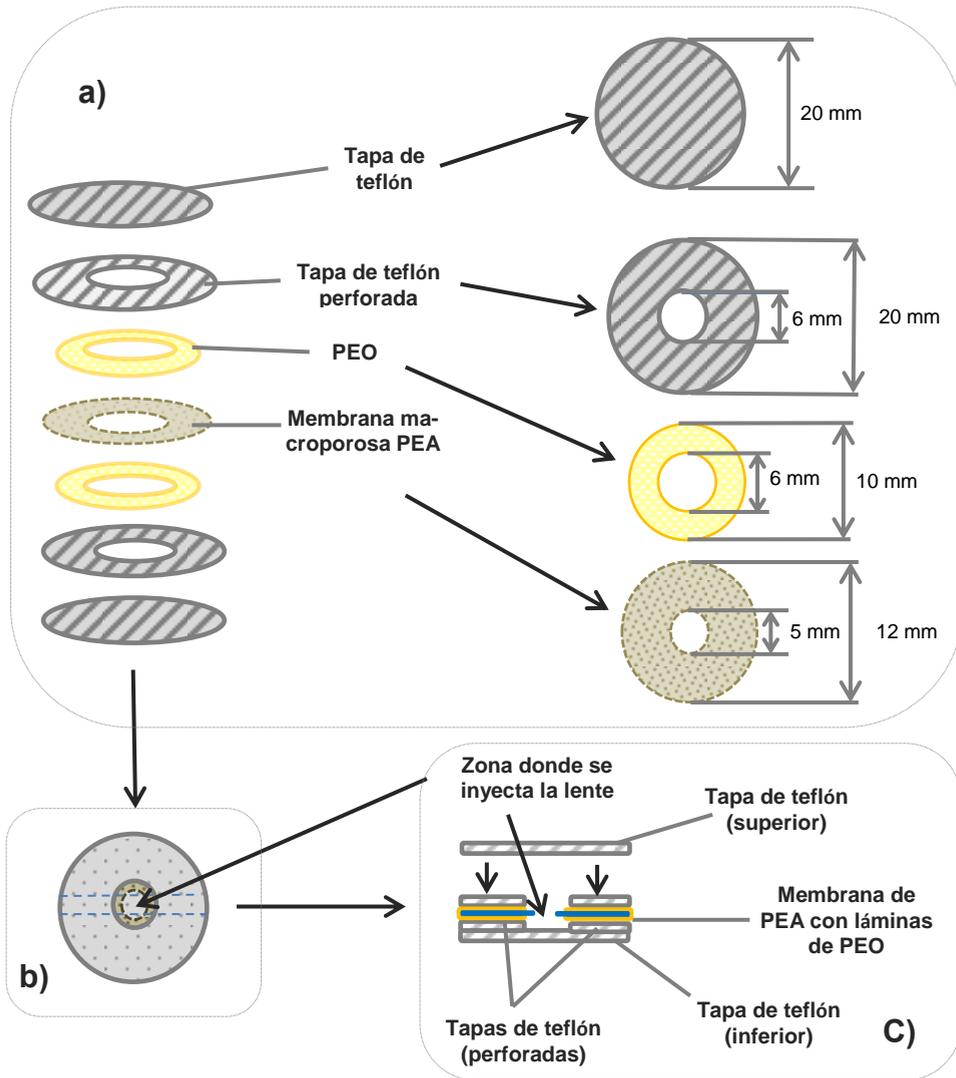
En el concepto del diseño de la prótesis (figura 3.4), en la zona central de la membrana se ha de polimerizar la lente generándose una única pieza. Durante el proceso de la polimerización, se ha de proteger los poros de la membrana ya que al producirse la inyección del monómero, MMA, este reaccionaría con el PEA y taponaría los poros, efecto que hay que evitar porque la estructura del anillo ha de ser porosa. Inicialmente se utilizó parafina para rellenar los poros de la

membrana, pero el proceso no dio buen resultado. Por tanto, se decidió utilizar el poli óxido de etileno (Mw:100000(nominal), Polysciences), PEO, como relleno de los poros y protector de la membrana, ya que es un material que no reacciona con ninguno de los monómeros a utilizar, EA y MMA respectivamente, se elimina fácilmente con agua y soporta sin degradarse la temperatura a la cual ocurre la polimerización de la lente. Para que el PEO proteja a la membrana se ha de procesar de manera que se generen discos con la dimensión de 6 mm de diámetro interior y 10 mm de diámetro exterior. Los discos de PEO se obtuvieron a partir de una membrana muy fina de aproximadamente unas 50  $\mu\text{m}$  del mismo PEO. Para obtener dicha membrana, se preparó una disolución de PEO al 30% en agua y tras agitación de la disolución unas 48 horas, se vertió sobre una placa Petri de vidrio de forma que quedara sólo cubierta la base y se dejó evaporar el agua. A las 48 horas, se formó una membrana fina de PEO de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , que se despegó de la placa y se troqueló a las dimensiones deseadas.

Para obtener el prototipo de prótesis de córnea se diseñó una estrategia, cuyo principio consistía en encajar la lámina de PEO seguida de la membrana macroporosa colapsada de PEA y otra lamina de PEO, y estas a su vez entre láminas de teflón que van encajando dentro de una pieza que forma parte de un montaje que se cierra apretando, para conseguir que el monómero de MMA polimerice bien en la zona central de la membrana de PEA. En esta metodología, cuyo protocolo se expone en párrafos posteriores, el anillo poroso se coloca en un montaje, compuesto por diferentes piezas metáli-

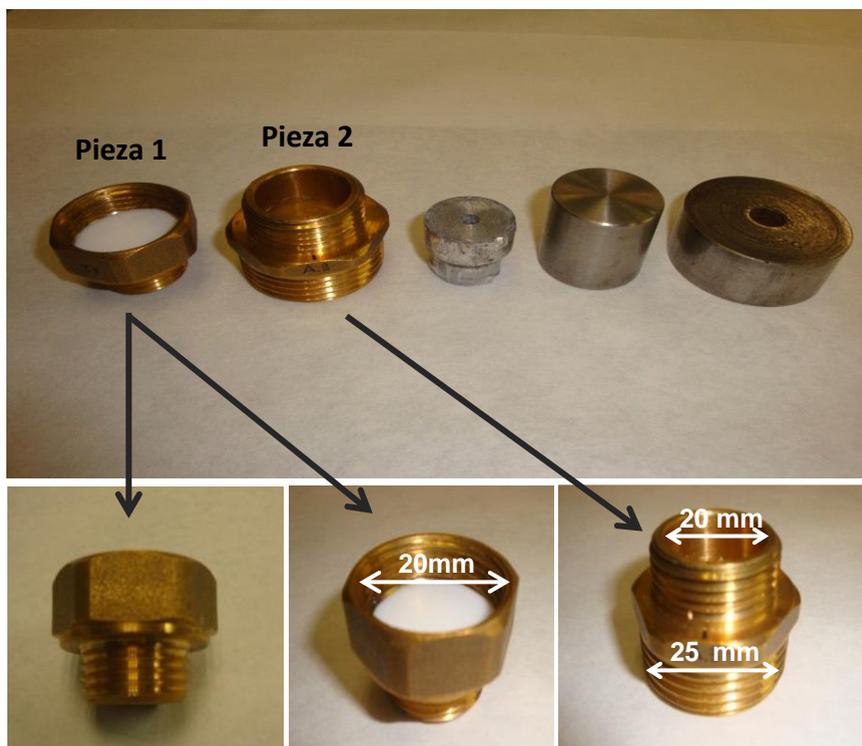
cas que encajan entre sí, de manera que permitan inyectar y polimerizar la lente de la prótesis sobre la zona central de la membrana, sin que el monómero difunda obstruyendo los poros, aunque si integrándose con el anillo para dar lugar a una sola pieza (a través de la IPN formada). Como se ha comentado, se utilizan láminas de PEO para recubrir la membrana macroporosa rellenando sus poros previamente, y que se elimina tras obtener la prótesis lavándola en agua. La membrana macroporosa de PEA se troquea a la medida deseada, con forma de anillo, y se dispone en el montaje con una lámina de PEO por encima y otra por debajo, siempre con un diámetro interior inferior al de la membrana macroporosa (1 mm menos).

Toda esta estructura de láminas y membrana estará entre láminas de teflón con forma de anillo que se ajusten perfectamente a las piezas del montaje, y con el mismo diámetro interior que la lámina de PEO, como puede observarse en la Figura 3.5a. Por último se cierra el conjunto colocando láminas de teflón lisas y sin perforar, en la parte superior e inferior. Una vez colocadas las láminas de teflón, las de PEO y la membrana macroporosa de PEA, a falta de colocar la tapa de teflón superior, se observaría algo similar a la Figura 3.5b. La membrana macroporosa debe sobresalir un poco, 1 mm que formará la IPN, de manera que al inyectar el polímero de la lente, quede integrada con él. Por lo tanto, es importante que las piezas o elementos estén procesadas lo más perfecto posible, especialmente las tapas de teflón perforadas ya que son las que actúan como molde para la lente, tal como se aprecia en la Figura 3.5c.



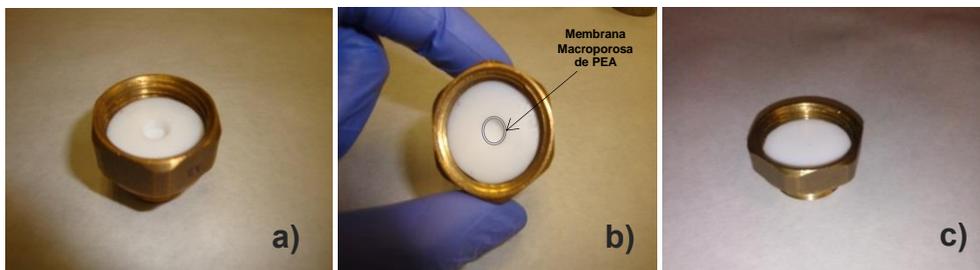
**Figura 3.5** Esquema preliminar para la obtención de la prótesis de córnea en una única pieza; a) materiales básicos utilizados en la polimerización de la lente en el anillo de anclaje poroso, b) vista superior de los materiales una vez superpuestos y c) corte transversal de la superposición de los materiales.

El montaje utilizado para obtener la prótesis está compuesto de varias piezas como se puede ver en la Figura 3.6. La pieza 1, es una tuerca metálica con dos roscas, un macho que hará de base, y una hembra de 20 mm de diámetro en la que irá todo el material para formar la prótesis, y que encaja con la rosca macho de la pieza 2. En este caso, la pieza 2, es una tuerca también metálica y de dos roscas, de 20 y 25 mm de diámetro respectivamente, y que funcionará como tapa. Por último, se dispone de diferentes pesas, que ayudarán a ejercer presión sobre el conjunto.



**Figura 3.6** Piezas del montaje para la obtención de la prótesis de córnea.

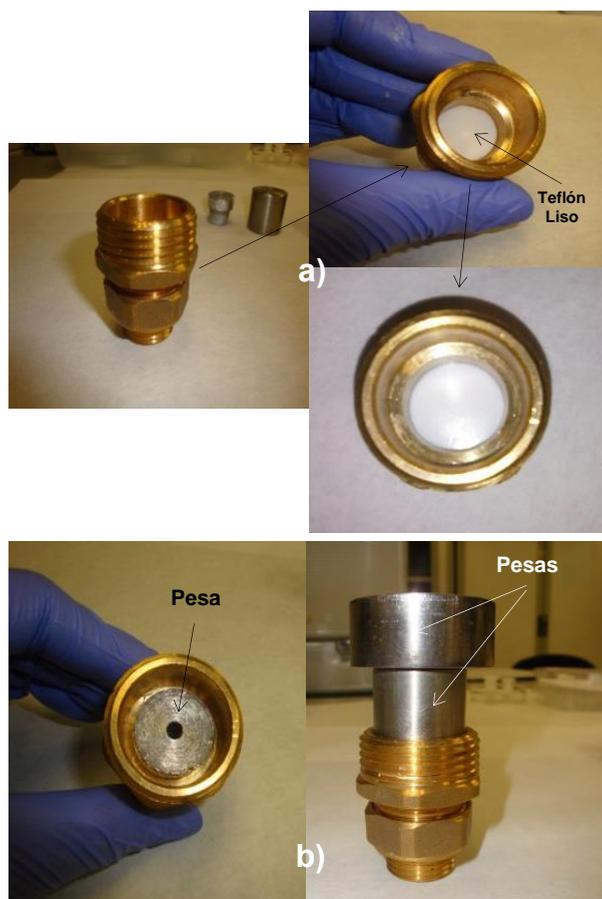
Con el diseño previsto y las piezas del montaje, se procedió a la obtención del prototipo de prótesis de córnea. Inicialmente, se troquelaron 4 discos de teflón con las medidas ajustadas tal y como se ve en la Figura 3.5, los dos lisos de 2 mm de espesor y los perforados de 1 mm, de manera que quedaron lo más ajustados posibles dentro de la pieza 1. Se colocó el primer disco de teflón liso dentro de la pieza 1, seguido de un disco de teflón perforado, un disco de PEO perforado, la membrana macroporosa de PEA también perforada, y otro disco de PEO, para acabar tapando con otro disco de teflón perforado, quedando la composición como se presenta en la Figura 3.7a. Antes de seguir con el proceso, se comprobó si asomaba el borde (zona que se convertirá en la IPN) de la membrana macroporosa de PEA que debe quedar lo más centrada posible (Figura 3.7b). A continuación, se encajó la última tapa de teflón lisa para cerrar (Figura 3.7c).



**Figura 3.7** Colocación y visualización de los distintos materiales en la pieza 1.

Una vez cerrado el montaje, se procedió al proceso de rellenado de los poros y recubrimiento de la membrana de PEA, a través de la

fundición de los discos de PEO. En este caso, se tomó la pieza 2 y se enroscó sobre la pieza 1 quedando bien apretados los discos de teflón (Figura 3.8a). Acto seguido, se fueron colocando las pesas, de forma que se encajó la pesa más pequeña dentro de la pieza 2 entrando en contacto con el teflón superior, y encima se fueron colocando las demás pesas ejerciendo suficiente presión (Figura 3.8b).



**Figura 3.8** Emplazamiento del montaje para el proceso de rellenado y protección de la membrana macroporosas, a través del a) ajuste de las piezas 1 y 2, y b) colocación de las distintas pesas.

El montaje se introdujo en estufa a 60°C durante 2 horas para que los discos de PEO fundieran y penetrasen en los poros de la membrana de PEA. Transcurridas las 2 horas, se sacó el montaje, previo enfriamiento en horno, y se retiraron las piezas para comprobar que se había formado la capa de protección de PEO sobre la membrana.

A continuación, se volvieron a colocar los materiales en la posición en la que estaban sobre la pieza 1, excepto el último teflón liso, para poder inyectar la solución de la lente. Se preparó una disolución de metil metacrilato (MMA) mezclado con un 5% de PMMA polimerizado sin entrecruzante, 0.5% de peróxido de benzoilo (BPO) como iniciador térmico de la reacción de polimerización y 0.5% de EGDMA, se agitó durante 1 hora, y se inyectó sobre la parte central del montaje 1 (Figura 3.7b) con ayuda de una pipeta Pasteur y evitando la formación de burbujas. Se añadió el PMMA polimerizado sin entrecruzante, para aumentar la viscosidad de la disolución y evitar así que el MMA pueda fluir entre los pequeños espacios existentes en las piezas. De manera inmediata, se colocó la tapa de teflón liso, se volvió a enroscar la pieza 2, se colocaron las pesas, se introdujo el montaje en horno, y se polimerizó por vía térmica a 60°C durante 24 horas.

Una vez transcurridas las 24 horas de polimerización, se desmoldó todo el montaje, y la pieza que forma la prótesis en una se lavó en agua para eliminar el PEO, durante 72 horas. Finalmente la prótesis se secó a temperatura ambiente durante 24 horas y a vacío hasta su secado total.

### **3.4.2 Caracterización estructural de la prótesis de córnea**

Para comprobar que la prótesis de córnea cumplía con los requisitos de estructura en una única pieza, con una parte central formada por la lente de PMMA, unida a la membrana macroporosa de PEA a través de una IPN (red interpenetrada de ambos monómeros, EA y MMA respectivamente) y que tras la eliminación del PEO seguía teniendo estructura macroporosa, se utilizó la técnica de SEM utilizando un equipo JEOL JSM 6300 (Japón), trabajando a un voltaje de 10 kV y una distancia inicial de la muestra de 20 mm.

La membrana se procesó de manera que se obtuvieron varias partes de la misma para su visualización en el SEM, correspondientes a la zona central de la lente junto a la IPN, y zona de IPN más la membrana macroporosa.

Estas muestras se recubrieron con oro durante 120 segundos, para poder realizar las micrografías de las muestras en distintos planos, superficial y transversal.

### **3.5 Biofuncionalización de copolímeros de PEA**

En este apartado, se expone las técnicas experimentales utilizadas en la biofuncionalización superficial de los sustratos poliméricos en forma de láminas no porosas y membranas macroporosas colapsadas seleccionadas como posibles candidatos a constituir el material del anillo de anclaje de una prótesis de córnea.

Para el proceso de biofuncionalización o recubrimiento con distintas proteínas de la matriz extracelular, se han utilizado las muestras secas y esterilizadas de láminas no porosas de las siete redes de copolímeros de PEA (ver Tabla 3.1 y apartado 3.1.1), y de las membranas macroporosas de PEA, PEA-HEA10 y PEA-AAc10 (apartado 3.1.2) obtenidas y preparadas en forma de discos de 5 mm de diámetro.

La biofuncionalización y estudio de eficiencia de los recubrimientos de proteínas en los copolímeros de PEA, ha sido realizada por el personal del grupo de Biomateriales del área de Salud de TECNALIA Innovación y Desarrollo (San Sebastián, España).

### **3.5.1 Preparación superficial de los materiales con proteínas.**

#### ***Preparación de las superficies con recubrimiento de FN***

Se realizó un proceso de recubrimiento de la proteína, FN, tanto por adsorción como por injerto sobre los copolímeros de PEA (siguiendo la Ref.<sup>329</sup>). La fibronectina de plasma humano (Sigma, España) se adsorbió en los copolímeros de EA que contenían un 10 o 20% en peso de HEA, AAc, o MAAC, por inmersión en una solución de 50 µg/ml de FN disuelta en PBS. El recubrimiento, se realizó depositando sobre cada réplica 100 µL de la solución de FN y PBS anterior, de manera que quedaron cubiertos los discos poliméricos, durante 1 hora y 30 minutos a 37°C y 30 minutos a temperatura ambiente. Tras

este tiempo, las muestras se lavaron 3 veces con la solución fisiológica de PBS para eliminar la proteína no adsorbida.

La FN se entrecruzó covalentemente en los copolímeros de EA que contenían un 10 o 20% en peso de AAc o MAAC. Para convertir el ácido carboxílico en un éster reactivo, para su posterior amidación con los grupos amino libres de la FN, los copolímeros carboxílicos/carboxilados (contienen AAc o MAAC) se hicieron reaccionar con una solución de 2mM de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-clorhidrato de etilcarbodiimida, EDAC (Sigma), y 5mM de sal sódica, NHS (Sigma), en un tampón ajustado a pH 5.5 de ácido etano sulfónico 2-(N-Morfolino), MES (Sigma), durante 30 minutos. Después de lavar los discos con MES ajustado a pH 5.5, se hicieron reaccionar con la FN de plasma humano (0.5 mg/mL; Sigma) en MES a pH 5.5 durante 2 horas, y finalmente se lavaron una vez con MES a pH 5.5 y dos veces con PBS, para eliminar la proteína no injertada.

### ***Preparación de las superficies con recubrimiento del péptido FNIII<sub>7-10</sub>***

Para la producción y purificación de la FNIII<sub>7-10</sub>, se transfirió a la E. coli BL21 (DE3) (Invitrogen, España) el plásmido pET-11 que contiene la secuencia FNIII<sub>7-10</sub>, y se expresó tal como se ha descrito previamente<sup>330</sup>, de manera que las proteínas expresadas quedaron en el sobrenadante. La proteína se precipitó a partir del sobrenadante bacteriano al 40% de saturación (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (Sigma, España), y se centrifugó a 10000 g durante 5 min para sedimentar la proteína.

Después, se resuspendieron en HCl-Tris 0.02 M (pH 7.9) conteniendo 0.02% de azida sódica (Sigma, España) y se cromatografiaron en un dispositivo Mono Q (Biorad, España), previa dilución con NaCl 0.2M (Sigma, España). La proteína finalmente se cuantificó usando un reactivo de Bradford; obteniéndose la cantidad de 1.7  $\mu\text{g/ml}$  de FNIII<sub>7-10</sub>. El recubrimiento de las superficies de las láminas no porosas con FNIII<sub>7-10</sub> se realizó siguiendo la misma metodología que para la FN; por adsorción sobre el PEA y los copolímeros de PEA que contienen 10% y 20% de HEA, los discos se recubrieron con 100 ml de una solución de 170 ng/ml de FNIII<sub>7-10</sub> en PBS durante 2 h a 37°C, y se lavaron entonces con PBS para eliminar la FNIII<sub>7-10</sub> sin reaccionar. El recubrimiento en los copolímeros de PEA que contienen 10 o 20% en peso AAC o MAAC se realizó mediante la inmovilización covalente. Se combinaron con 2 mM de EDAC y 5 mM de NHS en MES a pH 5.5 durante 30 minutos, convirtiendo los ácidos carboxílicos en esteres reactivos, que reaccionaron con los grupos amino libre de la FNIII<sub>7-10</sub>. Después se lavaron con MES a pH 5.5, y se hicieron reaccionar con FNIII<sub>7-10</sub> humana (170 ng/ml) en MES a pH 5.5 durante 2 horas a 37°C. Finalmente, los discos se lavaron una vez con MES a pH 5.5 y dos veces con PBS para eliminar la FNIII<sub>7-10</sub> sin reaccionar.

### ***Preparación de las superficies con recubrimiento de colágeno y colágeno-keratan sulfato (KSPG)***

En este caso, se recubrieron los discos de las láminas no porosas de PEA y copolímeros de PEA que contienen un 10% de HEA y 10% de

AAc. Las muestras se incubaron toda la noche en una solución fría de colágeno en condiciones ácidas a 4°C. El copolímero carboxilado se hizo reaccionar previamente con 2 mM EDAC y 5 mM de NHS en MES a pH 5.5 durante 30 minutos (convirtiéndose el ácido carboxílico en éster reactivo para su posterior amidación con los grupos amino libres del colágeno). Después, de este tiempo de incubación, la solución de colágeno se retiró, y se realizó una fibrilación del colágeno con un tampón de fosfato a 37°C. Para mejorar la bioestabilidad del recubrimiento, se llevó a cabo un proceso de entrecruzamiento, donde los discos se incubaron en tampón MES con EDAC/NHS a un pH de 5.5. A continuación, los discos se lavaron con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M y agua destilada, para su posterior liofilización (discos recubiertos con colágeno). La incorporación del KSPG (GAG sulfatado) al colágeno se produjo durante el proceso de entrecruzamiento (40 µg de KSPG/ml de MES/EDAC/NHS).

Las membranas macroporosas de PEA, PEA-HEA10 y PEA-AAc10, también se recubrieron con colágeno y KSPG, siguiendo el mismo protocolo de recubrimiento que el realizado para las láminas no porosas.

### **3.5.2 Cuantificación de recubrimientos de proteínas a través de inmunoadsorción enzimática (ELISA)**

Para la determinación de la eficiencia de los distintos recubrimientos proteicos sobre las distintas muestras, se ha utilizado la técnica de inmunoadsorción enzimática, ELISA.

En el caso del recubrimiento con FN, además se cuantificaron la FN y los motivos de adhesión celular expuestos (secuencia de arginina-glicina-ácido aspártico, RGD, y dominio de adhesión FNIII<sub>7-10</sub>). Los discos de los copolímeros recubiertos con las distintas proteínas, se bloquearon por inmersión en una solución con BSA (Fisher), al 2% en PBS durante 2 horas a 37°C y después se lavaron dos veces con PBS. Los anticuerpos primarios y diluciones utilizadas para la detección de cada una de las proteínas de recubrimiento fueron: para la detección de la FN, anticuerpo policlonal anti FN humana producido en conejo, Sigma, a una dilución 1:50; para el RGD, anticuerpo monoclonal producido en ratón y dirigido contra el dominio de unión celular de la FN humana, clon P1H11, Chemicon, a una dilución 1:260; para la FNIII<sub>7-10</sub>, anticuerpo monoclonal HFN7.1 producido en ratón y dirigido contra la unión flexible entre los dominios III<sub>9</sub> y III<sub>10</sub>, Abcam, a una dilución 1:260; anticuerpo de colágeno (anticuerpo de colágeno I [COL-1]) (Abcam ab90395) en dilución 1:500; y anticuerpo monoclonal anti-queratán sulfato producido en ratón (Acris, BM553) a dilución 1:900. Estos anticuerpos se incubaron junto con las muestras durante 2 horas a 37°C. Tras la eliminación de los anticuerpos primarios, se realizó un lavado intensivo con PBS conteniendo Tween 20 (PBST), para eliminar el anticuerpo no unido.

Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano, (“horseradish peroxidase”, HRP), anticuerpo secundario policlonal producido en conejo y dirigido contra la IgG-H&L de ratón ab6728, Abcam, y anticuerpo policlonal producido en cabra y anti-IgG de conejo, se añadieron a los discos poliméricos a las diluciones de 1:45

para la detección de FN, 1:83 para la detección de RGD y FNIII<sub>7-10</sub>, y a 1:300 para la detección de colágeno y KSPG, y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación, las superficies se enjuagaron con PBST, seguido de la adición de una solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se detuvo, mediante transferencia de parte de la solución colorante a una placa de 96 pocillos (Corning, USA) con una solución de parada de ácido sulfúrico 2N (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

La medida de la densidad óptica se realizó a través de un lector Powerwave XS (Bio Tek Instruments, Winooski, VT) a 450 nm. Para las láminas no porosas, se analizaron tres discos para cada material, y cada anticuerpo y se tomaron como referencia los copolímeros sin recubrimiento, a excepción de la FN, en el que se analizaron nueve discos, quedando la distribución de réplicas de material de la siguiente forma; nueve réplicas para la FN, tres para FNIII<sub>7-10</sub>, tres para el colágeno y el colágeno con KSPG.

En el caso de las membranas poliméricas macroporosa se evaluaron 12 réplicas para el colágeno y el colágeno con KSPG, tomando también como referencia los copolímeros sin recubrimiento.

Para obtener detalles del análisis estructural de los recubrimientos en los distintos copolímeros de PEA (láminas no porosas), se recurrió a la técnica de SEM. Las muestras se prepararon con la deposición de oro sobre la superficie de las mismas, con un dispositivo de recubrimiento por bombardeo iónico (Polaron SC762, VGMicrotech, East Grinstead, Reino Unido) a 25 mA durante 30 segundos.

El recubrimiento metálico sobre la superficie permitió obtener muestras conductoras que se pudieron analizar bajo alto vacío en SEM (JEOL JSM 5910 LV, Tokio, Japón).

### **3.6 Caracterización biológica de células adultas de tejido adiposo humano en los materiales**

En este apartado se explica las técnicas experimentales utilizadas en la determinación de la eficiencia de colonización de las células h-ADAS, sobre láminas no porosas de PEA y copolímeros de PEA que no fueron descartadas en la evaluación de las características que presentan tras la inmersión en medio de cultivo celular y recubiertas con las proteínas de la matriz extracelular comentadas en el apartado 3.5.

Además se explican los procesos realizados de implantación y análisis de biointegración de los implantes macroporosos en las córneas de conejo.

Para el estudio de eficiencia celular de los sustratos con distintas proteínas, se han utilizado las láminas no porosas de PEA, PEA-HEA10, PEA-HEA20 y PEA-AAc10, y como implantes para las córneas de conejos las membranas macroporosas de PEA, PEA-HEA10 y PEA-AAc10, preparadas en forma de discos de 5 mm de diámetro.

### **3.6.1 Colonización celular en redes de copolímeros de PEA**

#### ***Aislamiento de h-ADAS***

El aislamiento de las h-ADAS, ha sido realizado por el personal del departamento de Plástica y Cirugía Reconstructiva del Hospital Santa Cristina y Centromin (Madrid, España).

La obtención de las h-ADAS se produjo siguiendo el siguiente protocolo: el cirujano plástico (J. Fernández-Delgado) obtuvo las células lipoaspiradas (Tejido adiposo humano) de una paciente donante femenina sometida a una liposucción selectiva. Los protocolos de aislamiento y el uso de los tejidos fueron aprobados por la junta de revisión institucional del hospital y se almacenaron en el Banco Biológico del Hospital La Paz (Madrid, España). Se obtuvo el formulario de consentimiento de la paciente por medio oral y por escrito. Mediante análisis serológicos sobre las muestras obtenidas de la paciente, se descartaron las patologías-enfermedades, de infección activa por el VIH, el virus de la hepatitis C y la sífilis. El lipoaspirado obtenido a través de la liposucción, se lavó exhaustivamente con PBS, se digirió, y se procesó como se lleva a cabo en otros estudios anteriores<sup>282,331</sup>. El sedimento obtenido se cultivó en un medio no inductivo, que consiste en DMEM (Gibco-BRL) conteniendo 1 mM de piruvato de sodio y 2 mM de glutamina (Sigma-Aldrich), 10% de FBS (Whittaker), y 100 U/mL de P/S. Este protocolo se ha desarrollado en un estudio anterior de los grupos de VISSUM y Hospital La Paz, siendo eficaz en el aislamiento de células h-ADAS capaces de diferenciación en linaje multipotentes<sup>273</sup>. Una vez obtenidas las h-ADAS

se procedió a su colonización *in vitro* en las láminas no porosas de PEA y copolímeros de PEA que se corresponden con el PEA, PEA-HEA10, PEA-HEA20 y PEA-AAc10, y con los distintos recubrimientos proteicos.

El proceso de colonización celular, ha sido realizado por el personal del laboratorio de Ingeniería Celular, IDIPAZ, del Instituto de Investigación del Hospital La Paz (Madrid, España).

Los biomateriales en forma de láminas no porosas y como discos protésicos circulares de 5 mm de diámetro y 100  $\mu\text{m}$  de espesor, se insertaron en placas de 96 pocillos (Corning, NY), se lavaron dos veces con PBS, y se preincubaron en medio de cultivo DMEM. Después de 24 h en incubación, se sembraron en el biomaterial 100000 células en 100  $\mu\text{L}$  de medio, iniciándose el cultivo a 1 y 4 semanas.

### **3.6.2 Estudio de viabilidad celular**

El estudio de supervivencia celular de las láminas no porosas recubiertas con proteínas, ha sido realizado por el personal del laboratorio de Ingeniería Celular, IDIPAZ, del Instituto de Investigación del Hospital La Paz (Madrid, España).

En primer lugar, se realizó la comparación de la supervivencia celular en los diversos biomateriales, solos o con recubrimientos (proteínas), mediante el recuento celular a 1 y 4 semanas después de la siembra. El proceso de contaje de las células se llevó a cabo con dos métodos diferentes.

El primer método se realizó con una tinción DAPI. El DAPI se añadió a una concentración final de 5 ng/ml de medio de cultivo, y se inyectaron sobre las células para incubarse durante 15 min a 37°C. Después de dos lavados con PBS, se añadió medio fresco a las células. Las fotografías realizadas de los núcleos teñidos, se tomaron en zonas de las muestras elegidas aleatoriamente. Para el cálculo del número total de células, se tomaron al menos cinco zonas diferentes, y se realizaron tres repeticiones del experimento. Las fotografías obtenidas, utilizando un objetivo de 20x, se realizaron con una cámara Nikon (Nikon Corporation, Tokio, Japón) montada en un microscopio invertido Zeiss y procesadas con el software Nis-elements (Nikon). El segundo método de conteo, se realizó a través de la colonización celular mediante la tripsinización de los biomateriales durante 5 min: se resuspendieron las células, se tiñeron con azul de tripan al 0.4% (Sigma-Aldrich) durante 1 min, y se realizó el recuento de células vivas bajo un microscopio invertido en un hemocitómetro. Se contó el mismo número de células usando ambos métodos, por lo que se decidió utilizar el método de la tinción DAPI, para después poder utilizar los biomateriales colonizados en posteriores análisis.

### **3.6.3 Implantación de membranas macroporosas en las córneas de conejos**

La implantación de las membranas macroporosas (implantes macroporosos) en las córneas de los conejos, ha sido realizada por el personal del Instituto Oftalmológico Vissum (Alicante, España) y la Universidad Miguel Hernández (Alicante, España).

Los estudios en animales se efectuaron siguiendo las directrices de los Comités de Investigación de Animales, en el Instituto Oftalmológico de Alicante, Vissum (España) y el Hospital La Paz (España), y de acuerdo con las normas de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) para la experimentación animal (Declaración de ARVO para el uso de animales en oftalmología e Investigación de la Visión). Para evaluar la biointegración y seguridad biológica (bioseguridad) de los implantes trasplantados en las córneas de conejo, se realizó un experimento triple-ciego y controlado para cada implante macroporoso seleccionado, con un total de 30 conejos blancos adultos de Nueva Zelanda (Granja San Bernardo, Navarra, España). Antes de la siembra *in vitro* de las células, sobre los implantes macroporosos, las h-ADAS se incubaron en dilución 1:200 con una solución de carbocianina de di alquilo fluorescente de clorometil benzamida, CM-Dil Vybrant (Molecular Probes, Eugene, OR), y en DPBS, durante 10 min. Finalmente, las muestras se lavaron tres veces en PBS. De este modo, todas las membranas intracitoplasmáticas (los orgánulos), excepto el plasma y las membranas nucleares, se marcaron con fluorescencia, y así las células pudieron identificarse fácilmente bajo la óptica de fluorescencia durante el análisis post mortem.

### ***Procedimiento quirúrgico y tratamiento postquirúrgico***

Los conejos fueron anestesiados con una combinación de ketamina intramuscular (35mg/kg) y xilazina (10mg/kg). A los conejos colocados bajo un microscopio quirúrgico, se les practicó una incisión para-

limbal superior, de 5 mm de largo y 200  $\mu\text{m}$  de profundidad con una cuchilla de 45°. En la zona de la córnea central (estroma) se creó un bolsillo intraestromal a profundidad media corneal de 7 mm de diámetro, utilizando una cuchilla pequeña de media luna (SharptomeTM, Sharpoint), para dejar espacio a las membranas macroporosas, que se colocaron desplegadas y centradas dentro de la córnea. A continuación, la incisión se cerró con dos suturas de hilo nylon10-0. Al final de la cirugía, 2 veces al día y durante los 4 días siguientes, se les aplicó profloxacina tópica al 0.3%, clorhidrato ciclopentolato al 0.5%, y buprenorfina subcutánea. Para el estudio experimental *in vivo* con los implantes macroporosos, sólo se empleó un ojo de cada animal, el ojo izquierdo en este caso. La mitad de los implantes (15 ojos) se colonizaron con h-ADAS y la otra mitad fueron membranas macroporosas sin colonización de h-ADAS. Para los controles negativos falsos, se utilizó el ojo derecho, en algunos casos se trataron los ojos contralaterales utilizando el mismo procedimiento que el comentado anteriormente pero sin la inserción de un implante macroporoso, y en otros casos fue un ojo de control sin procedimiento alguno.

#### **3.6.4 Observación postquirúrgica, evaluación clínica e histológica de los implantes**

La observación postquirúrgica y las posteriores evaluaciones (biointegración clínica e histología de implantes), han sido realizadas por el personal del Instituto Oftalmológico Vissum (Alicante, España), el departamento de Oftalmología del Hospital Ramón y Cajal (Madrid,

España) y el departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia (Valencia, España).

Mientras los animales estaban bajo anestesia general, cada ojo tratado fue examinado bajo el microscopio, tal y como se ha descrito en el apartado anterior, a las 2, 4, 8, y 12 semanas después de la cirugía. El examen clínico buscó incidencias del tipo inflamación de la córnea, transparencia (T), neovascularización (N), o cualquier otra superficie ocular o complicación de la cámara anterior, y que se comentan a continuación. La córnea es un tejido avascular cuya transparencia es crítica para la visión, ya que permite la transmisión adecuada de la luz y su refracción a la retina. La presencia de tejido cicatrizado o neovasos sobre o dentro de la córnea, compromete su transparencia, y por lo tanto la función visual del ojo. Todas las incidencias observadas, las evaluó un oftalmólogo experto y externo sobre una base enmascarada. La transparencia corneal se graduó en una escala de 1-4 (1: implante transparente pero visible; 2: bruma leve; 3: bruma moderada; 4: opacificación severa haciendo difícil observar las estructuras internas del ojo) y la neovascularización en una escala de 0-3 según la gravedad (0: ausencia; 1: periférica y leve; 2: periférica y moderada, 3: grave y que afecta a la córnea central). Los conejos se sacrificaron 12 semanas después de la cirugía, por administración intravenosa de una solución de eutanasia T-61, en combinación con embutramida, yoduro de mebezonio, y clorhidrato de tetracaína. Los ojos fueron enucleados, fijados con formalina y embebidos en parafina para su posterior estudio histológico.

### ***Histología y localización de las h-ADAS en el estroma***

Para realizar la histología y localización de las h-ADAS en el estroma corneal, se tiñeron varias secciones de cada córnea con hematoxilina-eosina y tricromo de Masson, y se realizó el examen de microscopía de luz. Las células h-ADASCs marcadas con solución CM-Dil Vybrant se localizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia.

### **3.7 Análisis estadístico de los resultados**

El estudio estadístico de los resultados de la caracterización física de WCA sobre las láminas no porosas se realizó mediante un análisis Two-way ANOVA de múltiples comparaciones.

En el caso de las membranas macroporosas colapsadas con distinto grado de hidrofiliidad, el estudio estadístico de los resultados de los datos de cuantificación de DNA total en el cultivo a 2 horas, 1, 7, 14 y 21 días, se realizó mediante un análisis Two-way ANOVA de múltiples comparaciones según la variable considerada, material o periodo de cultivo.

A las membranas macroporosas colapsadas con distinto grado de entrecruzante, se les realizó un estudio estadístico de los resultados de las propiedades mecánicas y de los datos de cuantificación de DNA total en el cultivo a 2 horas, mediante un análisis Two-way ANOVA de múltiples comparaciones según la variable considerada, grado de entrecruzamiento o espesor de partida. En el caso de los

resultados de la cuantificación de DNA total en el cultivo a 1, 7, 14 y 21 días, también se ha utilizado el análisis Two-way ANOVA de múltiples comparaciones considerando las variables de, periodo de cultivo o espesor de partida. Y por último, en los datos de contaje de núcleos, se volvió a utilizar el análisis Two-way ANOVA de múltiples comparaciones considerando esta vez las variables tiempo de cultivo, profundidad del material o espesor de partida.

El estudio estadístico de los resultados de la cuantificación de FN sobre las láminas no porosas se realizó mediante un análisis “Two-way” ANOVA de múltiples comparaciones según la variable considerada. Finalmente, en el caso de la supervivencia celular se realizó un análisis de t-student con modificación Bonferroni, y en la observación clínica la prueba de Mann-Whitney no paramétrica también con modificación Bonferroni.

En todos los casos se ha utilizado una significación estadística de  $p < 0.05$ . Todos los análisis estadísticos excepto los de supervivencia celular, se han realizado con el programa GraphPad Prism, expresando los valores obtenidos como un valor promedio con su respectiva desviación estándar. Las barras indican el error estándar y los asteriscos las diferencias estadísticamente significativas (4 asteriscos proporcionan la mayor diferencia estadísticamente significativa correspondiente a un valor de  $p < 0.0001$ , 3 asteriscos a un valor de  $p$  entre 0.0006-0.0003, 2 asteriscos a un valor de  $p$  entre 0.009-0.004, 1 asterisco la menor diferencia estadísticamente significativa y sin asterisco ninguna diferencia estadísticamente significativa).



## **Capítulo 4. Resultados y discusión**



En este capítulo se exponen los resultados obtenidos respecto a la estructura y propiedades de la serie de copolímeros de PEA desarrollados para diversas terapias de medicina regenerativa.

Inicialmente se realizó un estudio de los sustratos poliméricos en forma de láminas no porosas con el fin de conocer algunas propiedades físicas y térmicas que pueden afectar a la adsorción de las proteínas y la consecuente adhesión celular. Después, se ha evaluado la morfología y propiedades de los soportes macroporosos previamente al proceso de colapso que conduce a las membranas finas objeto de esta tesis. Además se realizó un estudio biológico *in vitro* con membranas macroporosas colapsadas con distinto grado de hidrofiliidad y el estudio de propiedades de las membranas macroporosas colapsadas de copolímeros de PEA utilizadas como implantes en un modelo de córnea de conejo. Se han realizado cultivos *in vitro* de MSCs sobre membranas macroporosas colapsadas con distinto grado de entrecruzamiento como portadoras celulares y se ha optimizado el método de obtención de las mismas. Finalmente se desarrolló un prototipo de prótesis de córnea siguiendo el modelo core-skirt.

Asimismo, se presentan los resultados obtenidos en los estudios de biofuncionalización y biointegración en un modelo de córnea de conejo sobre copolímeros de PEA en colaboración con otros grupos de investigación.

## **4.1 Propiedades de las láminas no porosas**

Se han efectuado ensayos sobre las láminas no porosas de las 7 redes de copolímeros de PEA, para la determinación del WCA, adsorción de agua y DSC, y cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.1. De esta forma, podemos analizar algunas de las propiedades que pueden afectar a la adsorción de las proteínas, y determinar diferencias entre las distintas propiedades superficiales (topografía, química y energía superficial)<sup>300</sup>, de los sustratos poliméricos estudiados respecto a su interacción con la proteína (resultados que se muestran en el capítulo 4.6).

### **4.1.1 Caracterización del grado de hinchamiento y grado de humectabilidad de las superficies de los materiales**

Tal y como se comentó en el apartado 3.2.1, la determinación del grado de humectabilidad de la superficie de las láminas no porosas se puede determinar por la medida del WCA.

Se puede observar (Tabla 4.1) que la red de PEA es un material amorfo, con una temperatura de transición vítrea de  $-13.7^{\circ}\text{C}$ , por lo tanto, se puede asumir que su comportamiento es el de un material parecido al caucho a temperatura ambiente. Además, el ángulo de contacto del agua ( $72.3^{\circ}$ ) y la capacidad de absorción de agua de sólo un 1.5%, muestran que el PEA es un material muy hidrófobo, característica que influye favorablemente en la cantidad y conforma-

ción de determinadas proteínas de adhesión de la matriz extracelular como la fibronectina.

**Tabla 4.1.** Ángulo de Contacto, Contenido agua en equilibrio, y Temperaturas de Transición Vítrea de las muestras secas y húmedas.

Referencias	WCA (grado)	CA <sub>eq</sub> % (10.000 min)	T <sub>g</sub> seco (°C)	T <sub>g</sub> húmedo (°C)
PEA	72.30 ± 0.07	1.5	-13.7 ± 0.5	-13.9 ± 0.5
PEA-HEA10	69.70 ± 0.30	3.6	-9.8 ± 0.5	-15.1 ± 0.5
PEA-HEA20	67.90 ± 0.05	5	-8.4 ± 0.5	-7.0 ± 0.5
PEA-AAc10	70.50 ± 0.06	4.2	-2.9 ± 0.5	-12.1 ± 0.5
PEA-MAAc10	71.00 ± 0.04	4	6.8 ± 0.5	-10.2 ± 0.5
PEA-AAc20	60.50 ± 0.18	8	-3.9 ± 0.5	3.8 ± 0.5
PEA-MAAc20	71.40 ± 0.05	5	-11.9 ± 0.5	-13.5 ± 0.5

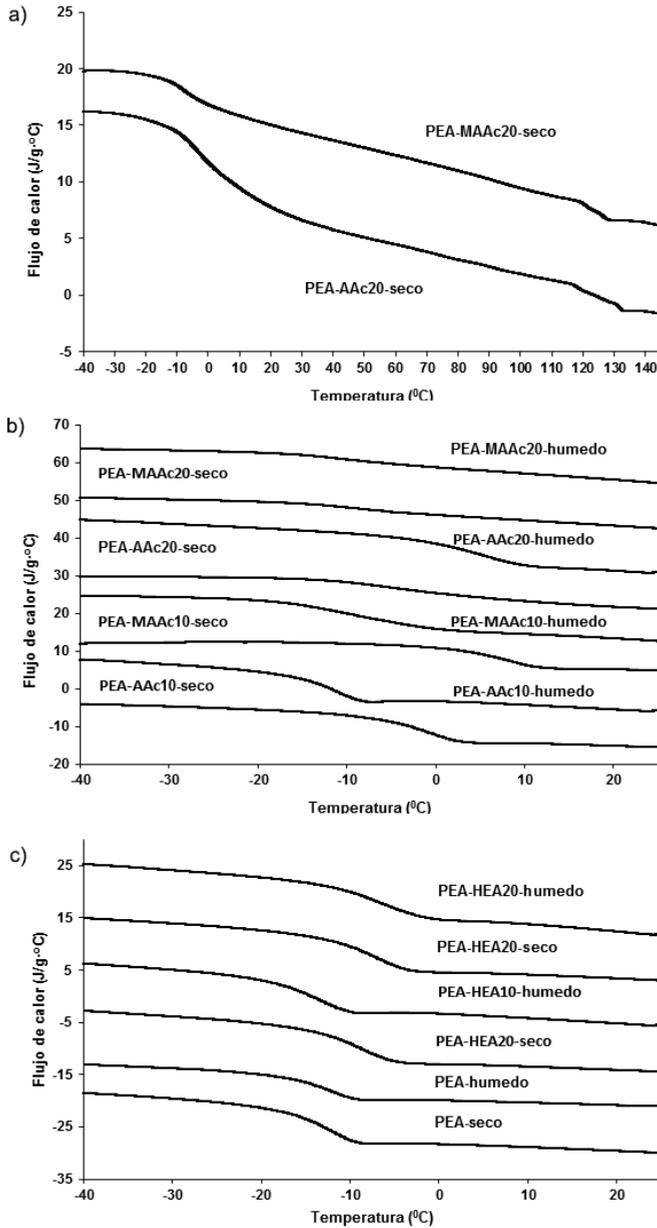
La humectabilidad y la hidrofiliidad del PEA como se ha comentado, puede modificarse mediante la copolimerización con monómeros más hidrófilos<sup>37,50,51,319</sup>. Así pues, la adición de un 20% en peso de HEA aumentó la capacidad de absorción de agua hasta un 5%, mientras que el ángulo de contacto se redujo a 67.9°.

Los copolímeros que contiene un 20% en peso de grupos carboxilos, AAc y MAAC son más hidrófilos, con una capacidad de adsorción de agua del 8 y 5% respectivamente. También podemos observar, como el ángulo de contacto del PEA-AAc disminuyó a 60° para un contenido en AAc del 20%, pero en el caso del PEA-MAAc el aumento producido de la humectabilidad fue muy pequeño.

#### **4.1.2 Evaluación de la homogeneidad de los copolímeros a escala nanométrica: Separación de fases**

La homogeneidad del copolímero producida por la polimerización de los radicales libres se evaluó a través del ensayo de DSC (Figura 4.1). La observación de más de una transición vítrea en los termogramas de calentamiento de DSC pondría de manifiesto, la presencia de separación de fases en el material de copolímero, incluso en dimensiones nanométricas.

La Figura 4.1 (c), nos muestra como el copolímero de PEA-HEA, seco o húmedo, presenta una única transición vítrea que se desplaza en el eje de temperatura con la variación de la composición del copolímero; mientras que en la Figura 4.1 (a) se puede observar como los copolímeros que contienen grupos AAc o MAAC presentan rastros de una transición vítrea a elevada temperatura. Este hecho, puede atribuirse a los dominios formados por los bloques de PAAc o PMAAc, que se asocian formando agregados que tienen su transición vítrea a alta temperatura y cercana a la de los polímeros de PAAc o PMAAc puros.



**Figura 4.1** Termogramas de calentamiento de DSC de las redes de copolímero: (a) PEA-MAAc20 y PEA-AAc20 en todo el rango de temperatura de las medidas, (b) PEA-MAAc y PEA-AAc en el rango de temperatura de la transición vítrea de la fase rica en PEA, y (c) red de copolímeros de PEA y PEA-HEA.

Los termogramas correspondientes a las muestras secas y húmedas de los copolímeros de AAc y MAAC se presentan en la Figura 4.1(b,c), mostrando el efecto de la plastificación debido al agua, lo que confirma la incorporación de los grupos hidrófilos en la fase del polímero responsable de la transición vítrea de baja temperatura.

### **4.1.3 Comportamiento de los materiales inmersos en medio de cultivo celular**

En este apartado se presentan las características evaluadas en las láminas no porosas de copolímeros de PEA, tras 24 horas en medio de cultivo. Tal y como podemos ver en los resultados mostrados en la Tabla 4.2, las láminas no porosas de PEA-AAc20 y PEA-MAAc20 habían aumentado visiblemente de tamaño, debido a la hidratación.

Asimismo, se pudo observar que el pH del medio que contenía las láminas de PEA-AAc10, PEA-MAAc10, PEA-AAc20, y PEA-MAAc20 se acidificó.

En el caso de las láminas de PEA-MAAc10, PEA-AAc20, y PEA-MAAc20 se comprobó que eran opacas, y por lo tanto difíciles de observar bajo el microscopio. En el caso de los copolímeros de MAAC, también se observó que eran menos flexibles que los otros copolímeros, hecho que complicaría su evaluación y más concretamente su manipulación. Estos resultados, se tuvieron en cuenta, por lo que se han descartado en caracterizaciones posteriores.

**Tabla 4.2** Características de las láminas no porosas de PEA y copolímeros de PEA tras su inmersión en el medio de cultivo.

Referencias	pH del medio	tamaño	Transparencia
PEA	7.5	Estable	Sí
PEA-HEA10	7.5	Estable	Sí
PEA-HEA20	7.5	Estable	Sí
PEA-AAc10	7.1	Estable	Sí
PEA-MAAc10	6.8	Estable	No
PEA-AAc20	6.8	Incrementado	No
PEA-MAAc20	6.7	Incrementado	No

## Discusión

Una de las características más importantes de las redes de copolímeros como los sintetizados en esta tesis, es la homogeneidad en la distribución de las unidades monoméricas de los diferentes componentes a nivel molecular. Las diferencias en la reactividad del monómero, puede producir la formación de cadenas de copolímero con un mayor contenido en el componente más reactivo, siempre en promedio.

En el proceso de la polimerización, el consumo del monómero más reactivo, hace que se formen secuencias del componente con menor reactividad, prácticamente puro, al final de la reacción. Este hecho,

puede producir separación de fases a escala nanométrica, con tamaños de dominio de unos pocos nanómetros. Estos dominios apenas pueden observarse por técnicas de microscopía. Sin embargo, la transición vítrea, es un fenómeno que implica movimientos de cadenas de polímero en regiones de reordenamiento de apenas unos pocos nanómetros. Si tiene lugar la separación de fases, la transición vítrea de las diferentes fases implicadas se puede detectar, incluso si el tamaño del dominio es menor que 10nm. Por el contrario, si los componentes se mezclan a nivel molecular en todo el volumen de la mezcla<sup>332</sup>, se detectará una única transición vítrea. Por tanto, los termogramas de DSC de las muestras secas y húmedas nos proporcionan información sobre la estructura a nivel molecular.

Los copolímeros al azar presentan una sola, y amplia transición vítrea que aparece en un intervalo de temperatura situado entre la de los homopolímeros correspondientes. Por el contrario, la presencia de separación de fases (incluso a escala nanométrica, como se ha comentado) produce dos transiciones vítreas; cada una de ellas en el rango de los homopolímeros puros. Estas temperaturas de transición vítrea se encuentran más o menos desplazadas dependiendo del grado en el que cada componente se disuelve en el otro. La Figura 4.1a, muestra el segundo barrido de calentamiento obtenido, una vez eliminada la historia térmica del material, de las redes de los copolímeros secos PEA-AAc20 y PEA-MAAc20. Ambos copolímeros muestran una transición vítrea en el intervalo de temperatura de -20 y 20°C que corresponde a la fase rica de PEA, y otra entre 120 y 130°C correspondiente a la fase del PAAc o PMAAc.

Como puede observarse en la Figura 4.1(b,c), la incorporación de segmentos de AAc o MAAC a la de red del copolímero, se detecta por el desplazamiento de la transición vítrea a baja temperatura con respecto a la del PEA puro cuando el copolímero absorbe agua.

La Tabla 4.1 recoge los valores de las temperaturas de transición vítrea,  $T_g$ , de los diferentes copolímeros. Es interesante comparar la temperatura de transición vítrea de las muestras húmedas con respecto a las muestras secas (sus homologas). La introducción de moléculas de agua en la fase del polímero aumenta la movilidad de la cadena de polímero disminuyendo así su  $T_g$ ; lo que se conoce como plastificación.

En las muestras que contienen un 10% de AAc o MAAC, la plastificación de la fase rica de PEA indica la incorporación de los grupos hidrófilos. Sin embargo, en las muestras que contienen un 20% de AAc o MAAC, los resultados no son tan claros. En principio, un mayor contenido de monómero hidrófilo en la red debería implicar una plastificación más pronunciada, es decir, un desplazamiento mayor de la transición vítrea hacia temperaturas más bajas, y en realidad este no es el caso. La interpretación de este resultado puede atribuirse al hecho de que una parte significativa de grupos de segmentos hidrófilos, se separan de la fase del copolímero rica en PEA, disminuyendo así, su carácter plastificante.

En el caso de las redes de copolímeros de PEA-HEA la temperatura de transición vítrea de los dos homopolímeros no son tan diferentes,  $-13.7^{\circ}\text{C}$  para el PEA y  $5^{\circ}\text{C}$  ( $-9.8^{\circ}\text{C}$  para el caso del 10% de HEA en nuestro caso) para el PHEA<sup>36</sup>. El hecho de que no haya dos transiciones vítreas separadas en los termogramas de DSC de los copolímeros secos, y el desplazamiento de la temperatura de transición vítrea al aumentar el contenido de HEA, parece apoyar la idea de que se está formando un copolímero al azar. En el copolímero de PEA-HEA10, esta transición vítrea claramente se desplaza a temperaturas bajas con la absorción de agua, pero en la muestras con un 20% de HEA esto no ocurre (Figura 4.1c). Este comportamiento mostrado en nuestro sistema, podría deberse a la reorganización de dominios hidrófilos debido a la presencia de agua, fenómeno conocido como interacción hidrófoba<sup>36</sup>.

Dado que los grupos funcionales se introducen en la cadena del polímero mediante la copolimerización, el EA y las unidades monoméricas funcionales se distribuyen a lo largo de las cadenas del polímero a distancias moleculares, y por tanto, la composición de la superficie se espera que refleje la composición promedio del material. Este hecho, y el contenido de los distintos grupos funcionales, afecta a la adsorción de proteínas tal y como se verá en los apartados posteriores 4.7 y 4.8 respectivamente.

## **4.2 Propiedades de los soportes macroporosos no colapsados**

La ingeniería de tejidos persigue la regeneración de los tejidos u órganos dañados con la implantación de una estructura macroporosa en el sitio del defecto. Es difícil predecir el comportamiento mecánico del soporte después de implantarse, siendo esencial en la regeneración de los tejidos musculo esqueléticos, como el cartílago articular o el hueso, donde están sometidos a elevadas cargas dinámicas.

En esta sección se ha estudiado el comportamiento mecánico de soportes macroporosos no colapsados de PEA-HEA10 con diferentes grados de entrecruzamiento. En particular, se analiza el comportamiento del soporte macroporoso no colapsado tras ciclos de carga y descarga hasta el 15% de deformación.

A partir de las imágenes de SEM se estudia la morfología de los soportes macroporosos antes y después del ensayo, y a partir de las curvas tensión deformación, se analiza la deformación permanente que se produce en el material.

### **4.2.1 Morfología**

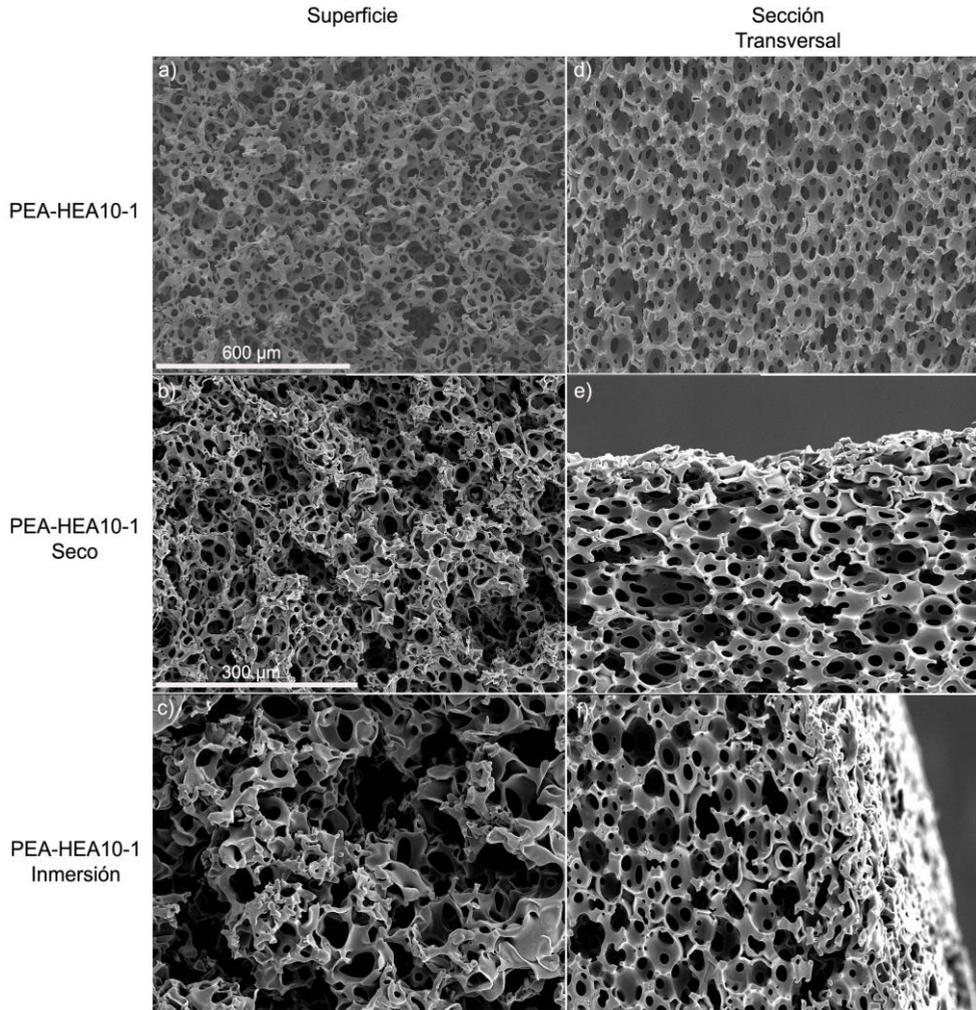
Se ha utilizado la microscopía electrónica de barrido, para analizar la microestructura de los soportes macroporosos tras el ensayo de compresión, verificando si permanece la estructura de poros esféricos bien interconectados o si existe algún cambio estructural como

puede ser la deformación de poros, rotura-deformación de trabéculas,..., comparándolos con el soporte antes de ensayar.

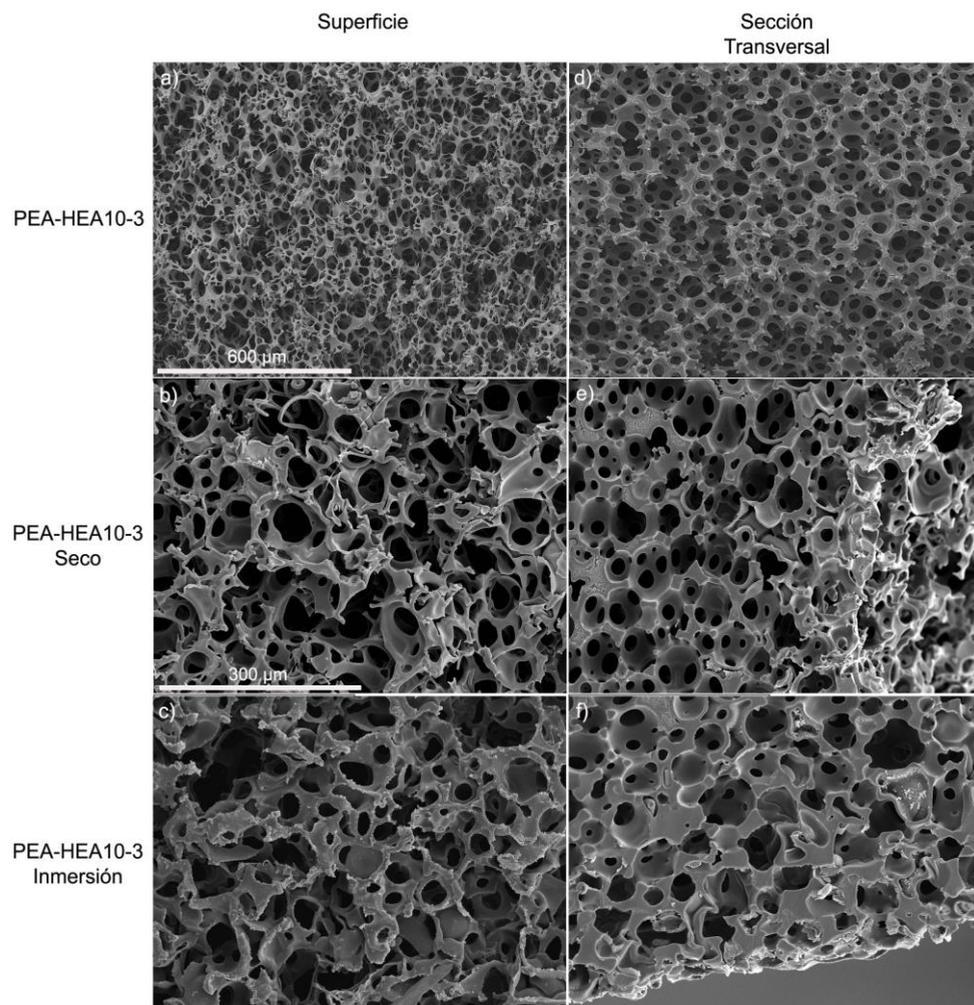
Tal y como se observa en las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4, todos los soportes macroporosos no colapsados previo al ensayo de compresión, presentan una estructura de poros bien interconectados y esféricos.

Además podemos observar (Figuras 4.2a, 4.3a y 4.4a) como los soportes con mayor densidad de entrecruzamiento, presentan poros más abiertos y más interconectados, con trabéculas más finas.

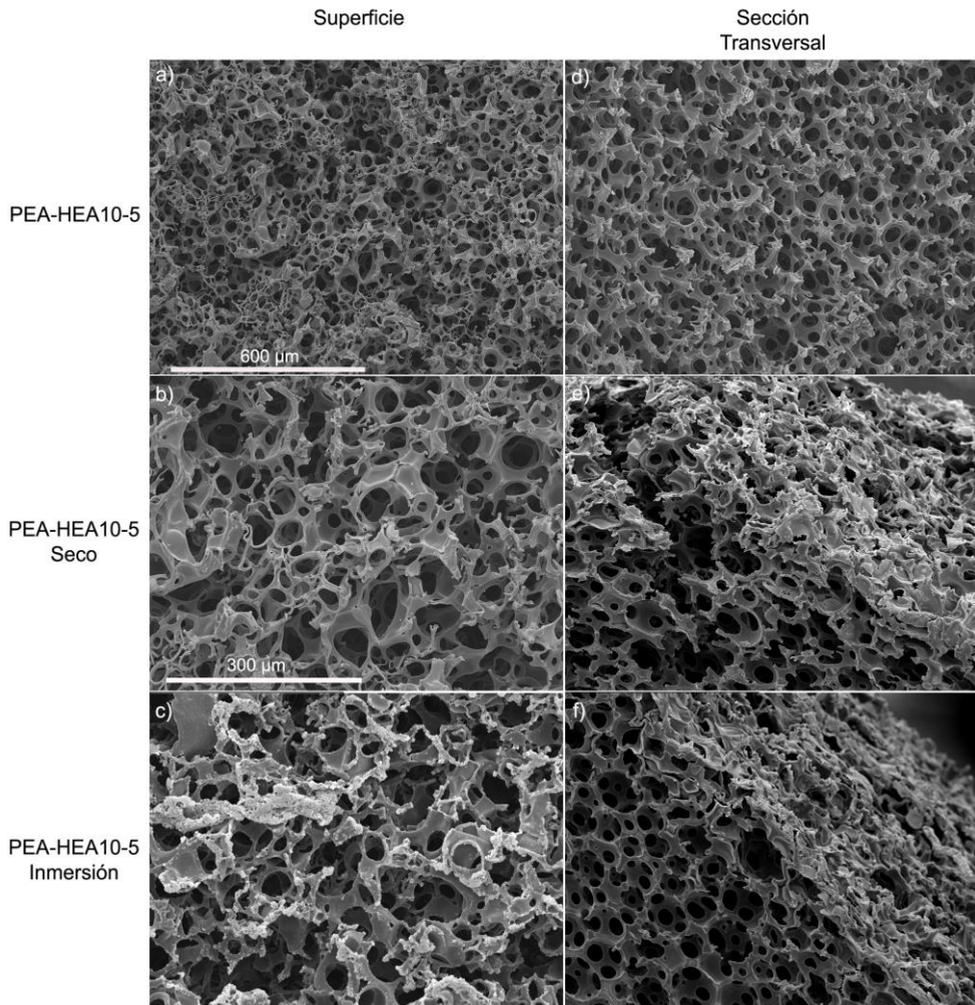
Tras el ensayo realizado de compresión (tanto en seco como en inmersión), y cómo podemos observar en las micrografías de SEM (Figuras 4.2, 4.3 y 4.4), los soportes macroporosos sufren cambios en su estructura como aplastamiento de los poros a nivel de superficie (Figuras 4.2(b,e), 4.3(b,e) y 4.4(b,e)) o rotura de trabéculas, siendo más evidente conforme aumenta la densidad de entrecruzamiento. Este cambio de microestructura también aparece en todos los soportes macroporos ensayados en inmersión (Figuras 4.2c, 4.3c y 4.4c).



**Figura 4.2** Micrografías SEM de la superficie y la sección transversal del soporte macroporoso no colapsado de PEA-HEA10 con 1% EGDMA, antes (a y d, con barra de escala 600  $\mu\text{m}$ ), y después (b,c,e y f, con barra de escala 300  $\mu\text{m}$ ) del ensayo de compresión no confinada. (Imágenes representativas de un total de  $n=3$  réplicas analizadas por muestra).



**Figura 4.3** Micrografías SEM de la superficie y la sección transversal del soporte macroporoso no colapsado de PEA-HEA10 con 3% EGDMA, antes (a y d, con barra de escala 600  $\mu\text{m}$ ), y después (b,c,e y f, con barra de escala 300  $\mu\text{m}$ ) del ensayo de compresión no confinada. (Imágenes representativas de un total de  $n=3$  réplicas analizadas por muestra).



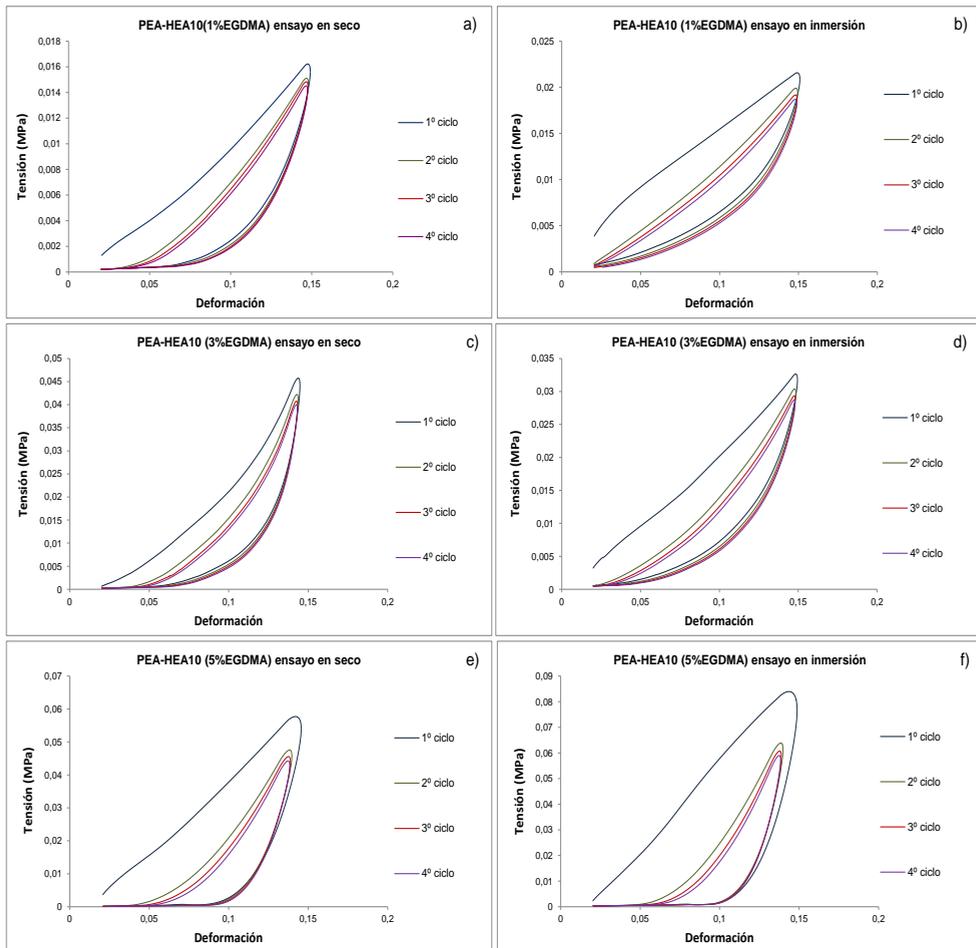
**Figura 4.4** Micrografías SEM de la superficie y la sección transversal del soporte macroporoso no colapsado de PEA-HEA10 con 5% EGDMA, antes (a y d, con barra de escala 600  $\mu\text{m}$ ), y después (b,c,e y f, con barra de escala 300  $\mu\text{m}$ ) del ensayo de compresión no confinada. (Imágenes representativas de un total de  $n=3$  réplicas analizadas por muestra).

#### **4.2.2 Propiedades mecánicas de los soportes secos y en inmersión**

Los resultados del ensayo de compresión no confinada al que se sometieron los soportes macroporosos con distinto grado de entrecruzamiento se muestran en la Figura 4.5.

Como se comentó en el apartado 3.2.6, las muestras se sometieron a una serie de ciclos de carga y recuperación hasta una deformación del 15%, análoga la que sufre el cartílago articular. Como se puede observar en la Figura 4.5, en todos los casos la curva tensión-deformación en el primer ciclo de carga es diferente de las siguientes, lo que se ha denominado efecto Mullins o de reblandecimiento por deformación<sup>333</sup>. Después del primer ciclo de carga y recuperación las curvas son prácticamente idénticas.

Cuando se comparan las curvas tensión-deformación de las muestras ensayadas en seco (Figura 4.5 (a,c,e)) se aprecia un aumento de la tensión máxima alcanzada para la deformación del 15% con el grado de entrecruzamiento, lo que indica un aumento de la rigidez de la esponja. Además se ve en las curvas de recuperación un claro cambio de comportamiento, las muestras con mayor grado de entrecruzamiento (Figura 4.5e) vuelven a carga 0 cuando la deformación es aún del orden del 8%. Este comportamiento a efectos de los sucesivos ciclos de carga y recuperación implica una deformación permanente de este orden, que se asocia con la producción de un cierto colapso en la estructura porosa durante la deformación.



**Figura 4.5** Curvas de histéresis de los diferentes ciclos de carga y descarga del ensayo de compresión no confinada de los soportes macroporosos no colapsados de: (a,b) PEA-HEA10 con 1% EGDMA, (c,d) PEA-HEA10 con 3% EGDMA y (e,f) PEA-HEA10 con 5% EGDMA. (n= 5 réplicas por cada muestra analizada).

Tal y como se observa en la Figura 4.5 (b,d,f), el efecto del agua que rellena los poros en los ensayos de inmersión es muy claro tanto en las curvas de carga con mayor pendiente en las bajas deformaciones, como en las curvas de recuperación que muestra un comportamiento más elástico, ya que la muestra prácticamente recupera la deformación en cada ciclo durante el ensayo Figura 4.5 (b,d).

La muestra más entrecruzada (Figura 4.5 f) es la excepción, el efecto del agua es muy pequeño y la deformación permanente al acabar el ciclo se mantiene en el ensayo de inmersión.

## **Discusión**

Se ha comprobado (Figura 4.5) como los soportes macroporosos no colapsados (con el poro vacío) sufren una deformación permanente tras su deformación hasta el 15% cuando se realiza el ensayo en seco.

Cuando el ensayo se realiza en inmersión, únicamente las muestras del 5% de EGDMA presentan esa deformación permanente. Esta deformación permanente es tanto mayor cuanto más entrecruzado está el polímero. Este comportamiento, se debe no sólo al diferente comportamiento mecánico del polímero en función del grado de entrecruzamiento, sino también a la microestructura (Figuras 4.2a, 4.3a y 4.4a) que en los soportes macroporosos con mayor densidad de entrecruzamiento presenta poros más abiertos y más interconecta-

dos, con trabéculas más finas, tal y como se ha podido observar en la Figura 4.4a.

Este tipo de microestructura, tras someterse a esfuerzos de compresión (en control por deformación), presenta deformaciones permanentes que se deben principalmente a deformación plástica de las trabéculas. Estas deformaciones, también podrían deberse a microfisuras del material con el colapso de los poros, pero este hecho no se ha observado en las imágenes de microscopía electrónica.

Cuando un soporte macroporoso se implanta en un tejido, su estructura porosa se llena de fluido fisiológico y luego progresivamente de tejido neoformado. El papel del agua rellenando los poros puede ser clave en el comportamiento mecánico en compresión.

Si el ensayo se realizara con la muestra confinada sin permitir el flujo del agua que rellena los poros hacia el exterior de la muestra, la incompresibilidad del agua haría que la muestra apareciera como extraordinariamente rígida. En el caso de nuestras muestras en la compresión libre el agua fluye hacia el exterior. Las limitaciones a ese flujo hace que aumente la rigidez aparente aunque sólo ligeramente porque las muestras son altamente porosas. Por otra parte durante la descarga el agua vuelve a entrar en los poros colaborando en la recuperación.

Ambos efectos muestran la importancia tanto de la hidrofiliidad del material que controla la reabsorción del agua, como el impedimento que el tejido neoformado opone a la expulsión del agua durante la carga.

En este sentido nuestro grupo está desarrollando un modelo experimental en el que el crecimiento del tejido regenerado es simulado mediante la inclusión de polialcohol vinílico, PVA, en los poros y proceder a su endurecimiento mediante sucesivos ciclos de congelación y descongelación<sup>334</sup>. Los ensayos en los soportes objeto de esta tesis están en curso actualmente.

La distinta rigidez del soporte no sólo repercute en la capacidad de resistir sollicitaciones mecánicas una vez implantado, sino que también determina la transmisión de tensiones a las células alojadas en su interior. Este hecho es especialmente significativo en el caso de implantes destinados a la regeneración del cartílago articular, sometido a compresión dinámica. Nuestros soportes con distintas densidades de entrecruzamiento (entre el 1 y el 7% de EGDMA) se implantaron en defectos del cartílago articular en un modelo de rodilla de conejo. Este estudio fue realizado por D. Celso Pedraza como parte de su Tesis Doctoral<sup>335</sup>.

A partir de los resultados obtenidos en dicho estudio, puede concluirse de forma genérica que los soportes macroporosos implantados indujeron la regeneración del cartílago en la superficie articular lesionada, de manera inversamente proporcional al grado de entrecruzamiento (pero no de manera significativa), además de que la anidación celular e integración con el contorno también se mejoraba cuanto menor era el grado de entrecruzamiento, y la ocupación de los poros por parte del tejido aumentó con la porosidad del soporte macroporoso en los casos de 1%, 2% y 5% de EGDMA.

### **4.3 Estudio de respuesta biológica de membranas macroporosas con distinto grado de hidrofiliidad.**

Esta sección se ha centrado inicialmente en el estudio de biointegración y comportamiento de células MSCs sobre las membranas macroporosas colapsadas con distinto grado de hidrofiliidad seleccionadas principalmente por los resultados obtenidos de las características de las láminas no porosas inmersas en medio de cultivo celular (apartado 4.1.3), y que serían candidatos a formar parte del anillo de anclaje de la queratoprótesis-prótesis de córnea. Además se ha realizado una caracterización de propiedades de las membranas macroporosas colapsadas implantadas dentro de las córneas de conejos para el estudio de biointegración (apartado 4.7). Esta selección de membranas como implantes macroporosos, además de centrarse también en los resultados de las propiedades estudiadas, se debió a los buenos resultados presentados en el estudio de biofuncionalización y eficiencia celular, y que se muestran en el apartado 4.7.

Tal y como se ha descrito en el capítulo de “materiales y métodos”, la obtención de las membranas macroporosas colapsadas de PEA, copolímeros de PEA con distinto grado de hidrofiliidad, PEA-HEA10 y PEA-HEA20 respectivamente, y PEA-AAc10, se ha efectuado a través de la metodología que combina la técnica de las plantillas y la del colapso anisotrópico, a fin de obtener membranas de 100 $\mu$ m de espesor. La morfología y estructura del poro tras el colapso de las láminas macroporosas, se evaluó a través de la técnica de micros-

copía electrónica de barrido, sobre las membranas de tamaño 5x5mm.

El estudio biológico sobre las membranas macroporosas colapsadas de PEA, PEA-HEA10 y PEA-HEA20, de la eficiencia y proliferación de las MSCs, utilizando ensayos bioquímicos e inmunohistoquímicos, se determinó a diferentes tiempos de cultivo, 2 horas, 1, 7, 14 y 21 días, respectivamente. El planteamiento se centró en el análisis y la correlación del comportamiento celular con las características estructurales, como la topografía y la variable de grado de hidrofiliidad.

Para las membranas utilizadas como implantes macroporosos, además de la microestructura, se caracterizaron el grado de humectabilidad y su resistencia al desgarro.

#### **4.3.1 Análisis morfológico**

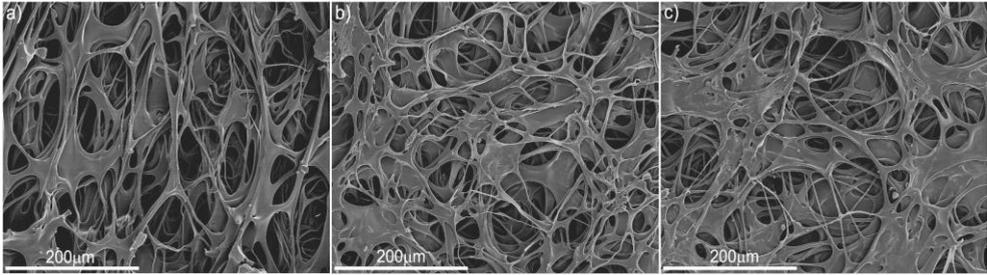
Se prepararon membranas macroporosas colapsadas, de cara a aumentar más la adherencia (proteínas) y mejorar la colonización celular de los biomateriales (cuyos resultados se muestran en los apartados 4.6 y 4.7), con respecto a sus homologas en forma de láminas no porosas.

La polimerización en el volumen vacío dentro de la plantilla produjo una estructura bien interconectada de red de copolímero basada en el PEA. Con esta metodología, se obtuvieron placas de aproximadamente 2 mm de espesor. Cuando la placa se sumergió en acetona

después de la polimerización, la plantilla de PMMA se disolvió. La red de copolímero que queda es insoluble en el disolvente (acetona), debido al entrecruzamiento covalente entre las cadenas de polímero, pero absorbe una cantidad importante de acetona; obteniéndose una estructura macroporosa hinchada, en la que la acetona llena los macroporos.

La evaporación del disolvente causó el colapso de la estructura porosa debido a que el copolímero hinchado en acetona es muy blando. La contracción de la estructura fue anisotrópica, con un colapso significativo en el espesor, y una contracción moderada en la superficie. El resultado fue una membrana delgada, de unas 100 $\mu$ m de espesor.

Se ha analizado la microestructura a nivel superficial de las membranas macroporosas de PEA, PEA-HEA10 y PEA-HEA20 tras el colapso, a través de las imágenes de SEM mostradas en la Figura 4.6, comparando la arquitectura porosa y la interconexión de los poros. Debido a que se usaron el mismo tipo de plantillas de PMMA, para producir las membranas macroporosas colapsadas con las tres composiciones seleccionadas, el estado inicial antes de la evaporación de acetona fue bastante similar en todas ellas. Sin embargo, el colapso de los poros depende de la composición, y más concretamente, en la variación de capacidad de adsorción de la acetona, y propiedades viscoelásticas de los diferentes copolímeros. Como consecuencia, la arquitectura del poro fue ligeramente diferente en las distintas membranas (Figura 4.6).



**Figura 4.6** Micrografías de SEM, de las membranas macroporosas colapsadas utilizadas en el estudio biológico: a) PEA, b) PEA-HEA10, y c) PEA-HEA20. Barra de escala 200  $\mu\text{m}$ . (Imágenes representativas de un total de  $n=3$  réplicas analizadas por muestra)

Examinando las micrografías de SEM, podemos observar cómo todas las membranas macroporosas presentan una buena interconexión de poros. En el caso de la membrana de PEA (Figura 4.6a), el efecto de la interconexión es más elevado en comparación con las otras membranas, haciendo a la membrana más porosa, además de un tamaño de poro idóneo para la penetración celular (con tamaño de poro en el plano horizontal entre 50 y 200  $\mu\text{m}$ ). Sin embargo, en el caso de las membranas macroporosas colapsadas con distinto grado de hidrofiliidad, 10% y 20% en peso de HEA respectivamente, existe una mayor tendencia a colapsar y aplastarse los poros, generándose zonas donde prácticamente no existe estructura de poro abierto (estructuras menos permeables), siendo más acusado en el caso de la membrana con mayor grado de hidrofiliidad (Figura 4.6c), por lo que se puede considerar como la membrana menos porosa.

### 4.3.2 Eficiencia de siembra y adhesión celular

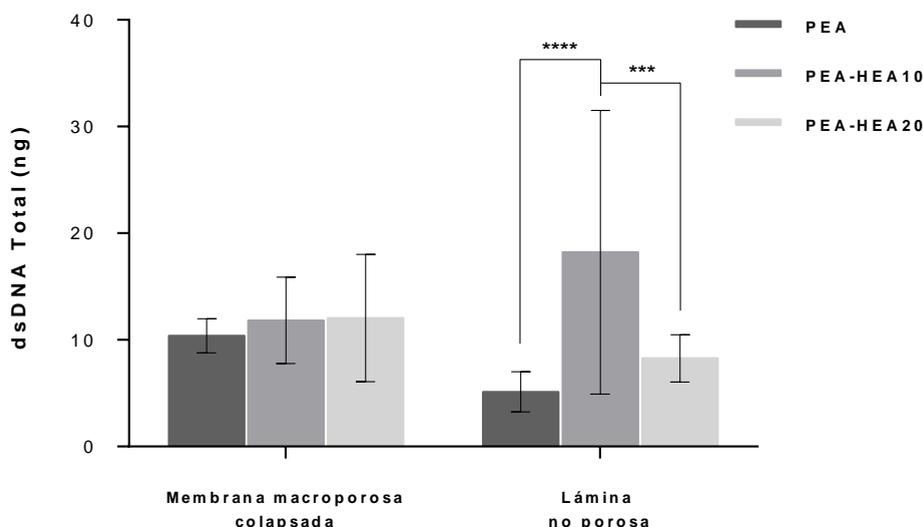
Se llevó a cabo un cultivo *in vitro* de células MSCs de medula ósea porcina durante 2 horas sobre las membranas macroporosas colapsadas y láminas no porosas de copolímeros de PEA con distinto grado de hidrofiliidad.

En este estudio de eficiencia y adhesión celular, para tiempo de cultivo corto, se han analizado los resultados del ensayo bioquímico de cuantificación de dsDNA total y el ensayo de inmunotinción contra vinculina, y cuyos resultados se comentan a continuación.

#### ***Cuantificación de DNA total***

Se ha cuantificado la concentración promedio de DNA total de nueve réplicas de cada tipo de membrana macroporosa y su correspondiente lámina no porosa, obtenidos por medida de absorbancia, y que determinan la eficiencia de siembra tras 2 horas de cultivo. Los resultados se muestran en la Figura 4.7.

Se puede observar que en las membranas macroporosas colapsadas no existen diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia de siembra respecto al grado de hidrofiliidad. Sin embargo, para el caso de las láminas no porosas, sí que se observa un aumento estadísticamente significativo de la eficiencia de siembra en la muestra con un contenido de 10% de HEA.



**Figura 4.7** Cuantificación de DNA total en las membranas macroporosas colapsadas y láminas no porosas, con distinto grado de hidrofiliicidad, cultivadas durante 2 horas. (4 asteriscos  $p < 0.0001$  y 3 asteriscos  $p = 0.0006$ ). (n=9 réplicas por cada tipo de muestra).

Por otro lado, podemos observar como la eficiencia de siembra es ligeramente mayor en las membranas macroporosas de PEA y PEA-HEA20, comparadas con sus correspondientes láminas no porosas.

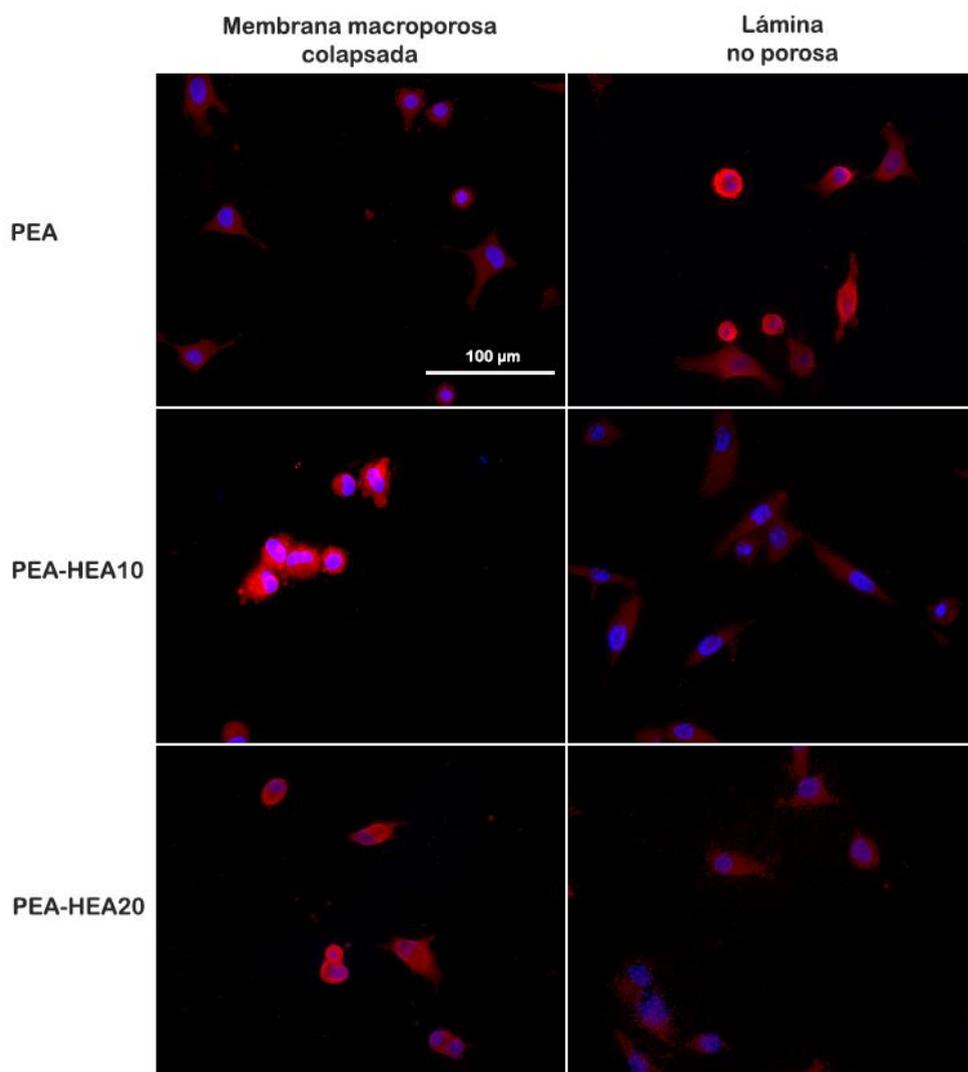
### **Análisis de adhesión y morfología celular**

Se realizó un ensayo de inmunotinción contra vinculina, tras 2 horas de cultivo, para el estudio de adhesión y morfología celular, y se analizaron las micrografías obtenidas con el microscopio de fluorescencia, con respecto a la observación de adhesiones focales, distribución de la vinculina<sup>326-328</sup> y el tipo de morfología celular que pre-

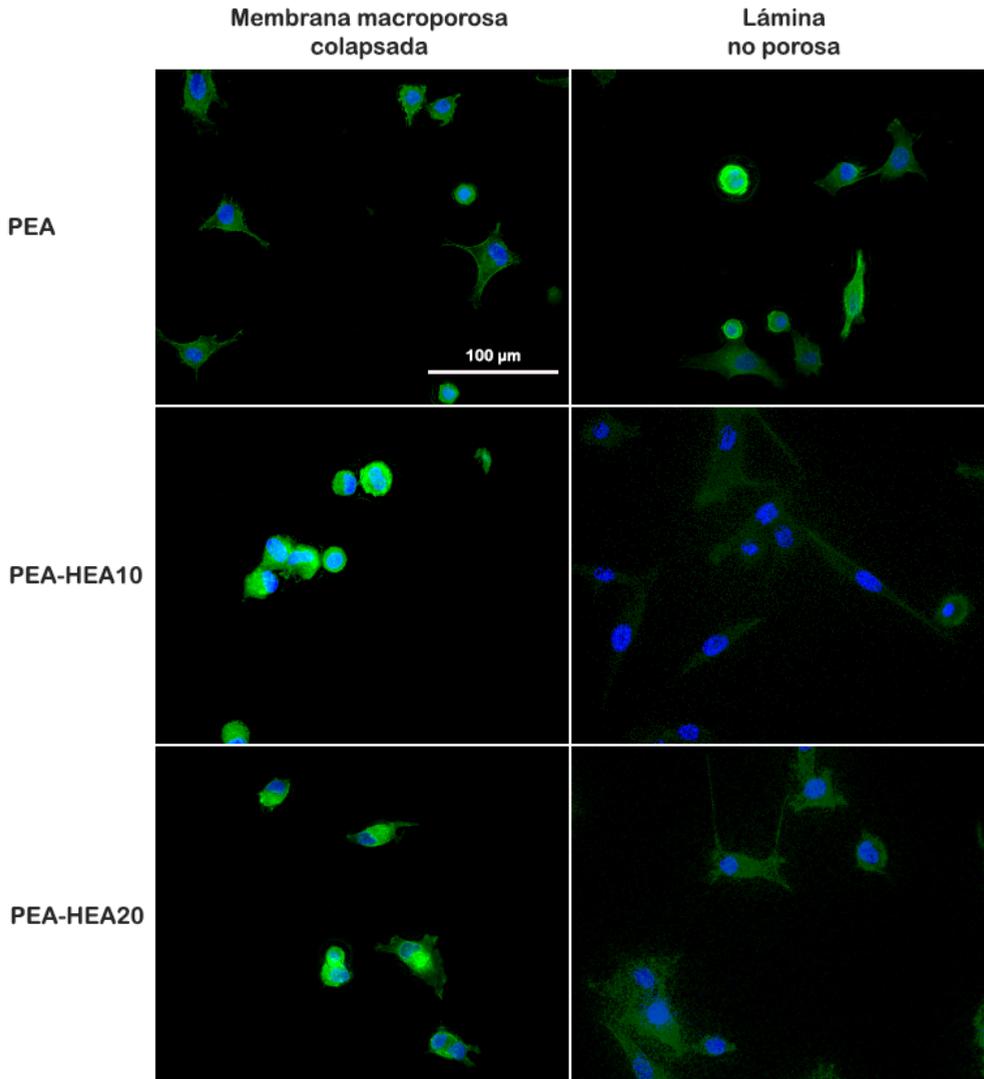
sentan. Estos resultados se muestran en las Figuras 4.8 y 4.9, respectivamente.

Al cabo de 2 horas de cultivo, se observó que las células se habían adherido, sobre todo en el caso del copolímero de PEA-HEA10, donde se aprecia como las células se han extendido y han desarrollado el citoesqueleto de actina de manera definida, debido a la generación de adhesiones focales que polimerizan las fibras de actina, comparada con las demás láminas no porosas.

También se aprecia que a mayor grado de hidrofiliidad, la vinculina que se expresa de manera difusa se concentra más en torno al núcleo, es decir, en la zona perinuclear o introplasmática, asumiendo que el aumento en la proporción de las unidades monoméricas de HEA en las membranas, afectan inicialmente de manera menos favorable a la adhesión y expansión celular<sup>336,337</sup>. Sin embargo, en la membrana de PEA (Figura 4.8), la vinculina se encuentra de una manera más o menos distribuida uniformemente por todo el citoplasma celular y más cercana a la membrana, apreciándose focalizada en las prolongaciones celulares, afectando inicialmente de manera más favorable a la adhesión celular, y de manera menos acusada que en el caso de su homóloga lámina no porosa.



**Figura 4.8** Marcaje de vinculina y núcleo celular de células MSCs de medula ósea porcina (canal rojo y azul, respectivamente) del ensayo de inmuoadsorción contra vinculina para membranas macroporosas colapsadas y membranas no porosas con distinto grado de hidrofiliicidad, cultivadas durante 2 horas. Barra de escala 100  $\mu\text{m}$ . (Imágenes representativas de un total de  $n=2$  réplicas analizadas por muestra).



**Figura 4.9** Marcaje del citoesqueleto y núcleo celular (canal verde y azul, respectivamente) del ensayo de inmunoadsorción contra vinculina para membranas macroporosas colapsadas y membranas no porosas con distinto grado de hidrofiliicidad, cultivadas durante 2 horas. Barra de escala 100 µm. (Imágenes representativas de un total de n=2 réplicas analizadas por muestra).

Con respecto a la morfología celular (Figura 4.9), podemos apreciar como en las láminas no porosas de los tres tipos de copolímeros, las células aparecen más extendidas y se adhieren bien.

Con respecto a las membranas, este hecho ocurre de manera diferente en el caso del PEA, ya que las células se encuentran algo más extendidas al compararse con los copolímeros de distinto porcentaje de HEA. Así pues, el entorno tridimensional juega un papel importante en este hecho. En el caso de las membranas con distinto porcentaje de HEA, el hecho de encontrar células más redondeadas y sin fibras de tensión de actina puede deberse a que en un primer momento las células penetran en los poros de las membranas y les cuesta encontrar puntos de anclaje a los cuales adherirse.

Hay que tener en cuenta que este tiempo de cultivo no es suficiente para que las células puedan adherirse, además como se comprueba en el estudio de proliferación celular para tiempos de cultivos mayores, han sido capaces de adherirse y expandirse en todas las membranas.

#### **4.3.3 Proliferación celular**

Se llevó a cabo un cultivo *in vitro* de células MSCs de medula ósea porcina durante 1, 7, 14 y 21 días sobre las mismas muestras del apartado anterior.

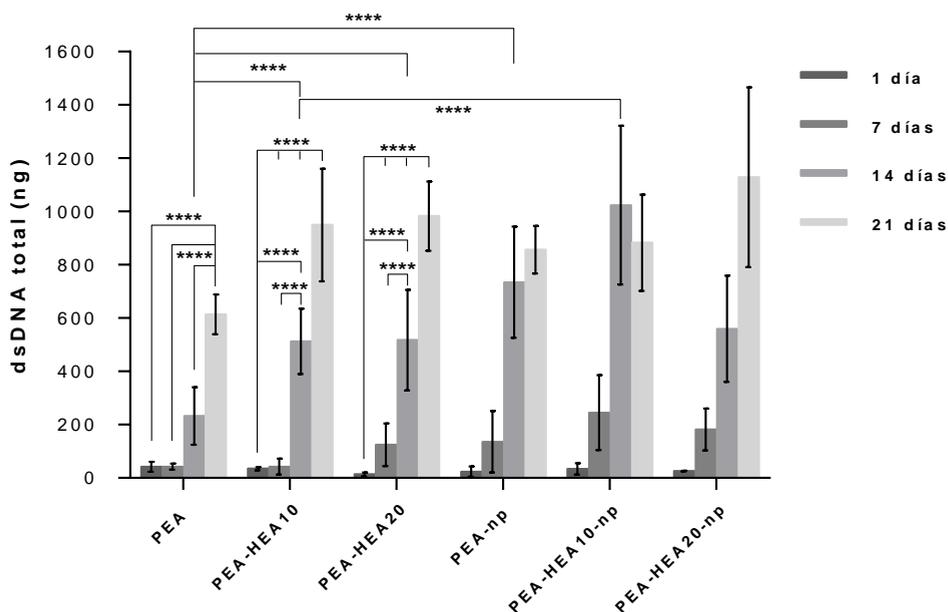
En este estudio de evaluación de la proliferación celular, para tiempos largos de cultivo, se han analizado los resultados del ensayo de cuantificación de dsDNA total y el ensayo de tinción actina-DAPI, y cuyos resultados se comentan a continuación.

### ***Cuantificación de DNA total***

Al igual que en el estudio celular a tiempo corto de cultivo, la proliferación se ha analizado mediante la cuantificación del DNA total. El estudio se ha realizado con el mismo número de réplicas por material y los resultados se muestran en la Figura 4.10.

Podemos observar como las células proliferan en todas las membranas con independencia del grado de hidrofiliicidad o porosidad, y lo hacen en la misma medida.

Además, podemos apreciar en todas las membranas macroporosas colapsadas un incremento significativo en la proliferación celular a través del tiempo de cultivo, siendo más lento durante los primeros días de cultivo y es a partir de la primera semana de cultivo cuando las células comienzan a proliferar más rápidamente, observándose un aumento significativo a día 14, en el caso de las membranas con el grupo funcional HEA con independencia de su proporción. Estos resultados son consistentes con los que se han obtenido de la inmunotinción de actina-DAPI, y que se comentan posteriormente (Figura 4.11).



**Figura 4.10** Cuantificación de DNA total en las membranas macroporosas colapsadas y láminas no porosas, con distinto grado de hidrofiliicidad, cultivadas durante 1, 7, 14 y 21 días. (4 asteriscos  $p < 0.0001$ ). ( $n = 9$  réplicas por cada tipo de muestra y tiempo programado)

En el caso de la membrana de PEA, se observa un comportamiento distinto, ya que las células no comienzan a proliferar hasta prácticamente los 21 días de cultivo, ya que no se observa un incremento significativo hasta este tiempo de cultivo.

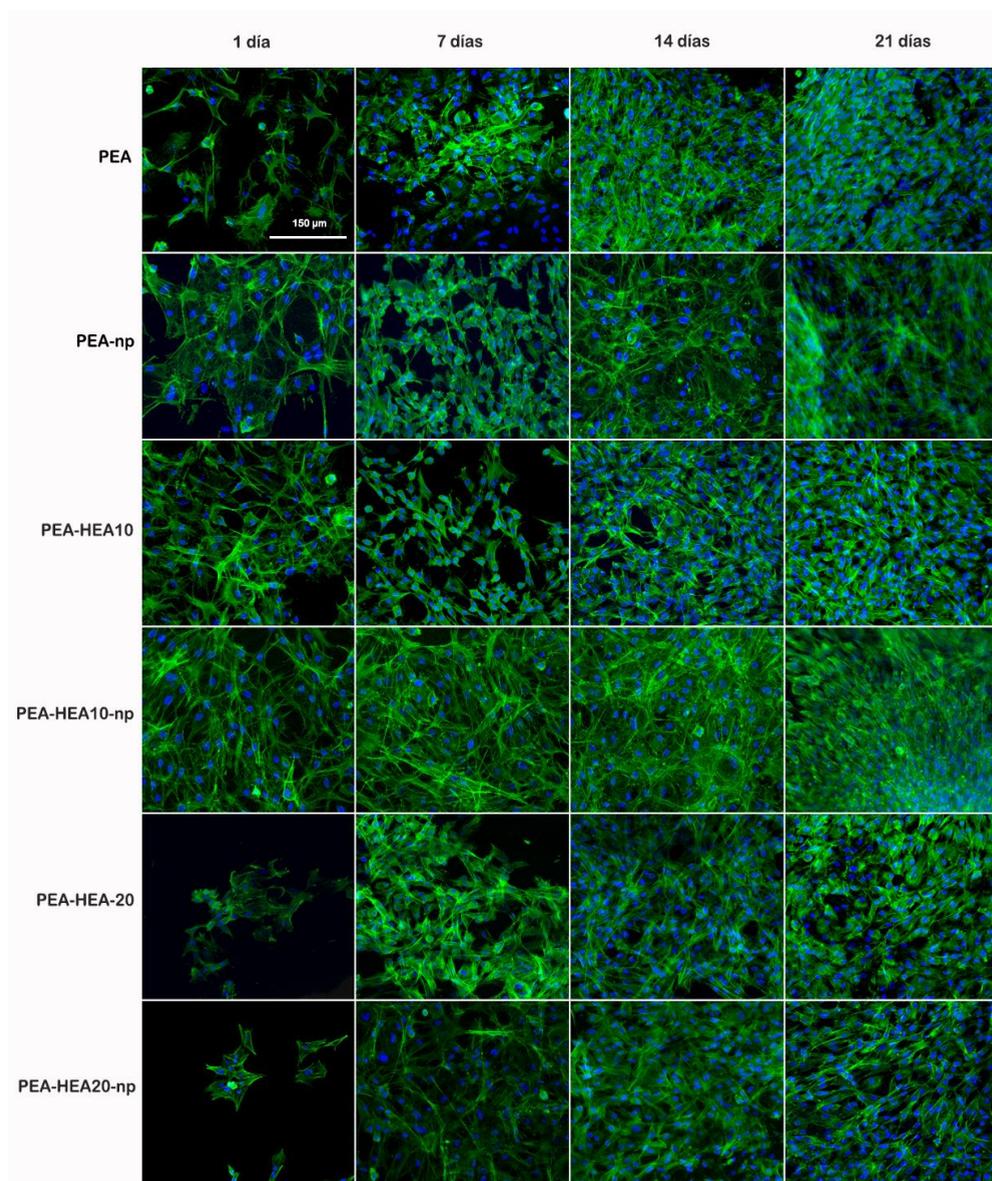
En el caso de la lámina no porosa se puede apreciar como la proliferación celular es más rápida que en las membranas, especialmente en los tiempos cortos.

### ***Distribución 3D de las células***

En el estudio de la capacidad proliferativa de las células sobre los distintos materiales a nivel superficial, y su correlación con el grado de hidrofiliicidad o su porosidad, a tiempos largos de cultivo, se realizó un ensayo de inmunotinción actina-DAPI, y cuyos resultados correspondientes a la observación por microscopía Confocal de fluorescencia se muestran en la Figura 4.11.

Podemos comprobar como las células en todos los materiales proliferan, y que a día 21, es tal la densidad celular, llegando a confluencia, que apenas puede apreciarse la morfología celular. Para tiempos de cultivos más cortos, 1 y 7 días, es posible advertir las diferencias en la distribución celular, de manera que a mayor grado de hidrofiliicidad en las láminas no porosas, mayor densidad celular.

Además, se puede observar (Figura 4.11) que en las láminas hay mayor población celular que en las membranas, estando de acuerdo con los ensayos de DNA total (Figura 4.10). Este hecho pone de manifiesto, que el entorno tridimensional inhibe en cierta medida la proliferación. En el caso de las membranas el efecto de la porosidad no es significativo, ya que puede observarse como en los primeros días de cultivo (7 días), la densidad celular es prácticamente similar en todas las membranas.



**Figura 4.11** Imágenes de microscopía Confocal de fluorescencia correspondientes a la tinción nuclear con DAPI y de la proteína actina del citoesqueleto con faloidina sobre las láminas no porosas y las membranas macroporosas colapsadas con distinto grado de hidrofiliicidad, cultivadas durante 1, 7, 14 y 21 días. Barra de escala 150 µm. (Imágenes representativas de un total de n=2 réplicas analizadas por muestra).

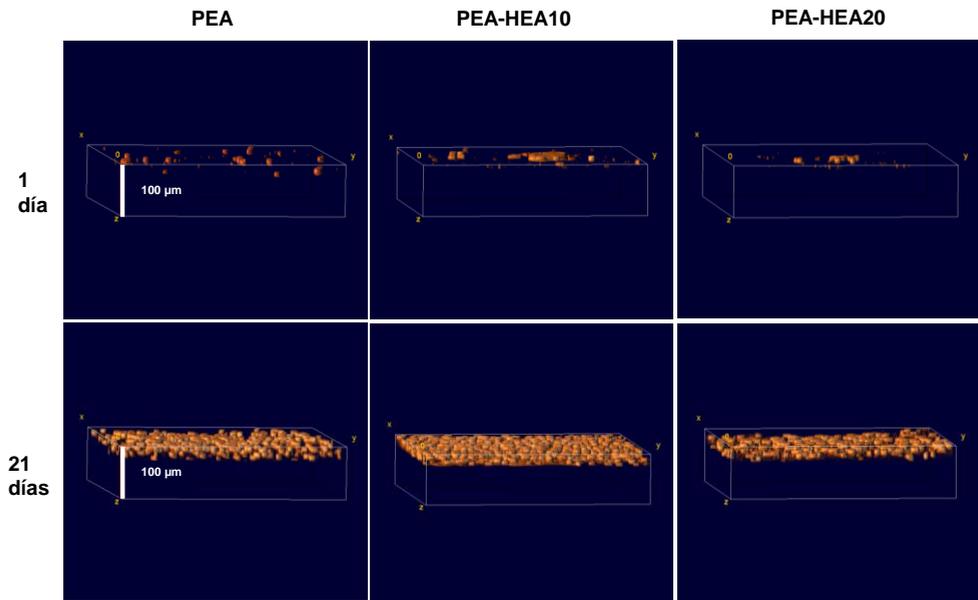
En cuanto a la morfología, no se aprecian diferencias a día 1 con respecto al grado de porosidad, sin apreciarse si se encuentran más o menos expandidas o en la forma estrellada. Con estos resultados, se puede considerar a las distintas membranas compatibles con la proliferación celular.

Para obtener el porcentaje de penetración en las membranas y para los tiempos de cultivos 1 y 21 días (obtener la evolución a lo largo del tiempo de cultivo) se tomaron imágenes en el microscopio Confocal de fluorescencia de las muestras utilizadas en la tinción actina-DAPI.

Las imágenes proporcionadas, se procesaron de forma que se obtuvieron las correspondientes representaciones 3D y el valor de la profundidad de penetración celular, de cada una de ellas, tal y como se muestra en la Figura 4.12 y en la Tabla 4.3, respectivamente.

**Tabla 4.3** Resultados de la penetración celular de las membranas macroporosas colapsadas con distinto grado de hidrofiliicidad a 1 y 21 días de cultivo. (n= 4 zonas por cada muestra analizada)

Referencias	Penetración celular ( $\mu\text{m}$ )	
	Día 1	Día 21
PEA	23	35
PEA-HEA10	12	26
PEA-HEA20	12	24



**Figura 4.12** Representación tridimensional de los núcleos celulares observados en microscopia Confocal de fluorescencia para las membranas macroporosas colapsadas, PEA, PEA-HEA10 y PEA-HEA20, a 1 y 21 días de cultivo. La escala en la dirección vertical es de 100  $\mu\text{m}$ .

El aumento de DNA total observado (Figura 4.10) demuestra la proliferación en las tres membranas. La microestructura de las membranas PEA-HEA10 y PEA-HEA20 que puede observarse en la imagen de SEM (Figura 4.6) presenta trabéculas más aplastadas en comparación con la de PEA, dejando menor interconexión entre los poros pero superficies más planas para la adhesión celular. En consecuencia, como se muestra en los datos de la Tabla 4.3, las células sembradas en la superficie penetran inicialmente en las membranas de PEA-HEA10 y PEA-HEA20 a menor profundidad que en la de PEA.

Con el tiempo de cultivo, las células penetran en estas membranas muy significativamente alcanzando más del doble de la penetración inicial al cabo de 21 días. También en el caso de la membrana de PEA aumenta el grado de penetración de las células con el tiempo.

#### **4.3.4 Evaluación de las propiedades de los implantes macroporosos para el modelo de córnea de conejo.**

El proceso de obtención de las membranas macroporosas colapsadas (PEA, PEA-HEA10 y PEA-AAc10) como implantes macroporosos, fue similar al descrito anteriormente (apartado 4.3.1). El resultado fue una membrana delgada, de unas 100 $\mu$ m de espesor, a partir de la cual se cortaron en piezas de diferentes tamaños para ser utilizadas en las diferentes caracterizaciones.

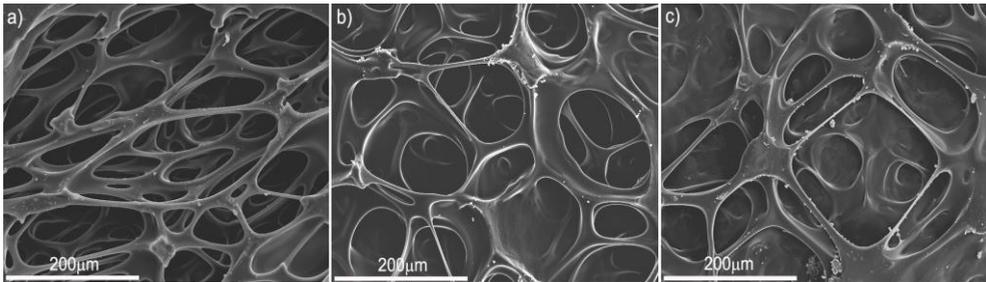
Para mejorar la adherencia y colonización celular de estos biomateriales, fueron implantados en las córneas de conejos con recubrimiento proteico y población celular (resultados mostrados en el apartado 4.7).

#### ***Morfología y determinación del Grado de humectabilidad***

Tal y como se ha comentado anteriormente, el colapso de los poros depende de la variación de la capacidad de absorción de la acetona y propiedades viscoelásticas de los diferentes copolímeros. Estas propiedades ligadas con la composición, generan ligeras diferencias

en la arquitectura porosa de las distintas membranas macroporosas tras el colapso, tal y como se muestra en la Figura 4.13.

Mientras que las membranas macroporosas del homopolímero de PEA y el copolímero que contiene HEA, Figura 4.13 (a,b), respectivamente, presentan una estructura de poros muy bien conectada, con mayor interconexión de poros en el caso del PEA, y con tamaño de poro en el plano horizontal similar que en el caso anterior (apartado 4.3.1) entre 50 y 200  $\mu\text{m}$  (rango adecuado para penetración celular), el copolímero que contiene el grupo funcional ácido, AAc, mostró una cierta tendencia a solaparse, produciendo estructuras menos permeables (Figura 4.13 c).

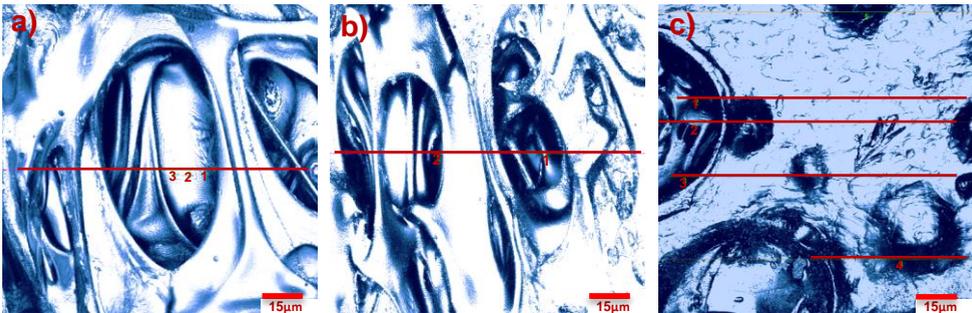


**Figura 4.13** Ejemplos de imágenes de SEM de las membranas macroporosas colapsadas que se han trasplantado en el modelo in vivo: (a) PEA, (b) PEA-HEA10, y (c) PE-AAc10 (barra de escala 200  $\mu\text{m}$ ). (Imágenes representativas de un total de  $n=3$  réplicas analizadas por muestra).

Con el objetivo de analizar la estructura de los poros, se utilizó la técnica de microscopía Confocal (Figura 4.14) donde se determinó la

profundidad de poro y se comprobó la interconexión en el plano transversal. La profundidad de poro se midió en varios puntos, y en zonas de las muestras elegidas aleatoriamente, como se observa en la Figura 4.14, y los valores medios se enumeran en la Tabla 4.4.

Estos valores muestran que las membranas macroporosas presentan una superficie rugosa capaz de albergar células sembradas, y una gran superficie específica para la unión de células y tejidos, tal y como ya se ha visto en los resultados del apartado 4.3.3 para las muestras de PEA y PEA-HEA10.



**Figura 4.14** Ejemplos de imágenes de Confocal de las membranas macroporosas trasplantadas en el modelo *in vivo*: (a) PEA, (b) PEA-HEA10, y (c) PEA-AAc10 (barra de escala 15  $\mu\text{m}$ ). (Imágenes representativas de un total de  $n=4$  zonas analizadas por muestra).

De igual forma, podemos observar como la profundidad de poro aumentó en las membranas de los copolímeros con grupos funcionales hidrófilos, HEA y AAC, en comparación a la membrana macroporosa de PEA (Tabla 4.4), debido a su aumento de la capacidad para ab-

sorber agua durante la última etapa de colapso a vacío, con el intercambio del disolvente acetona-agua.

**Tabla 4.4** Profundidad de poro y ángulo de contacto en agua, WCA, de las membranas macroporosas de PEA, PEA-HEA10 y PEA-AAc10.

Referencias	Profundidad de poro ( $\mu\text{m}$ )	WCA membranas macropo- rosas (grados)
PEA	16.5 $\pm$ 2.0	89.45 $\pm$ 0.09
PEA-HEA10	25 $\pm$ 15	84.52 $\pm$ 0.03
PEA-AAc10	80 $\pm$ 20	77.18 $\pm$ 0.18

El valor de WCA medido sobre las distintas membranas macroporosas (Tabla 4.4), nos indica que el PEA es un polímero hidrófobo. Sin embargo, el WCA se reduce significativamente cuando se le inserta el 10% en peso de HEA o AAc en las cadenas del polímero PEA.

Se ha podido comprobar, que los valores de WCA medidos en las membranas macroporosas colapsadas fueron superiores a los obtenidos en la evaluación de las propiedades de las láminas no porosa planas, aproximadamente 17° en el caso del PEA y 7° en las muestras más hidrófilas, Tabla 4.1 y Tabla 4.4 respectivamente. Este aumento en el carácter hidrófobo, podría ser debido a la rugosidad superficial de las membranas macroporosas, que se asocia con la resistencia de penetración de la gota de agua en sus huecos.

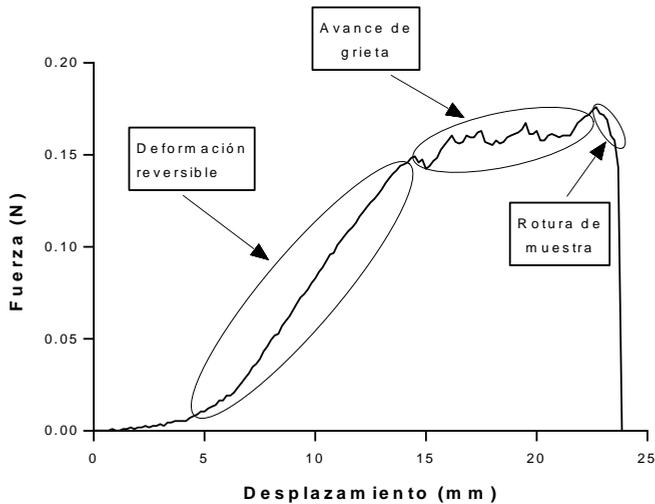
**Resistencia al desgarro**

En el caso de una prótesis de córnea, la membrana macroporosa que actúa de anillo de anclaje, se debe suturar a la córnea para evitar el desplazamiento de la prótesis mientras se integra en el tejido corneal. Por tanto, se realizó el ensayo de resistencia al desgarro sobre las muestras de los implantes macroporosos, para comprobar si son capaces de resistir al desgarro por sutura.

En el proceso de desgarro que sufre la muestra y tal como se muestra en la Figura 4.15, se pueden distinguir tres zonas diferentes; una zona inicial de deformación lineal en la que la muestra se va deformando sin desgarrarse debido a su comportamiento elástico (antes del inicio del avance de grietas), sigue la zona de propagación de grietas a fuerza prácticamente constante, y de poca pendiente donde la muestra deja de deformarse elásticamente y comienza a desgarrarse, correspondiéndose con la zona de picos en los que la fuerza sigue ciclos de disminución y aumentos de fuerza debido a la rotura sucesiva de trabéculas, y finalmente se produce la rotura de la muestra con una caída drástica de la fuerza aplicada.

Se midió la fuerza necesaria para hacer avanzar el hilo a una velocidad constante hasta la rotura de la muestra, pudiendo estimar la resistencia de las membranas al desgarro.

A partir de la curva (figura 4.15) se determinó la fuerza máxima que es capaz de soportar la membrana antes de romper.



**Figura 4.15** Ejemplo de la curva fuerza-desplazamiento obtenida del ensayo de resistencia al desgarro para una de la membranas macroporosa ensayada, PEA-HEA10. La máxima resistencia al desgarro se determina en la zona de rotura de la muestra.

La fuerza máxima obtenida para las membranas macroporosas se encuentran tabuladas en la Tabla 4.5. Podemos observar como en todas las muestras este valor es significativamente más alto que el requerido por cirujanos, para la resistencia a la sutura quirúrgica, y que corresponde al valor aproximado de  $0.04 \text{ N}^{322}$ . Cabe observar que en algunos casos se produjo la rotura del hilo de sutura antes que la de la muestra.

**Tabla 4.5** Valores de la fuerza máxima antes de rotura para la distintas membranas macroporosas colapsadas obtenida del ensayo de resistencia al desgarro. (n= 5 réplicas por cada muestra analizada).

Referencias	Máxima Fuerza (N)
PEA	0.07±0.01
PEA-HEA10	0.17±0.03
PEA-AAc10	0.27±0.034

## Discusión

La técnica utilizada para producir las membranas macroporosas colapsadas de los copolímeros de PEA, permitió obtener membranas porosas y finas, con estructura macroporosa bien interconectada, con ligeras diferencias en la arquitectura de poro entre las tres redes de copolímeros, PEA, PEA-HEA10 y PEA-HEA20.

Con el modelo propuesto de obtención de las membranas macroporosas, se ha estudiado la influencia del grado de hidrofiliicidad en las propiedades estructurales de las distintas membranas.

Tal y como se ha comentado, se ha podido observar como esta variación en la hidrofiliicidad, genera pequeñas diferencias en las características microestructurales de la red polimérica.

Por tanto, cuanto menor grado de hidrofiliidad, el colapso da lugar a membranas con poros más interconectados, mientras que el aumento de las unidades monoméricas de HEA, da lugar a membranas con trabéculas más superpuestas, es decir, una estructura más cerrada y aplastada. Este hecho puede deberse, en nuestro caso al porcentaje de HEA, ya que un aumento en el grado de hidrofiliidad implica una mayor cantidad de acetona absorbida en el proceso de eliminación de la plantilla de porógeno, generando una estructura polimérica más blanda y menos rígida, y en el proceso de colapso, las trabéculas entran en contacto unas con otras y generan mayor movilidad de las cadenas del polímero, pudiéndose enmarañarse unas con otras produciendo adhesiones físicas en las superficies, tal y como se ha podido observar en la Figura 4.6 (b,c).

Este tipo de membranas se desarrolló con el objetivo de formar parte de una prótesis de córnea tipo *core-skirt* como anillo de anclaje con el tejido corneal remanente. Este hecho está condicionado con uno de los problemas que presentan las membranas fabricadas por el modelo *core skirt*, y que corresponde con la biointegración de la prótesis con los tejidos circundantes. La biointegración depende del cumplimiento de requisitos tales como, el diámetro apto de poro<sup>338</sup> para la invasión celular, o la máxima interconexión de los poros<sup>338</sup>. Por tanto se plantearon dos estudios de cultivo celular para la comprobación de la biocolonización de las membranas macroporosas colapsadas obtenidas.

En el primer estudio de adhesión celular, y en concreto en los resultados de los ensayos inmunohistoquímicos, se han apreciado ciertas diferencias entre los distintos copolímeros, de manera que la incorporación de las unidades monoméricas de HEA hace que la célula comience a sintetizar más tardíamente vinculina ya que esta se localiza sobre todo en la zona perinuclear, y el copolímero más hidrófobo tiende a favorecer la adhesión celular ya que la vinculina se encuentra más distribuida por el citoplasma celular, mostrando un comportamiento más parecido a una lámina no porosa.

A pesar de estas diferencias las células son capaces de adherirse a todos los tipos de materiales, aunque en unos lo hagan de una manera más rápida que en otros.

En el estudio de proliferación celular se observó un crecimiento celular tan elevado que a los 21 días de cultivo fue imposible intuir la morfología y orientación celular (Figura 4.11), en todos los materiales. En los primeros días de cultivo sí es posible establecer diferencias entre las distintas redes poliméricas al igual que en su evolución a lo largo del cultivo. En el caso de las membranas se observa una proliferación celular menor en los primeros días de cultivo (crecimiento celular lento), para después prácticamente alcanzar la misma densidad celular que sus respectivas láminas no porosas. Estos resultados coinciden con los encontrados en la cuantificación de DNA total (Figura 4.10), ya que a los 14 días de cultivo se produce un incremento en la proliferación celular, además de observarse una monocapa densa en superficie en todos los materiales.

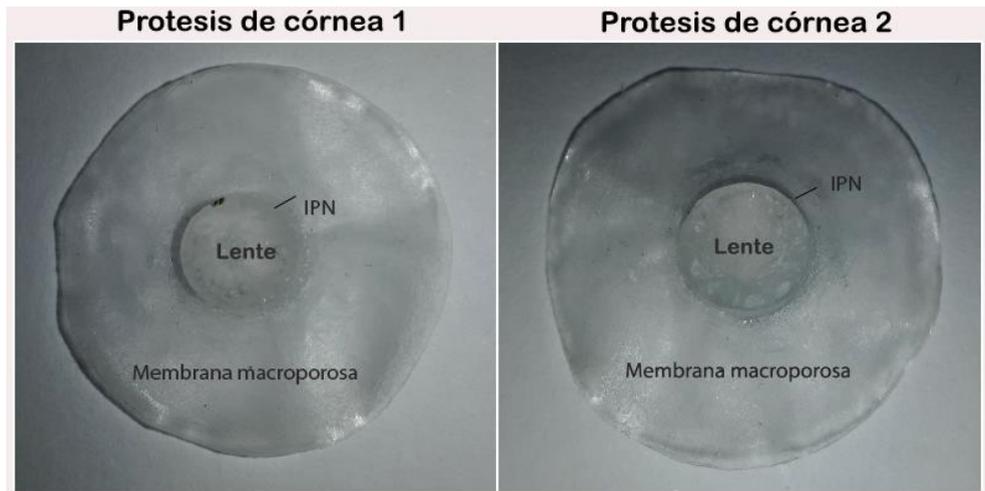
Asimismo se ha podido observar como en todas las membranas se produjo penetración celular. Aunque el copolimero más hidrófobo, PEA, presenta mayor grado de penetración celular a los 21 de cultivo, con todos los resultados obtenidos se puede considerar a todas las membranas estudiadas compatibles con la adhesión y proliferación celular, con independencia de la pequeña cantidad del componente hidrófilo, 10 o 20% de HEA. Por tanto en nuestro caso, el porcentaje de hidrofiliidad en los copolímeros de PEA estudiados no afecta de manera significativa al comportamiento celular. En un estudio se demostró que los mejores comportamiento celulares se encontraban en copolímeros hidrófobos y con pequeñas cantidades de componente hidrófilo (no excediendo del 30%)<sup>51</sup>.

En el caso de las membranas que fueron utilizadas como implantes para córnea en el estudio *in vivo* (apartado 4.7), también se han obtenido estructuras finas y con una red de poros interconectados. Del estudio realizado se demostró que estas membranas son suficientemente porosas, para mantener en ellas las células y ser implantadas en el organismo, o para ser colonizadas por las células en el organismo una vez implantadas. Además todas ellas, presentaron suficiente resistencia al desgarro por sutura con hilo quirúrgico (fuerza de resistencia superior a 0.04N<sup>322</sup>).

## 4.4 Prótesis de Cornea

### ***Diseño, fabricación y estructura del prototipo de prótesis de córnea***

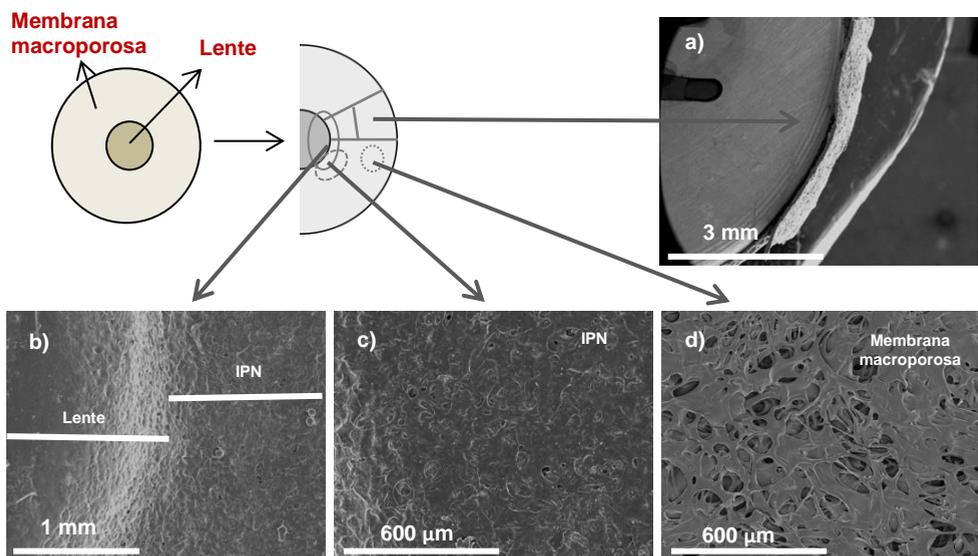
Tras la obtención del prototipo de prótesis de córnea a través de la metodología explicada en el apartado 3.4.1, se procedió a comprobar que la queratoprótesis tipo *core-skirt* obtenida cumplía con los requerimientos de estructura en una única pieza, que se compone de una parte central óptica (lente que en nuestro caso es de PMMA), unida a una membrana macroporosa de PEA a través de una zona de IPN (red interpenetrada del EA y MMA). Inicialmente se procedió a la comprobación de manera visual.



**Figura 4.16** Imágenes de dos prototipos de prótesis corneales obtenidas con diseño de partes integradas en una única pieza: lente de PMMA y membrana macroporosa colapsada de PEA.

Tal y como podemos observar en la Figura 4.16, se aprecia cómo se ha obtenido la prótesis de córnea de partes integradas en una única pieza, intuyéndose de manera clara las distintas partes que la componen, lente, zona de IPN y anillo de anclaje, respectivamente.

A continuación y a través de SEM, se comprobó micro estructuralmente, las distintas partes de la prótesis y que tras la eliminación del PEO la membrana macroporosa de PEA mantenía su estructura porosa.



**Figura 4.17** Micrografías de SEM, del prototipo de prótesis corneal 1 en varias zonas: a) sección transversal de la membrana macroporosa a 4 mm de la lente (barra de escala 3 mm), b) zona central de la lente junto a la IPN (barra de escala 1 mm), c) área de la IPN (barra de escala 600 μm) y d) superficie de la membrana macroporosa colapsada (barra de escala 600 μm).

La muestra cortada en las distintas partes (zona central de la lente junto a la IPN, y zona de IPN mas la membrana macroporosa) se visualizó en los planos, superficial y transversal de la misma (Figura 4.17).

En la Figura 4.17 podemos observar tambien claramente las diferentes partes de la prótesis de córnea. Por un lado, y como vemos en la Figura 4.17 b, se distinguen las dos zonas correspondientes a la lente y la IPN, observándose diferencias estructurales entre ambas.

Con respecto a la zona de la membrana macroporosa, si se compara con su microestructura antes de formar parte de la prótesis de córnea (Figura 4.6a), podemos apreciar en la Figura 4.17c, como los poros aparecen más chafados y cerrados, con abundantes zonas solapadas.

## **Discusión**

El diseño preparado (apartado 3.4.1) para obtener una prótesis de prótesis de córnea tipo *core-skirt*, con la estrategia de ir encajando los distintos materiales en un dispositivo compuesto de piezas metálicas, ha dado lugar a la obtención de un primer concepto de prototipo de prótesis de córnea con partes integradas en una única pieza.

Se ha podido comprobar de manera visual y a través de SEM, como cumplía con los requisitos de estructura en una única pieza (lente unida a la membrana macroporosa a través de una IPN).

En SEM, además se ha podido ver las diferentes partes con una transición continua entre ella, de modo que se han formado los tres tipos de estructura diferentes (lente, IPN y anillo de anclaje) integradas en una única pieza. Sin embargo, se he podido observar como la membrana sufría cambios de estructura tras su integración en la prótesis de córnea. En el estudio estructural de SEM (Figuras 4.6a y 4.17), se observó cómo estos cambios microestructurales que ha sufrido la membrana tras la obtención de la prótesis de córnea están referidos al solape de los poros, mostrando zonas tapadas sin poros, más a nivel superficial ya que en el continuo transversal (figura 4.17a) aunque se ha chafado los poros, parece que sigue la estructura porosa. Este cambio en la estructura porosa podría deberse a varios factores. Por un lado, podría haber habido penetración en los poros, incluso con reacción, de pequeñas cantidades de monómero de MMA en el proceso de polimerización de la lente, sobre todo en la parte superficial debido a un posible flujo de monómero a través de la zona de unión entre las tapas de teflón y la membrana de PEA. Por otra parte, el tiempo de lavado de la prótesis para eliminar el PEO de la membrana macroporosa, podría no ser suficiente, por lo que todavía quedasen restos en los poros, o en el paso de fundido del PEO para su penetración en los poros de la membrana macroporosa, el peso que soporta la estructura PEO y membrana (pesas) es tan elevado que chafa la estructura de los poros. Este último factor también podría tener efecto en la parte de la polimerización de la lente. Por lo tanto, se ha de perfeccionar los protocolos a fin de evitar esta pérdida de porosidad de las membranas.

#### **4.5 Optimización de la arquitectura de poro y repuesta biológica de membranas macroporosas como portadoras bioestables de células.**

Algunas técnicas de ingeniería tisular, requieren de la implantación de un soporte fino y macroporoso, como vehículo para trasplante de células en el organismo. En esta sección del capítulo se estudia la metodología seguida para la producción de membranas macroporosas, flexibles y delgadas, basadas en la red de un copolímero con diferentes densidades de entrecruzamiento (aportando rigidez al copolímero) destinado a diferentes aplicaciones de medicina regenerativa. A destacar, principalmente su uso como portadoras bioestables de células madre mesenquimales a modo de venda o apósito para regeneración de piel, tratamiento de úlceras corneales o bucales, y como anillo de anclaje de una prótesis de córnea, entre otras.

Uno de los problemas que se ha generado en el proceso de síntesis de las membranas macroporosas colapsadas de algunos de los materiales de esta tesis, es la generación tras el proceso de colapso de zonas en la superficie de la membrana donde las trabéculas de los poros se tapan unas a otras perdiendo la estructura de poro abierto. Este hecho, puede implicar que la membrana presente dificultades para la siembra de las células o la invasión del tejido adyacente una vez implantada en el caso de su uso en una prótesis de córnea. Con este fin, se diseñó una variante del método basado en el colapso de poros anisotrópico<sup>77</sup> (primera metodología del apartado 3.1.2) que combina la técnica de las plantillas y la obtención de soportes tridi-

mensionales macroporosos de distintos espesores iniciales antes del colapso de los poros. Se han producido membranas delgadas macroporosas hechas en este caso de la red del copolimero PEA-HEA10, con diferentes densidades de entrecruzamiento. El colapso de poro fue producido por hinchamiento en acetona de los soportes tridimensionales con distintos espesores iniciales, posterior secado por evaporación del disolvente, y finalmente un intercambio por el agua, para producir membranas porosas de 100 micras de espesor.

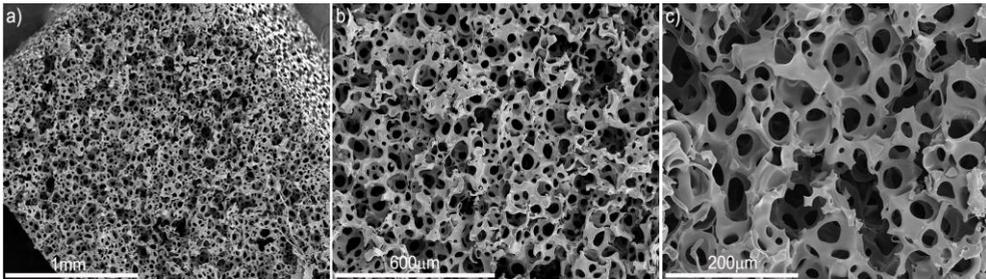
Se seleccionaron las redes del copolimero de PEA-HEA10 para obtener las membranas macroporosas colapsadas, acorde a los resultados que se mostrarán en el apartado 4.7. Además de que estos materiales se han propuesto previamente como soportes de cultivo celular o para producir el anillo de anclaje de una prótesis de córnea<sup>122,210,339</sup>.

Se ha analizado el procesamiento, microestructura y propiedades mecánicas de las membranas macroporosas colapsadas sintetizadas, de manera que se estudió la relación entre la densidad de entrecruzamiento de la red, con la microestructura, y las propiedades mecánicas de las membranas. Además se realizó un estudio del comportamiento celular en el interior de dichas membranas, analizando la eficiencia de la siembra, viabilidad y proliferación de células MSCs.

La morfología del poro obtenido se observó por microscopía electrónica de barrido y microscopía láser Confocal. Las propiedades mecánicas se caracterizaron por los ensayos de tensión-deformación

en modo tracción y resistencia al desgarro<sup>322,340</sup>; y finalmente el estudio de la eficiencia y la proliferación celular se determinó a las 2 horas, 1, 7, 14 y 21 días desde la siembra.

Como se comenta en el apartado 3.1.2, las membranas macroporosas colapsadas de los copolímeros de PEA con distinto grado de entrecruzamiento, se han obtenido a partir de un soporte macroporoso isotrópico o esponja con estructura de poros esféricos bien interconectados como el que se muestra en la Figura 4.18. Como se puede observar, el diámetro de los poros es del orden de 90  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.18** Ejemplos de imágenes de SEM de uno de los soportes macroporosos o esponjas de partida utilizados en este estudio, COP-3 (3% de EGDMA) y 1500  $\mu\text{m}$  de grosor, a diferentes aumentos; (a) barra de escala 1mm (b) 600  $\mu\text{m}$ , y (c) 200  $\mu\text{m}$ . (Imágenes representativas de un total de  $n=3$  réplicas analizadas por muestra).

Uno de los requisitos que debían cumplir estas membranas macroporosa colapsadas según su aplicación, era que mantuviesen una estructura de poro interconectado y abierto similar a la mostrada por

su soporte poroso de partida, de manera que las células pudieran adherirse y proliferasen en el interior de ellas, aunque fuesen membranas finas; y así poder solventar el problema que surge de la metodología de colapso utilizada en la obtención de las membranas macroporosas colapsadas (primera metodología del apartado 3.1.2). Si se corta una lámina de 100  $\mu\text{m}$  de espesor a partir del soporte poroso o esponja, el material se disgrega completamente ya que el espesor de corte es prácticamente el mismo que el diámetro de los poros del soporte de partida (Figura 4.18). Es por esto, que se ha seguido un proceso en el que se colapsa el soporte poroso, compactándolo en sentido transversal. Para conseguir este efecto, simplemente se hinchó en un buen solvente que ablandó el polímero, haciendo que se comporte como un gel y se dejó evaporar el disolvente manteniendo el soporte apoyado en una superficie plana. Al mismo tiempo que sucede la evaporación del solvente, la estructura blanda del soporte se va aplastando en sentido vertical. Como podremos observar (Figura 4.19), la contracción en los otros ejes es mucho menor. Hasta este punto el proceso fue similar al utilizado en los estudios anteriores, sólo con la salvedad del espesor del soporte de partida previo al colapso, siendo esta una de las variables junto con el proceso de parada del colapso, con la que se modificó el procesado de obtención de las membranas y que podrán solventar el problema de zonas solapadas entre poros.

Las membranas con los distintos grados de entrecruzamiento estudiados, tendrán siempre el mismo espesor final de 100  $\mu\text{m}$ , pero para obtenerlas se partirá de soportes porosos de distintos espesores.

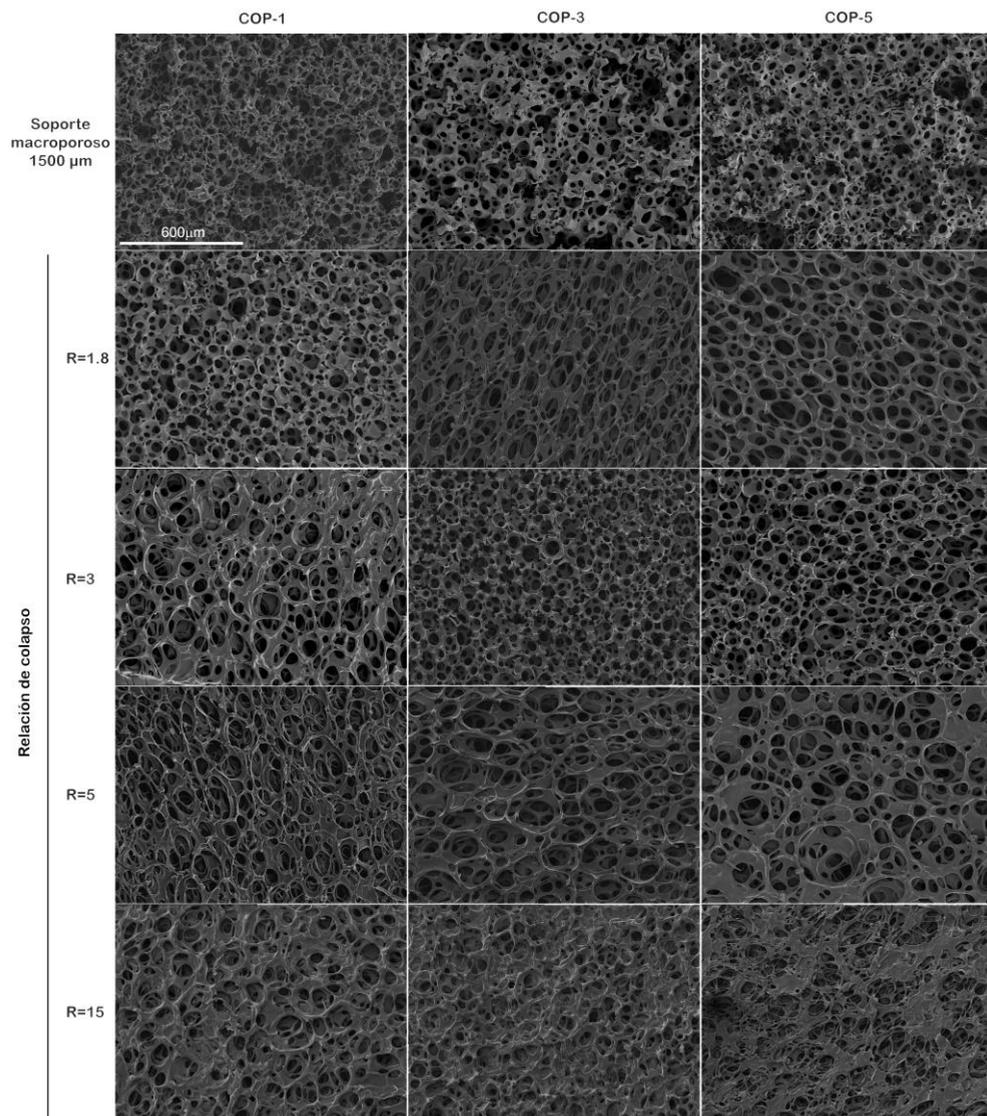
Cuando el grosor inicial es muy grande, 1500  $\mu\text{m}$  en este estudio, la membrana obtenida tiene mucho material en poco espesor y por tanto se espera que sea menos porosa, con zonas de solape de poros, aunque también sea más resistente. Cuando se parte de un soporte de espesor muy pequeño, 180  $\mu\text{m}$  en este estudio, la membrana final está muy poco compactada, y será por lo tanto más porosa y posiblemente menos resistente mecánicamente.

El compromiso está en encontrar una membrana suficientemente porosa para poder sembrarla con células y, sin embargo, suficientemente resistente para poder manipularla y hacer frente a las solicitudes de tensiones en su aplicación.

#### **4.5.1 Microestructura y porosidad**

A fin de analizar la microestructura a nivel superficial de las membranas y compararlas con los distintos soportes macroporosos de partida, además de verificar la porosidad y la interconexión de los poros tras el colapso de dichos soportes macroporosos, se utilizó la técnica de SEM.

Se tomaron micrográficas de los soportes macroporosos de partida (sin colapsar), COP-1, COP-3 y COP-5, y de las membranas macroporosas colapsadas (cuyo espesor final fue de 100  $\mu\text{m}$ ) obtenidas a partir de dichos soportes macroporosos, con distintos espesores antes de colapsar, 180, 300, 500 y 1500  $\mu\text{m}$  y R de 1.8, 3, 5 y 15 respectivamente (Figura 4.19).



**Figura 4.19** Micrografías SEM de los soportes macroporosos de partida COP-X (X=1, 3 y 5% de entrecruzante) y de las membranas macroporosas colapsadas de 100 μm de espesor para las series de COP-X-R (X=1, 3 y 5% de entrecruzante y R = 1.8, 3, 5 y 15). Todas las micrografías han sido tomadas al mismo aumento. Barra de escala 600 μm. (Imágenes representativas de un total de n=2 réplicas por muestra).

Examinando las micrografías mostradas en la Figura 4.9, podemos observar como la arquitectura final de los poros depende de la relación de colapso,  $R$ . Fijándonos, en las micrografías de las membranas macroporosas obtenidas del soporte macroporoso de partida COP-1, podemos observar que existe una mayor tendencia a colapsar y a la pérdida de circularidad del poro con el consecuente ensanchamiento del mismo, conforme aumenta el espesor de las láminas porosas previas al colapso. Así, en la membrana obtenida por el colapso de una lámina porosa de  $180\ \mu\text{m}$  de espesor,  $R=1.8$ , la estructura porosa es bastante similar a la de partida, por el contrario en la membrana que se obtiene a partir de la lámina de  $1500\ \mu\text{m}$  de espesor,  $R=15$ , los poros parecen aplastados.

Al aumentar el grado de entrecruzamiento, el poro colapsado es más abierto y circular, para cualquier  $R$ , tal y como podemos observar en el caso del COP-3 y COP-5, apreciándose una menor superposición de trabéculas.

Al fijarnos en la otra variable, en los tres copolímeros podemos ver que a mayor espesor de partida previo al colapso, menor es la porosidad, ya que el número de capas de material que colapsan también es mayor y lo podemos observar visualmente por la proximidad a la superficie de las trabéculas observadas en el interior de cada poro que aparece en la superficie. Se produce una mayor superposición de las trabéculas en el COP-1 con respecto a los otros copolímeros. Por un lado, si nos fijamos en la relación de colapso  $R=5$ , al aumentar el grado de entrecruzamiento, los poros de la membrana colap-

sada parecen más abiertos e interconectados, con un tamaño de poros que varía desde 50  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$ , y por otra parte, a partir de determinado espesor previo al colapso,  $R=15$ , el número de capas de material que colapsan es tan elevado que no es posible obtener la estructura de poros abiertos e interconectados idónea, sino que la porosidad es muy reducida o casi nula en ciertas zonas, lo cual no permitirá prácticamente la entrada y proliferación de células en su interior como se comprueba en el estudio celular. Además, esta pérdida de estructura tridimensional es más acusada cuanto mayor es el grado de entrecruzamiento de las láminas porosas colapsadas. Además, podemos ver que los poros son altamente anisotrópicos.

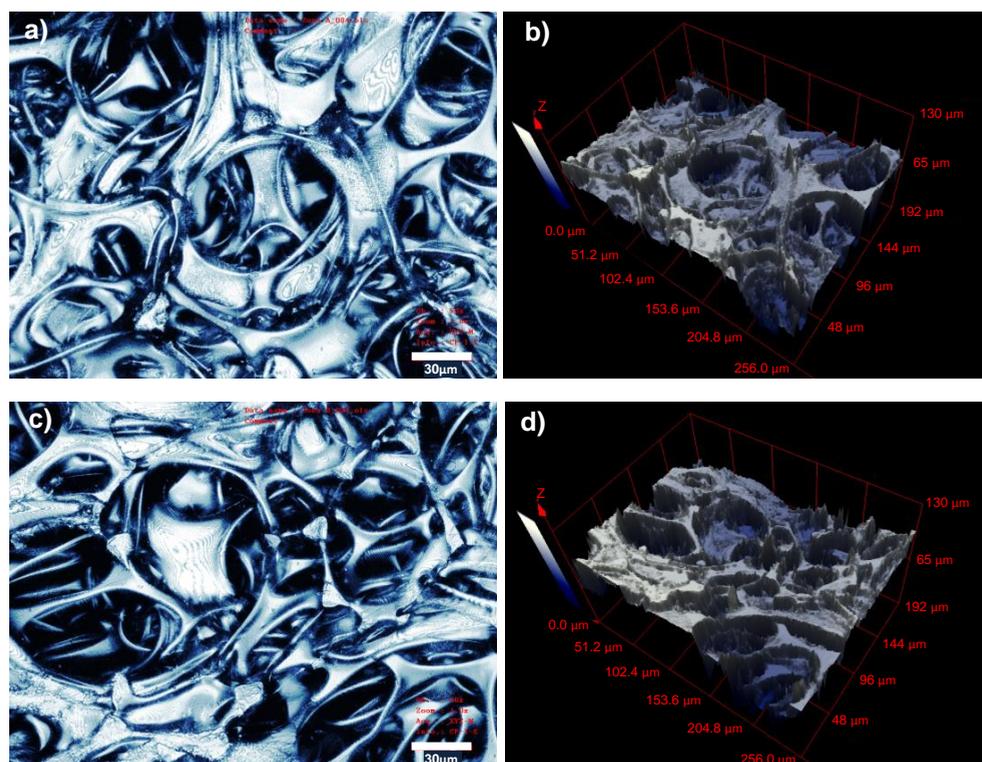
Asimismo podemos observar en la Figura 4.19, que el diámetro de los poros observados en la superficie de la membrana son similares a los del soporte macroporoso de partida, mientras que en promedio en la dimensión perpendicular a la superficie tienen que ser reducidos por la relación de colapso  $R$ .

Finalmente, haciendo referencia a la forma y el tamaño de poro, no se puede extraer una conclusión clara y general en este tipo de caracterización para los tres tipos de entrecruzante, ya que cada membrana macroporosa colapsada de un espesor de partida determinado, presenta unas propiedades distintas según el grado de entrecruzamiento del material.

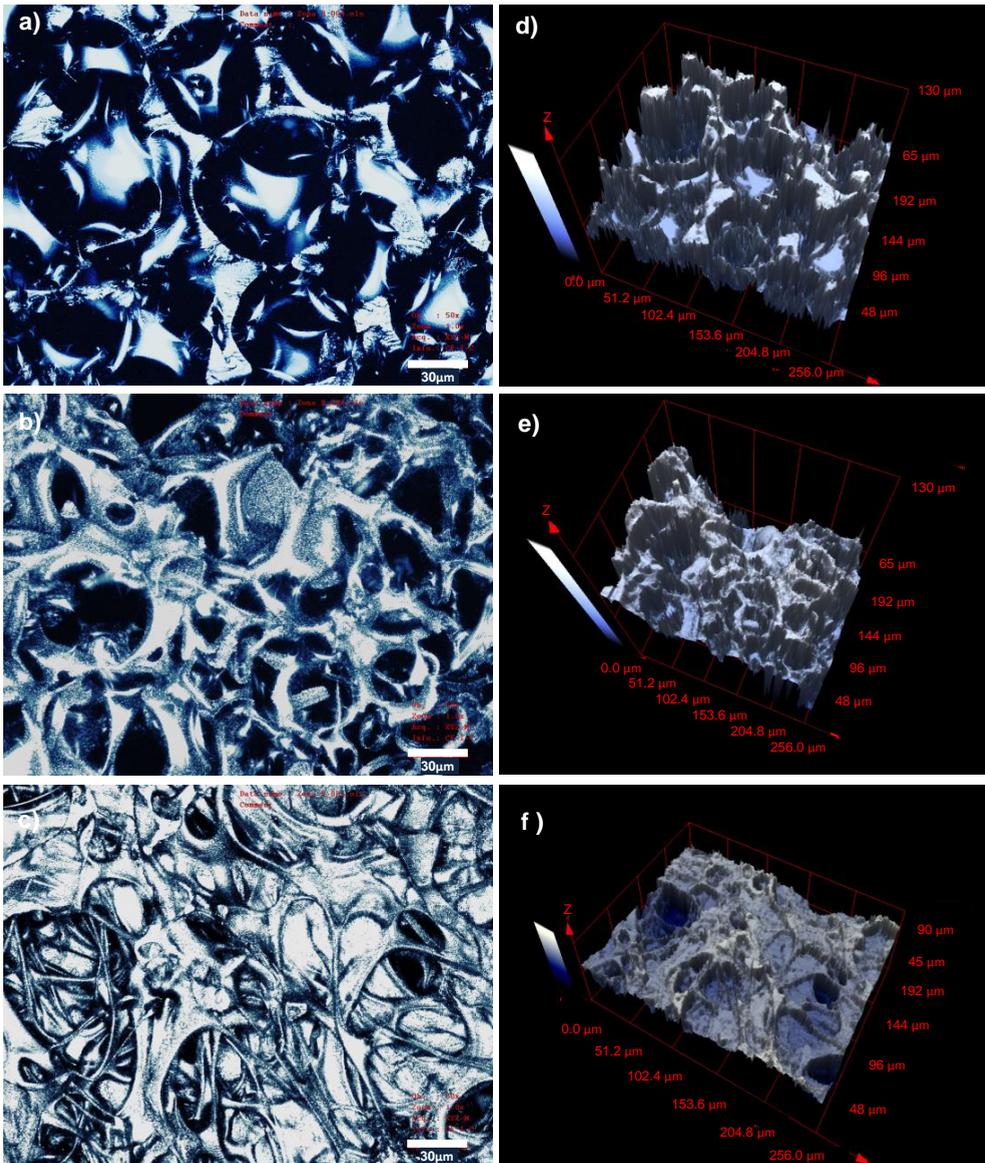
Para completar el análisis de la estructura de poro, y junto con el SEM obtener una visión completa de la interconexión y el grado de aplastamiento de los poros, se ha utilizado la reconstrucción 3D de la geometría a través de la microscopía Confocal láser de barrido.

La reconstrucción en 3D permite obtener una visión de las profundidades de los poros y su interconectividad. La Figura 4.20 muestra como ejemplo, la reconstrucción 3D de las membranas macroporosas colapsadas de los COP-3-R5 y COP-5-R5, en la que podemos apreciar que, aunque la porosidad ha disminuido respecto a la muestra sin colapsar, como se esperaba, todavía hay poros lo suficientemente grandes como para albergar células en el interior, y con un alto grado de interconexión entre ellos. Este comportamiento también se aprecia en menor medida en las membranas macroporosa del COP-1-R5.

De las otras membranas macroporosa colapsadas medidas, y como ejemplo mostrado en la Figura 4.21, se ha observado que hasta la relación de colapso  $R = 5$ , a pesar de que los poros sufren aplastamiento, continúan estando interconectados y en algunos casos, los poros van desde una cara a otra de las membranas. En el caso de la relación de colapso  $R = 15$ , se observa una estructura similar a una película o lamina no porosa, con una elevada topografía superficial rugosa, pero sin poros capaces de alojar células en el interior.



**Figura 4.20** Micrografías del Confocal láser de barrido de las membranas macroporosas colapsadas de 100  $\mu\text{m}$  de espesor. a,c) Imagen de la superficie del COP-3-R5 y del COP-5-R5, y b,d) representación tridimensional del COP-3-R5 y del COP-5-R5. Barra de escala 30  $\mu\text{m}$ . (Imágenes representativas de un total de  $n=2$  réplicas por muestra).



**Figura 4.21** Micrografías del Confocal láser de barrido de las membranas macroporosas colapsadas de 100 μm de espesor: a,b,c) Imagen de la superficie del COP-3-R1.8, COP-3-R3 y del COP-3-R15, y d,e,f) Representación tridimensional del COP-3-R1.8, COP-3-R3 y del COP-3-R15. Barra de escala 30 μm.

Asimismo, se ha determinado la porosidad de la plantilla de PMMA y de los soportes macroporosos de partida.

La medida de porosidad, como se ha comentado anteriormente en el apartado 3.2.5 de “materiales y métodos”, se ha realizado a través de un método de medidas geométricas y pesada de los materiales<sup>321</sup>. En estos cálculos se ha tenido en cuenta la densidad del copolímero en bloque que es de 1.1363 g/cm<sup>3</sup> para el PEA-HEA10 (resultado evaluado en otro estudio) y de 1.19 g/cm<sup>3</sup> para el PMMA.

En la Tabla 4.6, podemos ver los resultados del valor promedio de la porosidad para los distintos copolímeros.

**Tabla 4.6** Porosidad media de la plantilla de PMMA y de los soportes macroporosos no colapsados en función del grado de entrecruzamiento del copolímero. (n= 5 réplicas por cada muestra analizada).

	$\phi$ (%)
PMMA	9±5
COP-1	78±4
COP-3	83±3
COP-5	87±4

Podemos observar (Tabla 4.6), que la porosidad de los soportes macroporosos de partida de todas las densidades de entrecruzamiento es adecuada para el crecimiento celular.

Al observar el valor de la porosidad de la plantilla de porógeno ( $9\pm 5\%$ ), los soportes macroporosos debían tener un valor aproximado del 90% de porosidad. Podemos observar que cuanto más entrecruzado es el copolímero, más se aproxima al valor de porosidad de la plantilla de PMMA. En el caso del COP-5 esta diferencia de porosidad es del 3%. Estas diferencias en los valores de la porosidad de los soportes macroporosos de partida al compararse con la plantilla de PMMA, vienen del proceso de hinchado de la red polimérica en acetona para la extracción del porógeno y posterior cambio por agua para obtener el soporte macroporoso.

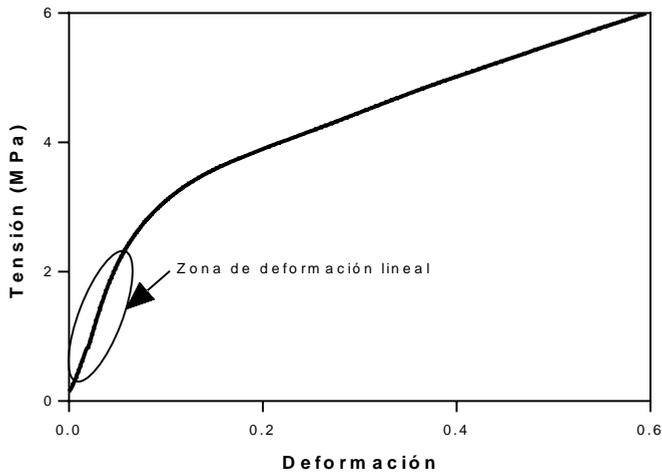
#### **4.5.2 Propiedades mecánicas**

Se realizaron ensayos mecánicos de resistencia a la tracción y al desgarro, cuyos resultados se correlacionarán con las características microestructurales de las membranas observadas en SEM y en Confocal, además de la porosidad. De esta forma se pretende buscar una correlación entre el procesamiento y el comportamiento mecánico de las membranas delgadas.

### **Ensayo de tensión-deformación**

En el caso de la implantación de una prótesis ocular, se ha de tener en cuenta que esta se ve sometida a esfuerzos mecánicos resultantes de la presión intraocular (presión intraocular media se encuentra entre 2-4 kPa<sup>341</sup>), o bien de factores externos de la misma forma que ocurriría en los casos de vendas o apósitos para curación de heridas o regeneración de la piel. Por ello, se han realizado pruebas mecánicas de resistencia a tracción sobre las membranas, que constituyen en el caso de la prótesis ocular, la zona más susceptible de daños, por ser la parte del anillo de anclaje de un modelo de prótesis de córnea como el propuesto en el estudio anterior (apartado 4.4).

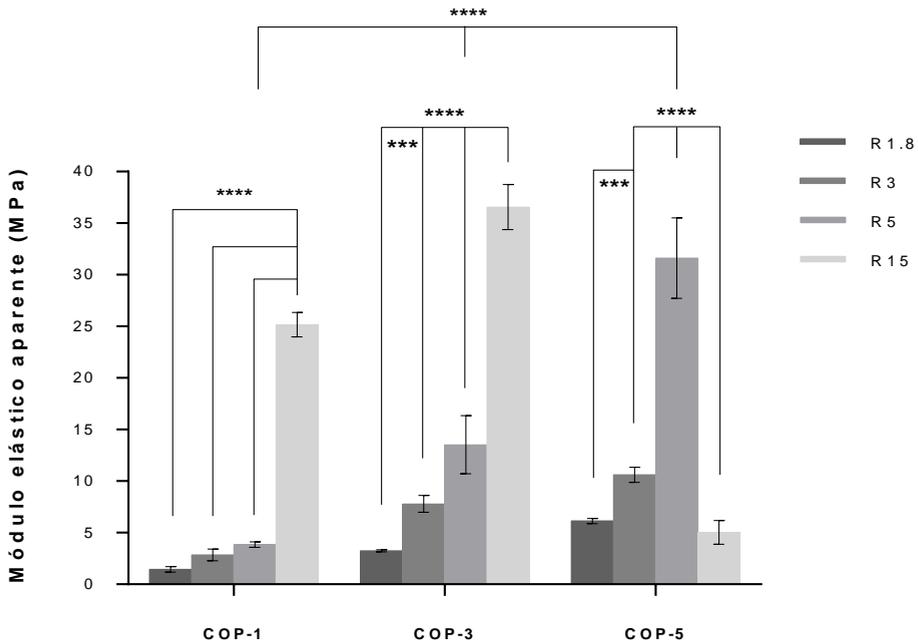
El ensayo de resistencia a tracción consiste en someter una muestra a una fuerza de carácter axial de tensión creciente, y a una velocidad constante, de manera que la deformación del material se va incrementando en función de la tensión aplicada. Así, en el proceso de tracción sobre la muestra, y tal como se representan gráficamente los datos obtenidos del ensayo, en una curva de tensión-deformación (Figura 4.22), se observa una zona de deformación lineal cuya pendiente se corresponde con el módulo elástico aparente o módulo de Young, que nos muestra el comportamiento elástico de un material y su resistencia a la deformación reversible.



**Figura 4.22** Ejemplo de la curva de tensión-deformación obtenida del ensayo de resistencia a tracción para una de las membranas macroporosas, COP-3-R15.

En la Figura 4.23 se muestra gráficamente el módulo elástico promedio de las distintas membranas macroporosas colapsadas estudiadas. Teniendo en cuenta las dos variables analizadas estadísticamente (grado de entrecruzamiento y espesor previo al colapso) podemos observar que el grado de entrecruzamiento tiene un efecto significativo en el módulo elástico. Aumentando el grado de entrecruzamiento, aumenta la resistencia mecánica y la rigidez de las trabéculas de la membrana produciendo valores más altos del módulo elástico para un mismo espesor previo al colapso, excepto entre el COP-1-R1.8 y COP-3-R1.8. La muestra de COP-5-R15 es una excepción, donde el módulo elástico aparente desciende considerablemente, alcanzando valores similares al COP-5-R1.8, mostrando

una fractura frágil, ya que un colapso tan fuerte en un material altamente entrecruzado produce un número importante de defectos en la estructura que induce la propagación de grietas y modos de deformación que hace que el material resista menos.



**Figura 4.23** Promedio de las medidas del módulo elástico aparente de las diferentes membranas macroporosas, COP-1, COP-3 y COP-5, y R = 1.8, 3, 5 y 15. (4 asteriscos  $p < 0.0001$  y 3 asteriscos  $p = 0.0006$ ). (n= 5 réplicas por cada tipo de muestra analizada).

Además podemos observar como la resistencia a deformación aumenta con el incremento de la relación de colapso, R, de manera significativa en el COP-3 y COP-5, excepto para COP-5-R15, en el

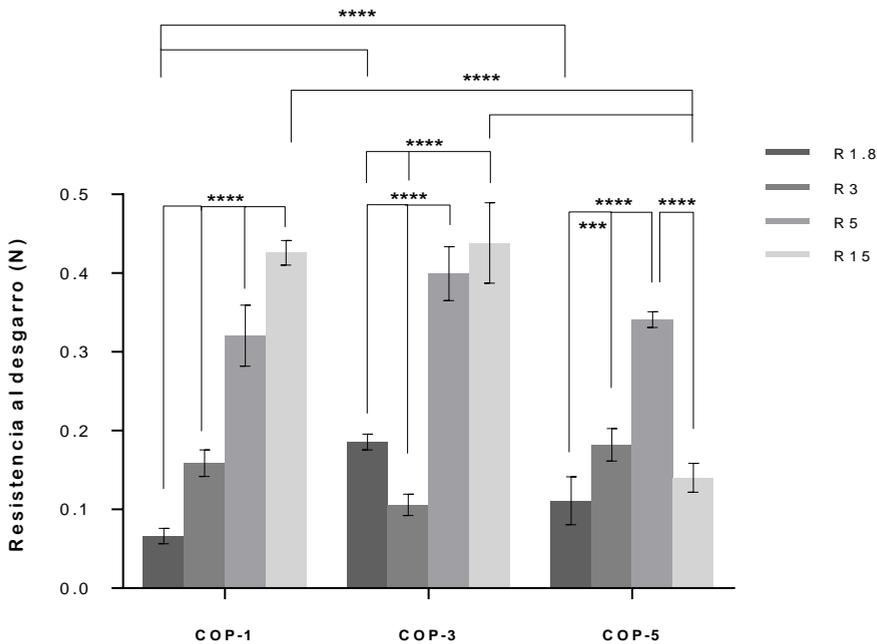
cual, cómo se ha comentado anteriormente, el módulo elástico aparente desciende considerablemente. En el caso de COP-1, el módulo elástico no varía de manera significativa, observándose un módulo elástico bajo hasta la membrana con R15.

### ***Ensayo resistencia al desgarro***

Se ha realizado el ensayo de resistencia al desgarro sobre las membranas, a fin de obtener una aproximación de su resistencia a la sutura. Tal y como se comentó anteriormente en el apartado 4.1.3, la resistencia al desgarro se definió como la fuerza máxima en la región de la propagación de grietas.

Los resultados de la fuerza máxima (resistencia al desgarro en la Figura 4.24), nos muestran de la misma forma que en la resistencia a deformación, que a mayor relación de colapso mayor resistencia al desgarro, para un mismo grado de entrecruzamiento, salvo en la muestra COP-5-R15 donde se observa una disminución drástica, que podría explicarse por la relación directa que existe entre la rigidez y la fragilidad comentadas anteriormente, de manera que las propiedades de resistencia al desgarro se mantienen hasta el punto en el que se combinan una baja porosidad y un grado de entrecruzamiento muy elevado, momento en el que la membrana macroporosa dada su fragilidad, se desgarra fácilmente. Por tanto, el espesor previo al colapso es una variable que influye directamente y de manera significativa en la resistencia al desgarro, es decir, las membranas macroporosas son más resistentes al desgarro cuando el espe-

sor previo al colapso es mayor. Este comportamiento podría deberse al hecho de que cuanto mayor es el espesor previo al colapso mayor cantidad de material colapsa y, como consecuencia, el número de trabéculas que encuentra el hilo en su avance a través de la membrana macroporosa es mayor.



**Figura 4.24** Promedio de las medidas directas de la resistencia al desgarro, es decir, de la fuerza máxima aplicada en el ensayo (fuerza máxima que soporta la membrana macroporosa antes de empezar a desgarrarse) para cada grado de entrecruzamiento y espesor de partida previo al colapso. (4 asteriscos  $p < 0.0001$  y 3 asteriscos  $p = 0.0006$ ). ( $n = 5$  réplicas por cada tipo de muestra analizada).

Podemos observar (Figura 4.24) que el grado de entrecruzante tiene una influencia menor en la resistencia al desgarro en comparación con el espesor previo al colapso, comentada anteriormente, ya que no hay diferencias estadísticamente significativas. Además se puede observar, incluso que en el COP-5-R, existe una disminución de esta característica con respecto a los otros dos copolímeros. No obstante, la resistencia al desgarro óptima obtenida corresponde al material con un grado de entrecruzamiento intermedio, COP-3, independientemente del espesor inicial.

Realizando un análisis comparativo de los resultados obtenidos de microestructura y propiedades mecánicas, se puede ver como una menor porosidad de las membranas colapsadas conforme se aumenta el espesor previo al colapso, se traduce en una mayor resistencia a la tracción; del mismo modo que mayor grado de entrecruzamiento de las cadenas, da lugar a membranas de poro más abierto y circular, a la par de más rígidas y más resistentes a la deformación, hasta el punto en el que mayor grado de rigidez y menor porosidad de las membranas afecta negativamente a la resistencia a deformación.

Asimismo, se ha observado que a mayor porosidad de las membranas y más parecida es su estructura a la del soporte macroporoso de partida, menor resistencia a desgarro ofrecen. Además, el material con grado de rigidez intermedia, COP-3, que previo al colapso es el más poroso, da lugar a membranas colapsadas con características estructurales que proporcionan una mayor resistencia al avance del hilo a través de dichas membranas.

En base a los resultados mostrados, se decidió que el COP-3 era el material más apropiado para el ensayo de proliferación celular a tiempos largos de cultivo, 1, 7, 14 y 21 días.

Se desarrollaron dos estudios celulares, con el fin de analizar y correlacionar el comportamiento celular con las características estructurales, en este caso la topografía<sup>342</sup> y las propiedades mecánicas<sup>342</sup> de los materiales.

El estudio de la respuesta biológica “*in vitro*”, buscó por un lado encontrar los requisitos de porosidad óptimos que permitan la siembra de células en los poros de estas membranas, y por otro lado comparar la capacidad de expansión de las MSCs de cerdo alojadas en los poros de los materiales con similitud de estructura de soporte tridimensional macroporoso, o adheridas en la superficie de una membrana macroporosa más similar a una monocapa-lámina no porosa. Todas las muestras se han cultivado de igual manera, mediante la colocación de la suspensión celular sobre una de las caras de los materiales.

#### **4.5.3 Eficiencia de siembra y adhesión celular**

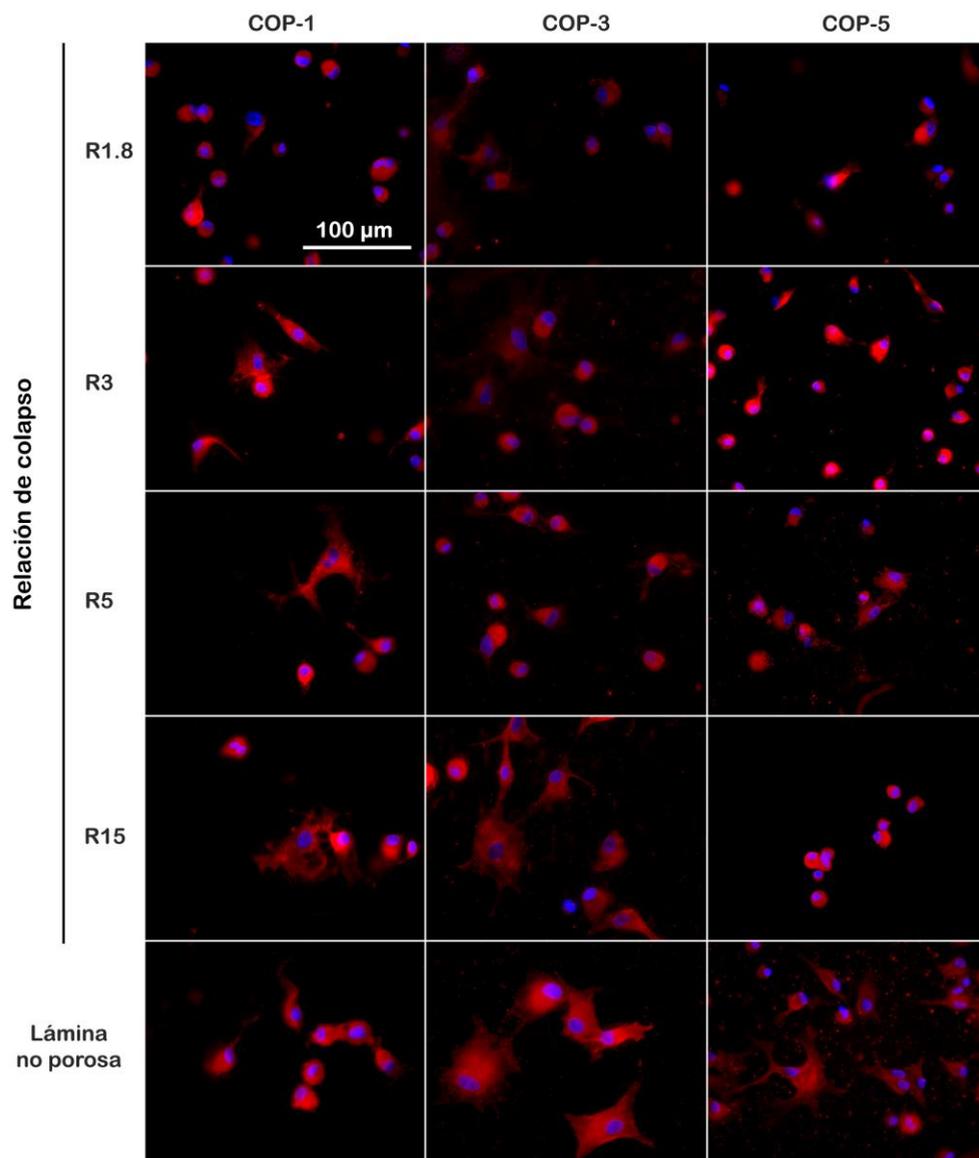
Este estudio biológico celular a tiempo corto de cultivo, 2 horas, con MSCs de cerdo en pase 2, se ha efectuado sobre las láminas no porosas y las membranas macroporosas colapsadas, de los copolímeros con distinto grado de entrecruzamiento y espesores previos al colapso.

### ***Inmunohistoquímica***

Para el análisis de la morfología celular, verificar que las células se adhieren y que tipo de adhesión presentan, tras 2 horas de incubación, se efectuó un ensayo de inmuoadsorción contra vinculina. Los resultados del ensayo inmunohistoquímico contra vinculina con los núcleos marcados con DAPI se muestran en la Figura 4.25 (Imágenes representativas de un total de  $n=2$  réplicas analizadas por muestra) y Figura 4.26 (Imágenes representativas de un total de  $n=2$  réplicas analizadas por muestra).

En el análisis y comparación de las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia, en relación con la observación de las adhesiones focales y distribución de la vinculina, se observó que, en las láminas no porosas y planas, al cabo de 2 horas, las células se habían adherido (Figura 4.26), especialmente en el caso del COP-3-np, en las que se puede apreciar como las células se extienden y desarrollan el citoesqueleto con fibras de tensión, demostrando que se forman adhesiones focales a partir de las cuales polimerizan las fibras de actina.

Sin embargo, la tinción con vinculina (Figura 4.25), aunque intensa, se expresa de manera difusa por toda la superficie celular y no se ven las placas características en el contorno.



**Figura 4.25** Marcaje de vinculina y núcleo celular (canal rojo y azul, respectivamente) del ensayo de inmunoadsorción contra vinculina para láminas no porosas y membranas macroporosas colapsadas de 100  $\mu\text{m}$  de espesor con distinto grado de rigidez y relación de colapso, cultivadas durante 2 horas. Barra de escala de 100  $\mu\text{m}$ .

Observamos, que al aumentar el grado de entrecruzamiento, la vinculina se concentró más en la zona perinuclear o introplasmática. Por tanto, se puede decir que una rigidez elevada, genera inicialmente un efecto poco favorable a la adhesión y expansión celular<sup>336,337</sup> (Figura 4.25).

Por el contrario, se pudo apreciar que al aumentar el espesor previo al colapso de las membranas y más se parecen estas a una lámina no porosa por su superficie plana, más acusado en el caso del COP-3, la vinculina se encuentra más o menos distribuida uniformemente por todo el citoplasma celular y más cercana a la membrana, observándose focalizada en las prolongaciones celulares y una extensión mayor de la célula, es decir, el elevado número de capas de material colapsadas afecta de manera positiva a la adhesión celular.

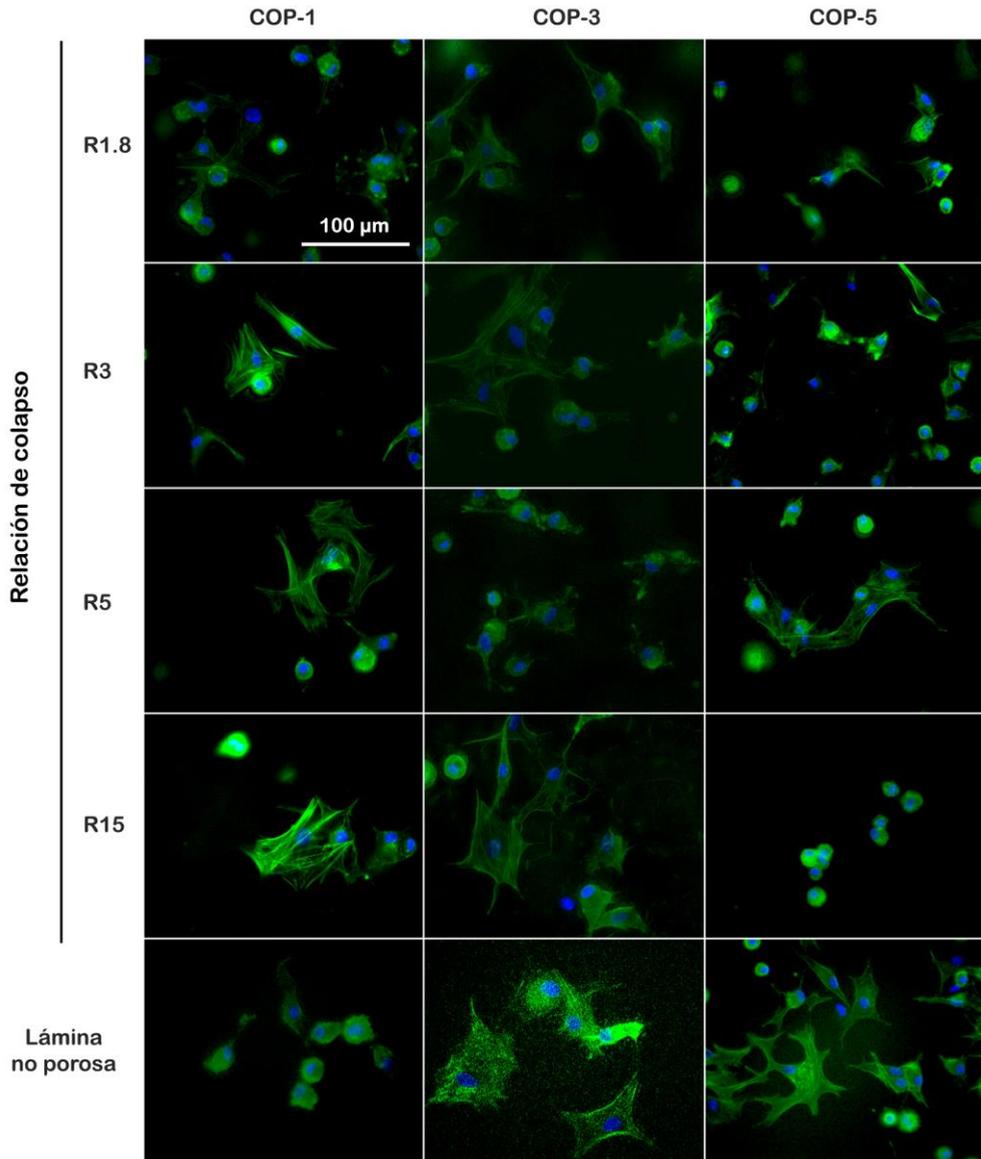
En la Figura 4.26, podemos observar como en las muestras de las láminas no porosas COP-3 y COP-5, las células se extienden y se adhieren bien, y sin embargo son más redondeadas en la lámina de COP-1. En el caso de las membranas, ocurre lo contrario, ya que en las membranas de COP-1 las células se encuentran más extendidas, en comparación con los otros copolímeros.

Tal y como sucedía en las membranas con distinto grado de hidrofili- cidad del estudio anterior (apartado 4.3), este hecho pone de mani- fiesto, que el entorno tridimensional juega un papel importante en este caso. En los soportes planos, las células han mostrado un pa- trón “normal” de comportamiento, ya que al cabo de 2 horas apare- cen extendidas y con el citoesqueleto formado.

Sin embargo, en algunas membranas se observan zonas con células extendidas, pero en muchas otras se encuentran redondeadas. Esto, podría deberse a que las células en un primer momento penetran en los poros de la membrana y en los mismos les cuesta encontrar puntos de anclaje, de manera que inicialmente tienen más dificultad para encontrar superficies de material a las que adherirse, por lo que se muestran redondeadas y sin fibras de tensión de actina.

Obviamente, hay que tener en cuenta que no todas las membranas se comportan igual porque los entornos que encuentran son muy heterogéneos.

A pesar de estos resultados, se ha de tener en cuenta que con tiempos de cultivos mayores, se puede esperar que, las células sean capaces de adherirse y expandirse en todas las membranas y láminas estudiadas, aunque en unas lo hagan más rápido que en otras; así para poder comprobarlo es aconsejable realizar el mismo ensayo con un periodo de incubación superior a las 2 horas.



**Figura 4.26** Marcaje del citoesqueleto y núcleo celular (canal verde y azul, respectivamente) del ensayo de inmuoadsorción contra vinculina para láminas no porosas y membranas macroporosas colapsadas de 100 µm de espesor con distinto grado de rigidez y relación de colapso, cultivadas durante 2 horas Barra de escala de 100 µm.

### ***Cuantificación de DNA total***

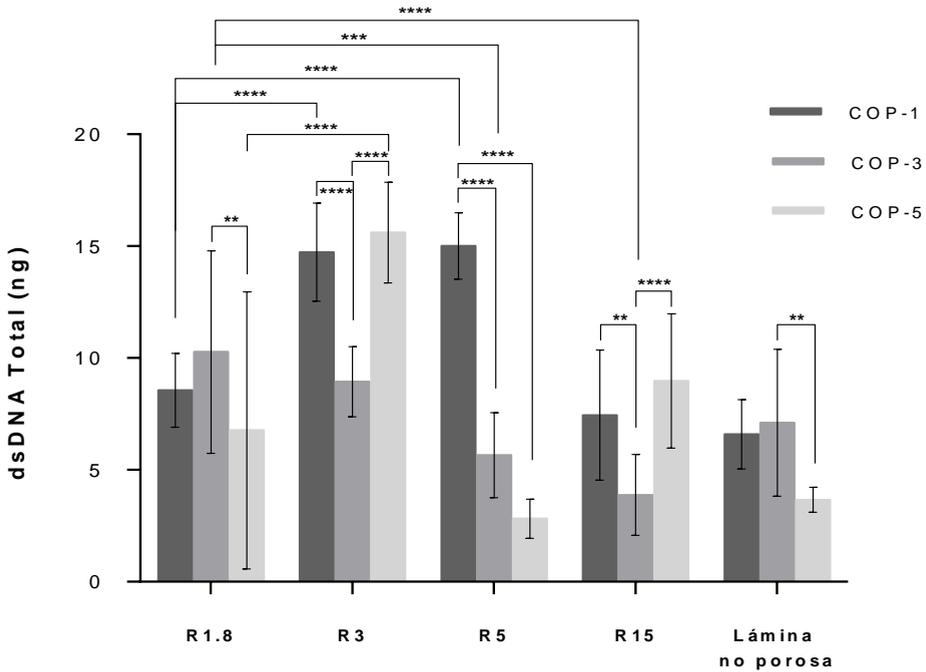
Como se comentó en el apartado 3.3.3, se ha evaluado la concentración media de DNA total que contiene cada tipo de muestra, a través de un ensayo de digestión celular con proteinasa-K y tinción con el fluoróforo Picogreen.

Los resultados que se presentan en la Figura 4.27, corresponden al promedio de los valores de DNA total de nueve réplicas de cada tipo de membrana macroporosa o lamina no porosa, obtenidos por medida de absorbancia, y que miden la eficiencia de siembra tras 2 horas de cultivo.

En la Figura 4.27, podemos observar diferencias significativas en la eficiencia de siembra respecto a la variable de grado de entrecruzamiento, de manera que, dentro de cada grupo con un mismo grado de entrecruzamiento, y cuanto más parecida es la membrana macroporosa a la lámina no porosa (con respecto a su superficie plana), menor es la adhesión o la eficiencia de siembra.

También se puede observar, que en el caso del COP-3 es el que muestra una menor eficiencia de siembra, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros dos copolímeros.

En líneas generales, las muestras analizadas presentan una débil relación entre la eficiencia de siembra celular y el espesor previo al colapso.



**Figura 4.27** Cuantificación de DNA total en las membranas macroporosas y láminas no porosas, con distinto grado de entrecruzamiento, cultivadas durante 2 horas. (4 asteriscos  $p < 0.0001$ , 3 asteriscos  $p = 0.0006$  y 2 asteriscos  $p = 0.004$ ). ( $n = 12$  réplicas por cada tipo de muestra)

Podemos ver que para los espesores previos al colapso menores, R1.8 y R3, se obtiene una mayor eficiencia de siembra respecto a los espesores de R5 y R15, con independencia del grado de entrecruzamiento, siendo estas diferencias estadísticamente significativas, es decir, en las membranas macroporosas colapsadas más porosas la eficiencia de siembra es mayor, lo que puede implicar que hay un número significativo de células que desde el primer momento penetran en los poros y quedan retenidas en ellos, es decir, parece

que algunas de las células entran por sí mismas en la estructura porosa, ocupan los poros de las membranas y otras células quedan en la superficie formando una capa.

Las muestras de R5 y R15, que presentan una topografía muy rugosa con huecos de pocas micras, mostraron una eficiencia de siembra parecida a la de una monocapa es decir a una lámina no porosa, probablemente debido al colapso de estas muestras que genera membranas con una superficie muy plana con poros no accesibles a las células.

#### **4.5.4 Proliferación celular**

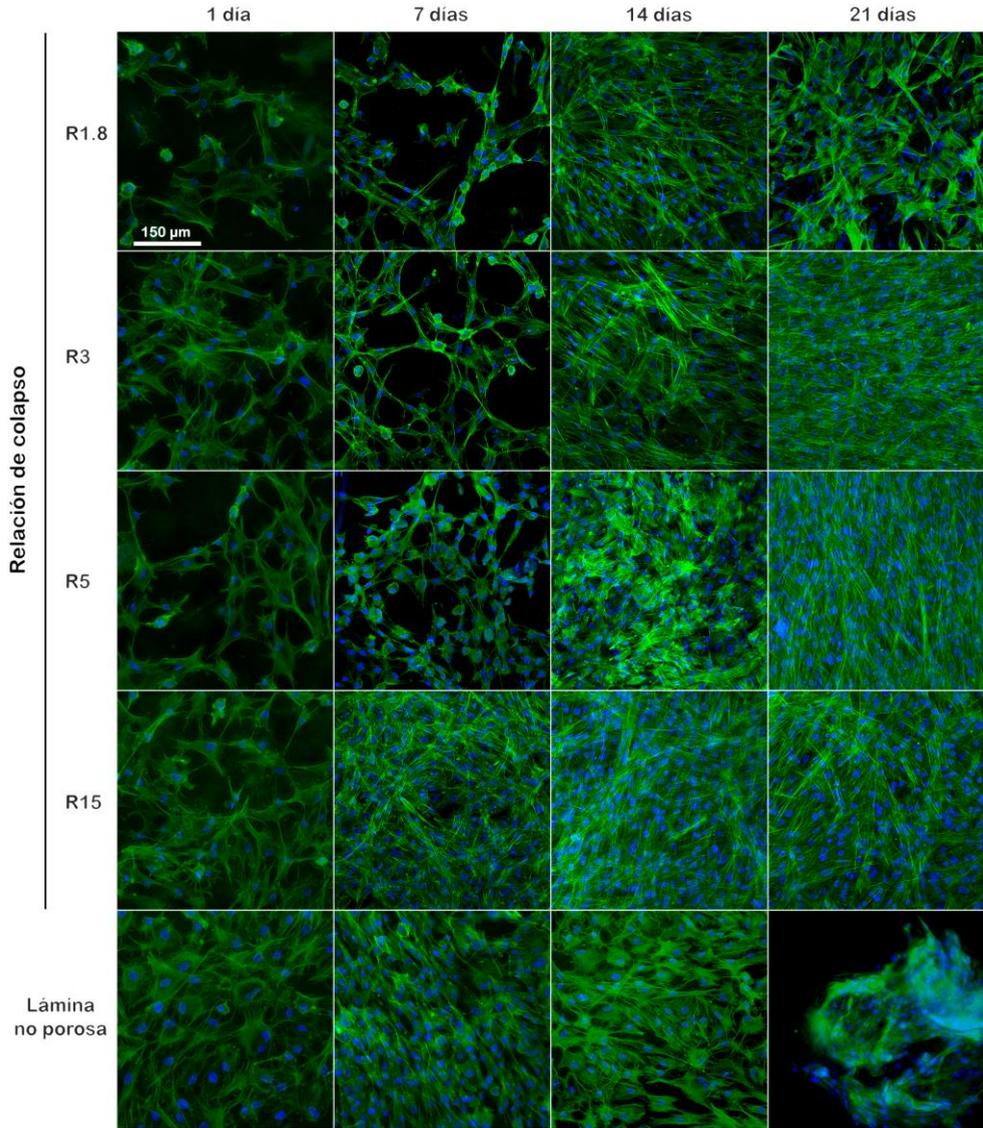
El estudio biológico a tiempos largos de cultivo, 1, 7, 14 y 21 días, se ha realizado sobre las láminas no porosas utilizadas como referencia y las membranas macroporosas colapsadas a los distintos espesores previos al colapso para el COP-3.

#### ***Inmunohistoquímica***

Debido a que no se obtuvieron resultados concluyentes de la tinción con Ki 67 que podría haber marcado las células en proliferación, se decidió teñir las distintas muestras únicamente con DAPI y faloidina (Tinción actina-DAPI), para poder analizar la proliferación celular a lo largo de los correspondientes tiempos de cultivos, 1, 7, 14 y 21 días, respectivamente.

Se visualizaron en microscopia Confocal de fluorescencia, las membranas macroporosas colapsadas a los distintos espesores previos al colapso para el COP-3. Las imágenes obtenidas muestran la totalidad de las células en una pequeña zona de la membrana y no sólo las células más superficiales, como ocurría en el microscopio de fluorescencia.

Estos resultados correspondientes a la observación por microscopía Confocal de la tinción actina-DAPI, se muestran en la Figura 4.28 (Imágenes representativas de un total de  $n=2$  réplicas analizadas por muestra). En ellos, podemos comprobar, como claramente las células proliferan en el material, y que tras los 21 días de cultivo existe tal densidad celular que apenas puede distinguirse la morfología de las células. No obstante, en los tiempos de cultivo más cortos, 7 días, es posible advertir las diferencias en la distribución celular, de forma que cuanto mayor es el espesor previo al colapso en las membranas, la densidad celular es mayor. Estos resultados están de acuerdo con los valores de DNA totales calculados para estos tiempos largos de incubación y que se muestran más adelante, donde las muestras con elevado espesor previo al colapso poseen una densidad celular mayor.



**Figura 4.28** Imágenes de microscopía Confocal de fluorescencia correspondientes a la tinción nuclear con DAPI y de la proteína actina del citoesqueleto con faloidina sobre las sobre las láminas no porosas y las membranas macroporosas colapsadas de 100 μm de espesor a las distintas relaciones de colapso para el COP-3, cultivadas durante 1, 7, 14 y 21 días. Barra de escala de 150 μm

Englobando el trascurso de los primeros tiempos de cultivo, se ha podido observar que, cuanto mayor espesor previo al colapso, más se parece la membrana a una lámina no porosa, de manera que las células crecen en monocapa y proliferan más rápidamente en los primeros días de cultivo, mientras que al ser más porosa la membrana, el crecimiento en los primeros días es más lento.

En el caso a las láminas no porosas, se puede observar como la densidad celular se mantiene de una manera más o menos estable en todos los tiempos de cultivo.

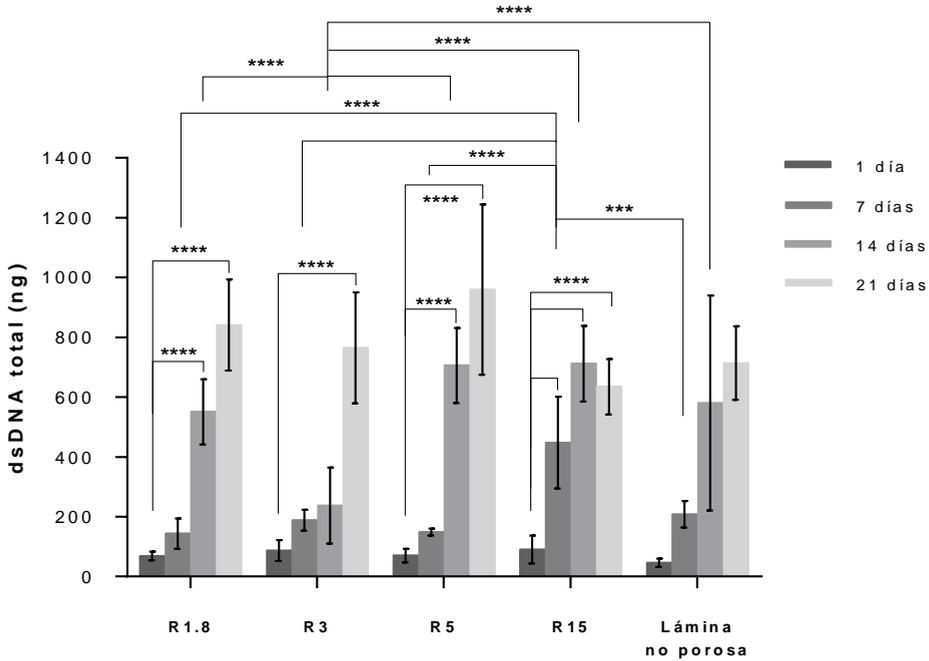
Con respecto a la forma en la cual proliferan las células, a las 24 horas tras el cultivo, todas las muestras presentan extensión celular frente a la morfología redondeada que se observa en el ensayo inmunohistoquímico de las muestras cultivadas durante 2 horas. En las imágenes de las membranas con menores espesores previos al colapso (R= 1.8, 3 y 5) y en los primeros días de cultivo (1 y 7 días), se puede apreciar claramente la forma del poro sobre el material, lo que implica que las células se adhieren a las trabéculas de los poros de las membranas.

### ***Cuantificación de DNA total***

Se ha cuantificado la concentración media de DNA total de la misma manera que en las muestras cultivadas durante 2 horas. Igualmente, los resultados que se han representado corresponden al promedio de los valores de DNA total de nueve réplicas de cada tipo de mues-

tras del COP-3, para las que se midió la absorbancia a los diferentes tiempos de cultivo (1, 7, 14 y 21 días).

Tal y como podemos apreciar en la Figura 4.29, las células proliferan en todas las membranas del COP-3-R, y lo hacen en la misma medida, de manera estadísticamente significativa para R= 1.8, 3 y 5. Asociando este comportamiento, para R1.8 y R5, el crecimiento celular es lento durante los primeros días de cultivo, y es a partir de la primera semana de cultivo cuando las células comienzan a proliferar, observándose un incremento significativo a día 14. Para R3 el comportamiento observado es diferente, de manera que las células comienzan a proliferar a partir de la segunda semana de cultivo ya que no se observa un incremento significativo en la proliferación hasta el día 21. En el caso de la membrana macroporosa de R15 y lámina no porosa también existe un incremento significativo de la proliferación celular en los primeros 14 días de cultivo, a partir de los cuales el crecimiento celular prácticamente se mantiene constante en el caso de las láminas no porosa, y en el COP-3-R15 a día 7 se observa un incremento significativo de la proliferación celular, para luego disminuir a día 21. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la inmunoadsorción (Figura 4.28), en particular, en el caso de las láminas no porosas donde la densidad celular se mantiene estable a tiempos largos de cultivo. Finalmente, podemos observar, que a tiempo 21 días, la membrana con mayor número de células es la membrana con R5. Los demás materiales presentan una proliferación celular similar entre ellos, siendo el COP-3-R15 el que presenta menor número de células.



**Figura 4.29** Cuantificación de DNA total en las láminas no porosas y las membranas macroporosas colapsadas a los distintos espesores previos al colapso para el COP-3, cultivadas durante 1, 7, 14 y 21 días. (4 asteriscos  $p < 0.0001$  y 3 asteriscos  $p = 0.0006$ ). ( $n = 12$  réplicas por cada tipo de muestra y tiempo programado).

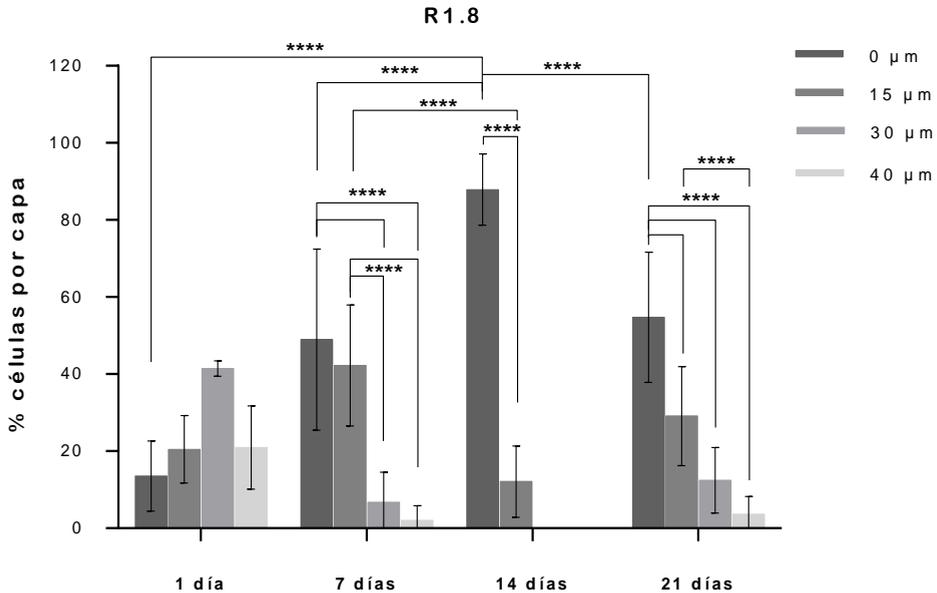
### Contaje celular

Se ha estudiado la proliferación celular de las membranas del COP-3 mediante recuentos de células en distintas profundidades utilizando el microscopio Confocal. En las imágenes proporcionadas (no mostradas en la Tesis debido a su gran volumen) se realizó un contaje celular a distintas profundidades (0, 15, 30 y 40  $\mu\text{m}$  de profundidad), tomando como superficie aquella capa en la que se aprecia la fluo-

rescencia del primer núcleo con su máxima intensidad. Una vez obtenido el número de células para cada una de las profundidades en las distintas imágenes, se calcula el porcentaje celular en cada profundidad contada con respecto del total del recuento realizado en la misma imagen. Finalmente, se obtuvo el promedio de los porcentajes de cada profundidad para un mismo tiempo de cultivo, en cada una de las membranas. Se han representado los datos de porcentajes para cada membrana macroporosa por separado, mostrando los porcentajes celulares en cada capa respecto del total contado y la evolución de la distribución celular en las capas a lo largo del tiempo de cultivo (Figuras 4.30, 4.31, 4.32 y 4.33).

En la Figura 4.30, que representa el COP-3-R1.8, podemos observar que inicialmente las células penetran y se adhieren, distribuyéndose de manera homogénea, puesto que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las distintas profundidades a día 1. Sin embargo, a medida que avanza el cultivo celular, las células comienzan a proliferar en superficie y no en el interior de la membrana, hasta que a día 14 la proliferación en profundidad es muy baja, sólo siendo efectiva en las capas más superficiales. Finalmente a día 21, predomina la proliferación en superficie, aunque también hay presencia celular en las cuatro profundidades estudiadas, observándose diferencias estadísticamente significativas en función de la profundidad, de manera que la presencia celular es menor cuanto mayor es la profundidad. Este resultado, puede deberse al hecho de que, tras un periodo de adaptación y expansión celular las células superficia-

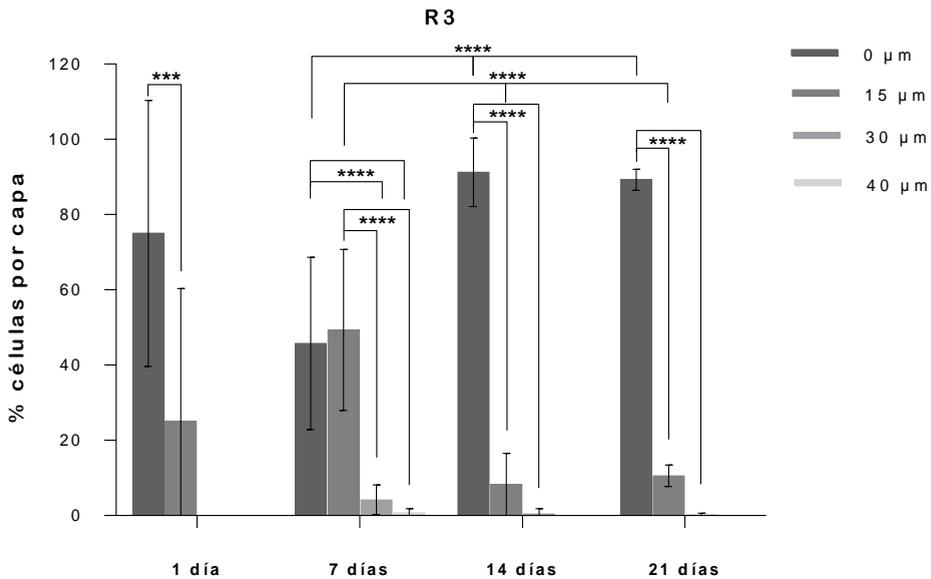
les, una vez alcanzada la confluencia, tienden a proliferar hacia el interior del material.



**Figura 4.30** Diagrama comparativo del porcentaje de núcleos contados a las profundidades de 0, 15, 30 y 40  $\mu\text{m}$  respecto del total de núcleos contados en la membrana macroporosa del COP-3 con relación de colapso R1.8 cultivada durante 1, 7, 14 y 21 días. (4 asteriscos  $p < 0.0001$ ). (n= 4 zonas por cada muestra y tiempo programado).

En el caso de la membrana macroporosa de COP-3-R3, los resultados que se observan (Figura 4.31) son distintos a los anteriores. Inicialmente existe cierta penetración celular en el interior de la membrana, pero sólo en las capas más superficiales. A partir de aquí, las células comienzan a proliferar en superficie y en las capas más superficiales de la membrana, pero a partir de los 7 días de cultivo, el

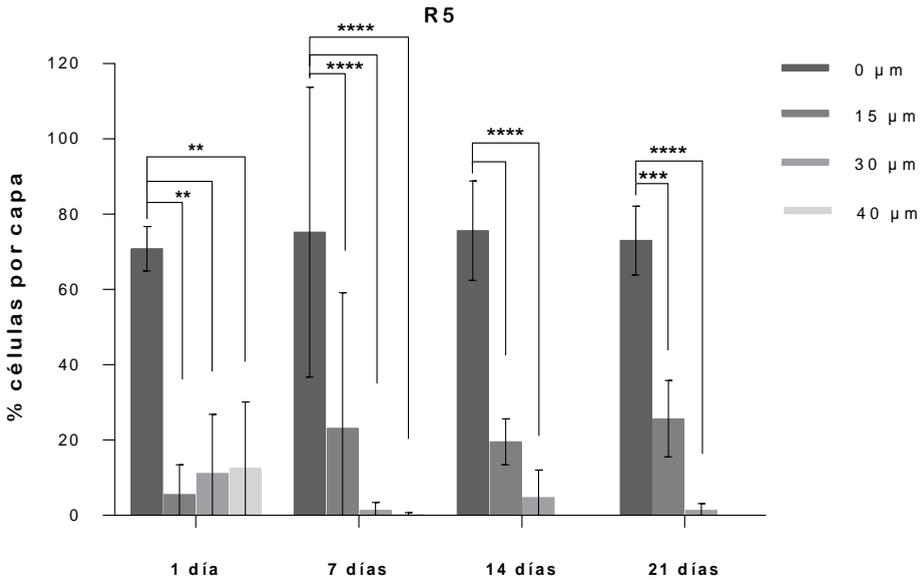
crecimiento observado en profundidad comienza a descender de manera significativa en comparación con la proliferación superficial, y finalmente se detiene a los 21 días, con una proliferación mucho mayor en superficie, menor en las capas superficiales y nula en la capas más profundas de la membrana.



**Figura 4.31** Diagrama comparativo del porcentaje de núcleos contados a las profundidades de 0, 15, 30 y 40  $\mu\text{m}$  respecto del total de núcleos contados en la membrana macroporosa del COP-3 de con relación de colapso R3 cultivada durante 1, 7, 14 y 21 días. (4 asteriscos  $p < 0.0001$  y 3 asteriscos  $p = 0.0006$ ). ( $n = 4$  zonas por cada muestra y tiempo programado).

Como puede observarse en la Figura 4.32, la membrana de R5, inicialmente presenta cierta penetración celular incluso en las capas más profundas, aunque la mayoría de células quedan retenidas en

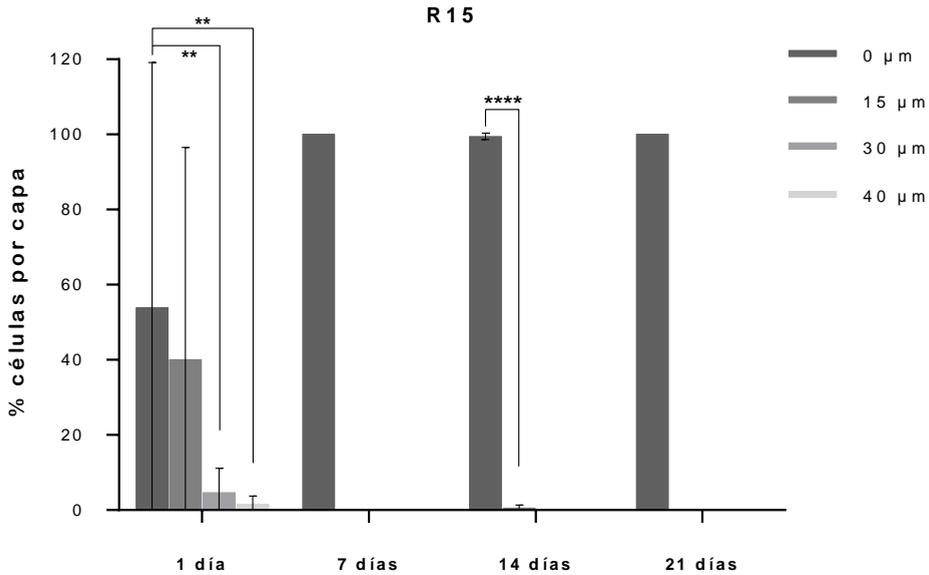
superficie. Conforme avanza el periodo de cultivo, las células proliferan en superficie, manteniéndose cierto crecimiento celular en las capas más superficiales y mínimamente en capas más profundas de las 15  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.32** Diagrama comparativo del porcentaje de núcleos contados a las profundidades de 0, 15, 30 y 40  $\mu\text{m}$  respecto del total de núcleos contados en la membrana macroporosa del COP-3 de con relación de colapso R5 cultivada durante 1, 7, 14 y 21 días. (4 asteriscos  $p < 0.0001$ , 3 asteriscos  $p = 0.0006$  y 2 asteriscos  $p = 0.004$ ). ( $n = 4$  zonas por cada muestra y tiempo programado).

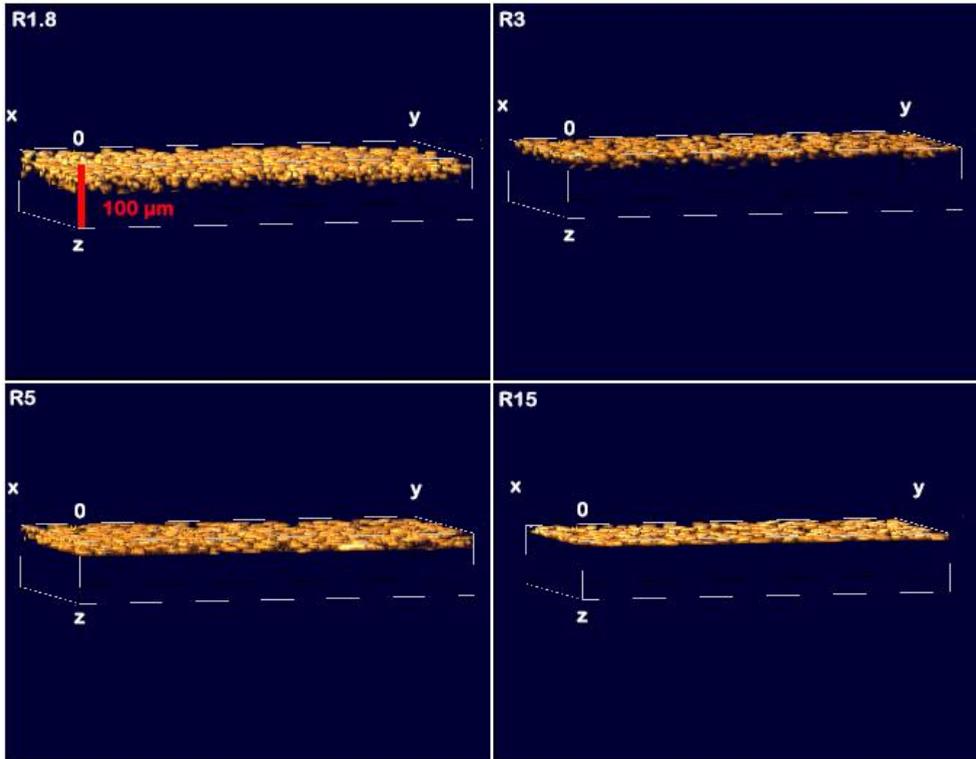
Por último, en la membrana de R15 (Figura 4.33), se obtienen resultados bastante concluyentes, ya que no existe ni penetración ni proliferación celular en profundidad, sino que todas las células crecen en

superficie en los primeros tiempos de cultivos asumiendo comportamiento similar al de una lámina no porosa en la que las células crecen en monocapa, deteniéndose la proliferación a partir de los 7 días de cultivo.



**Figura 4.33** Diagrama comparativo del porcentaje de núcleos contados a las profundidades de 0, 15, 30 y 40  $\mu\text{m}$  respecto del total de núcleos contados en la membrana macroporosa del COP-3 de con relación de colapso R15 cultivada durante 1, 7, 14 y 21 días (4 asteriscos  $p < 0.0001$  y 2 asteriscos  $p = 0.004$ ). ( $n = 4$  zonas por cada muestra y tiempo programado).

En la siguiente imagen, Figura 4.34, se muestra una representación 3D obtenida del microscopio Confocal de fluorescencia, de cada una de las membranas macroporosas con  $R = 1.8, 3, 5$  y  $15$  utilizadas en el conteo celular.



**Figura 4.34** Representación tridimensional de los núcleos celulares observados en microscopia Confocal de fluorescencia para las membranas macroporosas con relación de colapso de R1.8, R3, R5 y R15, a los 21 días de cultivo.

Se puede apreciar de manera más clara como, las membranas de COP-3-R1.8 y COP-3-R5 presentan cierto grado de proliferación en profundidad, siendo menos frecuente en el caso de la membrana de COP-3-R3 y nula para COP-3-R15. Analizando conjuntamente las micrografías de SEM del COP-3-R (Figura 4.19) y los resultados realizados en el estudio de la penetración y proliferación celular, pode-

mos advertir que, en las membranas macroporosas colapsadas con mayor espesor previo al colapso se observa menor grado de porosidad, comprobándose en microscopia Confocal que el crecimiento es totalmente superficial. La membrana con mayor porosidad y tamaño de poro intermedio (entre el R1.8 y R5), COP-3-R1.8, es la que permite una mayor penetración celular en el interior de la red, no obstante, en la membrana con el poro más grande y abierto, COP-3-R5, las células también penetran y proliferan en profundidad; por tanto la membrana de R3, es la que menor penetración y proliferación celular interna presenta, presentando el diámetro de poro más pequeño y similar al soporte macroporoso de partida.

En base a este análisis, para que se produzca penetración y proliferación celular en profundidad es necesaria la existencia de una combinación de porosidad elevada a la par de un diámetro de poro adecuado.

## **Discusión**

La metodología de colapso seguida en este estudio para la obtención de membranas macroporosas delgadas, ha consistido en la evaporación, a temperatura ambiente, del disolvente acetona en el que se han hinchado las láminas macroporosas, y la interrupción del colapso cuando alcanzan las 100  $\mu\text{m}$  de espesor, mediante un intercambio de la acetona que hay en la red por agua. Este colapso se produce a partir de láminas porosas inicialmente de espesor varia-

ble, mientras el espesor final de la membrana fue siempre de 100  $\mu\text{m}$ . Así pues, el grado de colapso del poro y por lo tanto la porosidad y la conectividad de los poros de la membrana, pueden modularse. Para tal fin, el soporte macroporoso de partida se cortó para producir láminas porosas de grosor variable que se hincharon hasta equilibrio en acetona y se dejaron secar en condiciones ambientes.

Analizando el proceso completo (comentado en apartado 3.1.2), tras la polimerización de la red de copolímero, la extracción de la plantilla de porógeno, se produjo por hinchamiento en acetona (buen disolvente de la plantilla). Una vez eliminado el porógeno, la acetona se cambió lentamente por el agua generando un soporte macroporoso con los poros llenos de agua que se dejó secar. En este caso, la red de copolímero es lo suficientemente fuerte para mantener el poro abierto ya que su capacidad de absorción de agua es bastante limitada, debido al pequeño contenido de HEA y su estado a temperatura ambiente es el de una goma dura. Con este procedimiento, se obtuvieron soportes macroporosos no colapsados con estructura de poros totalmente abiertos (tal y como se ve en la Figura 4.18). Este soporte, se cortó a diferentes espesores obteniéndose láminas macroporosas que se dejaron hinchar hasta equilibrio en acetona. En estas condiciones, el copolímero a temperatura ambiente está muy por encima de su transición vítrea (Tabla 4.1), debido al efecto de plastificación del disolvente, y por lo tanto posee una estructura muy blanda. En este momento, se comienza con la metodología del colapso, donde la acetona contenida en la lámina se va evaporando hasta el punto en el que la red hinchada no se sostiene sobre sí

misma y las capas del material comienzan a colapsar (aplastamiento por su propio peso). Este proceso ocurre así, ya que si se deja que la acetona se evapore mientras que la lámina está a temperatura ambiente sobre una superficie plana, el disolvente que se encuentra en los poros se evapora más rápidamente que el disolvente de hinchado del polímero que deberá ser desorbido del polímero (la red de polímero sigue siendo muy blanda durante las primeras etapas de evaporación del disolvente), generándose una estructura que no se sostiene a sí misma. La magnitud de este efecto, en nuestro caso depende de la densidad de entrecruzamiento, debido a que una mayor cantidad de entrecruzante implica una menor cantidad de acetona adsorbida por el polímero haciendo que se mantenga más rígido durante el proceso del colapso y se alcance una estructura de poro abierto e interconectado, y viceversa. El resultado es que los poros colapsan con una disminución importante de espesor<sup>253</sup>. Este efecto se utiliza en esta parte del trabajo para producir membranas macroporosas delgadas.

Cuando por este proceso de colapso se llega a una lámina de unas 100  $\mu\text{m}$  de espesor, independientemente de su espesor de partida, se aplica un intercambio de la acetona contenida en la lámina por agua, para detener el proceso de contracción y evitar que la estructura colapse totalmente y se pierda la porosidad. Este cambio de acetona por agua hace que la  $T_g$  del polímero aumente, disminuya su flexibilidad, y la estructura tridimensional alcanzada en ese momento permanezca. Finalmente, se obtienen las membranas macroporosas finas con una red de poros interconectados, con diferente

arquitectura de poro, morfología y tamaño distinto del soporte macroporoso de partida (Figura 4.19). Por tanto, es importante destacar que debido a la variación de la densidad de entrecruzamiento en la red del copolímero de PEA-HEA10, se pueden modular propiedades importantes del mismo. Por tanto, con el incremento de la cantidad de EGDMA añadida a la polimerización, la  $T_g$ , y el modulo elástico aumentan, mientras que la capacidad de absorción de acetona disminuye, de manera que estas propiedades determinan la microestructura de la membrana formada. Es fundamental también resaltar que la  $T_g$  del polímero seco es próxima a la temperatura ambiente y hace que al absorber la acetona y plastificar la red polimérica se encuentre siempre en estado goma, lo que le aporta flexibilidad y le permite colapsar hasta el punto que se ve en las imágenes de SEM para los valores de R mayores (Figura 4.19). Podemos observar además que las trabéculas se aplastan y se pegan unas a otras. De la misma forma que se ha comentado en el apartado 4.3, esto ocurre porque cuando estas trabéculas entran en contacto unas con otras, las cadenas de polímero poseen mucha movilidad (elevado número de cadenas activas) y pueden enmarañarse unas con otras en las superficies produciendo adhesiones físicas. Este efecto ocurre con los polímeros de la serie de acrilatos con las  $T_g$  más bajas, tal como el PEA que es un material muy adhesivo sobre casi cualquier tipo de superficie.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la morfología de los poros depende significativamente de la densidad de entrecruzamiento<sup>80</sup>. Al aumentar la densidad de entrecruzamiento, la capacidad de

hinchamiento de la red polimérica disminuye<sup>343,344</sup>, y como consecuencia, los cambios volumétricos en las trabéculas del soporte macroporoso durante el hinchamiento y deshinchamiento son más pequeños. Por un lado, la estructura porosa del soporte macroporoso de partida (Figura 4.4 y Figura 4.5), presenta trabéculas más delgadas y poros más interconectados, ya que dicho soporte aumenta menos su volumen durante la extracción de la plantilla de porógeno, y por otro lado se produce una menor contracción de la estructura porosa cuando se produce el colapso (Figura 4.5), de la misma forma que se ha demostrado en un estudio anterior<sup>253</sup>.

Obteniendo este tipo de membranas finas y porosas, se consigue así solucionar dos de los problemas más comunes en la parte porosa de los anillos de anclaje de las prótesis de córnea de modelo core-skirt que existen actualmente, la falta de interconexión de los poros y el espesor elevado del soporte poroso, que limitan la difusión de oxígeno y nutrientes a través de toda la estructura del soporte, como ocurre en el modelo propuesto por Zellander et al.<sup>345</sup>. La permeabilidad a los nutrientes está estrechamente relacionada con el tamaño y la interconexión de los poros, por lo que depende de manera fundamental de la técnica de fabricación del soporte macroporoso<sup>277</sup> y en este caso de la membrana macroporosa.

Para el método propuesto de fabricación de las membranas macroporosas, se ha estudiado la influencia del grado de entrecruzamiento y el espesor previo antes del colapso, en las propiedades estructurales de las membranas de PEA-HEA10 entrecruzadas con EGDMA, y se observa que variando estos factores, las características microes-

estructurales de la red polimérica son diferentes. Por tanto, cuanto mayor es la densidad de entrecruzamiento, el colapso da lugar a láminas con poros más abiertos, interconectados y circulares, con un tamaño de poro que varía desde 100  $\mu\text{m}$  hasta 250  $\mu\text{m}$ , mientras que menor entrecruzamiento de las cadenas da lugar a membranas de poros alargados y trabéculas superpuestas; es decir, una estructura más cerrada y aplastada. Este aplastamiento de la estructura ocurre incluso en la estructura inicial del soporte macroporoso de partida para el COP-1, debido a que el material posee poca rigidez, y repercutirá en la estructura final del material. La influencia del grado de entrecruzamiento en la porosidad ha sido estudiada con anterioridad en soportes tridimensionales colapsados totalmente<sup>253</sup>, tal y como se ha comentado anteriormente, por lo que el efecto que produce que los poros se colapsen con una disminución del espesor, se ha utilizado en esta parte de la tesis para producir membranas macroporosas delgadas. Además, podemos apreciar una reducción de la porosidad del soporte macroporoso cuanto mayor es el espesor previo al colapso, independientemente de la rigidez, lo cual concuerda con lo esperado, puesto que a mayor espesor de partida, mayor número de capas de material que colapsan. Esta disminución de la porosidad ocurre hasta el punto en el que el número de capas de material es demasiado elevado y las trabéculas se adhieren unas a otras obstruyéndose los poros, por lo que se pierde la estructura tridimensional propia de los soportes porosos que permite alojar células en su interior.

También se ha realizado una caracterización de las propiedades mecánicas de las membranas, para obtener una idea acerca de qué tipo de membrana presenta mejores propiedades frente a esfuerzos mecánicos que pudiera soportar en el modelo de prótesis propuesto además de su aplicación como trasplante de células y se ha intentado relacionar dichas propiedades con las características estructurales, además de identificar si los tamaños de poro muy elevados compromete las propiedades mecánicas de las membranas<sup>346</sup>. En base a los resultados obtenidos, se puede decir que las membranas macroporosas colapsadas presentan mejores propiedades de resistencia a la deformación cuanto mayor es el grado de entrecruzamiento del material y cuanto mayor es el espesor previo al colapso, o mayor número de capas de lámina porosa colapsada, hasta el punto en que valores altos en ambos factores proporcionan tal nivel de rigidez que afecta negativamente a la resistencia de la membrana a tensiones mecánicas, y se torna frágil y quebradiza; las trabéculas de las que está compuesta la membrana macroporosa se rompen con facilidad. En este caso, no se descarta que en la membrana macroporosa antes de su de formación (ensayo) ya hubiesen bastantes trabéculas rotas debido al propio proceso de colapso al obtener la membrana.

Por otro lado, los resultados de los experimentos de resistencia a desgarrar difieren de los de tensión-deformación. Si bien se mantiene la tendencia de mayor resistencia a desgarrar cuanto mayor es el espesor previo al colapso del material, y la relación entre mayor porcentaje de entrecruzante y fragilidad, las mejores propiedades de

resistencia a desgarro se dan en valores de grado de entrecruzamiento intermedio. De ello, se puede deducir que en la propiedad de resistencia a desgarro no sólo influyen la rigidez y el espesor de partida, sino que en este caso adquieren importancia las características del poro y sus trabéculas, que determinan la resistencia que opone la membrana al hilo en su avance a través del material. Por ello, valores de entrecruzamiento con EGDMA que se sitúan en torno al 3% y características estructurales intermedias como las que se dan en COP-3 proporcionan membranas con mayor resistencia a la sutura.

Asimismo, podemos decir si analizamos conjuntamente las características microestructurales y las propiedades mecánicas que, conforme más se parecen las membranas al soporte macroporoso de partida estructuralmente hablando, peores propiedades mecánicas poseen, luego el colapso de las membranas mejora las propiedades mecánicas de las membranas por la estructura característica que les otorga.

En conclusión, se ha conseguido obtener un material fino con elevada porosidad que se mantiene en todo su espesor, comprobado mediante la visualización del material en el microscopio de Confocal (Figuras 4.20 y 4.21), y capaz de soportar las tensiones mecánicas a los que se vería sometido en el caso de un apósito para el trasplante de células en piel y úlceras corneales y formando parte de una prótesis de córnea, por lo que salva uno de los factores limitantes en la prótesis de Chirila o AlphaCor<sup>TM</sup> Keratoprosthesis<sup>164,347</sup>.

Otro problema importante que se presenta en las membranas fabricadas del modelo *core-skirt*, es la biointegración de esta con los tejidos circundantes, como ocurre en la Seoul-Type KPro<sup>195,196</sup>, en el modelo propuesto por Trinkaus-Randall et al.<sup>192</sup>, y en la prótesis desarrollada por el grupo de Legeais<sup>58</sup>. Para que dé lugar la biointegración de la prótesis corneal, es necesario un diámetro de poro apto para la invasión celular, superior a 5-10 veces el diámetro de la célula, 100  $\mu\text{m}$  aproximadamente<sup>338</sup>, la máxima interconexión de los poros<sup>338</sup>, y que además esto no repercuta en las propiedades mecánicas<sup>348</sup>. En casos de regeneración de piel y cicatrización de heridas existe un rango óptimo de tamaño de poro (20-125  $\mu\text{m}$ ) para una viabilidad y actividad celular adecuada<sup>349,350</sup>. Esto llevó, al desarrollo de dos estudios de cultivo celular para la comprobación de la biocolonización de las membranas macroporosas colapsadas obtenidas.

Se efectuó un estudio de la adhesión celular para los tres grados de entrecruzamiento y sus distintos espesores previos al colapso, junto con la correspondiente lámina no porosa. En los resultados de los experimentos de inmunohistoquímica se aprecian ciertas diferencias entre materiales, de manera que el mayor entrecruzamiento de las cadenas de polímero (incremento en la cantidad de EGDMA) hace que la célula comience a sintetizar vinculina más tardíamente, ya que en estos casos se localiza sobre todo en la zona perinuclear, luego de ello se extrae la conclusión de que un elevado grado de entrecruzamiento afecta negativamente a la adhesión celular. Con respecto al espesor previo al colapso, a pesar de que el espesor de partida afecta a la rigidez de las membranas y sus propiedades me-

cánicas, en lo que respecta al comportamiento celular, lo que influye en mayor medida es la porosidad de la membrana, que determina la topografía del material. Así, cuanto mayor es el espesor de partida, la lámina es menos porosa, y la vinculina de las células se encuentra más distribuida por el citoplasma celular y focalizada en las prolongaciones celulares, luego menor porosidad (elevada área superficial específica de la membrana) influye de manera positiva en la adhesión celular.

Se da la misma relación positiva para la expansión celular en el material, de manera que en las muestras más porosas, las células quedan redondeadas. Esto hace suponer, que menor porosidad implica mayor parecido de la membrana a una lámina no porosa en cuanto a que las células se encuentran en una superficie en la que no pueden penetrar, y las superficies planas tienden a favorecer la adhesión celular, mientras que en muestras más porosas las células penetran en los poros y les cuesta más adherirse. Este efecto del área superficial efectiva (porosidad) juega un papel importante en la adhesión celular inicial, aunque este efecto desaparece en la proliferación celular<sup>351,352</sup>, ya que la migración celular mejora en las membranas macroporosas con poros más grandes, como se ha podido comprobar en el estudio de contaje celular (Figuras 4.30, 4.31, 4.32 y 4.33). Sin embargo, la adhesión y expansión no ocurre al mismo nivel que en la lámina no porosa, ya que las membranas, aunque poco porosas, tiene cierta topografía con huecos. Pese a las diferencias entre materiales, se debe tener en cuenta, que tal vez las células son capaces de adherirse a todos los tipos, aunque en unos lo hagan más

rápido que en otros, por lo que se debería realizar un ensayo de adhesión con más tiempo de cultivo y así poder comprobar que estas diferencias entre materiales en la adhesión verdaderamente existen.

También se cuantificó el DNA total y se visualizaron las muestras en microscopio Confocal, pero los resultados no fueron concluyentes, aunque sí cabe decir que en las muestras más porosas la eficiencia de siembra es mayor.

Paralelamente a la siembra de los materiales para el estudio de adhesión, se sembraron los materiales COP-3 (R= 1.8, 3, 5 y 15, y su respectiva lamina no porosa), para efectuar un estudio de proliferación, ya que se decidió que, por sus propiedades estructurales intermedias y por los buenos resultados en los ensayos mecánicos, COP-3 era el material más idóneo para ser utilizado como membrana porosa de una prótesis de córnea. Así pues, dado el fallo del ensayo con el anticuerpo Ki67, se tiñeron las muestras con faloidina-DAPI, y posteriormente fueron visualizadas en microscopio Confocal y microscopio de fluorescencia, de manera que se obtuvo una tabla que reúne imágenes representativas de cada membrana o lámina no porosa para cada periodo de cultivo, permitiéndonos ver la evolución del cultivo a lo largo del tiempo y la tasa de crecimiento celular. El crecimiento celular es tal a 21 días que es imposible apreciar la morfología u orientación celular (Figura 4.28), aunque cabe mencionar que se intuye cierta intensidad de fluorescencia menor para algunos núcleos en COP-3-R1.8, lo que lleva a pensar que puede que las células se encuentren en el interior del material, teoría que posteriormente se comprobó mediante un contaje celular por capas en las

imágenes proporcionadas por microscopio Confocal. Aun así, en los primeros días de cultivo celular (7 días), es posible establecer diferencias entre las membranas y también en su evolución a lo largo del cultivo. La lámina no porosa y la membrana menos porosa, R15, experimentan una proliferación celular elevada en los primeros días de cultivo, que luego se estanca y la población celular se mantiene, mientras que en las membranas más porosas el crecimiento celular es lento al inicio del cultivo, con una proliferación mínima, y luego comienzan a multiplicarse a partir de la primera semana de cultivo, o incluso después, hasta alcanzar la misma densidad celular que la lámina no porosa y COP-3-R15. Estos resultados coinciden totalmente con los ensayos de cuantificación de DNA total (Figura 4.29). Respecto a este ensayo, hay que resaltar también que el crecimiento celular es continuado a lo largo del tiempo de cultivo.

Por último, el experimento que más luz ha arrojado al estudio de la proliferación celular, ha sido la tinción nuclear y visualización de las muestras en microscopio Confocal, para realizar un conteo celular en capas a distinta profundidad. De esta manera, se consiguió encontrar diferencias entre membranas con respecto a la distribución y proliferación de las células, calculando el porcentaje de células en cada rango de profundidad con respecto del total de células contadas en la imagen. Por otro lado, también influye en la distribución y comportamiento celular la porosidad, ya que se ha visto que cuanto más porosa es la membrana, en aquellas en las que el tamaño de poro lo permite, mejores resultados se obtienen en cuanto a penetración y proliferación en profundidad, como es el caso de COP-3-

R1.80. Contrariamente a esto, la menor porosidad derivada de un mayor espesor previo al colapso, dificulta o impide el acceso al interior, las células quedan retenidas en la superficie o en las primeras capas del material y con el tiempo sólo proliferan las que quedan en superficie. Lo que se deduce de este ensayo es que aquellas membranas que tienen el poro menos colapsado, permiten una mayor penetración celular en la red durante la siembra. Sin embargo, puede decirse, en términos generales, que las células madre mesenquimales de médula ósea tienen tendencia a perder la capacidad de proliferación cuando se alojan en los poros de la membrana macroporosa, mientras que proliferan rápidamente las que se encuentran en la superficie de la misma. Cuanto más aplastado está el poro y más encerradas las células, menos proliferan.

En conclusión, las membranas más aptas para su uso, considerando los estudios celulares y de propiedades mecánicas realizadas, son COP-3-R1.8 y COP-3-R5, siendo la primera la que mejores resultados muestra en el cultivo *in vitro* por su elevada porosidad combinada con un diámetro de poro intermedio, aunque posee peores propiedades mecánicas. Ambas membranas macroporosas cumplen los valores mínimos necesarios en las propiedades mecánicas, fuerza de resistencia superior a  $0.04 \text{ N}^{322}$  y modulo elástico superior a  $2-4 \text{ kPa}^{341}$ . Por ello, la elección de una membrana u otra para su aplicación o bien como portadoras bioestables de células (apósitos para piel o úlceras corneales) o en córneas artificiales dependerá entre otros de los factores críticos que hay que solventar en cada uno de ellos.

En nuestro caso, se han obtenido membranas manejables, finas pero a la par flexibles y de tacto suave, además la  $T_g$  del copolímero es adecuada, y es un material resistente pero deformable. Todas estas propiedades hacen idóneas ambas membranas, COP-3-R1.8 y COP-3-R5, en la aplicación como trasplante de células, que tiene en cuenta entre otras la flexibilidad de la membrana. Asimismo, sería interesante tanto tener las células más en superficie o bien más embebidas en los poros.

En el caso de la prótesis de córnea, la elección de membrana dependerá de la parte del desarrollo de la prótesis que consiste en la unión de la membrana porosa a un óptico. El COP-3-R1.8 teóricamente se integrará mejor con el tejido circundante, pero requerirá una mayor pericia por parte del cirujano, y más cuidado por riesgo de rotura; y en el caso del COP-3-R5 tendrá más dificultades para integrarse, pero resistirá mejor los esfuerzos o tensiones mecánicas. En caso de implantación de la prótesis, se podría intentar combinar este modelo con sistemas de liberación controlada para mejorar la biointegración, tal y como probó el grupo de Trinkaus et al.<sup>193</sup>, o bien implantar la prótesis con un recubrimiento previo de proteínas involucradas en la adhesión<sup>58,192</sup> y/o sembrada con células.

Como conclusiones a destacar, inicialmente la finalidad de esta parte de la Tesis, era obtener una membrana muy fina y porosa que permitiese la penetración y proliferación celular en el interior de la red y que a pesar de estos requisitos tuviera unas propiedades mecánicas mínimas de resistencia mecánica a deformación y a sutura en el caso de prótesis de córnea a pesar de su porosidad.

El objetivo se ha cumplido, puesto que se ha conseguido controlar el proceso de colapso produciendo membranas que cumplen los requisitos mínimos de propiedades mecánicas y en las que existe una penetración celular en una cara de hasta 40 $\mu$ m. La proliferación en el interior no es elevada, siendo indicativo de que las células madre mesenquimales de la medula ósea tienen tendencia a perder la capacidad de proliferación cuando se alojan en los poros. En este sentido, teniendo en cuenta que las células no proliferan en el interior de los poros (en todo el espesor), sería necesario ajustar el número de células sembradas a este hecho. Además se ha estudiado la influencia del grado de entrecruzamiento y espesor previo al colapso en las propiedades mecánicas y biológicas y se han establecido diferencias entre los materiales. A grandes rasgos en cuanto a propiedades mecánicas, cuanto mayor es el grado de entrecruzamiento y mayor es el espesor de partida mejores propiedades poseen, pero sólo hasta cierto punto. En cuanto a propiedades biológicas, cuanto mayor es la porosidad del material, aunque las células requieren de un periodo de adaptación para adherirse a las trabéculas, la penetración y proliferación celular en el interior es mayor.

***Perspectivas de futuro.*** Es necesario realizar estudios biológicos más amplios relacionados con la capacidad de las MSCs de mantener su estado de indiferenciación en el interior de estas membranas macroporosas colapsadas con medio de cultivo de/en expansión y con la capacidad de diferenciación de las MSCs a queratocitos en el interior de la membrana en condiciones de diferenciación.

## 4.6 Estudio de adsorción e injerto de fibronectina (FN) sobre láminas no porosas de copolímeros de PEA

En este apartado del capítulo 4, se expondrá el estudio efectuado de biofuncionalización superficial de los sustratos poliméricos seleccionados, como posibles candidatos a formar parte del anclaje de una prótesis de córnea, y en forma de láminas no porosas que se caracterizaron anteriormente física y térmicamente (apartado 4.1).

Se ha evaluado la cantidad de proteína adherida, fibronectina, (FN; por adsorción y/o injerto) y de la exposición de los motivos de adhesión celular (secuencia RGD, y el dominio de adhesión FNIII<sub>7-10</sub> que consiste en el motivo de adhesión RGD y el de sinergia, prolina-histidina-serina-arginina-asparagina (PHSRN), situados respectivamente en los módulos décimo y noveno de tipo III de la FN), en copolímeros de PEA, en forma de láminas no porosas, y cuya composición química se ha diseñado con el fin de aumentar la capacidad de humectación y para introducir grupos funcionales ácidos que permitan injertar la proteína en la superficie mediante enlaces covalentes. Por una parte, la FN se adsorbió a los copolímeros de PEA, PEA-HEA, PEA-AAc, y PEA-MAAc, y por otra, se entrecruzó covalentemente a los copolímeros de, PEA-AAc, y PEA-MAAc.

La cantidad de FN adherida y la exposición de los fragmentos de las secuencias de RGD y dominio de adhesión FNIII<sub>7-10</sub> implicados en la adhesión celular, se han cuantificado mediante la técnica del ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA). El dominio de adhesión FNIII<sub>7-10</sub> interacciona con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , que controla la prolifera-

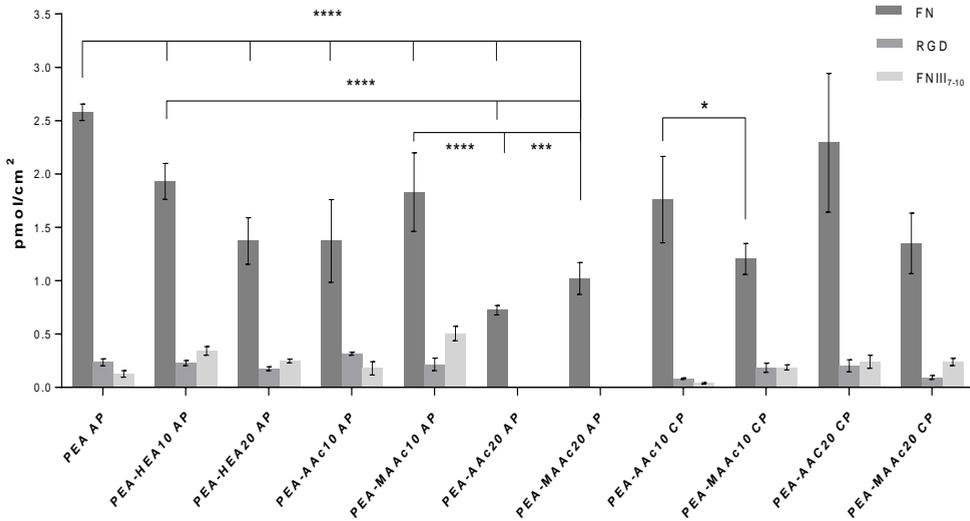
ción y la diferenciación, la progresión del ciclo celular y el ensamblaje de la matriz de FN<sup>353</sup>.

Se ha comprobado que, los copolímeros con un bajo contenido en componente hidrófilo mostraron una disminución del ángulo de contacto en agua. Además, la FN se fijó con éxito en todas las superficies, especialmente en las superficies con más carácter hidrófobo. Sin embargo, la exposición de sus secuencias de adhesión celular, que es el factor clave en la adhesión y proliferación celular, fue mayor en las superficies hidrófilas.

Los resultados presentados en este apartado y parte del apartado 4.1 se han publicado en: N. Briz, C.M. Antolinos-Turpín, J. Alió, N. Garagorri, J.L. Gómez Ribelles, J.A. Gómez-Tejedor. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 101, 991–7 (2013).

#### **4.6.1 Adsorción y adhesión covalente de FN**

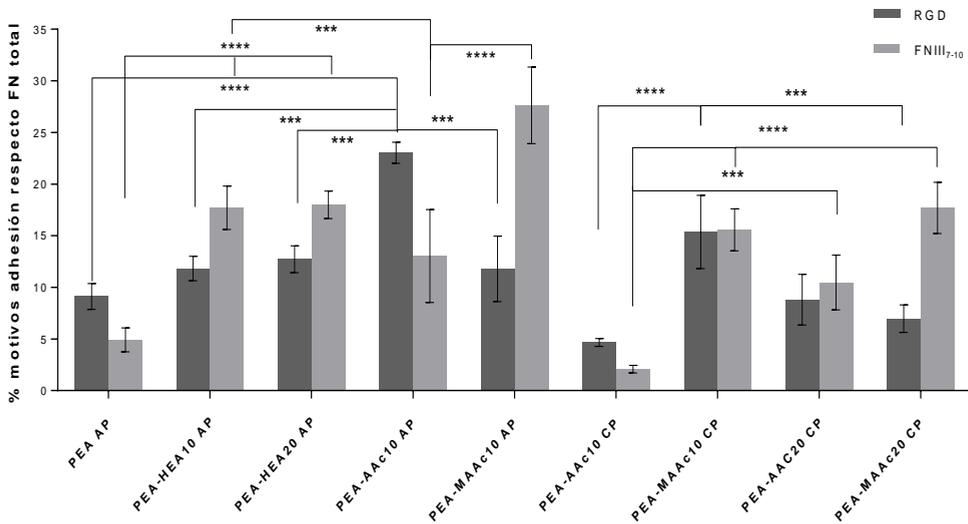
A través del inmunoensayo ELISA, se han cuantificado, tanto la FN como sus motivos de adhesión expuestos, secuencia RGD, y el dominio de adhesión FNIII<sub>7-10</sub>, respectivamente, sobre cada una de las diferentes redes de copolímeros de PEA, y cuyos resultados, se encuentran recogidos en las Figuras 4.35 y 4.36.



**Figura 4.35** Caracterización de los polímeros recubiertos con FN, mostrando la cantidad de fibronectina adsorbida (AP) en PEA y sus sustratos de redes de copolímero, o injertada (CP) en los sustratos PEA-AAC y PEA-MAAc. Además se muestra la exposición total de la secuencia RGD y dominio de adhesión FNIII<sub>7-10</sub> en todos los sustratos. (4 asteriscos  $p < 0.0001$ , 3 asteriscos  $p = 0.0003$  y 1 asteriscos  $p = 0.001$ ). (n=3 réplicas analizadas por muestra).

Como se puede observar en la Figura 4.35, la cantidad total de FN adsorbida (AP) en los copolímeros que contienen grupos hidrófilos es claramente menor que sobre el sustrato de PEA. En el caso de la FN injertada (CP), se aprecia como la cantidad de FN injertada es menor para el copolímero de MAAc en comparación con los copolímeros de AAC.

Por otra parte, podemos ver (Figura 4.35) como aumenta la cantidad de FN injertada con el incremento de la cantidad de grupos ácidos (MAAc o AAc), tal como se espera por el aumento de grupos reactivos. La secuencia RGD y el dominio de adhesión FNIII<sub>7-10</sub> total expuestos también se muestra en la Figura 4.35, mientras que la Figura 4.36 muestra la proporción de los ligandos exhibidos con respecto a la cantidad total de FN adsorbida.



**Figura 4.36** Cuantificación de las secuencias péptidas, donde se refleja la exposición de la secuencia RGD y dominio de adhesión FNIII<sub>7-10</sub> respecto a la cantidad total de fibronectina adsorbida (AP) o injertado (CP) sobre la superficie del sustrato. (4 asteriscos  $p < 0.0001$  y 3 asteriscos  $p = 0.0003$ ). (n=3 réplicas analizadas por muestra).

## Discusión

Con respecto al estudio de la biofuncionalización de las superficies poliméricas con FN, podemos observar como la cantidad de FN adsorbida sobre los sustratos disminuye significativamente con el aumento del contenido de grupos hidroxilo (Figura 4.35); un hecho que se vincula con el aumento del CAeq y la disminución del WCA (Tabla 4.1). En el caso de los sustratos de PEA-HEA este resultado puede estar relacionado con las diferencias de respuesta celular en el cultivo celular sobre estos sustratos<sup>51</sup>.

Campillo-Fernández et al.<sup>51</sup> han demostrado que la adhesión y la viabilidad de células endoteliales humanas, HUVEC sobre los sustratos, requería de un recubrimiento previo de FN, y tanto los ensayos de viabilidad, como el número de células, se redujeron drásticamente con el aumento de los grupos de HEA en el sustrato<sup>51</sup>. En un trabajo anterior, sobre el cultivo de células epiteliales conjuntivales sobre soportes con esta formulación<sup>319</sup>, se encontró un resultado similar; donde el número de células se redujo considerablemente, con el tiempo de cultivo en soportes con sólo el 20% de HEA, y no eran viables en soportes que contenían un 50% de HEA. Por otra parte, se comprobó que la conformación de la FN adsorbida cambiaba con la hidrofiliidad<sup>319</sup>.

Por otra parte, los resultados mostrados en la Figura 4.36, ponen de manifiesto, que la exposición de la secuencia RGD y el dominio de adhesión FNIII<sub>7-10</sub> en el copolímero PEA-HEA, en relación a la cantidad total de FN adsorbida, aumentan con el contenido de HEA, y es

significativamente mayor que en el caso del PEA puro. Además, se pudo observar que los copolímeros de HEA con FN adsorbida, son propicios para favorecer la exposición de dominios de FNIII<sub>7-10</sub>. La exposición de los ligandos de adhesión también se analizó en el caso de los copolímeros de PEA-AAc y PEA-MAAc conteniendo un 10% de unidades monoméricas hidrófilas. Se pudo observar, que la exposición de secuencias de RGD fue predominante en los sustratos de PEA-AAc, mientras que en el PEA-MAAc se produjo todo lo contrario; en cualquier caso son más altos que los obtenidos en los sustratos de PEA. Es interesante mencionar, que en un estudio sobre este tipo de sustratos<sup>37</sup>, la adhesión de los condrocitos se mejoró por la presencia de pequeñas cantidades de componente hidrófilo en el copolímero, hecho que se atribuyó a una mejor exposición de las secuencias de adhesión de las proteínas adsorbidas del medio de cultivo.

El injerto de FN en los sustratos de PEA como se ha comentado anteriormente, se realizó por reacción sobre los grupos carboxilo expuestos en la superficie del copolímero; obteniéndose copolímeros de PEA-AAc y PEA-MAAc con diferentes contenidos de AAc y MAAc. Ambas series de redes poliméricas, poseen propiedades físicas muy similares con respecto a la capacidad de absorción de agua y de energía superficial. La diferencia entre las dos series de copolímeros es esencialmente la movilidad del grupo carboxilo, mucho más restringida en el caso de la unidad monomérica de MAAc, debido a la proximidad de un grupo metilo unido al mismo átomo de carbono en la cadena polimérica principal.

En el caso del AAc este grupo metilo está sustituido por un átomo de hidrógeno. Estudios de espectroscopia dieléctrica o de relajación dinámico-mecánica han demostrado que la rotación alrededor del enlace que une el grupo carboxilo a la cadena principal es mucho más fácil en el AAc que en el MAAC<sup>354</sup>. La influencia de este hecho en el injerto de FN en la superficie del copolímero es significativa; como se muestra en la Figura 4.35, la cantidad de FN injertada en la superficie es mayor en el copolímero que contiene AAc que en aquellos con MAAC para la misma fracción de grupos carboxilo. Por otro lado, se esperaba que el incremento en el contenido de AAc y MAAC, diera lugar a una mayor cantidad de FN fijada en la superficie, ya que la cantidad de grupos COOH es más alta. Sin embargo, no se han observado diferencias significativas, que podrían deberse a la separación de fases mostrada en DSC (Figura 4.1), y que hace que la fase rica en PEA se sature con unidades monoméricas de AAc o MAAC, mientras que el resto forma dominios que no son activos para la adhesión de FN. En efecto, se ha comprobado que un aumento de la fracción de MAAC en la red polimérica desde el 10% al 20% no aumenta el WCA (Tabla 4.1), lo que sugiere que no existen más grupos carboxilo en la superficie.

En el caso de las redes que contienen AAc, la exposición de secuencias RGD y dominios FNIII<sub>7-10</sub> aumenta significativamente, cuando el contenido de AAc va desde el 10 al 20%. Este comportamiento puede también observarse en la exposición del dominio FNIII<sub>7-10</sub> en el copolímero PEA-MAAC. Por el contrario, la exposición de la secuencia RGD disminuye cuando el porcentaje de MAAC au-

menta. No obstante, se ha de destacar que la cantidad de FN adsorbida sobre las distintas redes, no mejora con respecto a la FN adsorbida sobre el PEA; sin embargo, la exposición de la secuencia y dominio de adhesión con respecto a la FN total es mayor.

Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con los de otros autores; resultados que demuestran la influencia de la química superficial en la conformación de la FN, que pueden adoptar una conformación más globular o extendida dependiendo de la distribución de los grupos hidrófilos o polares en la superficie. La conformación de la superficie, posteriormente influye en la adhesión celular<sup>36,309,314,315,355</sup>.

Como conclusiones a destacar, inicialmente se ha podido comprobar la capacidad de los sustratos de copolímeros basados en PEA para mantener el recubrimiento de FN, y su conformación de proteína mediante el estudio de la exposición de motivos de adhesión, que son esenciales para la adhesión y viabilidad celular. Se ha comprobado, que en el caso de la FN adsorbida, pequeños contenidos de grupos hidrófilos en la superficie, disminuye rápidamente la cantidad de FN total, y aumenta la exposición de los motivos de adhesión. Sin embargo, en el caso de la FN adherida covalentemente, la cantidad de FN es mayor cuanto más hidrófila es la superficie; pero parece, que la exposición de los dominios de adhesión no depende del grado de humectabilidad de los sustratos. Además, la exposición del dominio de adhesión FNIII<sub>7-10</sub> en FN injertada, mostró una dependencia con la composición de copolímero, siendo mayor en las superficies

de MAAc que en las superficies con AAc, y en las superficies con un alto contenido de unidades monoméricas de este tipo.

En términos generales, parece que el incremento en los grupos funcionales (OH y COOH) mejora la exposición de los motivos de adhesión, excepto la secuencia RGD en el PEA-MAAc10, siendo mayor en las superficies con OH. Además, la fijación de la FN por enlaces covalentes no permite ni mayores contenidos de proteína, ni más porcentaje de dominios de adhesión expuestos en la superficie con respecto a la adsorción de proteína.

Con estos resultados, se decidió realizar nuevamente un estudio de biofuncionalización de FN y FNIII<sub>7-10</sub>, en combinación con 2 recubrimientos más de la matriz extracelular, colágeno y colágeno más keratan sulfato, sobre las distintas redes de copolímeros de PEA estudiadas, para poder determinar que recubrimiento de proteínas es el óptimo, completado con un estudio de biointegración *in vivo*, como se expone a continuación (apartado 4.7).

#### **4.7 Biointegración de copolímeros macroporosos colapsados como implantes para córnea en modelo animal**

En este apartado, se explica el desarrollo realizado en un estudio de biointegración en un modelo animal experimental. Se ha implantado el soporte macroporoso que constituiría el anillo de anclaje de una prótesis de córnea. Estos soportes o implantes macroporosos en forma de membranas macroporosas colapsadas están basados en

los copolímeros de PEA descritos en el apartado 3.1.2, funcionalizados y previamente sembrados con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, con capacidad de diferenciarse a células corneales o de producir un efecto paracrino positivo en el tejido circundante<sup>54</sup>. El objetivo es el desarrollo de un tejido viable en el interior de la membrana de la prótesis, de forma que las células alojadas en el interior de los poros desarrollen el fenotipo de los queratocitos del estroma corneal y sinteticen una matriz extracelular que forme un continuo con el estroma corneal. En este sentido aunque el soporte macroporoso tiene que ser en este caso obviamente bioestable, la estrategia debe ser análoga a la regeneración de tejidos con técnicas de ingeniería tisular.

Inicialmente, se han evaluado *in vitro*, algunas de las redes de copolímeros de PEA, similares a las utilizadas en el estudio anterior, apartado 4.6, en forma de láminas no porosas, y en combinación con cuatro recubrimientos de la matriz extracelular, FN, FNIII<sub>7-10</sub>, colágeno y colágeno más el polisacárido keratan sulfato, determinando la eficiencia de colonización de las células h-ADAS (a 1 y 4 semanas de cultivo) sobre dichos sustratos, y el recubrimiento óptimo. Posteriormente, previa siembra con h-ADAS, o sin células, se implantaron dentro de las córneas de conejos los sustratos de copolímeros de PEA que mejores resultados mostraron en el estudio de eficiencia celular, en forma de membranas finas macroporosas, previamente caracterizadas física, mecánica y micro estructuralmente (apartado 4.3.4), y con los recubrimientos de proteínas, que resultaron óptimos de la evaluación *in vitro*.

Después de un periodo de tres meses de seguimiento, los animales se sacrificaron, y se evaluó la biointegración clínica e histológica del material implantado.

Con respecto al estudio celular, se comprobó, que las células h-ADAS se adherieron y sobrevivieron cuando se cultivaron en todas las membranas macroporosas basadas en PEA. Sin embargo, en las muestras de PEA con una alta hidrofiliidad, disminuyó la colonización *in vitro* de dichas células.

Por otro lado, los copolímeros con un contenido del 10% de unidades monoméricas de HEA (PEA-HEA10) y AAc (PEA-AAc10) mostraron las mejores tasas de colonización celular. Los copolímeros recubiertos con colágeno más keratan sulfato exhibieron una mayor colonización celular respecto a la fibronectina, el colágeno o los PEAs sin recubrimiento.

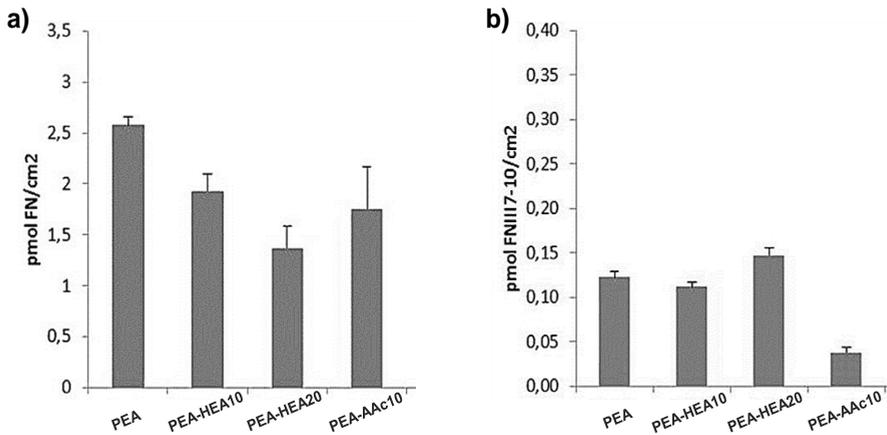
De la implantación *in vivo* de las membranas macroporosas, cabría destacar los siguientes resultados: tasas de extrusión del 72% para el PEA, del 50% para el PEA-AAc10, y del 0% para el PEA-HEA10; ligera reducción en la tasa de extrusión de los materiales colonizados con las h-ADAS; sin diferencias significativas entre los grupos con o sin h-ADAS respecto a la transparencia o la neo vascularización; y supervivencia de las h-ADAS en todas las membranas tras los 3 meses de seguimiento.

Los resultados presentados en este apartado y del apartado 4.3.4 se han publicado en: J. L. Alió del Barrio, M. Chiesa, G. Gallego Ferrer, N. Garagorri, N. Briz, J. Fernández-Delgado, I. García-Tuñón, L. Bataille, A. Rodríguez, F. Arnalich-Montiel, J. L. Gómez Ribelles, C.M. Antolinos-Turpín, J.A. Gómez-Tejedor, J.L. Alió, M.P. De Miguel. J. Biomed. Mater. Res. A. (2014)

#### **4.7.1 Eficiencia de la Biofuncionalización y colonización de h-ADAS en láminas no porosas**

A través del ELISA, se realizó el estudio de la biofuncionalización con los distintos recubrimientos proteicos, de las láminas no porosas de PEA y copolímeros de PEA que no fueron descartados en la evaluación de las características biofísicas.

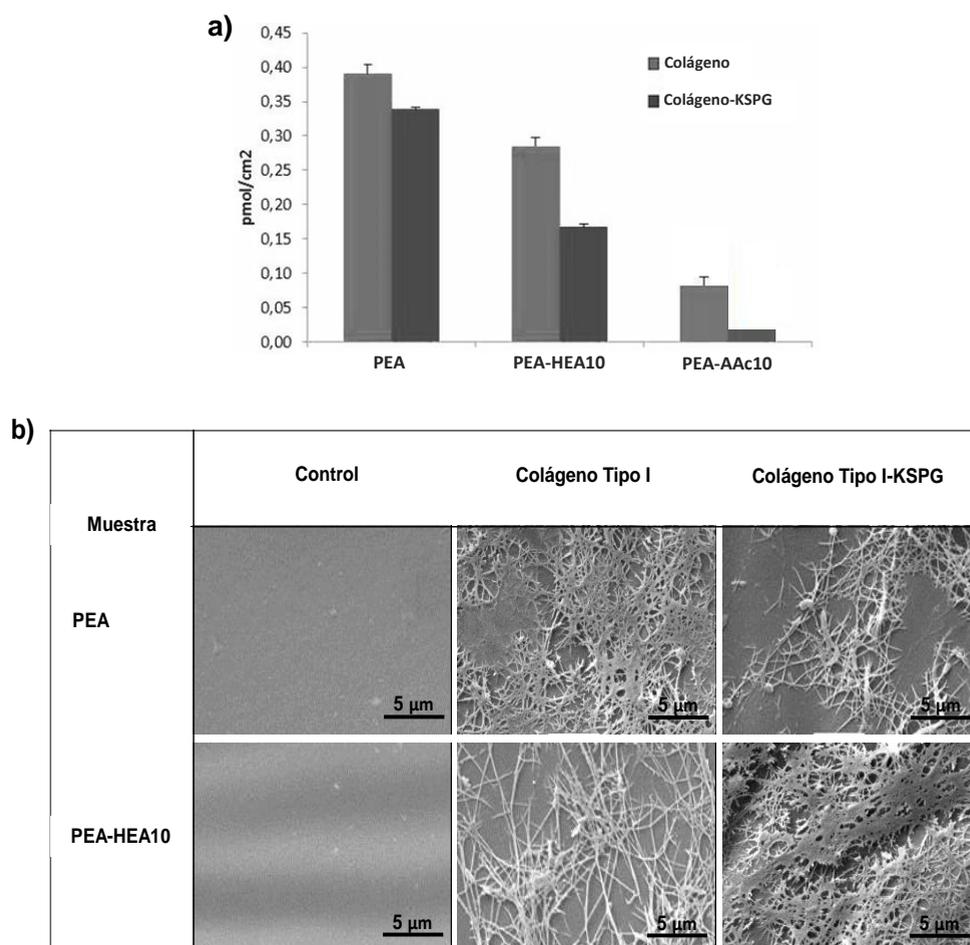
En la Figura 4.37, se muestran los resultados de la eficiencia de la adsorción de la FN, y del péptido FNIII<sub>7-10</sub> en las superficies de las láminas no porosas evaluadas. En el caso de las láminas de PEA, PEA-HEA10 y PEA-AAc10 se observaron los más altos niveles de FN por cm<sup>2</sup> de membrana (Figura 4.37a). La adsorción del péptido FNIII<sub>7-10</sub> fue menos eficaz, con niveles bajos de esta proteína encontrados sobre cualquiera de las láminas analizadas (Figura 4.37b).



**Figura 4.37** Eficiencia de la adsorción de recubrimiento sobre las superficies de las láminas no porosas de PEA y copolímeros de PEA evaluados por ELISA: a) recubrimiento fibronectina. b) recubrimiento del péptido FNIII<sub>7-10</sub>. (n=3 réplicas analizadas por muestra).

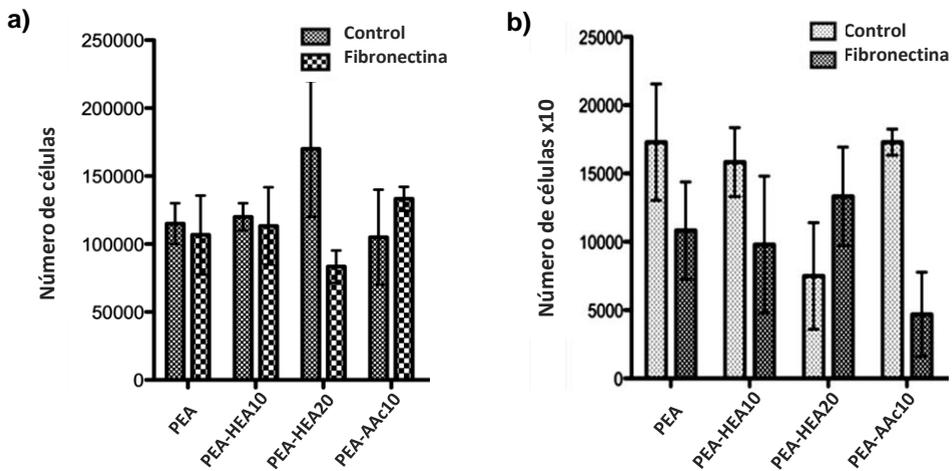
Los resultados de la eficiencia de la adsorción del colágeno y colágeno-KSPG sobre las láminas no porosas, se muestran en la Figura 4.38.

En este caso, se pudo observar como las láminas poliméricas correspondientes al PEA y al PEA-HEA10 mostraron la adsorción más eficiente en su superficie, para los dos recubrimientos proteicos, colágeno y colágeno-KSPG. Sin embargo, la lámina de PEA-AAc10 no lo fue tanto.



**Figura 4.38** a) La eficiencia de adsorción del recubrimiento sobre las superficies de las láminas no porosas de PEA y copolímeros de PEA evaluados por ELISA con colágeno y colágeno KSPG; b) Ejemplos de imágenes de SEM de las láminas no porosas de PEA y PEA-HEA10 recubiertas en la superficie con colágeno y colágeno-KSPG. (n=3 réplicas analizadas por muestra).

Por medio de la tinción DAPI, en las láminas no porosas de PEA y copolímeros de PEA, que no fueron descartados en la evaluación de las características biofísicas, con o sin los distintos recubrimientos proteicos, se realizó el conteo de núcleos y la evaluación de la colonización celular, cuyos resultados se muestran en la Figura 4.39, Figura 4.40 y Figura 4.41.



**Figura 4.39** Supervivencia celular después de la siembra de células en cada lámina de PEA con y sin recubrimiento de fibronectina (media  $\pm$  SD) a: a) 1 semana (número de células) y b) 4 semanas (número de células  $\times$  10). No se observaron diferencias estadísticamente significativas. (n=3 réplicas analizadas por muestra).

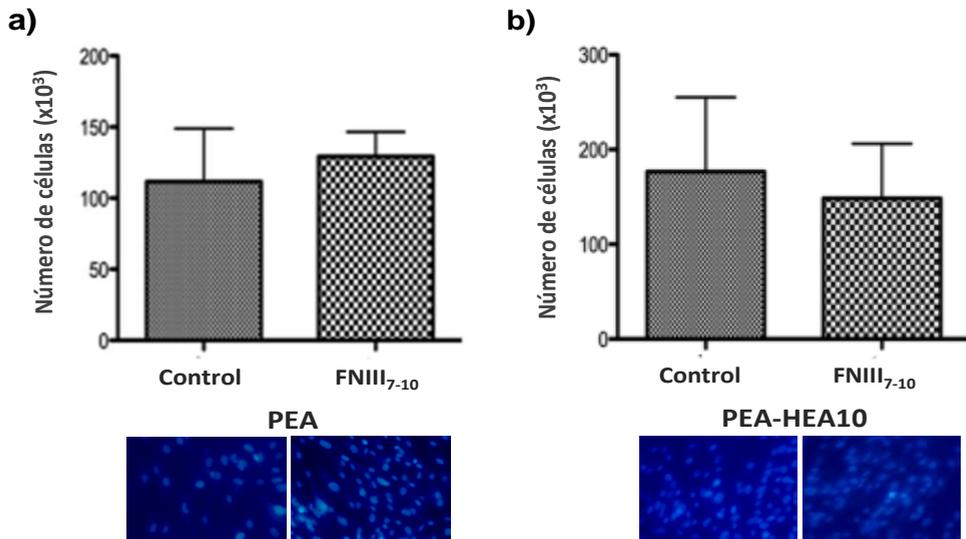
Con respecto a las láminas recubiertas de FN en PEA y copolímeros de PEA, se pudo comprobar que la presencia de FN no aumentó de manera significativa, la colonización celular en ninguna de las láminas estudiadas (Figura 4.39).

A 1 semana de cultivo (Figura 4.39a), se observó cómo las muestras de PEA, PEA-HEA10 y PEA-AAc10 proporcionaron mejor supervivencia celular. Sin embargo, en el caso de la lámina de PEA-AAc10, no se mantuvo la morfología celular normal. Después de 4 semanas de cultivo celular, se observó una tendencia en un número de casos, donde las células migraban fuera de las láminas, por lo que estos datos no se han presentado. Las láminas no porosas de PEA, PEA-HEA10 y PEA-AAc10 siguieron a través del tiempo de cultivo, la tendencia de una mayor supervivencia celular (Figura 4.39b).

Basándose en estos resultados, la membrana de PEA-HEA20 se excluyó de los experimentos y, en consecuencia, se seleccionaron sólo el PEA y PEA-HEA10 para los siguientes ensayos *in vitro*, debido a su capacidad de supervivencia celular más favorable, combinado con sus propiedades biofísicas óptimas.

No obstante, para los ensayos *in vivo* de las membranas macroporosas, también se seleccionó la membrana de PEA-AAc10.

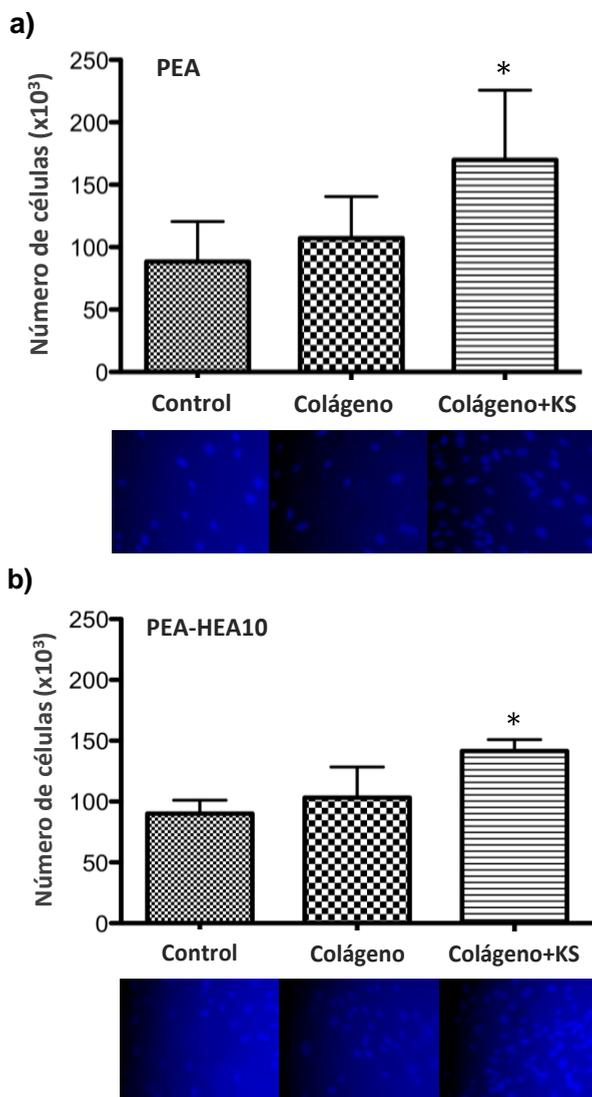
Con respecto al recubrimiento del péptido FNIII<sub>7-10</sub>, tampoco se observaron diferencias significativas en términos de supervivencia celular, entre las láminas no porosas con recubrimiento y sin recubrimiento del péptido FNIII<sub>7-10</sub> (Figura 4.40).



**Figura 4.40** Supervivencia celular a 1 semana después de la siembra de células sobre las láminas no porosas de PEA (a) y PEA-HEA10 (b) con y sin recubrimiento del péptido FNIII<sub>7-10</sub> (media ± SD). No se observaron diferencias estadísticamente significativas. (n=3 réplicas analizadas por muestra).

Si nos fijamos en los resultados mostrados en la Figura 4.41 de recuento celular sobre las láminas no porosas evaluadas de PEA y PEA-HEA10, con y sin recubrimiento de colágeno y colágeno-KSPG (KS), se observaron que no existían diferencias significativas en el caso del recubrimiento de colágeno sólo. Sin embargo, las superficies recubiertas con colágeno-KS, habían mejorado significativamente la supervivencia celular en ambas láminas de PEA y PEA-HEA10, comprobándose que el tiempo óptimo de cultivo en estas membranas fue de 4-7 días, tras los cuales el número de células disminuía. Basándose en estos datos, se seleccionó el recubrimiento de colá-

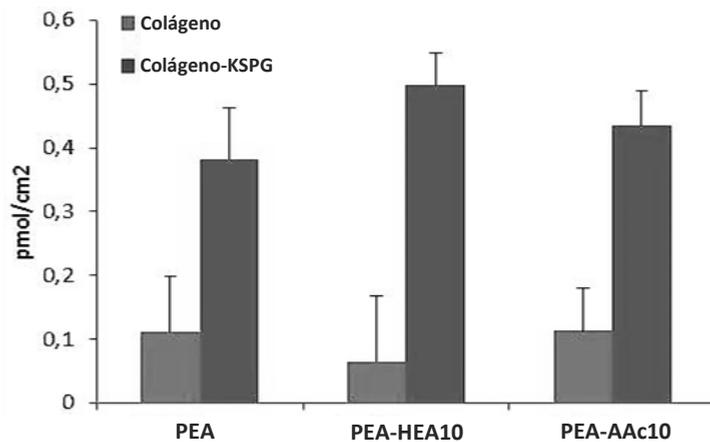
geno-KSPG sobre los implantes macroporosos para el ensayo *in vivo*.



**Figura 4.41** Recuento celular (número de células  $\times 10^3$ ) 1 semana después de la siembra sobre las láminas no porosas de PEA (a) y PEA-HEA10 (b) con y sin recubrimiento de colágeno o colágeno-KSPG (media  $\pm$  SD). (n=3 réplicas analizadas por muestra).

#### 4.7.2 Eficiencia de los recubrimientos en membranas macroporosas colapsadas

Al igual que en el apartado 4.7.1, se utilizó el ELISA para la caracterización de la eficiencia de los recubrimientos de colágeno y colágeno-KSPG en las membranas macroporosas colapsadas. Podemos observar en la Figura 4.42 como todas ellas, presentan una muy baja adsorción en el caso del recubrimiento de colágeno sólo, pero altos niveles de adsorción en el caso de colágeno-KSPG por  $\text{cm}^2$  de membrana y en cantidades similares en los tres tipos de membrana macroporosa probados.



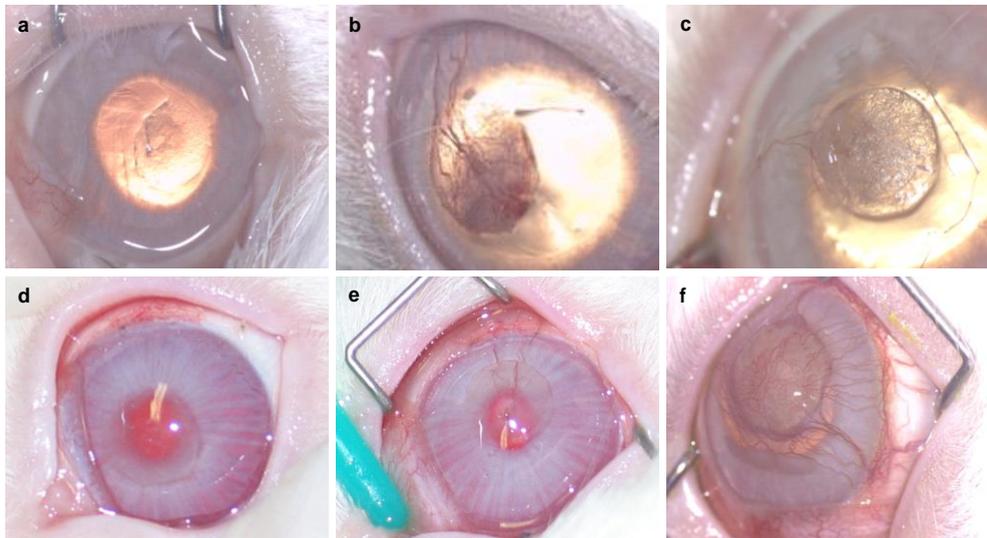
**Figura 4.42** Eficiencia de la adsorción de los recubrimientos con colágeno y colágeno-KSPG, evaluada por ELISA, en las superficies de las membranas macroporosas de PEA y copolímeros de PEA que se trasplantan en el modelo in vivo. (n=3 réplicas analizadas por muestra).

### 4.7.3 Evaluación clínica de las membranas macroporosas implantadas en la córnea

La cirugía se dividió en dos etapas o ensayos. Para el primer ensayo *in vivo*, se seleccionaron las membranas macroporosas de PEA con recubrimiento de colágeno-KSPG, con o sin colonización celular. Se prepararon nueve ojos de control ciegos con bolsillos estromales y sin membranas macroporosas y dieciocho ojos experimentales con bolsillos, y con membranas macroporosas (nueve con h-ADASCs y nueve sin h-ADASCs). Los restantes nueve ojos se dejaron sin tocar como ojos de control adicionales. La tabla 4.7 y la Figura 4.43, resumen los resultados preclínicos de los 30 casos experimentales, correspondientes a los dos ensayos o etapas realizados, en el momento de la eutanasia, y que se comentan a continuación.

*Membranas macroporosas de PEA.* Las membranas macroporosas tenían un aspecto transparente y granular, y generaron una opacidad central de grado 1 (T1) desde el momento de su implantación. De los 18 ojos de membranas de PEA implantados, se extruyeron 13, correspondiéndose con una tasa de extrusión del 72% (Tabla 4.7), y en la mayoría de ellos se produjeron dentro de los primeros 2 meses (Figura 4.43c). Muchos de estos casos extruidos, habían desarrollado previamente, y de manera precoz, úlceras corneales persistentes estériles. En la mayoría de los casos no extruidos, la transparencia se mantuvo estable durante todo el seguimiento, y la neovascularización de la córnea fue leve o moderada, periférica, y siempre por encima de la incisión quirúrgica (Figura 4.43a).

Un caso no presentó neovascularización, y dos casos desarrollaron opacificación severa y progresiva, y neovascularización del implante a partir del segundo mes de vigilancia (Figura 4.43b). Como pudo observarse, la córnea periférica se mantuvo intacta, libre de vasos y cicatrices en todo el estudio. No hubo inflamación ocular clínicamente relevante relacionada con el implante.



**Figura 4.43** Ejemplos de resultados preclínicos (aumento  $\times 2$ ) obtenidos en el momento de la eutanasia después de 3 meses con PEA (a, b, c- extrusión), PEA-HEA10 (d, e), y PEA-AAc10 (f). En las imágenes se observa la opacidad del implante de los biomateriales PEA (a, b, c) y PEA-AAc10 (f), la transparencia en PEA-HEA10 (d, e), y la neovascularización en el PEA-AAc10 (f).

**Tabla 4.7** Resultados preclínicos de los ojos experimentales al final del seguimiento. Traspacidad de la córnea (1, implante transparente pero visible; 2, neblina leve; 3, neblina moderada y 4, opacificación severa por lo que es difícil de observar la estructura interna del ojo). Neovascularización (0, ausencia; 1, periférica y leve; 2, periférica y moderada y 3, grave y que afecta a la córnea central).

Prótesis PEA (n:30)	Extrusión (%)	Casos sin extrusión							
		Traspacidad (%)				Vascularización (%)			
		1	2	3	4	0	1	2	3
PEA	78	50			50				100
PEA+h-ADASC	67	67			33	33	33		33
PEA-HEA10	0			100					100
PEA-HEA10 +h-ADASC	0			100					100
PEA-AAc10	67				100	33			67
PEA-AAc10 +h-ADASC	33				100				100

En base a estos resultados, se continuó el experimento con las otras dos membranas poliméricas macroporosa, que habían sido también compatibles con la colonización de las h-ADASC en los resultados anteriores *in vitro*: PEA-HEA10 y PEA-AAc10.

En particular, un motivo de elección de la membrana macroporosa de PEA-AAc10, radica en la metodología del recubrimiento, de manera que en el caso de la membrana de PEA-HEA10, el recubrimiento de Colágeno+KS se realiza mediante adsorción, mientras que en

la de PEA-AAc10 el Colágeno+KS se une covalentemente por lo que la conformación de colágeno será diferente en ambas superficies, cambiando así la exposición de dominios de adhesión celular, pudiendo dar resultados satisfactorios con respecto a la implantación.

En este segundo ensayo, se confeccionaron seis casos con membranas macroporosas de PEA-HEA10 (tres con h-ADASCs y tres sin h-ADASCs), seis casos con membranas macroporosas de PEA-AAc10 (tres con h-ADASCs y tres sin h-ADASCs), y seis ojos ciegos de control. Los restantes seis ojos se dejaron intactos como ojos de control adicionales.

*Membranas macroporosas de PEA-HEA10.* Estas membranas macroporosas presentaban un aspecto semitransparente, y generaron una opacidad central de grado 3 (T3) desde el momento de su implantación. Durante todo el seguimiento, no se observó ningún caso de extrusión del implante o ulceración corneal (Tabla 4.7). La transparencia se mantuvo estable en todos los casos, durante todo el seguimiento sin producción de más opacificación. Sin embargo, en la mayoría de los casos (a excepción de un caso, Figura 4.43d), se desarrolló una neovascularización corneal superior, periférica, y moderada, a partir de la incisión quirúrgica, con una implicación leve en la córnea central (Figura 4.43e). La córnea periférica se mantuvo intacta y libre de vasos y cicatrices en todo el estudio. No hubo inflamación ocular clínicamente relevante, relacionada con el implante.

*Membranas macroporosas de PEA-AAc10.* Estas membranas macroporosas también presentaron un aspecto semitransparente, y generaron una opacidad central de grado 2 (T2) desde el momento de su implantación. Se observaron tres casos de extrusión del implante (50%); y en los casos no extruidos, el implante produjo una marcada protuberancia central anterior (Tabla 4.7). Una semana después de la implantación, todos los casos desarrollaron una moderada y difusa inflamación ocular, asociada con una opacificación progresiva del implante, que se convirtió (cuando no se extruye) completamente opaca (T4) desde el segundo mes de seguimiento, impidiendo de ese modo la visualización de cualquier estructura intraocular central. También se desarrolló una neovascularización difusa y severa, involucrando a la mayoría de la superficie de la córnea (Figura 4.43f). Sólo se detectó un caso de queratopatía lipídica, que implica presencia de lipoproteínas en exceso, asociada con la vascularización. La inflamación ocular desapareció al tercer mes, exceptuando lo establecido en uno de los casos en el que fue persistente dicha inflamación.

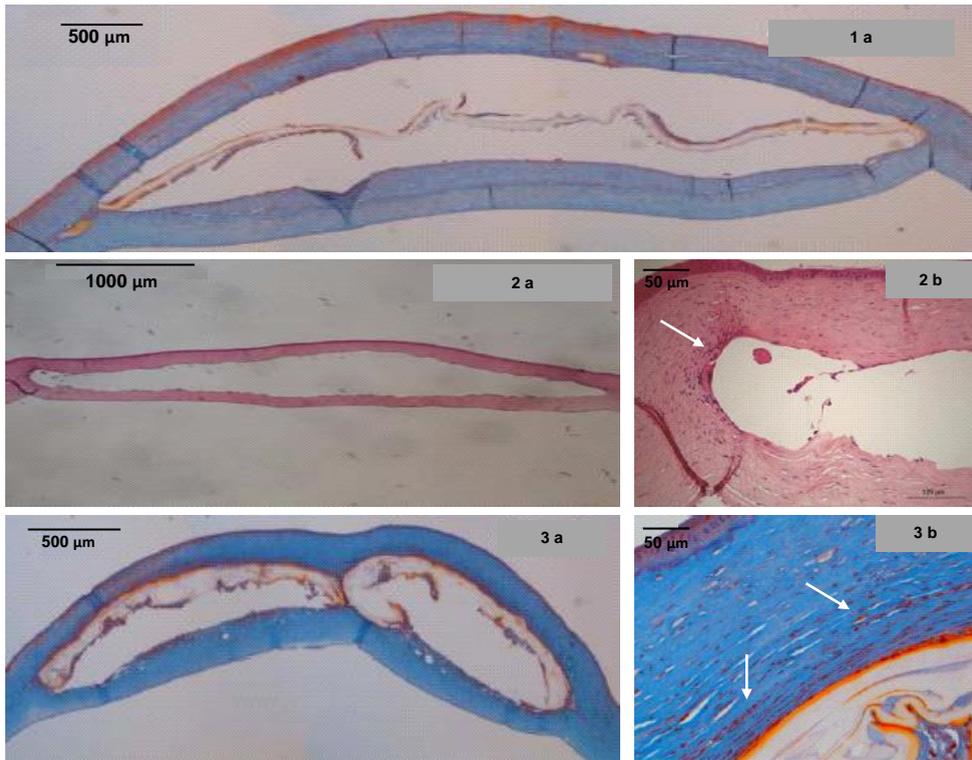
En términos generales, se puede concluir que todos los animales toleraron bien el procedimiento, a pesar de algunas complicaciones. Hubo dos casos de perforación posterior hacia la cámara anterior (4,4% de los bolsillos), y cinco casos de laceración de la pared anterior del bolsillo (11% de los bolsillos). Las diferencias en la tasa de extrusión entre el PEA y PEA-HEA10 fueron estadísticamente significativas. Las diferencias en la transparencia y la neovascularización no fueron estadísticamente significativas entre las distintas membra-

nas. Por otra parte, se observó una ligera reducción en la tasa de extrusión con la presencia de las h-ADASC, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Finalmente, no se observaron tampoco diferencias relativas a la transparencia o la vascularización, con respecto a la presencia o ausencia de h-ADASCs.

#### **4.7.4 Análisis histológico y evaluación de la presencia de h-ADASCs en las córneas**

Con respecto al análisis histológico de las córneas trasplantadas, y como se muestra en la Figura 4.44, no se observaron diferencias histológicas relevantes entre las distintas membranas macroporosas. En los casos de extrusión, no hubo evidencia de algún tipo de material o cavidad, y sí se pudieron observar cambios residuales en su estroma: abundancia de vasos y la presencia de macrófagos (Figura 4.44).

Los casos sin extrusión del implante, presentaron una cavidad ovalada en el estroma central, de 5 mm de diámetro y 300-600  $\mu\text{m}$  de profundidad, que fue parcialmente ocupada por la membrana macroporosa, en forma de disco cromóforo de 100  $\mu\text{m}$  de espesor (Figura 4.44-1a, 2a, 3a). Esta cavidad central se produjo debido a la dehiscencia del tejido, como una abertura espontánea del tejido suturado durante la intervención quirúrgica, es decir, durante el procesamiento de la muestra después de la fijación. Se observó una respuesta moderada de los macrófagos alrededor del implante, con cuerpo extraño de células gigantes y aisladas.



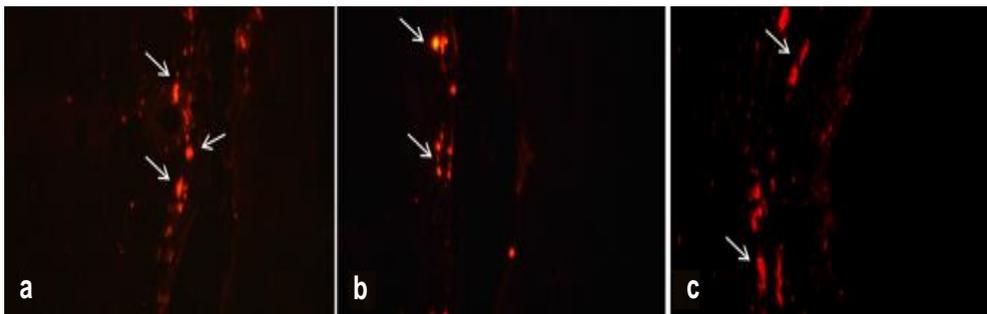
**Figura 4.44** Secciones histológicas tras la eutanasia, de PEA (1a), PEA-HEA10 (2a, 2b), y PEA-AAc10: (3a, 3b), teñidas con tricromo de Masson (1a, 3a, 3b) y hematoxilina-eosina (2a, 2b). Las membranas macroporosas aparecen como discos cromófobos (1a, 2b, 3b). Se observa reacción de macrófagos alrededor del implante siendo más intenso en las esquinas (2b, flecha) y con PEA-AAc10 (3b, flechas). Se observa también una tira de tejido conectivo denso que rodea el implante (1a, 3a).

También se ha observado la presencia de una interfase entre el material implantado y los tejidos corneales del conejo, que se compone de una tira de tejido conectivo denso que rodea el implante, con infiltrados inflamatorios ocasionales, células parecidas a miofibroblastos

y neovasos, que son más abundantes en las esquinas de la cavidad (Figura 4.44-2b). Estos hallazgos han sido más pronunciados en las córneas con las membranas macroporosas de PEA-AAc10 (Figura 4.44-3b).

Para evaluar si las h-ADASCs sobrevivieron el interior de la córnea de conejo *in vivo*, se utilizó la técnica de microscopía de epifluorescencia con disolución CM-Dil Vybrant, cuyos resultados, se muestran en la Figura 4.45.

Las ocho córneas con membranas macroporosas colonizadas y no extruidas, presentaron células fuertemente positivas para la disolución de CM-Dil, y distribuidas alrededor del implante (flechas ubicadas en Figura 4.45). Las células estaban presentes en poca cantidad, independientemente del tipo de membrana macroporosa analizada (Figura 4.45). La CM-Dil Vybrant no se detectó en ninguno de los controles negativos, o en los ojos experimentales con membranas macroporosas descelularizadas.



**Figura 4.45** Fluorescencia de las células mediante Vybrant CM-Dil: (a) PEA, (b) PEA-HEA10 y (c) PEA-AAc10. (Aumentos 400x)

## Discusión

El objetivo principal de este estudio fue evaluar las membranas macroporosas de PEA y copolímeros de PEA (*in vitro e in vivo*) como posibles soportes tridimensionales porosos que pudiesen mejorar la queratoprótesis, lo que podría evitar la elevada tasa de complicaciones relacionadas con las opciones de tratamiento actuales que utilizan principalmente PMMA o PHEMA para sus soportes<sup>215,216</sup>.

La introducción de unidades hidrófilas parece ser importante en la biointegración de la prótesis de PEA dentro del estroma corneal. Se han considerado y utilizado en este estudio dos tipos de estas unidades hidrófilas. Por una parte, el HEA introduce grupos hidroxilo en la superficie del material, y por otra, el AAc o el MAAC introducen grupos carboxilos funcionales. Mientras el HEA simplemente cambia la tensión superficial, como se observa por la disminución significativa en los valores de WCA con el bajo contenido de HEA de la muestra, las unidades de AAc o MAAC aumentan la humectabilidad de la superficie del sustrato, y permiten la unión de proteína, tal y como se ha mostrado en otros estudios<sup>319,356</sup>. Un número importante de estudios, han propuesto injertar grupos carboxilo sobre la superficie de la queratoprótesis, que se traduce en un aumento significativo en la unión de biomaterial en el tejido corneal. Además, la presencia de grupos carboxilo teóricamente ayuda a la inmovilización de colágeno en la superficie a través de los enlaces covalentes<sup>213,357</sup>.

Sin embargo, nuestros resultados muestran que la colonización celular disminuye en presencia de elevada hidrofiliidad (20%), especialmente cuando los grupos hidrófilos provienen de las unidades de AAc o MAAC (Figura 4.39b), y sigue siendo excelente en presencia de baja hidrofiliidad (10%), pero sin diferencias significativas en comparación con las membranas no porosas de PEA.

Por otro lado, las membranas no porosas de PEA, han mostrado una respuesta favorable a la adsorción de proteínas sobre su superficie. Estas proteínas exhiben ligandos de adhesión, que teóricamente deberían mejorar la adhesión de la célula a la superficie del implante. Sin embargo, sólo se pudo demostrar una mejora de forma significativa, en la adhesión de las h-ADAS con el recubrimiento de colágeno-KSPG, cuando se compara con el biomaterial sin recubrimiento. La FN, el péptido FNIII<sub>7-10</sub> y colágeno solo, no mejoraron la adhesión celular en este estudio.

Para el ensayo *in vivo*, además de la membrana macroporosa de PEA, los dos copolímeros que contienen la cantidad más baja de HEA y AAC también se implantaron, teniendo en cuenta que estos biomateriales tuvieron una supervivencia celular *in vitro* favorable, y propiedades biofísicas óptimas. Se confeccionaron seis casos con las membranas macroporosas de PEA-HEA10 y PEA-AAc10, ya que este número de muestras fue suficiente para demostrar que hubo diferencias estadísticamente significativas en las tasas de extrusión del implante entre el PEA (72%) y el PEA-HEA10 (0%), y sin diferencias entre el PEA y PEA-AAc10 (50%). Por lo tanto, la baja hidroxila-

ción de las membranas de PEA mejoró significativamente su supervivencia *in vivo*, con respecto a las otras dos membranas.

La temperatura de transición vítrea del PEA, que está muy por debajo de la temperatura corporal, asegura que el material está en un estado similar al caucho y de ese modo maleable y flexible, con un módulo elástico a la temperatura del cuerpo alrededor de  $1\text{MPa}^{358}$ . Este valor se aproxima al módulo de las córneas humanas que tiene un valor entre  $0.3$  y  $3\text{MPa}^{359}$ . El PEA es, sin embargo, un material bastante hidrófobo, lo que plantea preguntas acerca de su comportamiento dentro del estroma corneal y la posibilidad de ulceración debido a la fricción entre el implante y el tejido huésped. Esta fricción podría explicar la elevada tasa de úlceras corneales y de extrusión del implante (72%), detectados en los casos en los que las membranas macroporosas de PEA fueron implantadas, y no debido a una directa fusión del estroma corneal. Este resultado también se confirma por el hecho de que las membranas de PEA no generaron una inflamación clínicamente relevante, como lo hicieron las membranas del PEA-AAc10 durante el período postoperatorio.

Los resultados histológicos en los casos no extruidos con membranas de PEA también apoyan esta teoría, mostrando una moderada respuesta de los macrófagos con sólo un cuerpo extraño de células gigantes aisladas, pero no una fusión real del tejido circundante. Esta reacción histiocítica ocurre principalmente en las fronteras de la membrana, lo que sugiere una cierta cantidad de fricción en esas áreas.

El hecho de trasplantar un sustituto celular, junto con el soporte estructural, para llevar a cabo las funciones críticas en la homeostasis de la córnea realizado por queratocitos, es esencial, ya que producen factores tales como colágeno, proteoglicanos, y metaloproteinasas, que son indispensables para la salud de la córnea, y el mantenimiento a largo plazo de la transparencia corneal<sup>360</sup>. Para repoblar los soportes macroporosos se utilizan, células h-ADAS, que han demostrado ser una fuente perfecta de células madre autólogas para el desarrollo de la ingeniería tisular de córneas, y evitar las limitaciones que se encuentran con respecto a las células de la córnea<sup>219,273,361</sup>. A pesar de su potencial demostrado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con y sin h-ADAS, con ninguna mejora en la biointegración clínica e histológica, y en la tasa de extrusión del implante. Esta falta o carencia de efecto, podría ser debido al bajo número de h-ADAS. Sin embargo, se ha podido demostrar que las h-ADAS sobreviven al menos 3 meses *in vivo*, cuando se trasplantan junto con una membrana macroporosa de PEA. Los esfuerzos para aumentar el número de células promoviendo su supervivencia o proliferación *in vivo*, deben considerarse para futuros estudios.

Durante el procesado de las distintas muestras para histología, se desarrolló una cavidad en el estroma central en todos los casos de implantes no extruidos, por dehiscencia entre la membrana no porosa y el tejido circundante. Este hecho puede ser debido a la falta de integración real de la membrana dentro del estroma, o incluso a un aumento de presión. Por lo tanto, a pesar de la estructura macropo-

rosa de las membranas, ni las h-ADAS ni los queratocitos anfitriones parecen infiltrarse y generar nuevo colágeno dentro de ellas, como se esperaba inicialmente. Sin embargo, debido a la inactividad normal de los queratocitos, un seguimiento de sólo 3 meses podría no ser suficiente tiempo para completar este proceso, por lo que un aumento en el tiempo de seguimiento podría mostrar una invasión de la célula huésped en el implante poroso, con posterior biointegración real de las membranas estudiadas de PEA, en el estroma circundante. Aunque las membranas de PEA no llegaron a ser totalmente transparentes *in vivo*, este hecho sin embargo, no es relevante, porque se espera que los soportes macroporosos cumplan con la función de permanecer dentro de la periferia de la córnea (o córnea periférica), soportando una lente central con funciones ópticas y de transparencia.

Como principal conclusión, se ha presentado un nuevo tipo de biomaterial que puede utilizarse como soporte macroporoso para una futura queratoprótesis. A pesar de que son necesarias investigaciones o ensayos adicionales antes de su aplicación clínica, se ha demostrado que la baja hidroxilación de las membranas macroporosa de PEA mejora significativamente su supervivencia *in vivo*. Por tanto se propone en primera instancia al PEA, con baja hidroxilación, como soporte macroporoso para el anillo de anclaje de una queratoprótesis futura. No obstante, por los resultados obtenidos podría utilizarse también la membrana macroporosa de PEA-HEA10, como parte de anclaje entre la lente y el tejido corneal circundante.

**Conclusiones**



A continuación se presentan las principales conclusiones extraídas de esta tesis.

- 1.** Se ha desarrollado un procedimiento que permite obtener membranas finas macroporosas y flexibles basadas en copolímeros de PEA con suficiente resistencia mecánica y con estructura de poros interconectados que pueden ser sembradas por células.
- 2.** La metodología de obtención de las membranas macroporosas se basó en la producción de un soporte macroporoso isótropo con estructura de poros esféricos interconectados y el colapso de la estructura anisotrópicamente sólo en la dirección transversal, de manera que los poros quedaron aplastados pero manteniendo la interconexión y el espacio suficiente para alojar las células en los mismos.
- 3.** El método desarrollado es muy versátil, ya que ha permitido obtener membranas de composiciones variadas con el requisito de la formación del polímero “in situ” a través de la polimerización por vía radical utilizando la técnica de las plantillas. El espesor y grado de reticulación de la red formada inicialmente permite controlar la arquitectura de poro que se obtiene y las propiedades mecánicas. El efecto controlado de estas variables, se han utilizado para obtener membranas más o menos flexibles y más o menos porosas, adaptables a distintas aplicaciones.

4. Se ha comprobado que las membranas macroporosas obtenidas con 100 micras de espesor presentaban una resistencia al desgarro suficiente para permitir la sutura quirúrgica.

5. Los cultivos celulares *in vitro* de los distintos materiales demostraron que las células mesenquimales de medula ósea, sembradas en la superficie de la membrana pudieron penetrar espontáneamente hasta las 40 micras en el interior de la estructura porosa. Cuando se cultivaron en medio de expansión, se obtuvo una alta proliferación en superficie; sin embargo, aunque las células son viables en el interior de los poros, la estructura tridimensional inhibe la proliferación.

6. La incorporación de un pequeño porcentaje de grupos hidrofílicos al copolímero basado en el PEA mejoró la humectabilidad del mismo, presentando claras ventajas respecto a la siembra de las células, además de la ligera reducción en la tasa de extrusión e irritación que produjo en el tejido circundante cuando se implantó *in vivo*. La introducción de co-monómeros con grupos ácido dotó al material de puntos reactivos sobre los que injertar proteínas o polisacáridos de cara a mejorar la respuesta celular.

7. Se ha desarrollado un prototipo simplificado de prótesis de córnea con una "lente" cilíndrica de PMMA y un anillo de anclaje formado por una de las membranas macroporosas sintetizadas, consiguiendo integrar ambos componentes en una única pieza.

**8.** Mediante un modelo de córnea de conejo se ha podido comprobar que el material utilizado en el anillo de anclaje no provocó irritación y se biointegró en el tejido circundante.



**Glosario**



## Glosario

### A

AAc                      Ácido acrílico

### B

bMSCs                    Células madre mesenquimales procedentes  
del hueso subcondral

BSA                      Albúmina de suero bovino

BPO                      Peróxido de benzoilo

### C

CAeq                    Contenido de agua en equilibrio

CM-Dil Vybrant        Solución de carbocianina de di alquilo fluo-  
rescente de clorometil benzamida

### D

DAPI                    Tinción *in vivo* de 4,6-diamino-2-fenilindol

DMEM                   Medio Eagle modificado de Dulbeco

DEP                    Defectos epiteliales persistentes

DPBS                    Solución salina fosfatada de Dulbeco

DRACON                Polietilen tereftalato, PET

DSC                    Caloimetría Diferencial de Barrido

### E

EA                      Acrilato de etilo

EDAC                    N´-(3-dimetilaminopropil)-N´-clorhidrato de  
etilcarbodiimida

EDC                    1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EGDMA                Etilenglicol dimetacrilato

ELISA                    Ensayo de inmunoadsorción enzimática

ePFTE                    Politetrafluoroetileno expandido

**F**

FBS	Suero fetal bovino
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblasto recombinante humano
FN	Fibronectina

**H**

h-ADAS	Células madre adultas de tejido adiposo humano
HEA	Hidroxietil acrilato o acrilato de 2- hidroxietilo
HRP	Peroxidasa de rábano
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical

**I**

IPNs	Redes poliméricas interpenetradas
------	-----------------------------------

**K**

KPros	Queratoprótesis o prótesis totalmente sintéticas
KSPG	Keratan sulfato

**M**

MAAc	Ácido metacrílico
MEC	Matriz extracelular
MES	Ácido etano sulfónico 2-(N-Morfolino)
MSCs	Células madre mesenquimales

**N**

NHS	N-hidroxisuccinimida o sal sódica
-----	-----------------------------------

**P**

PAAc	Ácido poli acrílico
------	---------------------

---

PBS	Solución salina (tamponada) fosfatada
PBST	Solución salina fosfatada más Tween 20
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PEA	Poli acrilato de etilo
PEG	Polietilenglicol
PEO	Poli oxido de etileno
PFTE	Politetrafluoroetileno
PHEA	Poli hidroxietil acrilato
PHEMA	Poli hidroxietil metacrilato
PHSRN	Prolina-histidina-serina-arginina-asparagina
PLA	Ácido poliláctico
PLLA	Ácido poli-L-láctico
PMMA	Polimetacrilato de metilo o metil metacrilato
PP	Polipropileno
P/S	Penilicina/estreptomina
PU	Poliuretano
PVA	Polivinil alcohol
<b>R</b>	
RGD	Secuencia arginina-glicina-ácido aspártico
<b>S</b>	
SEM	Microscopía electrónica de barrido
<b>T</b>	
Tg	Temperatura de transición vítrea
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
<b>W</b>	
WCA	Ángulo de contacto del agua



## Referencias



1. Shalak, R. & Fox, C. *Tissue Engineering, Preface*. Eds. R. Liss, New York. 26–29 (1988).
2. Langer, R. & Vacanti, J. Tissue Engineering. *Science* **260**, 920–926 (1993).
3. Lanza, R., Lager, R. & Vacanti, J. *Principles of tissue engineering. 4th Edit. Academic Press-Elsevier*. (2013).
4. Liu, C., Xia, Z. & Czernuszka, J. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chem. Eng. Res. Des.* **85**, 1051–1064 (2007).
5. Drury, J. & Mooney, D. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337–4351 (2003).
6. Mravic, M., Péault, B. & James, A. Current trends in bone tissue engineering. *Biomed Res. Int.* **6**, (2014).
7. Luo, Y, et al. *Principles of Tissue Engineering. Princ. Tissue Eng.* 475–494 (Elsevier, 2014).
8. Langer, R. & Vacanti, J. *Principles of tissue engineering, R.L. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, Editor*. (2007).
9. Patrick, C., Mikos, A. & McIntire, L. *Prospects of tissue engineering. In: Frontiers in Tissue Engineering, Eds. Elsevier Science Ltd, Oxford.* 3–11 (1998).
10. Williams, D. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* **30**, 5897–909 (2009).
11. Hutmacher, D.W., et al. Can tissue engineering concepts advance tumor biology research? *Trends Biotechnol.* **28**, 125–33 (2010).
12. Ratner, B. *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine. 2nd Edition. Academic Press*. (2004).
13. Williams, D. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**, 2941–53 (2008).
14. Temenoff, J. & Mikos, A. *Biomaterials: the intersection of biology and materials science. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall*. (2008).
15. Daniel, D. & Stuart, L. *Polymers: basic principles. In: Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman FJS and JEL, editor. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. 3th Edit. Elsevier.* 64–79 (2013).

16. Sachlos, E. & Czernuszka, J. T. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur. Cell. Mater.* **5**, 29–40 (2003).
17. Chan, B.P. & Leong, K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur. Spine J.* **17 Suppl 4**, 467–79 (2008).
18. Hutmacher, D. & Kent, L. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues, state of the art and future perspectives. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **12**, 107–124 (2001).
19. Almeida, H. & Bártolo, P. Virtual topological optimisation of scaffolds for rapid prototyping. *Med. Eng. Phys.* **32**, 775–82 (2010).
20. Leong, K., Cheah, C. & Chua, C. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* **24**, 2363–2378 (2003).
21. Dado, D. & Levenberg, S. Cell-scaffold mechanical interplay within engineered tissue. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 656–64 (2009).
22. Sobral, J.M., et al. Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. *Acta Biomater.* **7**, 1009–18 (2011).
23. Nair, L. & Laurencin, C. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 762–798 (2007).
24. Coury, A. Biostable polymers as durable scaffolds for tissue engineered vascular prostheses. *Tissue Eng. Vasc. Prosthet. grafts. R.G. Landes Co.* 471–480 (1999).
25. King, R.N. & Lyman, D. J. Polymers in contact with the body. *Environ. Health Perspect.* **11**, 71–4 (1975).
26. Mathur, A.B., et al. In vivo biocompatibility and biostability of modified polyurethanes. *J Biomed Mater Res* **36**, 246–257 (1997).
27. Heumann, S., et al. New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and polyamide fibres. *J. Biochem. Biophys. Methods* **69**, 89–99 (2006).
28. O'Brien, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* **14**, 88–95 (2011).
29. Hollister, S. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.* **4**, 518–24 (2005).

30. Stathopoulos, A., et al. Water sorption and polymer dynamics in hybrid poly(2-hydroxyethyl-co-ethyl acrylate)/silica hydrogels. *Eur. Polym. J.* **46**, 101–111 (2010).
31. Klouda, L. & Mikos, A. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68**, 34–45 (2008).
32. Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **944**, 62–73 (2001).
33. Katime, D., Katime, O. & Katime, I. *Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones.. Servicio editorial de la Universidad del país Vasco. Capítulos 1; 7, 15-20.* 121–228 (2004).
34. Peppas, N. & Moyniman, H. *Hydrogels in medicine and pharmacy, vol. 2. Wiley and Sons, Inc. In: Peppas NA, editor.* 49 (1987).
35. Jeong, S., Huh, K. & Park, K. *Hydrogel drug delivery systems. Polymers in drug delivery. CRC Press (Taylor & Francis Group), Inc. In: Uchegbu IF, Schätzlein AG, editors.* 51–59 (2006).
36. Campillo-Fernández, A.J., et al. Water-induced (nano) organization in poly(ethyl acrylate-co-hydroxyethyl acrylate) networks. *Eur. Polym. J.* **44**, 1996–2004 (2008).
37. Pérez Olmedilla, M., et al. Response of human chondrocytes to a non-uniform distribution of hydrophilic domains on poly (ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymers. *Biomaterials* **27**, 1003–12 (2006).
38. Chirila, T.V., et al. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) sponges as implant materials: in vivo and *in vitro* evaluation of cellular invasion. *Biomaterials* **14**, 26–38 (1993).
39. Chirila, T.V. An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. *Biomaterials* **22**, 3311–3317 (2001).
40. Gomez-Tejedor, J.A., et al. Dynamic Mechanical Relaxation of Poly(2-Hydroxyethyl Acrylate)-silica Nanocomposites Obtained by the Sol-gel Method. *J. Macromol. Sci. Part B* **46**, 43–54 (2007).
41. Myung, D., et al. Development of hydrogel-based keratoprostheses: A materials perspective. in *Biotechnol. Prog.* **24**, 735–741 (2008).
42. Bakhshandeh, H., et al. Poly (epsilon-caprolactone) nanofibrous ring surrounding a polyvinyl alcohol hydrogel for the development of a biocompatible two-part artificial cornea. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 1509–15 (2011).

43. Ferrer, G. Swelling and thermally stimulated depolarization currents in hydrogels formed by interpenetrating polymer networks. *J. Non. Cryst. Solids* **237**, 692–696 (1998).
44. Gómez-Tejedor, J.A., et al. Poly(ethyl methacrylate-co-hydroxyethyl acrylate) random co-polymers: Dielectric and dynamic-mechanical characterization. *J. Non. Cryst. Solids* **353**, 276–285 (2007).
45. Salmerón, M., et al. The structure of poly(ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymer networks by segmental dynamics studies based on structural relaxation experiments. *Polymer (Guildf)*. **45**, 2349–2355 (2004).
46. Tomić, S.L., et al. Smart poly(2-hydroxyethyl methacrylate itaconic acid) hydrogels for biomedical application. *Radiat. Phys. Chem.* **79**, 643–649 (2010).
47. Montheard, J., Chatzopoulos, M. & Chappard, D. 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA): chemical properties and applications in biomedical fields. *Polym Rev* **32**, 1–34 (1992).
48. Dos Santos, J.F.R., et al. Soft contact lenses functionalized with pendant cyclodextrins for controlled drug delivery. *Biomaterials* **30**, 1348–55 (2009).
49. Robinson, K. & Khan, M. Controlled polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate by ATRP at ambient temperature. *Macromolecules* **34**, 3155–3158 (2001).
50. Escobar, JL, et al. Proliferation and differentiation of goat bone marrow stromal cells in 3D scaffolds with tunable hydrophilicity. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **91**, 277–86 (2009).
51. Campillo-Fernández, A.J., et al. Analysis of the biological response of endothelial and fibroblast cells cultured on synthetic scaffolds with various hydrophilic/hydrophobic ratios: influence of fibronectin adsorption and conformation. *Tissue Eng. Part A* **15**, 1331–41 (2009).
52. Supp, D. & Boyce, S. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin. Dermatol.* **23**, 403–412 (2005).
53. Sokolsky-Papkov, M., et al. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 187–206 (2007).
54. Alió Del Barrio, J.L., et al. Biointegration of corneal macroporous membranes based on poly(ethyl acrylate) copolymers in an experimental animal model. *J. Biomed. Mater. Res. A* 1–44 (2014).

55. Chirila, T.V. An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. *Biomaterials* **22**, 3311–3317 (2001).
56. Tighe, B. *Hydrogels in medicine and pharmacy, vol. III*, CRC, Boca Raton. (1997).
57. Sun, W., Darling, A., Starly, B. & Nam, J. Computer-aided tissue engineering: overview, scope and challenges. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **47**, 29–47 (2004).
58. Hollick, E., Watson, S., Dart, J., Luthert, P. & Allan, B. Legeais BioKpro III keratoprosthesis implantation: long term results in seven patients. *Br J Ophthalmol* **90**, 1146–1151 (2006).
59. Siegwart, D., Oh, J. & Matyjaszewski, K. ATRP in the design of functional materials for biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 18–37 (2012).
60. Chirila, T.V., et al. Interpenetrating polymer network (IPN) as a permanent joint between the elements of a new type of artificial cornea. *J Biomed Mater Res* **28**, 745–753 (1994).
61. Myung, D., et al. Bioactive interpenetrating polymer network hydrogels that support corneal epithelial wound healing. *J Biomed Mater Res A* **90**, 70–81 (2009).
62. Lévesque, S.G., Lim, R. M. & Shoichet, M. S. Macroporous interconnected dextran scaffolds of controlled porosity for tissue-engineering applications. *Biomaterials* **26**, 7436–46 (2005).
63. Hoffart, L., Carles, G. & Matonti, F. Lamellar corneal lenticule graft to treat keratolysis after AlphaCor keratoprosthesis implantation. *Eur J Ophthalmol* p.0 (2014).
64. Stamatialis, D.F., et al. Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *J. Memb. Sci.* **308**, 1–34 (2008).
65. Duan, H., Feng, B., Guo, X. & Wang, J. Engineering of epidermis skin grafts using electrospun nanofibrous gelatin/polycaprolactone membranes. *Int. J. Nanomedicine* **8**, 2077–2084 (2013).
66. Walker, N.G., et al. A Chemically Defined Carrier for the Delivery of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells to Skin Wounds. *Tissue Eng. Part C-Methods* **18**, 143–155 (2012).
67. Pianigiani, E., et al. Human De-epidermized Dermis as a Stem Cell Carrier. *Transplant. Proc.* **42**, 2244–2246 (2010).

68. Mogoşanu, G. & Grumezescu, A. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int. J. Pharm.* **463**, 127–136 (2014).
69. Waaijman, T., et al. Use of a Collagen-Elastin Matrix as Transport Carrier System to Transfer Proliferating Epidermal Cells to Human Dermis *In vitro*. *Cell Transplant.* **19**, 1339–1348 (2010).
70. Pal, K., Banthia, A. & Majumdar, D. Polymeric hydrogels: characterization and biomedical applications. *Des. monomers Polym.* **12**, 197–220 (2009).
71. Niu, G. *et al.* Heparin-modified gelatin scaffolds for human corneal endothelial cell transplantation. *Biomaterials* **35**, 4005–14 (2014).
72. De la Mata, A., et al. Chitosan–gelatin biopolymers as carrier substrata for limbal epithelial stem cells. *J. Mater. Sci. Med.* **24**, 2819–2829 (2013).
73. Levis, H.J., et al. Plastic compressed collagen as a novel carrier for expanded human corneal endothelial cells for transplantation. *PLoS One* **7**, 1–10 (2012).
74. Murphy, M. & Mikos, A. *Polymer Scaffold Fabrication*. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, editors. *Principles of tissue engineering*. 3rd Edit. Elsevier. 309–21 (2007).
75. Dhandayuthapani, B., et al. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *Int. J. Polym. Sci.* **2011**, 1–19 (2011).
76. Wake, M., Gupta, P. & Mikos, A. Fabrication of pliable biodegradable polymer foams to engineer soft tissues. *Cell Transplant.* **5**, 465–473 (1996).
77. Brigido, R., et al. Polymer Scaffolds With Interconnected Spherical Pores and Controlled Architecture for Tissue Engineering: Fabrication, Mechanical Properties, and Finite Element Modeling. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **81**, 448–455 (2007).
78. Escobar, J.L., et al. Structure and properties of methacrylate-endcapped caprolactone networks with modulated water uptake for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* **83B**, 266–275 (2007).
79. Dinu, M.V., et al. Morphological and swelling properties of porous hydrogels based on poly(hydroxyethyl methacrylate) and chitosan modulated by ice-templating process and porogen leaching. *J. Polym. Res.* **20**, 10 (2013).

80. Brigido, R., et al. Acrylic scaffolds with interconnected spherical pores and controlled hydrophilicity for tissue engineering. *J. Mater. Sci.* **40**, 4881–4887 (2005).
81. Huang, D., et al. Facile fabrication of gradient bioactive coating with hierarchically porous structures and superior cell response. *Mater. Lett.* **133**, 105–108 (2014).
82. Santamaría, V.A., et al. Influence of the macro and micro-porous structure on the mechanical behavior of poly(l-lactic acid) scaffolds. *J. Non. Cryst. Solids* **358**, 3141–3149 (2012).
83. Cruz, D., et al. Differentiation of mesenchymal stem cells in chitosan scaffolds with double micro and macroporosity. *J. Biomed. Mater. Res. A* **95**, 1182–93 (2010).
84. Lebourg, M., et al. Biodegradable polycaprolactone scaffold with controlled porosity obtained by modified particle-leaching technique. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 2047–53 (2008).
85. Siddiqui, N. & Pramanik, K. Effects of Micro and Nano beta-TCP Fillers in Freeze-Gelled Chitosan Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J. Appl. Polym. Sci.* **131**, 10 (2014).
86. Deplaine, H, et al. Evolution of the properties of a poly( l -lactic acid) scaffold with double porosity during *in vitro* degradation in a phosphate-buffered saline solution. *J. Appl. Polym. Sci.* **131**, n/a–n/a (2014).
87. Demirdogen, B., et al. Silica coating of the pore walls of a microporous polycaprolactone membrane to be used in bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **102**, 3229–3236 (2014).
88. Plazas Bonilla, C.E., et al. New porous polycaprolactone-silica composites for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C-Materials Biol. Appl.* **40**, 418–426 (2014).
89. Gaona, L., Gómez Ribelles, J., Perilla, J. & Lebourg, M. Hydrolytic degradation of PLLA/PCL microporous membranes prepared by freeze extraction. *Polym. Degrad. Stab.* **97**, 1621–1632 (2012).
90. Lebourg, M., et al. Porous membranes of PLLA–PCL blend for tissue engineering applications. *Eur. Polym. J.* **44**, 2207–2218 (2008).
91. Ho, M.H., et al. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. *Biomaterials* **25**, 129–138 (2004).

92. Doshi, J. & Reneker, D. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J. Electrostat.* **35**, 151 (1995).
93. Silva, C.S.R., et al. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Electrospun Scaffolds Filled with Nanoparticles. Production and Optimization According to Taguchi's Methodology. *J. Macromol. Sci. Part B-Physics* **53**, 781–799 (2014).
94. Gómez Tejedor, J.A., et al. Assessment of the parameters influencing the fiber characteristics of electrospun poly(ethyl methacrylate) membranes. *Eur. Polym. J.* **47**, 119–129 (2011).
95. Areias, A.C., et al. Assessment of parameters influencing fiber characteristics of chitosan nanofiber membrane to optimize fiber mat production. *Polym. Eng. Sci.* **52**, 1293–1300 (2012).
96. Xiang, P., et al. A novel Bruch's membrane-mimetic electrospun substrate scaffold for human retinal pigment epithelium cells. *Biomaterials* **35**, 9777–88 (2014).
97. Wang, B.Y., et al. Electrospun polylactide/poly(ethylene glycol) hybrid fibrous scaffolds for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **100A**, 441–449 (2012).
98. Zeltinger, J., et al. Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition. *Tissue Eng.* **7**, 557–572 (2001).
99. Evans, M.D.M., Taylor, S., Dalton, B. & Lohmann, D. Polymer design for corneal epithelial tissue adhesion :pore density. *J Biomed Mater Res A* **64**, 357–364 (2003).
100. Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A. & Chiellini, E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog. Polym. Sci.* **35**, 403–440 (2010).
101. Langer, R. 1994 Whitaker Lecture: polymers for drug delivery and tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng.* **23**, 101–111 (1995).
102. Langer, R. & Vancanti, J. Drug delivery and targeting. *Nature* **392**, 5–10 (1998).
103. Langer, R. Biomaterials in Drug Delivery and Tissue Engineering: One Laboratory's Experience. *Acc. Chem. Res.* **33**, 94–101 (2000).
104. Ohara, T., et al. *Acrylic Acid and Derivatives. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 1–19 (2003).
105. Sastri, V.R. *Plastics in Medicals Devices: Properties, Requirements and Applications.* 2th Edit. Publishing WA, editor. (2013).

106. He, W. & Benson, R. *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices. Handb. Polym. Appl. Med. Med. Devices* 55–76 (Elsevier, 2014).
107. Wichterle, O. & Lim, D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* **185**, 117–118 (1960).
108. Lloyd, A., Faragher, R. & Denyer, S. Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials* **22**, 769–785 (2001).
109. Patel, A. Intraocular lens implants: a scientific perspective. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. San Diego, CA: Elsevier. Chapter 7.11. (2004).
110. Schanzlin, D.J., et al. Two-year outcomes of intrastromal corneal ring segments for the correction of myopia. *Ophthalmology* **108**, 1688–94 (2001).
111. Bozukova, D., et al. Polymers in modern ophthalmic implants – historical background and recent advances. *Mater Sci Eng R* **69**, 63–83 (2010).
112. Meyers, R.A. *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference. Wiley-VCH 722* (1995).
113. Dohlman, C., Harissi-Dagher, M. & Graney, J. The Boston keratoprosthesis: a new threadless design. *Digit J Ophthalmol* **13**, 3 (2007).
114. Goma, A., Comyn, O. & Liu, C. Keratoprostheses in clinical practice - a review. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **38**, 211–24 (2010).
115. Klufas, M.A., & Colby, K. A. The boston keratoprosthesis. *Int. Ophthalmol. Clin.* **50**, 161–175 (2010).
116. Peyton, F.A. History of resins in dentistry. *Dent. Clin. North Am* **19**, 211–222 (1975).
117. Zhang, X., Zhang, B., Zhu, K. & Lin, J. Mechanical and thermal properties of denture reinforced with silanized aluminum borate whiskers. *Dent. Mater. J.* **31**, 903–908 (2012).
118. Tihan, T., Ionita, M., Popescu, R. & Iordachescu, D. Effect of hydrophilic-hydrophobic balance on biocompatibility of poly(methyl methacrylate) (PMMA)-hydroxyapatite (HA) composites. *Mater. Chem. Phys* **118**, 265–269 (2009).

119. Vallo, C.I., Montemartini, P. E. & Cuadrado, T. R. Effect of Residual Monomer Content on Some Properties of a Poly ( methyl methacrylate ) -Based Bone Cement. *J. Appl. Pol. Sci.* 1367–1383 (1998).
120. Schade, V. & Roukis, T. Role of polymethylmethacrylate antibiotic-loaded cement in addition to debridement for the treatment of soft tissue and osseous infections of the foot and ankle. *J. Foot Ankle Surg* **49**, 55–62 (2010).
121. Soria, J.M., et al. Survival and differentiation of embryonic neural explants on different biomaterials. *J Biomed Mater Res A* **79**, 495–502 (2006).
122. Martínez-Ramos C., et al. Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neurons on laminin-coated polymeric substrates. *Tissue Eng Part A* **14**, 1365–1375 (2008).
123. Chirila, T.V., et al. Artificial cornea. *Prog Polym Sci* **23**, 447–473 (1998).
124. Albon, J. Corneal transplantation and artificial cornea. *J Mech Med Biol* **3**, 95–106 (2003).
125. Duan, X. & Sheardown, H. Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: mechanical properties and corneal epithelial cell interactions. *Biomaterials* **27**, 4608–17 (2006).
126. Li, F., et al. Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Am. J. Ophthalmol.* **100**, 138–318 (2004).
127. Fregard, T.J. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye (Lond)*. **11**, 465–71 (1997).
128. DelMonte, D. W. & Kim, T. Anatomy and physiology of the cornea. *J. Cataract Refract. Surg.* **37**, 588–98 (2011).
129. Chirila, T.V. *Biomaterials and regenerative medicine in ophthalmology*. Woodhead Publishing Limited and CRC. (2010).
130. Ruberti, J., Zieske, J. & Trinkaus-randall, V. *Corneal-Tissue Replacement*. In: Lanza R, Langer R, Vacanti, editors. *Principles of tissue engineering*. 3th Edit. Elsevier. 1025–47 (2007).
131. Griffith, M., et al. Artificial human corneas: Scaffolds for transplantation and host regeneration. *Cornea* **21**, 54–61 (2002).
132. Millis, E. *Medical Contact Lens Practice*. *Med. Contact Lens Pract.* 129–135 (Elsevier, 2005).

133. Jacobs, D.S., Johns, L. & Le, H.G. *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film. Ocul. Surf. Dis. Cornea, Conjunctiva Tear Film* 283–291 (Elsevier, 2013).
134. Astin, C. Therapeutic contact lenses-an overview of some lens types. *J. Br. Contact Lens Assoc.* **14**, 129–133 (1991).
135. Jackson, A.J., Sinton, J., Frazer, D. & Morrison, E. Therapeutic contact lenses and their use in the management of anterior segment pathology. *J. Br. Contact Lens Assoc.* **19**, 11–19 (1996).
136. Gupta, H. & Aqil, M. Contact lenses in ocular therapeutics. *Drug Discov. Today* **17**, 522–7 (2012).
137. Tieppo, A., Boggs, A.C., Pourjavad, P. & Byrne, M.E. Analysis of release kinetics of ocular therapeutics from drug releasing contact lenses: Best methods and practices to advance the field. *Cont. Lens Anterior Eye* **37**, 305–13 (2014).
138. Dos Santos, J.F.R. *et al.* Soft contact lenses functionalized with pendant cyclodextrins for controlled drug delivery. *Biomaterials* **30**, 1348–55 (2009).
139. Alvarez-Lorenzo, C., Hiratani, H. & Concheiro, A. Contact lenses for drug delivery. *Am. J. Drug Deliv.* **4**, 131–151 (2006).
140. Alvarez-Lorenzo, C., Yañez, F. & Concheiro, A. Ocular drug delivery from molecularly-imprinted contact lenses. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **20**, 237–248 (2010).
141. Williams, R.L. & Kearns, V.R. *Drug-Device Combination Products. Drug-Device Comb. Prod.* 311–338 (Elsevier, 2010). doi:10.1533/9781845697488.2.311
142. Blackmore, S. The use of contact lenses in the treatment of persistent epithelial defects. *Cont. Lens Anterior Eye* **33**, 239–44 (2010).
143. Benitez-del-Castillo, J. & Lemp, M. *Ocular Surface Disorders. Ltd, JP Medical.* 285 (2012).
144. Xinming, L., *et al.* Polymeric hydrogels for novel contact lens-based ophthalmic drug delivery systems: a review. *Cont. Lens Anterior Eye* **31**, 57–64 (2008).
145. Nicolson, P.C. & Vogt, J. Soft contact lens polymers: an evolution. *Biomaterials* **22**, 3273–83 (2001).
146. Stapleton, F., *et al.* Silicone Hydrogel Contact Lenses and the Ocular Surface. *Ocul. Surf.* **4**, 24–43 (2006).

147. Romero-Rangel, T. *et al.* Gas-permeable scleral contact lens therapy in ocular surface disease. *Am. J. Ophthalmol.* **130**, 25–32 (2000).
148. Pullum, K. & Buckley, R. Therapeutic and Ocular Surface Indications for Scleral Contact Lenses. *Ocul. Surf.* **5**, 40–49 (2007).
149. Ruberti, J. & Zieske, J. Prelude to corneal tissue engineering - gaining control of collagen organization. *Prog. Retin. Eye Res.* **27**, 549–77 (2008).
150. Griffith, M., *et al.* Corneal Regenerative Medicine: Corneal Substitutes for Transplantation. *Cornea and External Eye Disease. Essentials Ophthalmol.* 37–53 (2008).
151. McLaughlin, C., Tsai, R.F., Latorre, M. & Griffith, M. Bioengineered corneas for transplantation and *in vitro* toxicology. *Front Biosci J virtual Libr* **14**, 3326–3337 (2009).
152. Duan, D., Klenkler, B. & Sheardown, H. Progress in the development of a corneal replacement: Keratoprosthesis and tissue-engineered corneas. *Expert Rev Med Devices* **3**, 59–72 (2006).
153. Liu, W., *et al.* Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. *Biomaterials* **29**, 1147–1158 (2008).
154. Liu, Y., *et al.* A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 1869–1875 (2006).
155. Merrett, M., *et al.* Tissue engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes for implantation: performance of type I versus type III collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 3887–3894 (2008).
156. Fagerholm, P. *et al.* A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study. *Sci. Transl. Med.* **2**, 46ra61 (2010).
157. Fagerholm, P., *et al.* Corneal Regeneration Following Implantation of a Biomimetic Tissue-Engineered Substitute. *Clin Transl Sci* **2**, 162–164 (2009).
158. Zhou, Y., *et al.* Development and characterization of acellular porcine corneal matrix using sodium dodecylsulfate. *Cornea* **30**, 73–82 (2011).
159. Du, Y., Chen, J., Funderburgh, J., Zhu, X. & Li, L. Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. *Mol Vis* **9**, 635–643 (2003).

160. Hayashida, Y., et al. Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 1632–1639 (2005).
161. Hichs, C.R., et al. Keratoprostheses: Advancing toward a true artificial cornea. *Surv Ophthalmol* **42**, 175–189 (1997).
162. Khan, B., Dudenhoefer, E. & Dohlman, C. Keratoprosthesis: an update. *Curr Opin Ophthalmol* **12**, 282–287 (2001).
163. Legeais, J. & Renard, G. A second generation of artificial cornea (Biokpro II). *Biomaterials* **19**, 1517–1522 (1998).
164. Hicks, C.R., et al. Development and Clinical Assessment of An Artificial Cornea. *Prog Retin Eye Res* **19**, 149–170 (2000).
165. Barnham, J. & Roper-Hal, L. Keratoprosthesis: a long-term review. *Br J Ophthalmol* **67**, 468–474 (1983).
166. Strampelli, B. Keratoprosthesis with osteodontal tissue. *Am J Ophthalmol* **89**, 1029–1039 (1963).
167. Viitala, R, et al. Towards a synthetic osteo-odonto-keratoprosthesis. *Acta Biomater.* **5**, 438–452 (2009).
168. Falcinelli , G.C., et al. Osteo odonto keratoprosthesis up to date. Acta XXV concilium ophthalmologicum 1986. Rome: Kugler & Ghedin. 2772–2776 (1987).
169. Falcinelli, G.C., Barogi, G. & Taloni, M. Osteoodontokeratoprosthesis: present experience and future prospects. *Refract Corneal Surg* **9**, 193–194 (1993).
170. Falcinelli, G.C., Barogi, G., Corazza, E. & Colliardo, P. Osteo-odonto-keratoprotesi: 20 anni di esperienze positive ed innovazioni. *Oftalmologica Italiana: Atti LXXIII Congresso Soc.* 529–532 (1993).
171. Falcinelli, G.C., et al. Personal changes and innovations in Strampelli's osteo-odonto-keratoprosthesis. *Ann Inst Barraquer* **28**, 47–48 (1999).
172. Falcinelli G.C., et al. Modified Osteoodonto- keratoprosthesis for Treatment of Corneal Blindness. Long-term Anatomical and Functional Outcomes in 181 Cases. *Arch Ophthalmol* **123**, 1319–1329 (2005).
173. Ricci, R., et al. Strampelli's osteo-odonto-keratoprosthesis. Clinical and histological long-term features of three prostheses. *Br J Ophthalmol* **76**, 232–235 (1992).

174. Teichmann, K., Al-hussain, H. & Karcioğlu, Z. Long-term complications of Strampelli's osteo-odonto-keratoprosthesis. *Aust N Z J Ophthalmol* **24**, 158–159 (1996).
175. Liu, C., et al. The osteo-odonto-keratoprosthesis. *Semin Ophthalmol* **20**, 113–128 (2005).
176. Liu, C., et al. Keratoprosthesis surgery. *Dev Ophthalmol* **41**, 171–186 (2008).
177. Cardona, H., et al. Keratoprosthesis: acrylic optical cylinder with supporting intralamellar plate. *Am J Ophthalmol* **64**, 228–233 (1964).
178. Castroviejo, R., Cardona, H. & DeVoe, A. G. The present status of prosthokeratoplasty. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **67**, 207–234 (1969).
179. Vijayasekaran, S., Robertson, T., Hicks, C., Hirst, L. Histopathology of Long-Term Cardona Keratoprosthesis: A Case Report. *Cornea* **24**, 233–237 (2005).
180. Dohlman, C. & Doane, M. Some factors influencing outcome after keratoprosthesis surgery. *Cornea* **13**, 214–218 (1994).
181. Dudenhoef, E.J., et al. Histopathology of explanted collar button keratoprostheses: A clinicopathologic correlation. *Cornea* **22**, 424–428 (2003).
182. İlhan-Sarac, O. & Akpek, E. Current concepts and techniques in keratoprosthesis. *Curr Opin Ophthalmol* **16**, 246–256 (2005).
183. Behlau, I., et al. Biocompatibility and biofilm inhibition of N,N-hexyl,methyl-polyethylenimine bonded to Boston Keratoprosthesis materials. *Biomaterials* **32**, 8783–96 (2011).
184. Dudenhoefe, E.J., et al. Histopathology of explanted collar and button keratoprostheses: a clinicopathologic correlation. *Cornea* **22**, 424–428 (2003).
185. Greiner, M., Li, J. & Mannis, M. Longer-term vision outcomes and complications with the boston type 1 keratoprosthesis at the university of California, Davis. *Ophthalmology* **118**, 1543–1550 (2011).
186. Harissi-Dagher, M. & Dohlman, C.H. The Boston Keratoprosthesis in severe ocular trauma. *Can. J. Ophthalmol.* **43**, 165–169 (2008).
187. Chew, H.F., et al. Boston Keratoprosthesis Outcomes and Complications. *Cornea* **28**, 989–996 (2009).

188. Sweeney, D.F. *et al.* Nutritional Requirements of the Corneal Epithelium and Anterior Stroma: Clinical Findings. **39**, 284–291 (1998).
189. Legeais, J.M., *et al.* A new fluorocarbon for keratoprosthesis. *Cornea* **11**, 538–545 (1992).
190. Drubaix, I., *et al.* Collagen synthesised in fluorocarbon polymer implant in the rabbit cornea. *Exp Eye Res* **62**, 367–376 (1996).
191. Legeais, J.M., *et al.* Influence of ePFTE polymer implant permeability on the rate and density of corneal extracellular matrix synthesis. *J Biomed Mater Res* **36**, 49–54 (1997).
192. Trinkaus-Randall, V., Wu, X.Y., Tablante, R. & Tsuk, A. Implantation of a synthetic cornea: design, development and biological response. *Artif. Organs* **21**, 1185–1191 (1997).
193. Trinkaus-Randall, V. & Nugent, M. Biological response to a synthetic cornea. *J Control. Release* **53**, 205–214 (1998).
194. Wu, X., Tsuk, A., Leibowitz, H. & Trinkaus-Randall, V. In vivo comparison of three different porous materials intended for use in a keratoprosthesis. *Br J Ophthalmol* **82**, 569–576 (1998).
195. Lee, J.H., *et al.* Development of a newly designed double-fixed Seoul-type keratoprosthesis. *Arch. Ophthalmol.* **118**, 1673–1678 (2000).
196. kim, M.K., *et al.* Seoul-Type Keratoprosthesis: preliminary results of the first 7 human cases. *Arch Ophthalmol* **120**, 761–766 (2002).
197. Pintucci, S., Pintucci, F., Cecconi, M. & Caiazza, S. New Dacron tissue colonisable keratoprosthesis: clinical experience. *Br. J. Ophthalmol.* **79**, 825–829 (1995).
198. Pintucci, S., Pintucci, F., Caiazza, S. & Cecconi, M. The Dacron felt colonizable keratoprosthesis: after 15 years. *Eur J Ophthalmol* **6**, 125–130 (1996).
199. Pintucci, S., Perilli, R., Formisano, G. & Caiazza, S. Influence of dacron tissue thickness on the performance of the Pintucci biointegrable keratoprosthesis: an *in vitro* and in vivo study. *Cornea* **20**, 647–650 (2001).
200. Chirila, T., Constable, I., Crawford, G. & Russo, A. Keratoprosthesis. US Patent, 5,300,116, 5. *April 1994*
201. Hicks, C.R., Werner, L., Vijayasekaran, S., Mamalis, N. & Apple, D. Histology of AlphaCor skirts: evaluation of biointegration. *Cornea* **24**, 933–940 (2005).

202. Crawford, G., Hicks, C.R., Lou, X. & Vijayasekaran, S. The Chirila Keratoprosthesis : Phase I. **6420**, 883–889 (2002).
203. Hicks, C.R.. *et al.* Development and clinical assessment of an artificial cornea. *Prog. Retin. Eye Res.* **19**, 149–170 (2000).
204. Hicks , C.R., *et al.* Clinical results of implantation of the Chirila keratoprosthesis in rabbits. *Br J Ophthalmol* **82**, 18–25 (1998).
205. Hicks, C.R., *et al.* Corneal replacement using a synthetic hydrogel cornea. *Eye* **17**, 385–392 (2003).
206. Hicks , C.R., *et al.* Deposits in artificial corneas: risk factors and prevention. *Clin Exp. Ophthalmol* **32**, 185–191 (2004).
207. Vijayasekaran, S., *et al.* ‘Calcification of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogel sponges implanted in the rabbit cornea: a 3-month study. *J Biomater Sci Polym Ed* **11**, 599–615 (2000).
208. Holak, S.A., Holak, H.M. & Bleckmann, H. AlphaCor keratoprosthesis: Postoperative development of six patients. *Graefe’s Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **247**, 535–539 (2009).
209. Caldwell, D.R. The soft keratoprosthesis. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **95**, 751–802 (1997).
210. Myung, D., *et al.* Design and fabrication of an artificial cornea based on a photolithographically patterned hydrogel construct’. *Biomed Microdevices* **9**, 911–922 (2007).
211. Myung, D., *et al.* Glucose-permeable interpenetrating polymer network hydrogels for corneal implant applications: a pilot study. *Curr Eye Res* **33**, 29–43 (2008).
212. Langefeld, S., *et al.* Aachen keratoprosthesis as temporary implant for combined vitreoretinal surgery and keratoplasty: report on 10 clinical applications. *Graefe’s Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **238**, 722–726 (2000).
213. Kompa, S., *et al.* Aachen keratoprosthesis as temporary implant. Case report on first clinical application. *Int J Artif Organs* **23**, 345–348 (2000).
214. Kompa, S., *et al.* The type II aachen-keratoprosthesis in humans: Case report of the first prolonged application. *Int J Artif Organs* **24**, 110–114 (2001).
215. Aldave, A.J., *et al.* International results with the Boston type I keratoprosthesis. *Ophthalmology* **119**, 1530–8 (2012).
216. Jirásková, N., Rozsival, P., Burova, M. & Kalfertova, M. AlphaCor artificial cornea: clinical outcome. *Eye (Lond)*. **25**, 1138–46 (2011).

217. Tan, D.H., Dart, J.K.G., Holland, E. J. & Kinoshita, S. Corneal transplantation. *Lancet* **379**, 1749–61 (2012).
218. Trinkaus-Randall, V., Banwatt, R., Capecchi, J., Leibowitz, H.M. & Franzblau, C. In vivo fibroplasia of a porous polymer in the cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **32**, 3245–3251 (1991).
219. De Miguel, M.P., et al. Cornea and ocular surface treatment. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **5**, 195–204 (2010).
220. Temenoff, J.S. & Mikos, G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* **21**, 431–40 (2000).
221. Hunziker, E. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr. Cartil.* **10**, 432–463 (2001).
222. Darling, E. & Athanasiou, K. Articular cartilage Bioreactors and bioprocesses. *Tissue Eng.* **9**, 9–26 (2003).
223. Beris, A., Lykissas, M., Papageorgiou, C. & Georgoulis, A. Advances in articular cartilage repair. *Injury* **36**, 14–23 (2005).
224. Martin, I., Miot, S., Barbero, A., Jakob, M. & Wendt, D. Osteochondral tissue engineering. *J. Biomech.* **40**, 750–65 (2007).
225. Mano, J.F. & Reis, R.L. Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **1**, 261–73 (2007).
226. Chung, C. & Burdick, J. Engineering cartilage tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 243–62 (2008).
227. Mercier, N., Costantino, H., Tracy, M. & Bonassar, L. A novel injectable approach for cartilage formation in vivo using PLG microspheres. *Ann. Biomed. Eng.* **32**, 418–29 (2004).
228. Garcia-Giralt, N., et al. A porous PCL scaffold promotes the human chondrocytes redifferentiation and hyaline-specific extracellular matrix protein synthesis. *J. Biomed. Mater. Res. A* **85**, 1082–9 (2008).
229. Schagemann, J.C., et al. Poly-epsilon-caprolactone/gel hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* **93**, 454–63 (2010).
230. Waldman, S.D., Spiteri, C.G., Gryn timer, M.D., Pilliar, R.M. & Kandel, R. a. Long-term intermittent shear deformation improves the quality of cartilaginous tissue formed *in vitro*. *J. Orthop. Res.* **21**, 590–6 (2003).

231. Park, H., et al. Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **28**, 3217–27 (2007).
232. Kim, H.J., Lee, J.H. & Im, G.I. Chondrogenesis using mesenchymal stem cells and PCL scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* **92**, 659–66 (2010).
233. Discher, D.E., Janmey, P. & Wang, Y.L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310**, 1139–43 (2005).
234. Grodzinsky, A., Levenston, M.E., Jin, M. & Frank, E. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2**, 691–713 (2002).
235. Schnabel, M., et al. Dedifferentiation associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthr. Cart.* **10**, 62–70 (2002).
236. Bonaventure, J., et al. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp. Cell Res.* **212**, 97–104 (1994).
237. Agrawal, C. & Ray, R. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* **55**, 141–50 (2001).
238. Ishaug, S., Yaszemski, M., Bizios, R. & Mikos, A. Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* **28**, 1445–1453 (1994).
239. Li, W., Danielson, K.G., Alexander, P.G. & Tuan, R.S. Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly (  $\epsilon$  -caprolactone ) scaffolds. (2003).
240. Martinez-Diaz , S., et al. In vivo evaluation of 3-dimensional polycaprolactone scaffolds for cartilage repair in rabbits. *Am J Sport. Med* **38**, 509–519 (2010).
241. Raghunath, J., Rollo, J., Sales, K.M., Butler, P.E. & Seifalian, A.M. Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **46**, 73–84 (2007).
242. Lien, S.M., Li, W.T. & Huang, T.J. Genipin-crosslinked gelatin scaffolds for articular cartilage tissue engineering with a novel crosslinking method. *Mater. Sci. Eng. C* **28**, 36–43 (2008).

243. Dai, W., et al. The influence of structural design of PLGA/collagen hybrid scaffolds in cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **31**, 2141–52 (2010).
244. Lebourg, M. *et al.* Cell-free cartilage engineering approach using hyaluronic acid-polycaprolactone scaffolds: a study in vivo. *J. Biomater. Appl.* **28**, 1304–15 (2014).
245. Gamboa, T., et al. Chondrocytes Cultured in an Adhesive Macroporous Scaffold Subjected to Stirred Flow Bioreactor Behave Like in Static Culture. *J. Biomater. Tissue Eng.* **3**, 312–319 (2013).
246. Zhao, H., et al. A polylactide/fibrin gel composite scaffold for cartilage tissue engineering: fabrication and an *in vitro* evaluation. *J Mater Sci Mater Med* **20**, 135–143 (2009).
247. Ahmed, T., Dare, E. & Hincke, M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **14**, 199–215 (2008).
248. Eyrich, D., et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* **28**, 55–65 (2007).
249. Chung, C., et al. Influence of gel properties on neocartilage formation by auricular chondrocytes photoencapsulated in hyaluronic acid networks. *J. Biomed. Mater. Res. A* **77**, 518–25 (2006).
250. Antunes, J.C., et al. Novel poly(L-lactic acid)/hyaluronic acid macroporous hybrid scaffolds: characterization and assessment of cytotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res. A* **94**, 856–69 (2010).
251. Izquierdo, R., et al. Biodegradable PCL scaffolds with an interconnected spherical pore network for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* **85**, 25–35 (2008).
252. Barry, J.J., Gidda, H.S., Scotchford, C.A. & Howdle, S.M. Porous methacrylate scaffolds: supercritical fluid fabrication and *in vitro* chondrocyte responses. *Biomaterials* **25**, 3559–68 (2004).
253. Diego, R.B., et al. Pore collapse during the fabrication process of rubber-like polymer scaffolds. *J. Appl. Polym. Sci.* **104**, 1475–1481 (2007).
254. Gómez Ribelles, J.L., et al. The role of three-dimensional scaffolds in the regeneration of joint cartilage. A. Fred J.F., H Gamboa (Ed), *Biodevices 2010. INSTICC, Port. Val. Spain* 229–234 (2010).
255. Maher, S.A., et al. Nondegradable hydrogels for the treatment of focal cartilage defects. *J. Biomed. Mater. Res. A* **83**, 145–55 (2007).

256. Puskas, J.E. *et al.* Dynamic stress relaxation of thermoplastic elastomeric biomaterials. *Polymer (Guildf)*. **50**, 245–249 (2009).
257. Puskas, J.E. *et al.* Fatigue testing of implantable specimens: Effect of sample size and branching on the dynamic fatigue properties of polyisobutylene-based biomaterials. *Polymer (Guildf)*. **50**, 591–597 (2009).
258. Götz, C., *et al.* Investigation of structure-property relationships of polyisobutylene-based biomaterials: Morphology, thermal, quasi-static tensile and long-term dynamic fatigue behavior. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **10**, 206–15 (2012).
259. Götz, C., *et al.* Influence of e-beam irradiation on the dynamic creep and fatigue properties of poly(aliphatic/aromatic-ester) copolymers for biomedical applications. *Polymer (Guildf)*. **50**, 5499–5507 (2009).
260. Shimko, D. & Nauman, E. Development and characterization of a porous poly (methyl methacrylate) scaffold with controllable modulus and permeability. *J. Biomed. Mater.* 360–369 (2007).
261. Klouda, L., *et al.* Effect of biomimetic conditions on mechanical and structural integrity of PGA/P4HB and electrospun PCL scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 1137–44 (2008).
262. Masuoka, K., *et al.* Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS scaffold). *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **75**, 177–84 (2005).
263. Wong, M.W.N., *et al.* Engineered allogeneic chondrocyte pellet for reconstruction of fibrocartilage zone at bone-tendon junction--a preliminary histological observation. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **70**, 362–7 (2004).
264. Jung, Y., *et al.* Cartilage regeneration with highly-elastic three-dimensional scaffolds prepared from biodegradable poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone). *Biomaterials* **29**, 4630–6 (2008).
265. Wang, Y., Bian, Y.Z., Wu, Q. & Chen, G.Q. Evaluation of three-dimensional scaffolds prepared from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for growth of allogeneic chondrocytes for cartilage repair in rabbits. *Biomaterials* **29**, 2858–68 (2008).
266. Kitahara, S., *et al.* In vivo maturation of scaffold-free engineered articular cartilage on hydroxyapatite. *Tissue Eng. Part A* **14**, 1905–13 (2008).
267. Langer, R., Vacanti, J. Tissue Engineering. *Science (80)*. **260**, 920–926 (1993).

268. Rabkin, E. & Schoen, F. Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovasc. Pathol.* **11**, 305–17 (2002).
269. Armstrog, S. Stem cells; A novel Therapy. *West Coast Vet. J* 20–28 (2011).
270. Friedenstein , A.J., et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp Hemato* **2**, 83–92 (1974).
271. Friedenstein, A., Gorskaja, J. & Kulagina, N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hemato* **4**, 267–274 (1976).
272. Dominici, M., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
273. Arnalich-Montiel, F., et al. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells* **26**, 570–9 (2008).
274. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 726–736 (2008).
275. Laverdet, B., et al. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. *Pathol. Biol.* **62**, 108–117 (2014).
276. Caplan, A.I. & Bruder, S. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol. Med.* **7**, 259–264 (2001).
277. Izal, I., et al. Culture of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on of poly(L-lactic acid) scaffolds: potential application for the tissue engineering of cartilage. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **21**, 1737–50 (2013).
278. Tanaka , T., et al. Bone augmentation by bone marrow mesenchymal stem cells cultured in threedimensional biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A* **91**, 428–435 (2009).
279. Michelacci, Y.M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36**, 1037–46 (2003).
280. Espandar, L., et al. Adipose-derived stem cells on hyaluronic acid-derived scaffolds: a new horizon in bioengineered cornea. *Arch Ophthalmol* **130**, 202–208 (2012).
281. Rama , P., et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med* **363**, 147–155 (2010).

282. De Ugarte, D.A., et al. Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow. *Cells Tissues Organs* **174**, 101–109 (2003).
283. Peng, L., et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* **17**, 761–73 (2008).
284. Fang, B., et al. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant. Proc.* **39**, 3358–62 (2007).
285. Puissant, B., et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Haematol.* **129**, 118–29 (2005).
286. De Miguel, M.P., et al. Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications. *Curr. Mol. Med.* **12**, 574–591 (2012).
287. Mezey, E., et al. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 1364–1369 (2003).
288. Mareschi, K., et al. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K<sup>+</sup> channel types. *Exp. Hematol.* **34**, 1563–72 (2006).
289. Chen, L., Tredget, E.E., Wu, P. & Wu, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* **3**, e1886 (2008).
290. Hu, L., et al. Effects of adipose stem cell-conditioned medium on the migration of vascular endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes. *Exp. Ther. Med.* **5**, 701–706 (2013).
291. Patel, K.M., et al. Mesenchymal stem cells attenuate hypoxic pulmonary vasoconstriction by a paracrine mechanism. *J. Surg. Res.* **143**, 281–5 (2007).
292. Van Poll, D., et al. Mesenchymal stem cell therapy for protection and repair of injured vital organ. *Cell Mol Bioeng* **1**, 42–50 (2009).
293. Walter, M.N., et al. Mesenchymal stem cell conditioned medium accelerates skin wound healing; an *in vitro* study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res* **316**, 1271–1281 (2010).
294. Minteer, D., Marra, K. & Rubin, J. Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **129**, 59–71 (2013).

295. Rada, T., Reis, R. & Gomes, M. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* **15**, 113–25 (2009).
296. Trounson, A., et al. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med.* **9**, 52 (2011).
297. Trounson, A. New perspectives in human stem cell therapeutic research. *BMC Med.* **7**, 29 (2009).
298. Mizuno, H. Adipose-derived stem and stromal cells for cell-based therapy: current status of preclinical studies and clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* **12**, 442–449 (2010).
299. Gumbiner, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345–57 (1996).
300. Schmidt, D., Waldeck, H. & Kao, W. Protein Adsorption to Biomaterials. *D.A. Puleo, R. Bizios, Ed.* 1–18 (2009).
301. McKenzie, J. & Webster, T. Protein Interactions at Material Surfaces. *R. Narayan, Ed. Springer US Boston, MA.* 215–237 (2009).
302. Chen, H., et al. Biocompatible polymer materials: Role of protein–surface interactions. *Prog. Polym. Sci.* **33**, 1059–1087 (2008).
303. García, A. Interfaces to Control Cell-Biomaterial Adhesive Interactions. *Adv. Polym. Sci.* **203**, 171–190 (2006).
304. Roach, P., Eglin, D., Rohde, K. & Perry, C. Modern biomaterials: a review - bulk properties and implications of surface modifications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **18**, 1263–77 (2007).
305. Vladkova, T. Surface Engineered Polymeric Biomaterials with Improved Biocontact Properties. *Int. J. Polym. Sci.* **2010**, 1–22 (2010).
306. Ertel, S.I., Ratner, B.D. & Horbett, T.A. Radiofrequency plasma deposition of oxygen-containing films on polystyrene and poly(ethylene terephthalate) substrates improves endothelial cell growth. *J. Biomed. Mater. Res.* **24**, 1637–59 (1990).
307. Way, T.D., et al. Preparation and characterization of branched polymers as postoperative anti-adhesion barriers. *Appl. Surf. Sci.* **256**, 3330–3336 (2010).
308. Hsieh, S.R., et al. Preparation and non-invasive in-vivo imaging of anti-adhesion barriers with fluorescent polymeric marks. *J. Fluoresc.* **19**, 733–40 (2009).

309. Lee, M.H., et al. Effect of biomaterial surface properties on fibronectin- $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin interaction and cellular attachment. *Biomaterials* **27**, 1907–16 (2006).
310. Hynes, R. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
311. García, A. Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* **26**, 7525–7529 (2005).
312. Marcos, A. Modificación de superficies de biomateriales poliméricos y estudios de biocompatibilidad. *Rev. Iberoam. Polim.* **9**, 206–210 (2008).
313. Michael, K.E. et al. Adsorption-Induced Conformational Changes in Fibronectin Due to Interactions with Well-Defined Surface Chemistries. 8033–8040 (2003).
314. Keselowsky, B.G., Collard, D.M. & García, A.J. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* **25**, 5947–54 (2004).
315. Tzoneva, R., Faucheux, N. & Groth, T. Wettability of substrata controls cell-substrate and cell-cell adhesions. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 1538–47 (2007).
316. Rico, P., et al. Substrate-induced assembly of fibronectin into networks: influence of surface chemistry and effect on osteoblast adhesion. *Tissue Eng. Part A* **15**, 3271–81 (2009).
317. Gugutkov, D., et al. Fibronectin activity on substrates with controlled -OH density. *J. Biomed. Mater. Res. A* **92**, 322–31 (2010).
318. Salmerón-Sánchez, M., et al. Role of material-driven fibronectin fibrillogenesis in cell differentiation. *Biomaterials* **32**, 2099–105 (2011).
319. Campillo-Fernández, A.J., et al. Future design of a new keratoprosthesis. Physical and biological analysis of polymeric substrates for epithelial cell growth. *Biomacromolecules* **8**, 2429–36 (2007).
320. Calvert, J.G. Glossary of atmospheric chemistry terms. *Int. Union Pure Commision Atmos. Chem. Appl. Chem. Div.* **62**, 2167–2219 (1990).
321. Chang, E. Preparation of microporous poly(VDF-co-HFP) membranes by template-leaching method. *Sep. Purif. Technol.* **72**, 156–166 (2010).

322. Li, F., et al. Recruitment of multiple cell lines by collagen-synthetic copolymer matrices in corneal regeneration. *Biomaterials* **26**, 3093–3104 (2005).
323. Dubey, G. & Mequanint, K. Conjugation of fibronectin onto three-dimensional porous scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Acta Biomater.* **7**, 1114–25 (2011).
324. Tsutsumi, S., et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 413–9 (2001).
325. Ródenas-Rochina, J., Gómez Ribelles, J.L. & Lebourg, M. Comparative study of PCL-HAp and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **24**, 1293–308 (2013).
326. Saunders, R.M., et al. Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 487–500 (2006).
327. Goldmann, WH, et al. Vinculin, talin and focal adhesions. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **17**, 1–5 (1996).
328. Mierke, C. The Role of Vinculin in the Regulation of the Mechanical Properties of Cells. *Cell Biochem Biophys* **153**, 115–126 (2009).
329. Hilbig, H., et al. Implant surface coatings with bone sialoprotein, collagen, and fibronectin and their effects on cells derived from human maxilar bone. *Eur J Med Res* **12**, 6–12 (2007).
330. Briz, N., Antolinos-Turpin, C.M., et al. Fibronectin fixation on poly(ethyl acrylate)-based copolymers. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **101**, 991–7 (2013).
331. Zuk, P.A., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**, 211–28 (2001).
332. Salmerón , M., et al. The structure of poly(ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymer networks by segmental dynamics studies based on structural relaxation experiments. *Polymer (Guildf).* **45**, 2349–2355 (2004).
333. Diani, J., Fayolle, B. & Gilormini, P. A review on the Mullins effect. *Eur. Polym. J.* **45**, 601–612 (2009).
334. Vikingsson, L., et al. An “*in vitro*” experimental model to predict the mechanical behaviour of macroporous scaffolds implanted in articular cartilage. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **32**, 125–131 (2014).

335. Pedraza, C. Morphometric and histopathological analysis of articular cartilage regeneration on tissue engineered scaffolds. Tesis Doctoral.Universitat de València (2014).
336. Song, F. & Ren, D. Stiffness of cross-linked poly(dimethylsiloxane) affects bacterial adhesion and antibiotic susceptibility of attached cells. *Langmuir* **30**, 2–6 (2014).
337. Chen, J., Wright, K.E. & Birch, M. Nanoscale viscoelastic properties and adhesion of polydimethylsiloxane for tissue engineering. *Acta Mech. Sin.* **30**, 2–6 (2014).
338. Melchels, F.P.W. *et al.* Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing. *Acta Biomater.* **6**, 4208–4217 (2010).
339. Soria, J.M., *et al.* Influence of the substrate's hydrophilicity on the *in vitro* Schwann cells viability. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **83A**, 463–470 (2007).
340. ANSI/AAMI. Cardiovascular Implants— Vascular Prosthesis. Sect. 8.8 (*Suture Retent. Strength*), VP2020–21, A.N.I.a.A.f.t.A.o.M. Instrumentation, Ed. (1994).
341. Shiose, Y. Intraocular pressure: New perspectives. *Surv. Ophthalmol.* **34**, 413–435 (1990).
342. Brunette, D.M., Hamilton, D., Chehroudi, B. & Waterfield, J. Update on improving the bio-implant interface by controlling cell behaviour using surface topography. *Int. Congr. Ser.* **1284**, 229–238 (2005).
343. Flory, P. & Rehner, J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. *J. Chem. Phys.* **11**, 521 (1943).
344. Kim, J.H., *et al.* Properties and swelling characteristics of cross-linked poly (vinyl alcohol)/chitosan blend membrane. *J. Appl. Polym. Sci.* **45**, 1711–1717 (1992).
345. Zellander, A., *et al.* Engineering copolymeric artificial cornea with salt porogen. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* (2013).
346. Karageorgiou, V. & Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**, 5474–91 (2005).
347. Hicks, C.R., *et al.* Keratoprosthesis: preliminary results of an artificial corneal button as a full-thickness implant in the rabbit model. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* **24**, 297–303 (1996).
348. Diego, R.B., *et al.* Acrylic scaffolds with interconnected spherical pores and controlled hydrophilicity for tissue engineering. *J. Mater. Sci.* **40**, 4881–4887 (2005).

349. Yannas, I.V. Tissue regeneration by Use of Glycosaminoglycan Copolymer. *Cilin Mater* **9**, 179–187 (1992).
350. Yannas, I. & Lee, E. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc. ...* **86**, 933–937 (1989).
351. O'Brien, F.J., et al. The effect of pore size on cell adhesion in collagen- GAG scaffolds. *Biomaterials* **26**, 433–431 (2005).
352. Murphy, C.M., Haugh, M.G. & O'Brien, F.J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **31**, 461–6 (2010).
353. Cutler, S. Engineering cell adhesive surfaces that direct integrin  $\alpha 5\beta 1$  binding using a recombinant fragment of fibronectin. *Biomaterials* **24**, 1759–1770 (2003).
354. McCrum, N., Read, B. & Williams, G. Anelastic and Dielectric Effects in Polymeric Solids. New York: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. (1967).
355. Lan, M.A., et al. Myoblast proliferation and differentiation on fibronectin-coated self assembled monolayers presenting different surface chemistries. *Biomaterials* **26**, 4523–31 (2005).
356. Li, Y., et al. Functionalized Polylactide Film Surfaces via Surface-Initiated ATRP. *Macromolecules* **44**, 2371–2377 (2011).
357. Von Fischern, T., et al. The Aachen keratoprosthesis A new approach towards successful keratoprosthesis-surgery. *Int. J. Artif. Organs* **22**, 52–57 (1999).
358. Gallego, G., et al. Nanodomains in a hydrophilic–hydrophobic IPN based on poly(2-hydroxyethyl acrylate) and poly(ethyl acrylate). *Eur. Polym. J.* **43**, 3136–3145 (2007).
359. Jayasuriya, A.C. et al. A study of piezoelectric and mechanical anisotropies of the human cornea. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 381–387 (2003).
360. Lynch, A. & Ahearne, M. Strategies for developing decellularized corneal scaffolds. *Exp. Eye Res.* **108**, 42–7 (2013).
361. Martínez-Conesa, E., Espel, E., Reina, M. & Casaroli-Marano, R. Characterization of ocular surface epithelial and progenitor cell markers in human adipose stromal cells derived from lipoaspirates. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 513–20 (2012).

