



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIEROS  
INDUSTRIALES VALENCIA

Curso Académico:



# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis tutores, Ana Vallés y Guillermo Vilariño por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de final de grado y por su ayuda incondicional a lo largo de estos meses. *Ana, gràcies per haver-me descobert el món dels biomaterials, i per contagiar-me la teua alegria i optimisme. Per totes eixes xarrades que hem compartit. Guillermo, gràcies per la paciència que has tengut amb mi, i per ensenyar-me com d'apassionant és la ciència. Per eixes classes de valencià tècnic.*

Agradecer también a todo el personal del Centro de Biomateriales y Ingeniería Tisular (CBIT) por vuestra amabilidad, y por haberme echado una mano siempre que lo he necesitado. Ha sido un placer trabajar con todos vosotros. A mis compañeros del "zulo", especialmente a Sofía y a Laura, gracias por amenizar las horas y horas que hemos pasado juntas. *Many thanks also to my irish colleagues, Nathan Devaney and Ailish Gillespie, because without your help this work couldn't have been possible.*

A mis chicas, Clara, Fuen, Sandra, Paula y Belén: gracias por haber compartido conmigo estos 4 largos y duros años de Ingeniería Biomédica, por todos los momentos que hemos pasado juntas y por haber estado en las duras y en las maduras. Sois, sin duda, lo más bonito que me llevo de esta etapa.

Como no, a mis amigas de Carlet, gracias por haber creído siempre en mí, por vuestro apoyo y cariño en este camino, y siempre.

Por último, y no por ello menos importante, GRACIAS a mi familia, porque sin ellos todo esto no hubiera sido posible. A mis padres, gracias por no haber permitido nunca que me rindiera. A mi hermana Mireia, por estar siempre, sin peros ni condiciones. Por todo lo que habéis aguantado mis lágrimas, y celebrado conmigo mis alegrías. Una y mil veces gracias.

Porque el final de una etapa es siempre el comienzo de otra, y como dijo Séneca, *"Todo concluye, pero nada perece"*.

Valencia, Julio 2017.



## RESUMEN

El poliglicerol sebacato (PGS) es un polímero sintético que se obtiene a partir de una reacción de policondensación, partiendo de ácido sebácico y glicerol. Se trata de un polímero biodegradable por erosión superficial, lo que permite un mantenimiento de su integridad y resistencia mecánica durante el proceso de degradación. Su comportamiento mecánico es no lineal, un comportamiento típico de materiales elastoméricos. Por todas estas características, y porque su fabricación en dos etapas ofrece un abanico de posibilidades en cuanto a su microarquitectura y combinación con otros materiales, poliméricos o no, el PGS está siendo objeto de estudio para diversas aplicaciones biomédicas.

En este trabajo se ha establecido un procedimiento para la fabricación de un andamiaje tridimensional con porosidad estratificada, a partir de poliglicerol sebacato. El diseño de este andamiaje se ha inspirado en la arquitectura tisular de los túbulos renales, encargados de la filtración de la sangre para obtener la orina. Así, el andamiaje diseñado cuenta con una capa interna con poros de tamaño superior, capaz de albergar células en sus poros, y dos capas externas cuyo tamaño de poro es subcelular, actuando así de barrera física y evitando el tránsito de somas celulares. Para su fabricación, se ha utilizado en ambas capas cloruro sódico (NaCl) como porógeno. En el caso de la zona central, el tamaño de las partículas de NaCl empleadas ha sido de 210-250  $\mu\text{m}$ , y una proporción PGS/NaCl de 1/9 en masa. En el caso de las capas externas, por primera vez se ha utilizado como porógeno lo que se ha denominado *nanosal*, NaCl cuyo tamaño de partículas es, en promedio, de unos 17  $\mu\text{m}$ .

A continuación, se han analizado sus propiedades morfológicas, mecánicas y biológicas mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), ensayos mecánicos a compresión y cultivos celulares tanto en la zona externa del andamiaje como en la zona central. Esta caracterización ha permitido evaluar el cumplimiento de las características exigidas para el andamiaje compuesto, pudiendo servir éste como soporte para un cocultivo celular indirecto, tanto para usarlo como modelo *in vitro* de patologías renales como otras, como testar fármacos o moléculas de interés.

**Palabras clave:** poliglicerol sebacato, ingeniería tisular, tejido renal, porosidad estratificada



# RESUM

El poliglicerol sebacat (PGS) és un polímer sintètic que s'obté a partir d'una reacció de policondensació, partint d'àcid sebàcic i glicerol. Es tracta d'un polímer biodegradable per erosió superficial, la qual cosa permet un manteniment de la seua integritat i resistència mecànica durant el procés de degradació. El seu comportament mecànic es no lineal, un comportament típic de materials elastomèrics. Per totes aquestes característiques, i perquè la seua fabricació en dos etpes ofereix un ventall de possibilitats en quant a la seua microarquitectura i combinació amb altres materials, polimèrics o no, el PGS està sent objecte d'estudi per a diverses aplicacions biomèdiques.

En aquest treball s'ha establert un procediment per a la fabricació d'una bastida tridimensional amb porositat estratificada, a partir de poliglicerol sebacat. El disseny d'aquesta bastida s'ha inspirat en l'arquitectura tisular dels túbuls renals, encarregats de la filtració de la sang per a obtindre l'orina. Així, la bastida dissenyada compta amb una capa interna amb porus de tamany superior, capaç d'albergar cèl·lules en els seus porus, i dos capes externes amb tamany de porus subcel·lular, actuant així de barrera física i evitant el trànsit de somes cel·lulars. Per a la seua fabricació, s'ha utilitzat en ambdues capes clorur sòdic (NaCl) com porògen. En el cas de la zona central, el tamany de les partícules de NaCl empleades ha segut de 210-250  $\mu\text{m}$ , i una proporció PGS/NaCl de 1/9 en masa. En el cas de les capes externes, per primera vegada s'ha utilitzat com a porògen el que s'ha denominat *nanosal*, NaCl que té un tamany de partícules, de mitjana, de uns 17  $\mu\text{m}$ .

A continuació, s'han analitzat les seues propietats morfològiques, mecàniques i biològiques mitjançant microscopia electrònica de rastreig d'emissió de camp (FESEM), assaigs mecànics a compressió i cultius cel·lulars tant en la zona externa de la bastida com en la zona central. Aquesta caracterització ha permès evaluar el compliment de les característiques exigides per a la bastida composta, podent servir aquesta com a suport per a un cultiu cel·lular indirecte, tant per a utilitzar-lo com model *in vitro* de patologies renals com altres, com provar fàrmacs o molècules d'interés.

**Paraules clau:** poliglicerol sebacat, enginyeria tissular, teixit renal, porositat estratificada



## **ABSTRACT**

Polyglycerol sebacate (PGS) is a synthetic polymer that is obtained from a polycondensation reaction, starting from sebacic acid and glycerol. It is a biodegradable polymer by surface erosion, which allows a maintenance of its integrity and mechanical resistance during this degradation. Its mechanical behavior is non-linear, a typical behavior of elastomeric materials. For all these characteristics, and because its two-steps manufacturing offers a variety of possibilities in terms of its micro-architecture and combination with other materials, polymeric or not, PGS is being studied for various biomedical applications.

In this work a procedure has been established for the manufacture of a three-dimensional scaffold with stratified porosity, based on polyglycerol sebacate. The design of this scaffold has been inspired on the tissue architecture of the renal tubules, responsible for the filtration of the blood to obtain the urine. Thus, the designed scaffolding has an internal layer with pores of superior size, capable of harbor cells in its pores, and two external layers whose pore size is subcellular, acting as a physical barrier and avoiding the transit of cellular sums. For its manufacture, sodium chloride (NaCl) has been used in both layers as porogen. In the case of the central zone, the size of the NaCl particles used was 210-250  $\mu\text{m}$ , and a PGS / NaCl ratio of 1/9 in mass. In the case of the outer layers, for the first time it has been used as porogen what has been called *nanosal*, NaCl whose particle size is, on average, about 17  $\mu\text{m}$ .

In addition, their morphological, mechanical and biological properties have been analyzed by field emission scanning electron microscopy (FESEM), mechanical compression tests and cell cultures both in the outer zone of the scaffold and in the central zone. This characterization has allowed to evaluate the fulfillment of the characteristics required for the composite scaffold, being able to serve as support for an indirect cellular co-culture, both for use as an in vitro model of renal pathologies and others, such as testing drugs or molecules of interest.

**Key words:** polyglycerol sebacate, tissue engineering, renal tissue, stratified porosity

# GLOSARIO

PGS	Poliglicerol sebacato
FESEM	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo <i>(Field Emssion Scanning Electron Microscopy)</i>
PCL	Policaprolactona
PEA	Poliacrilato de etilo
RPCs	Células progenitoras de la retina
SEM	Microscopio electrónico de barrido
DPI	Diseño y producción industrial
pre-PGS	Prepolímero de poliglicerol sebacato
CBIT	Centro de biomateriales e ingeniería tisular, UPV
THF	Tetrahidrofurano
DMF	Dimetilformamida
PHEA	Polihidroxietil acrilato
TMA	Análisis termomecánico <i>(Thermomechanical Analysis)</i>
DMEM	Medio de águila modificado por Dulbecco <i>(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)</i>
FBS	Suero Fetal Bovino <i>(Fetal Bovine Serum)</i>
DPBS	Tampón fosfato salino de Dulbecco <i>(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)</i>
O.C.T. Compound	Compuesto para corte de tejidos congelados <i>(Embedding medium for frozen tissue specimens to ensure Optimal Cutting Temperature)</i>



## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Esquemas de la arquitectura del tejido tubular renal. Izquierda) Esquema del sistema orgánico de filtración. Derecha) Estrategia de diseño del dispositivo en base a la arquitectura del tejido.....	23
<b>Figura 2</b> - Esquema conceptual del dispositivo.....	24
<b>Figura 3</b> - Proceso de síntesis del PGS, de acuerdo a los autores originales. (Rai, Tallawi, Grigore & Boccaccini, 2012).....	25
<b>Figura 4</b> - Distintas aplicaciones del PGS (a,b) Scaffolds tridimensionales de PGS en forma de panel de abeja, imágenes extraídas de Engelmayer et al. (2008); (a) imagen SEM de los scaffolds bilaminares con poros totalmente conectados, (b) sección transversal del scaffold bilaminar con células neonatales de corazón de rata teñidas con hematoxilina y eosina. (c,d) Imágenes SEM de la topología de los scaffolds con poros pasantes, extraídas de Redenti et al. (2009); (c) vista superior del scaffold de PGS con poros de 50 mm espaciados 175 mm uno del otro, (d) vista lateral del scaffold de PGS que muestra la forma de cono del poro formado en la superficie superior. (e,f) Fotos que muestran la pérdida de masa de las obleas de PGS durante la degradación in vitro, extraídas de Sun et al. (2009); (e) oblea el primer día, (f) oblea a los 30 días.....	27
<b>Figura 5</b> – Montaje experimental para la prepolimerización del PGS.....	30
<b>Figura 6</b> – Izquierda) Molde de teflón empleado para la síntesis de films. Derecha) Aspecto de un film, finalizada la etapa de curado. ....	31
<b>Figura 7</b> - Izquierda) Molde de teflón con agujeros pasantes empleado para la fabricación de scaffolds- Derecha) Montaje del molde con varillas y placa metálica para controlar la presión ejercida en la sinterización del porógeno. ....	34
<b>Figura 8</b> - Izquierda) Scaffold tras la etapa de curado. Derecha) Scaffold tras las etapas de lavado y secado.....	35
<b>Figura 9</b> - Montaje realizado para la polimerización del hidrogel de PHEA empleado después como soporte para el curado del PGS y despegado sencillo. ....	39
<b>Figura 10</b> - Molino Ultracentrífugo. Izquierda) Aspecto equipo. Derecha) Detalle del interior del molino.....	42
<b>Figura 11</b> - Imagen de microscopio óptico de las primeras membranas microporosas. Magnificación 20x, barra de escala 50 micras.....	43
<b>Figura 12</b> - Fibroblastos L929 en confluencia vistos al microscopio óptico antes de su siembra en los materiales preparados. Barra de escala: 100 µm.....	48
<b>Figura 13</b> - Inyección de los fibroblastos L929 en el interior del scaffold. ....	50

<b>Figura 14</b> - Imágenes FESEM de la superficie de las membranas obtenidas con un 20 y 40% de nanosal como porógeno, variando el tiempo de inmersión en agua y el secado tras el curado. La barra de escala, en la primera imagen, es la misma para las demás.....	54
<b>Figura 15</b> - Imágenes de la nanosal. (a) Imagen macroscópica del aspecto de la nanosal. (b) Imagen FESEM de la nanosal a 200 aumentos. Barra de escala: 20 micras. ....	55
<b>Figura 16</b> - Análisis del tamaño de las partículas de nanosal con ImageJ. (a) Zona de la imagen seleccionada para realizar la medición. (b) Resultados de la medición .....	55
<b>Figura 17</b> - Imágenes FESEM del scaffold estratificado a 200 aumentos. (a) Detalle de la membrana microporosa. (b) Corte transversal en el que se observa a la izquierda de la línea punteada la membrana microporosa y a la derecha la zona central del scaffold estratificado. (c) Detalle de la zona central. Barra de escala: 20 micras. ....	56
<b>Figura 18</b> - Análisis del tamaño de los poros con ImageJ. Región de la imagen de la membrana microporosa (a) o la zona central (c) seleccionadas para realizar la medición. Resultados de las mediciones de los poros de la membrana microporosa (b) y la zona central (d). ....	57
<b>Figura 19</b> - Corte del scaffold estratificado teñido con la tinción GIEMSA. ....	58
<b>Figura 20</b> - Curvas tensión-deformación unitaria para scaffolds y films.....	59
<b>Figura 21</b> - Tramo lineal en el que se ha calculado el módulo de Young para los scaffolds a tensiones bajas (entre 0 y 5 KPa). ....	60
<b>Figura 22</b> - Tramo lineal en el que se ha calculado el módulo de Young para los scaffolds a tensiones altas (entre 100 y 150 KPa). ....	60
<b>Figura 23</b> - Tramo lineal en el que se ha calculado el módulo de Young para los films (entre 100 y 150 KPa).....	61
<b>Figura 24</b> - Imágenes de microscopio óptico de los scaffolds estratificados con la tinción Coomasie. (a, b y c) Cultivo celular en zona externa; (a y b) Magnificación 10x,(c) Magnificación 20x. (d, e y f) Cultivo celular en la zona intersticial; (d y f) Magnificación 20x, (f) Magnificación 20x.....	63

## Índice de tablas

**Tabla 1** - Resumen de las pruebas realizadas para obtener membranas microporosas.....44

**Tabla 2** - Valor promedio del módulo de Young y del coeficiente de determinación para todas las muestras ensayadas. ....61



# ÍNDICE

<b>DOCUMENTO I: MEMORIA.....</b>	<b>19</b>
<b>1. OBJETIVOS DEL TRABAJO .....</b>	<b>20</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>21</b>
2.1 Biomateriales poliméricos .....	21
2.2 Problemática .....	22
2.3 Poliglicerol Sebacato (PGS).....	24
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 Síntesis de poliglicerol sebacato (PGS) en condiciones estándar .....	28
3.1.1 Etapa de prepolimerización .....	28
3.2 Preparación de films de poliglicerol sebacato (PGS).....	30
3.2.1 Etapa de curado.....	31
3.2.2 Lavado de los films de PGS .....	32
3.2.3 Secado de los films de PGS.....	33
3.3 Preparación de <i>scaffolds</i> de PGS .....	33
3.3.1 Preparación de la plantilla porogénica .....	33
3.3.2 Curado del PGS en la plantilla porogénica .....	35
3.3.3 Lavado de los <i>scaffolds</i> de PGS .....	36
3.3.4 Secado de los <i>scaffolds</i> de PGS.....	36
3.4 Obtención de membranas microporosas.....	36
3.4.1 Ensayos preliminares para obtener membranas microporosas empleando disolventes como porógeno .....	37
3.4.2 Ensayos preliminares para obtener membranas microporosas empleando sólidos como porógeno .....	41
3.5 Fabricación del <i>scaffold</i> estratificado .....	45
3.5.1 Lavado de los <i>scaffolds</i> estratificados .....	45
3.5.2 Secado de los <i>scaffolds</i> estratificados.....	46
3.6 Caracterización de los <i>scaffolds</i> estratificados .....	46
3.6.1 Caracterización morfológica - Observación de la morfoloía porosa mediante FESEM .....	46
3.6.2 Caracterización mecánica - Ensayo a compresión .....	47
3.6.3 Caracterización biológica - Cultivo celular .....	47
3.6.3.1 Descongelación y expansión de fibroblastos .....	48
3.6.2.3 Sanitización de los materiales y siembra de fibroblastos.....	48
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
4.1 Caracterización morfológica.....	52
4.2 Comportamiento mecánico a compresión.....	59
4.3 Cultivo celular .....	62

<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>65</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>66</b>
<b>DOCUMENTO II: PRESUPUESTO .....</b>	<b>69</b>
<b>1. OBJETIVO Y ESTRUCTURA .....</b>	<b>70</b>
<b>2. PRESUPUESTO DESGLOSADO.....</b>	<b>71</b>
Capítulo 1: Síntesis de materiales.....	71
Capítulo 2: Caracterización de materiales .....	74
Capítulo 3: Material de protección individual.....	76
Capítulo 4: Personal.....	76
<b>3. PRESUPUESTO TOTAL DEL PROYECTO .....</b>	<b>77</b>
<b>4. PRESUPUESTO UNITARIO .....</b>	<b>79</b>



# **DOCUMENTO I: MEMORIA**

## 1. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El principal objetivo del presente trabajo de fin de grado (TFG) es establecer un procedimiento para la obtención de andamiajes microporosos (*scaffolds* en adelante, por su nombre en inglés) de poliglicerol sebacato (PGS) de porosidad estratificada, con poros capaces de albergar células en un entorno tridimensional en la zona central, y poros de tamaño subcelular en las dos caras externas. Así, se espera que puedan servir como soportes de cocultivo indirecto, en los que las células puedan comunicarse entre sí sin estar en contacto directo.

Otro de los objetivos de este trabajo es la caracterización de los *scaffolds* obtenidos tanto morfológica y mecánica como biológica. Para ello, la metodología que se va a seguir es, en primer lugar, preparar films no porosos de PGS que servirán como control, en segundo lugar fabricar los *scaffolds* correspondientes a la zona central con una porosidad de tamaño mayor y a continuación fabricar las membranas de porosidad subcelular de las capas externas. Una vez esté establecido un procedimiento para fabricar ambas zonas por separado, se estudiará cómo poder combinar *scaffold* y membranas para conseguir el *scaffold* con porosidad estratificada deseado. Los films no porosos se emplearán como referencia en los distintos ensayos.

Con tal de evaluar las características de dicho *scaffold*, se estudiarán sus propiedades morfológicas empleando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM), sus propiedades mecánicas mediante ensayos a compresión -puesto que se pretende que estos *scaffolds* formen parte de un dispositivo microfluídico de cocultivo celular en el que se simule el fallo renal, en el que estará sometido a fuerzas de compresión-, y finalmente se realizará un cultivo celular, con una siembra tanto en el interior de la zona central como en el exterior del dispositivo, para así comprobar que no hay migración de células de una estructura a la otra. Con ello se comprobará que los materiales se pueden emplear como soportes para el cocultivo celular, donde las células se comunican de manera indirecta, pero sin entrar en contacto. Como se trata de una prueba de concepto para confirmar que no existe tal migración, se utilizarán fibroblastos de ratón de línea comercial, que son células muy proliferativas y fáciles de cultivar, utilizadas habitualmente en cultivos exploratorios.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Biomateriales poliméricos

Un biomaterial se define como cualquier material diseñado para interactuar con sistemas biológicos. Existen distintas familias de biomateriales, como son: metales, cerámicas, polímeros, composites, biológicos... Las funciones para las que están diseñados suelen ser reparar, sustituir o regenerar un tejido biológico, aunque pueden cumplir también otras funciones como, por ejemplo, liberación controlada de fármacos.

Los biomateriales poliméricos son biomateriales de naturaleza mayoritariamente polimérica, es decir, pueden estar fabricados de un solo polímero, mezclas de polímeros, copolímeros, y pueden también ser composites o nanocomposites, donde aparecen componentes minoritarios de naturaleza cerámica o metálica. Los requisitos que deben cumplir varían en función de la finalidad para la que se vayan a utilizar, ya que, por ejemplo, una prótesis de cadera debe tener unas características muy distintas al componente diseñado para la reconstrucción de un diente, aunque ambas cumplirán una función de tejido óseo. Aunque dichas características deben estudiarse en profundidad para cada aplicación, sí se encuentran unos requisitos mínimos comunes que todos los biomateriales deben cumplir: ser procesables, esterilizables, no tóxicos, biocompatibles, y tener una durabilidad adaptada a su función.

En concreto, los biomateriales poliméricos representan la mayor clase de materiales utilizados en medicina. Esto ocurre porque ofrecen un amplio abanico de propiedades que los hacen útiles para una gran variedad de aplicaciones médicas, como por ejemplo el uso de hidrogeles de silicona para fabricar lentillas o el polietileno para la fabricación del cotilo en prótesis de cadera. La ventaja que ofrecen los biomateriales poliméricos frente a otros biomateriales como los metales o las cerámicas, es que muchos de ellos fueron diseñados y desarrollados específicamente para uso médico, como por ejemplo las siliconas de grado médico o los vidrios bioactivos. (Ratner, Hoffman, Schoen & Lemons, 2014)

En cuanto a las familias de biomateriales poliméricos, se puede diferenciar entre los polímeros biodegradables y los no biodegradables. Cabe destacar que, dependiendo de su origen, pueden también ser clasificados como naturales o sintéticos. La ventaja de los naturales es que posiblemente mejoran las interacciones célula-material, cuando se disponen en contacto con el organismo, aunque como inconveniente presentan la posibilidad de provocar reacciones inmunes. En cuanto a los sintéticos, su ventaja es que se pueden producir con

propiedades muy distintas variando los componentes o los procesos para sintetizarlos (Rai, Tallawi, Grigore & Boccaccini, 2012). A continuación se clasifican algunos de los polímeros más comunes, atendiendo a las características que se acaban de comentar (Young & Lovell, 2011 y Areizaga, Cortázar, Elorza & Iruin, 2002)

- Polímeros biodegradables sintéticos: poliésteres tales como ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), poliglicerol sebacato (PGS), policaprolactona (PCL), polidioxanona (PDS); polianhídridos, poliaminoácidos ...
- Polímeros biodegradables naturales: colágeno, fibrinógeno, gibrina, gelatina, celulosa, alginato, ácido hialurónico, quitosano...
- Polímeros no biodegradables: polietileno (PE), polipropileno(PP), poliestireno(PS), policloruro de vinilo (PVC), politetrafluoruroetileno (PTFE, Teflón)...

En este trabajo se propone emplear el poliglicerol sebacato (PGS) para resolver la problemática que se presenta a continuación. Más adelante se exponen las características generales de este polímero que han llevado a seleccionarlo entre otros.

## 2.2 Problemática

La idea de este trabajo es la obtención de un *scaffold* de PGS con porosidad estratificada, estando enmarcado en el proyecto "Desarrollo de un sistema basado en microtecnología que integra cocultivos celulares organizados, andamiaje específico y microsensores: hacia un modelo in-vitro de riñón" (DPI 2015-65401-C3-2-R), financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad. En él se pretende obtener un dispositivo microfluídico específico para lograr la arquitectura y funcionalidades que reproduzcan tejido tubular renal, que es el encargado de realizar la filtración de la sangre para eliminar los desechos que forman la orina. Este dispositivo debe contar con *scaffolds* celulares capaces de reproducir los substratos para que los diferentes tipos celulares que se anclan en los sistemas *in vivo*, puedan crecer y proliferar.

Para lograr dicha arquitectura, se intenta reproducir exactamente la existente en el tejido tubular renal, ilustrada en la figura 1. La figura 1, izquierda, muestra un esquema del sistema orgánico de filtración, estando a la izquierda el endotelio de un vaso sanguíneo (en color rosa), en la parte central la membrana basal (en color azul) y a la derecha el epitelio del túbulo que transporta la orina (en color amarillo). La figura 1, derecha, es la estrategia de diseño del dispositivo, en el que se observan las membranas porosas de tamaño subcelular en las capas externas, y la zona central intersticial, donde se encuentran las células, que se reproducirá con un *scaffold* con poros de tamaño celular que sea capaz de albergar a las células y proporcionarles un entorno favorable para su crecimiento y proliferación.

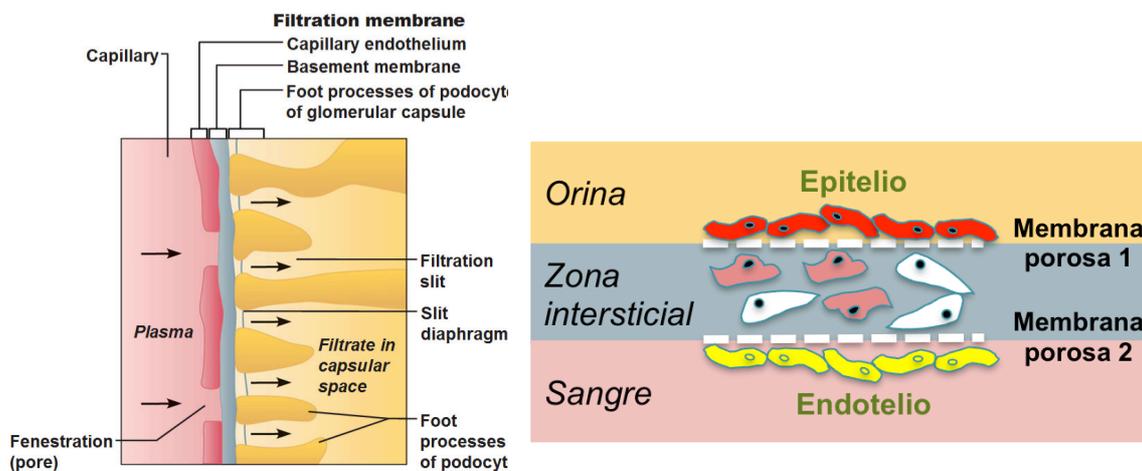


Figura 1 - Esquemas de la arquitectura del tejido tubular renal. Izquierda) Esquema del sistema orgánico de filtración. Derecha) Estrategia de diseño del dispositivo en base a la arquitectura del tejido.

Sin embargo, cabe destacar que el *scaffold* con porosidad estratificada fabricado en este trabajo, también podría servir para cualquier cocultivo indirecto más allá del alcance de este proyecto.

En este trabajo se ha optado por un diseño tricapa, tal y como se ilustra en la figura 2, en el que las capas externas serán más finas, con poros pasantes de tamaño subcelular que albergarán las células, y donde la capa central, de mayor grosor, tendrá una estructura con poros interconectados de diámetro mayor, que permitirá el intercambio de fluidos.

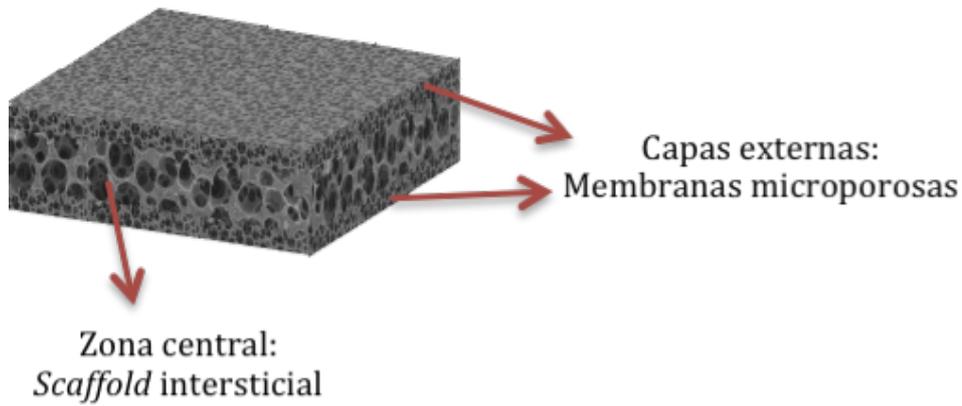


Figura 2 - Esquema conceptual del dispositivo

Esta estructura deberá ir, fuera ya del marco de este TFG, sellada a lo largo de su contorno para ser ensamblada en un dispositivo microfluídico de cultivo celular, que simulará, en el proyecto en que se enmarca este TFG, el intercambio sangre-orina en el tejido renal.

Por todo ello, en primer lugar el material que se escoja debe cumplir los requisitos generales de cualquier biomaterial polimérico, que se han comentado en el punto anterior. Además, para esta aplicación concreta, deberá conseguirse un biomaterial que:

- permita obtener un diámetro de poro pequeño en las distintas capas,
- soporte una temperatura elevada para el sellado de su contorno (100°C aproximadamente),
- no se degrade demasiado rápido (estable como mínimo durante el tiempo de cultivo),
- sea químicamente estable en condiciones fisiológicas, y
- no sufra un excesivo hinchado en medio acuoso, ya que podría alterar la estructura porosa.

### 2.3 Poliglicerol Sebacato (PGS)

En cuanto a la elección del polímero del que se fabricaría el andamiaje o *scaffold*, se consideraron varios que cumplieran varias o todas las características mencionadas en el apartado anterior. Entre los polímeros considerados se encontraban, además del PGS, la policaprolactona (PCL) y el poliacrilato de etilo (PEA).

En cuanto a la PCL, se trata de un polímero hidrófobo de la familia de los poliésteres, semicristalino. A la temperatura corporal, se encuentra por encima de su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), no es una red macromolecular, y además existen zonas cristalinas que evitan que las cadenas que lo forman tengan cierta movilidad.

El PEA, en cambio, se polimeriza habitualmente en forma de red, es elastomérico y amorfo como el PGS, con la desventaja de que no se degrada, puesto que al no poseer grupos éster no se hidroliza. Además, la polimerización es radicalaria, formada por un único monómero, pero necesitando de un entrecruzador para poder formar el retículo. En cambio, la polimerización del PGS es por condensación, siendo dos monómeros distintos con grupos funcionales que reaccionan entre sí. Como uno de estos monómeros (glicerol) es trifuncional, la polimerización no necesita de un entrecruzador para formar una red. Además, el hecho de que tenga dos grupos funcionales iguales y uno distinto, hace que esta polimerización pueda realizarse en dos etapas, lo que ofrece una gran ventaja en cuanto a su manipulación.

Por ello, se decidió usar el PGS por reunir todas las características mencionadas anteriormente, además de presentar ventajas tanto frente otras alternativas como las ya mencionadas.

Se trata este de un polímero sintético, cuya obtención se describió por primera vez en el año 2002, que se obtiene a partir del glicerol y del ácido sebácico, en una reacción de policondensación, tal y como se muestra en la figura 3:

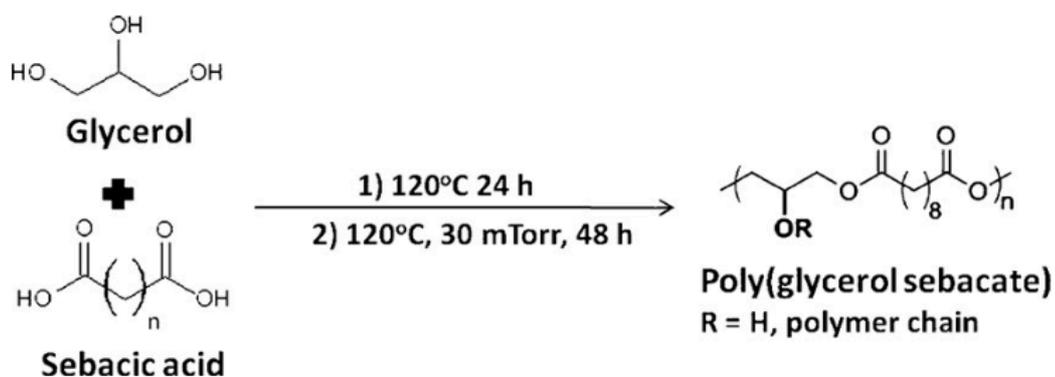


Figura 3 - Proceso de síntesis del PGS, de acuerdo a los autores originales. (Rai, Tallawi, Grigore & Boccaccini, 2012)

El glicerol es un alcohol incoloro e inoloro; y el ácido sebácico se obtiene como un intermediario natural en la  $\omega$ -oxidación de ácidos grasos de cadena larga. Ambos son no tóxicos y han sido aprobados por la FDA para aplicaciones médicas. (Loh, Abdul Karim & Owh, 2015). Por ello, el PGS se predice biodegradable tanto *in vitro* como *in vivo*. (Wang, Ameer, Sheppard & Langer, 2002)

En cuanto a la degradación, se trata de una degradación vía erosión superficial, en la que el PGS tiene una pérdida de masa lineal y mantenimiento de la resistencia mecánica (Loh *et al.*, 2015). Además, los productos de esta degradación son metabolizables por el cuerpo humano.

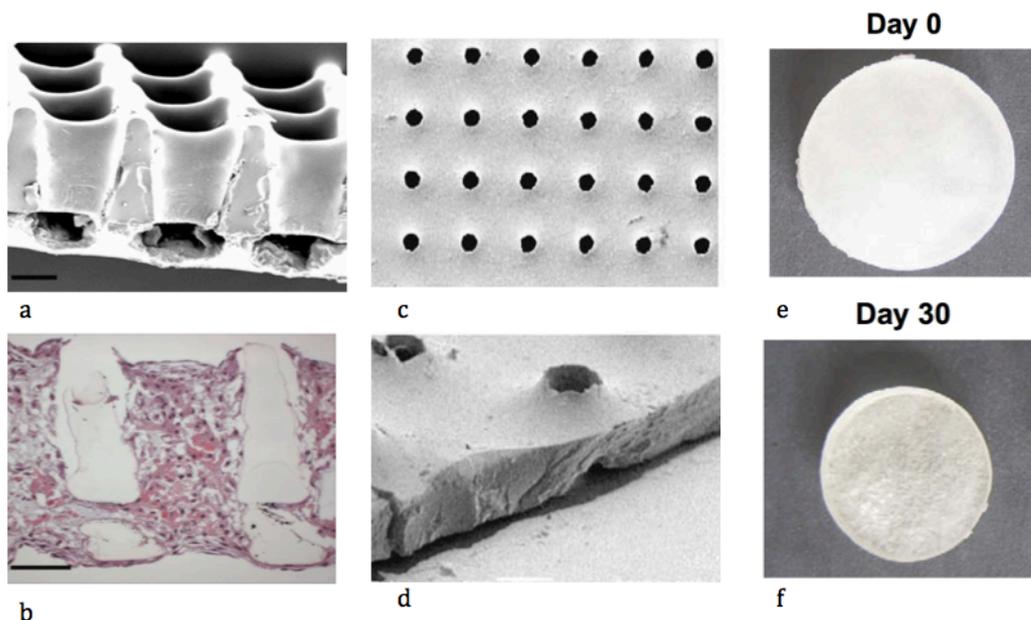
En lo referente a las propiedades mecánicas, el PGS tiene un comportamiento no lineal de tensión-deformación, típico de materiales elastoméricos. Sin embargo, estas propiedades pueden modificarse si se varían parámetros del proceso de síntesis, tales como la temperatura de curado, el tiempo de curado y la relación molar glicerol-ácido sebácico (Rai, Tallawi, Grigore & Boccaccini, 2012). Además, el PGS puede sufrir deformaciones reversibles, con una recuperación casi completa.

Actualmente, el PGS está siendo objeto de investigación en distintos campos de aplicación médica:

- Para **aplicaciones cardíacas**, se está investigando la terapia celular como estrategia de tratamiento en los casos de insuficiencia cardíaca desencadenada por un infarto de miocardio. Esta terapia puede ser el uso de células tanto autólogas como embrionarias. (Loh *et al.*, 2015). Por ejemplo, Engelmayer y sus colaboradores (Engelmayer *et al.*, 2008), fabricaron microestructuras de PGS de panel de abeja en forma de acordeón, que resultó en un *scaffold* 3D con rigidez y anisotropía ajustables para la siembra de células de corazón de rata neonatales. El panel de abeja en forma de acordeón fue diseñado por superposición de dos poros cuadrados de 200 x 200  $\mu\text{m}$  orientados a 45<sup>o</sup> en un patrón, para dejar una red plana de puntas onduladas de 50  $\mu\text{m}$  de ancho. (Figura 4a y 4b)

- Otro campo en el que se está utilizando el PGS es en la **oftalmología**. La degeneración de la retina afecta las funciones de los fotorreceptores, causando discapacidad visual. (Rai, Tallawi, Grigore & Boccaccini, 2012). Por ello, el objetivo es hacer llegar al espacio subretiniano fotorreceptores y células progenitoras de la retina (RPCs). En este contexto, Redenti y sus colaboradores (Redenti *et al.*, 2009) fabricaron *scaffolds* recubiertos con laminina (proteína de la matriz extracelular) para promover la diferenciación de las RPCs hacia fenotipos maduros. Los *scaffolds* se fabricaron a partir de un molde de polidimetilsiloxano (PDMS) obteniendo *scaffolds* de 45 mm de grosor, con poros de 50 mm de diámetro y separados 175 mm uno del otro. (Figura 4c y 4d)

- También se están investigando las propiedades del PGS para **administración controlada de fármacos**. En este campo, Sun y sus colaboradores (Sun *et al.*, 2009) investigaron el PGS como vehículo reabsorbible para la administración controlada de fármacos, para terapias anti-cáncer. Realizaron implantes circulares de PGS dopados con el fármaco anticancerígeno 5-fluorouracilo (5-FU), a diferentes concentraciones del fármaco. Las obleas se prepararon de 10 milímetros de diámetro y entre 1 y 1,5 milímetros de grosor. Se analizó la degradación *in vitro* de dichas obleas, sumergiéndolas en PBS (tampón fosfato salino) y manteniendo el baño a 37°C, comprobando posteriormente la pérdida de masa sufrida por las obleas debida a la degradación, mostrada en la figura 4e y 4f.



*Figura 4 - Distintas aplicaciones del PGS (a,b) Scaffolds tridimensionales de PGS en forma de panel de abeja, imágenes extraídas de Engelmayer et al. (2008); (a) imagen SEM de los scaffolds bilaminares con poros totalmente conectados, (b) sección trasversal del scaffold bilaminar con células neonatales de corazón de rata teñidas con hematoxilina y eosina. (c,d) Imágenes SEM de la topología de los scaffolds con poros pasantes, extraídas de Redenti et al. (2009); (c) vista superior del scaffold de PGS con poros de 50 mm espaciados 175 mm uno del otro, (d) vista lateral del scaffold de PGS que muestra la forma de cono del poro formado en la superficie superior. (e,f) Fotos que muestran la pérdida de masa de las obleas de PGS durante la degradación *in vitro*, extraídas de Sun et al. (2009); (e) oblea el primer día, (f) oblea a los 30 días.*

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 Síntesis de poliglicerol sebacato (PGS) en condiciones estándar

El proceso de síntesis del poliglicerol sebacato se divide en dos etapas diferenciadas: una primera de prepolimerización en la que se obtiene prepolímero de PGS (pre-PGS) en estado de líquido viscoso, formado esencialmente por cadenas largas; y una segunda etapa de curado durante la cual se obtiene el polímero final entrecruzado, una matriz sólida que no se puede fundir ni disolver.

La etapa de prepolimerización se realizó como se detalla a continuación en el apartado 3.1.1; y tras ella el prepolímero obtenido se puede o bien curar obteniendo el polímero final, o bien almacenar a baja temperatura para utilizarlo posteriormente. Se comprobó anteriormente que los films obtenidos en ambas condiciones no presentaban ninguna diferencia en cuanto a su aspecto o características, por lo que se puede considerar que el almacenamiento no afecta a sus propiedades. En lo referente a la etapa de curado, se realizó de distinta manera dependiendo de la aplicación para la que se necesitara el PGS (con o sin poros, y de distinto tipo), por eso se ha descrito en distintas secciones.

#### 3.1.1 Etapa de prepolimerización

Se utilizó un balón de tres bocas o balón de reacción. La cantidad de reactivos que se puede introducir en el balón es limitada, ya que se necesita que la temperatura sea de 130°C en todo el contenido del balón, y el procedimiento de síntesis convencional con calefacción focalizada no permite obtener una temperatura uniforme en toda el volumen de reactivos por encima de una masa relativamente pequeña.

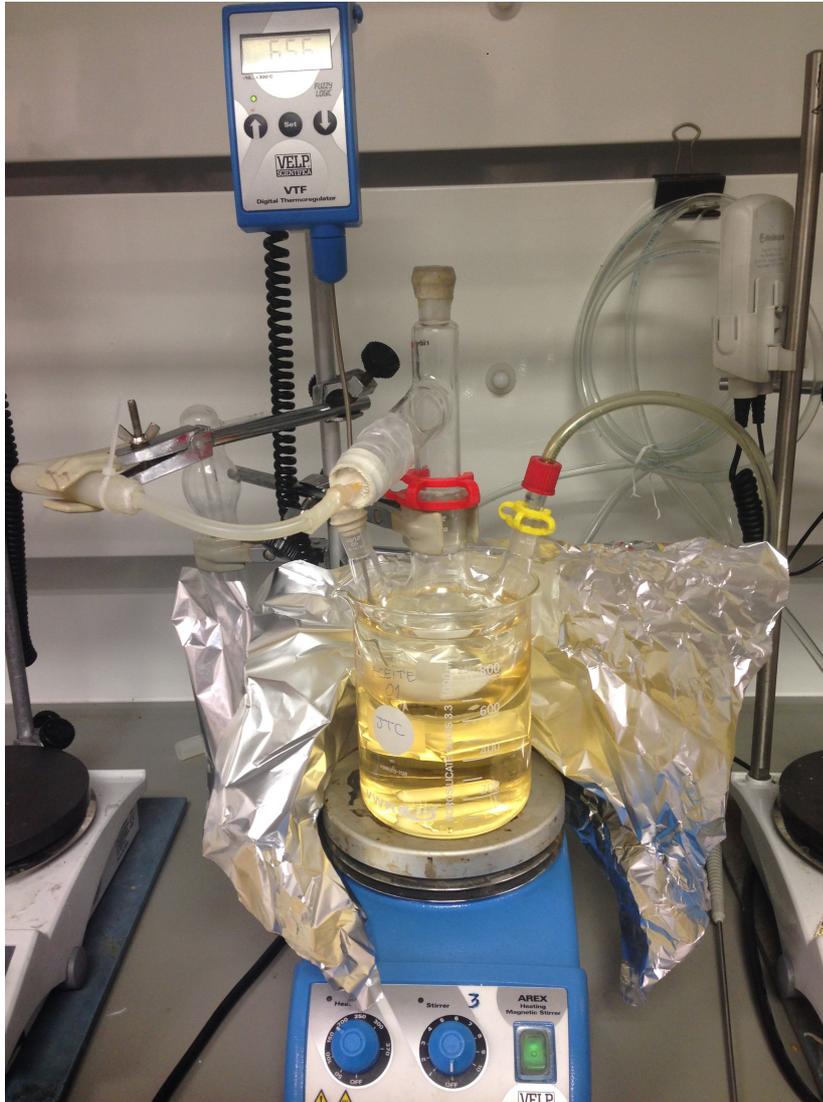
Sin embargo, experimentos previos realizados en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) demostraron que se podían obtener mayores cantidades de pre-PGS si se sumergía el balón de reacción en un recipiente con aceite térmico a la misma temperatura de la reacción. Este montaje es el que se utilizó para obtener el pre-PGS utilizado para la fabricación de los films (Figura 5).

Dentro del balón de reacción se dispusieron cantidades equimolares de ácido sebácico (Aldrich, 99% pureza) y glicerol (VWR, 98% pureza); siendo la masa total 6,4 gramos (2 gramos de glicerol y 4,4 gramos de ácido sebácico). Sin embargo, dado que el procedimiento es discontinuo y no se puede interrumpir, las proporciones equimolares iniciales se pueden hasta cuadruplicar para aumentar la producción de pre-PGS utilizando la mejora descrita en el párrafo anterior.

En una de las bocas se colocó la entrada de nitrógeno para crear una atmósfera inerte dentro del balón. Otra de las bocas se utilizó para la salida de dicho nitrógeno y evacuar el aire residente en origen o, en su caso, el agua formada durante la condensación. Para ello se utilizó un codo de vidrio con punta de goma, con una aguja conectada a una trampa de vacío que contenía agua. Para comprobar el correcto funcionamiento se observó en cada pre-polimerización cómo burbujeara el nitrógeno en el agua. La tercera de las bocas no se utilizó, por lo que se cegó.

Una vez realizado el montaje, y con el aceite precalentado a unos 100°C; se introdujo el balón dentro del aceite asegurando que toda la pared de dicho balón estaba en contacto con el aceite, a un nivel superior del nivel de los reactivos, ya que es necesario que todo el contenido esté a la misma temperatura. Se introdujo un pequeño agitador magnético dentro del balón, y otro en el recipiente que contenía el aceite, para facilitar la agitación por inducción.

Se dispuso todo el montaje en una placa calefactora. El sensor de temperatura se sumergió en el aceite, lo más cerca posible de los reactivos, en contacto con el balón. Se puso en marcha la agitación a unas 100 rpm comprobando que el imán introducido en el aceite se agitaba suavemente, consiguiendo inducir al introducido en el balón. Se configuró el termostato de la placa calefactora a 140°C para fundir el ácido sebácico, y se envolvió todo el montaje con papel de aluminio para evitar las pérdidas de calor tanto por radiación como por convección, puesto que el montaje se dispuso en una vitrina de extracción de gases, que contaba con un flujo laminar de aire.



*Figura 5 – Montaje experimental para la prepolimerización del PGS*

Una vez fundido el ácido sebácico, se bajó a la temperatura de 130°C y se mantuvo 24 horas para que se produjera la prepolimerización. Pasadas estas 24 horas se obtuvo el pre-PGS, que presentaba un aspecto de líquido viscoso.

### **3.2 Preparación de films de poliglicerol sebacato (PGS)**

A partir del pre-PGS obtenido en condiciones estándar se realizó el curado para la obtención de films. Estos films van a utilizarse como control en la caracterización de los materiales porosos.

### 3.2.1 Etapa de curado

Para llevar a cabo el curado del pre-PGS, se utilizaron placas de vidrio, moldes de teflón cuadrados y pinzas de sujeción, tal y como se muestra en la figura 6, izquierda.

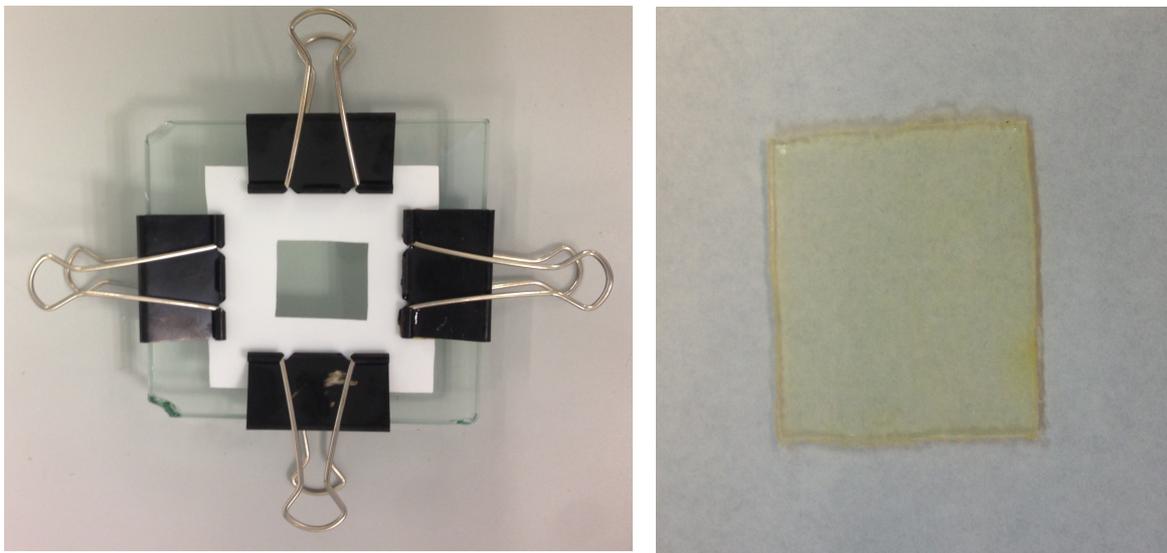


Figura 6 – Izquierda) Molde de teflón empleado para la síntesis de films. Derecha) Aspecto de un film, finalizada la etapa de curado.

Si se enfría el pre-PGS, es más difícil su manipulación ya que se vuelve más viscoso. Por ello, se dejó en todos los casos el balón dentro del aceite (ya sin aporte de calor) para que se mantuviese a elevada temperatura.

Con ayuda de una pipeta Pasteur se inyectó el pre-PGS en el molde, impregnando toda la superficie y también las paredes, procurando que no se formase ninguna burbuja de aire.

A continuación se curó en una horno de ventilación forzada (J.P Selecta, modelo Digitronic 2005161) configurado a 130°C durante 48 horas. Aunque en la bibliografía consultada, para la etapa de curado se utiliza vacío, en trabajos anteriores (Conejero-García *et al.*, 2017) se demostró que no hay diferencias en las propiedades estudiadas entre films obtenidos en condiciones de vacío y sin vacío. Por ello, se decidió llevar a cabo el curado sin vacío, por comodidad.

Una vez transcurrido este tiempo, se dejó enfriar cada molde unas dos horas, y con ayuda de una espátula se despegó el film del vidrio. Se obtuvo de cada molde un film de dimensiones 32 x 32 x 1,23 mm, determinadas por el molde de teflón, de un polímero ya con cadenas entrecruzadas y por tanto insoluble. El resultado tras el curado se muestra en la figura 6, derecha.

### **3.2.2 Lavado de los films de PGS**

Con tal de eliminar cadenas que no se han entrecruzado, monómeros y residuos remanentes, hay que someter los films a un proceso de lavado. El proceso que se siguió es el siguiente:

- **Etapa 1:** Se sumergió cada film en un recipiente con tetrahidrofurano (Scharlau) y se mantuvieron en un agitador orbital configurado a 100 rpm. El tetrahidrofurano es absorbido por la red macromolecular, permitiendo que esta se hinche y se filtren los elementos que se quieren lavar. El recipiente tiene que estar cerrado y debe ser lo suficientemente ancho para que permita al film hincharse, así como que se debe asegurar que la cantidad de tetrahidrofurano (THF) es suficiente para cubrir los films. Pasadas 24 horas se realizó un cambio por THF fresco, con cuidado de no retirarlo demasiado rápido ya que los films se podrían encoger y romper.
- **Etapa 2:** Se realizó un cambio progresivo de THF a etanol (Scharlau).
  - Cambio 25% volumen: se eliminó el 25% del volumen de THF y se añadió el mismo volumen de etanol. Se dejó 1 hora en agitación.
  - Cambio 50% volumen: se eliminó el 50% del volumen de la mezcla y se añadió el mismo volumen de etanol. Se dejó 1 hora en agitación.
  - Cambio 75% volumen: se eliminó el 75% del volumen de la mezcla y se añadió el mismo volumen de etanol. Se dejó 1 hora en agitación.
  - Cambio 100% volumen: se eliminó toda la mezcla y se renovó por el mismo volumen de etanol. Se dejó 21 horas en agitación, completando así las 24 horas necesarias para esta transición.
- **Etapa 3** Renovación completa. Se retiraron los 60ml de etanol para sustituirlos por 60ml de etanol nuevos. Se mantuvieron en agitación 24 horas más.
- **Etapa 4:** Cambio progresivo de etanol a agua Mili-Q. (agua tipo 1, extraída mediante el equipo Direct-Q3, Merk Millipore). Los pasos que se siguieron son análogos a los del cambio progresivo de la etapa 2.
- **Etapa 5:** Renovación completa. Se renovaron los 60ml de agua Mili-Q y se dejaron en agitación otras 24 horas.

### **3.2.3 Secado de los films de PGS**

Tras la fase de lavado, se procedió al secado necesario para eliminar el agua retenida en la red. Cabe destacar que al finalizar la fase de lavado, muchos de los films quedaban parcialmente segmentados. Esto ocurre porque el THF es un disolvente muy afín, y al hinchar tanto, el gel se fragiliza y rompe con facilidad en su manejo. Sin embargo, esto no es problema porque los trozos son de tamaño mayor a lo necesario para llevar a cabo cualquier caracterización propuesta.

Para el secado, se utilizaron placas Petri de vidrio con una base de teflón para evitar que los films se quedasen adheridos al vidrio. Se taparon parcialmente con la tapa de las placas, para permitir que se evaporasen los disolventes, evitando asimismo que cualquier sustancia entrase y contaminase los films. Se dejaron bajo campana de extracción de gases a temperatura ambiente 24 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, se introdujeron en un desecador de vacío (J. P Selecta, "Vacuo-Temp"). Los primeros 30 minutos se dejó funcionar la bomba con extracción continua. Después se dejaron en vacío estacionario 24 horas. Finalmente, se volvió a conectar la bomba 30 minutos más para dragar cualquier traza de disolvente en fase gas.

Después de este proceso los films ya estaban totalmente limpios y secos. Se almacenaron en bolsas herméticas para su posterior caracterización.

## **3.3 Preparación de scaffolds de PGS**

### **3.3.1 Preparación de la plantilla porogénica**

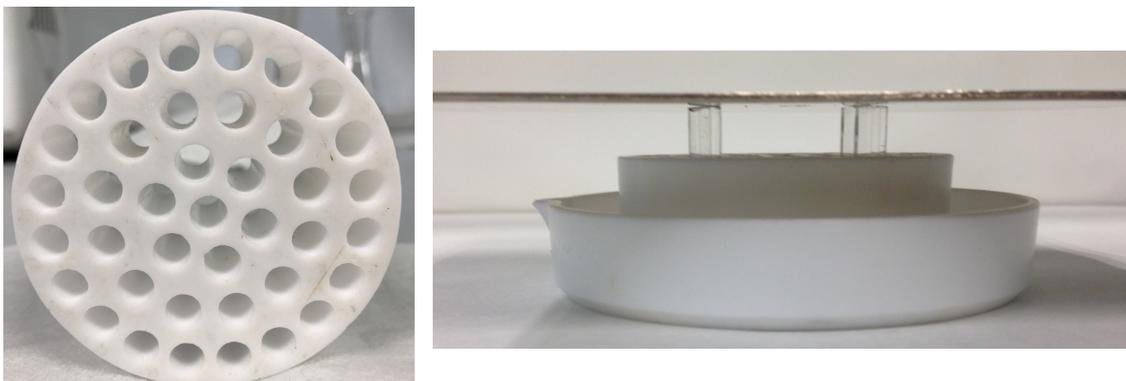
Para poder fabricar los *scaffolds* (andamiaje, en inglés) de PGS con cierta porosidad, se escogió el uso de plantillas porogénicas de partículas de sal común (NaCl), empleando el método de *salt fusion* implementado a partir de la descripción de (Gao, Crapo & Wang, 2006).

Experimentos previos en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT, 2015/2016) en los que se variaron tanto el diámetro de las partículas de sal, como la proporción pre-PGS/sal, determinaron que los parámetros ideales eran un diámetro de partículas de 212-250 $\mu$ m y una relación polímero/porógeno (w/w) de 1/9. La fracción de partículas con los diámetros específicos requeridos se obtuvo tamizando sal tras un proceso de molienda manual.

Para la fabricación de los *scaffolds* se escogió un molde de teflón redondo con agujeros pasantes (Figura 7, izquierda). Estos agujeros son circulares, de 1 cm de altura y 0,270 cm de diámetro. El proceso consistió en introducir 0,5 g de NaCl en cada uno de los pocillos del molde, con ayuda de un embudo. Para pesar la cantidad de NaCl se utilizó un pequeño recipiente forrado de papel de aluminio para evitar que las pequeñas partículas de sal se quedasen pegadas al recipiente.

Se intentó seleccionar pocillos del molde equidistantes, para asegurar una distribución de pesos correcta, ya que posteriormente en cada agujero que contiene sal se tapó con una varilla de vidrio y se colocó una placa metálica encima para ejercer una presión controlada, tal y como se muestra en la figura 7, derecha.

Se dejó el porógeno en el molde a temperatura ambiente unos 10 minutos.



*Figura 7 - Izquierda) Molde de teflón con agujeros pasantes empleado para la fabricación de scaffolds- Derecha) Montaje del molde con varillas y placa metálica para controlar la presión ejercida en la sinterización del porógeno.*

A continuación se introdujo en una estufa a 37°C, dentro de un recipiente cerrado herméticamente, que contenía un frasco de disolución de sulfato potásico (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Sharlab) saturada, consiguiendo así una humedad relativa del 96,59±0,34% dentro de dicho recipiente (Greenspan, 1977). El montaje se dejó 4 horas en el interior. Transcurrido este tiempo, se añadieron dos pesos encima de la placa metálica (m<sub>total</sub>=1214,7 gramos), y se dejaron 20 horas más dentro del recipiente. Por último, se introdujeron en una estufa a 130°C, y se dejaron 24 horas más sin peso. Transcurrido este tiempo, ya se obtuvieron las plantillas porogénicas de sal preparadas.

### 3.3.2 Curado del PGS en la plantilla porogénica

Siguiendo la proporción establecida de 1/9 (w/w), se dispensó el pre-PGS, con ayuda de una pipeta Pasteur, en el interior de cada uno de los pocillos que contenían la sal. Para ello debió calentarse previamente el pre-PGS a una temperatura de aproximadamente 110°C, ya que, de lo contrario, resultaba muy complicado su manejo. Además, se tenía que tener la precaución de que el PGS no tocara los bordes del molde, ya que si se quedaba en la pared no difundiría a lo largo del *scaffold*.

Otra de las limitaciones que se observaron a la hora de introducir el PGS, es que la masa que se dispensaba iba en función de la gota que se forma en la punta de la pipeta, y como resultado en prácticamente todos los casos la masa introducida fue ligeramente superior a la masa teórica que se había calculado. Para calcular el margen de error máximo, se obtiene la masa de una gota lo más pequeña posible (0,004g) y se calcula en función de la masa que se quiere pesar (0,065g); obteniendo un error máximo del 12,31%:

$$\text{error máximo (\%)} = \frac{0,004 \text{ g} \cdot (1/2)}{0,065 \text{ g}} \cdot 100 = \mathbf{12,31 \%} \quad (I)$$

Una vez se tuvo el pre-PGS en las plantillas porogénicas, se introdujo en el horno a 130°C durante 48 horas para que se realizase el curado.

Transcurrido este tiempo, se extrajeron los *scaffolds* del molde, cuyo aspecto es el que se ve en la figura 8, izquierda.



Figura 8 - Izquierda) Scaffold tras la etapa de curado. Derecha) Scaffold tras las etapas de lavado y secado.

Tal y como se observa en la Figura 8, izquierda, el PGS no había difundido hasta el extremo inferior de la plantilla de sal, debido a su viscosidad, ya que en el *scaffold* se diferencian a simple vista dos zonas: la zona de la izquierda, con un tono más oscuro, que sí que contiene PGS; y la zona de la derecha que sólo contiene sal. Estos restos se eliminan en el lavado, y explican que se obtenga *scaffolds* de tamaño inferior a lo esperado, si bien satisfactorio para las aplicaciones requeridas.

### 3.3.3 Lavado de los *scaffolds* de PGS

El proceso de lavado de los *scaffolds* es análogo al seguido para los films. Únicamente se incluyó un paso previo para eliminar la sal:

- **Etapas 1-5:** se sumergió cada *scaffold* en 50 ml de agua destilada y se sometieron a agitación continua (40-60 rpm). Transcurridas 2 horas se renovó el agua, y tras otras 5 horas se volvió a renovar.
- **Etapas 6-10:** se siguió exactamente el mismo procedimiento que las etapas 1 a 5 del lavado de films.

### 3.3.4 Secado de los *scaffolds* de PGS

Igual que en el lavado, el proceso de secado fue exactamente igual que el seguido para los films de PGS. El resultado obtenido tras el lavado y secado es el que se muestra en la figura 8, derecha.

## 3.4 Obtención de membranas microporosas

El rango de diámetro de poro deseado para las capas superior e inferior del andamiaje es de entre 1 y 5  $\mu\text{m}$ , para permitir la difusión de líquidos, nutrientes y moléculas de interés (entre ellas, todas aquellas señales de comunicación célula-célula durante el cocultivo indirecto), pero evitando el paso de células a su través. Por ello, en una primera aproximación se pensó en utilizar un disolvente y no un sólido como porógeno para que, tras el curado del pre-PGS, al extraerlo por disolución proporcionara poros de las “lagunas” de disolvente obtenidas durante la separación de fases. Se utilizaron dos disolventes distintos, y se variaron las condiciones de curado con tal de conseguir el espesor deseado. Sin embargo, aunque en algunos casos sí se consiguió obtener membranas, éstas tenían un espesor tan fino que no era posible separarlas del soporte de vidrio utilizado. Se optó entonces por cambiar dicho soporte por un soporte hidrófilo y parcialmente hinchado en agua, que sirviera a su vez como fuente de moléculas de agua empleadas como porógeno, pero no funcionó ya que el pre-PGS difunde a través del soporte antes de su curado, con lo que resultan dos redes interpenetradas a nivel de interfase. Por último, se estimó conveniente utilizar sólidos del tamaño

deseado como porógeno: en primer lugar se utilizó otro polímero previamente disuelto, la policaprolactona (PCL), y al no obtener un resultado favorable sino fases macroscópicamente diferenciadas, se utilizaron partículas de sal previamente tratadas para tenerlas en tamaño micrométrico, gracias a las cuales sí se obtuvo el resultado deseado. A continuación, se describen con detalle los experimentos realizados, las dificultades y problemas encontrados y la solución aportada en cada caso para llegar finalmente a lo que es el procedimiento de obtención de estas membranas.

### ***3.4.1 Ensayos preliminares para obtener membranas microporosas empleando disolventes como porógeno***

Se escogieron dos disolventes distintos, la dimetilformamida (DMF, Scharlab) y el N-octano (Sigma-Aldrich). La selección de estos dos disolventes está motivada porque el DMF tiene una temperatura de ebullición de 157°C, superior a la del curado del PGS (130°C), mientras que el N-octano tiene una temperatura de ebullición sólo ligeramente inferior (125,7°C).

Para realizar los experimentos, se calculó la masa necesaria de prepolimerización de PGS a partir del espesor deseado de 100 µm para esta capa, de la densidad del PGS tras el curado (1,1376g/cm<sup>3</sup>, Conejero-García, Á. *et al.* (2017)) y el tamaño de la placa Petri sobre la que se haría el experimento (diámetro 5,5 cm):

$$\text{Volumen necesario} = \pi \cdot \left(\frac{5,5 \text{ cm}}{2}\right) \cdot 100\mu\text{m} = 0,2376 \text{ cm}^3 \quad (II)$$

$$\text{Masa necesaria} = V \cdot \rho = 0,2376 \text{ cm}^3 \cdot 1,1376 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = 0,27 \text{ gramos PGS} \quad (III)$$

Estos cálculos son aproximados, en el sentido de que no se tiene en cuenta el volumen de poros, que no podría saberse con seguridad porque el polímero tiene tendencia a contraerse tras el lavado del porógeno y secado del material. Se realizaron en primer lugar 10 pruebas, 5 por cada disolvente, con proporciones del 10, 20, 30, 40 y 50% de pre-PGS en peso en la mezcla con el disolvente. Se dejaron las mezclas en agitación durante 24 horas en recipiente cerrado con tal de conseguir una disolución homogénea. Pasado este tiempo, se observó que el N-octano permaneció inmiscible en todas las disoluciones a pesar de la importante componente apolar que aporta el ácido sebácico y la eliminación de grupos polares durante la prepolimerización, por lo que sólo se dispusieron sobre soporte de vidrio para su curado aquellas disoluciones que contenían DMF.

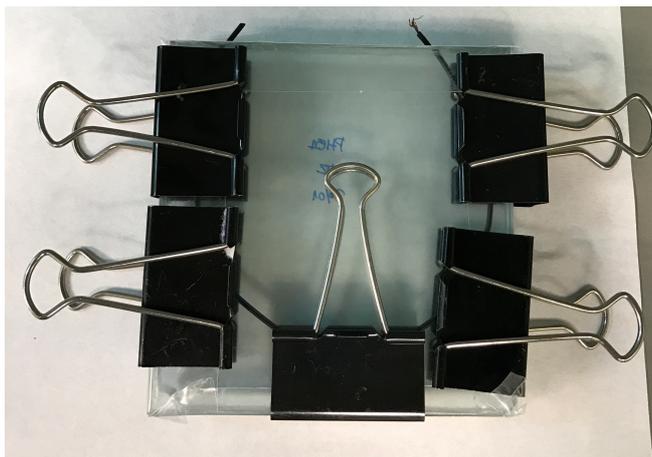
Tras este curado, se observó que a pesar de que sí se había realizado correctamente el curado, no se formó un film continuo sobre la placa como se esperaba, sino pedazos inconexos. Por ello, se repitió el experimento con DMF triplicando la cantidad de pre-PGS que se había calculado en un principio. Se decidió también tapar las placas Petri durante la fase de curado con tal de observar si la evaporación del disolvente afectaba al grosor de la capa y a su continuidad. Además, se realizó el experimento de manera paralela en dos cámaras herméticas en las que se introdujo un recipiente con DMF en un caso y agua destilada en el otro (en este caso el recipiente no estaba cerrado herméticamente, tenía la tapa por encima sin cerrar para evitar una sobrepresión por la ebullición del agua), para crear una atmósfera húmeda durante la fase de curado. Esta atmósfera húmeda se creó para evitar la rápida evaporación del disolvente y con ello la obtención de films no porosos, puesto que para el curado se utilizó un horno con ventilación forzada que de otro modo facilita la evaporación rápida del disolvente.

Tras las 48 horas a 130°C para conseguir el curado, se observó que las muestras en atmósfera de DMF no había curado convenientemente. Se probó también con proporciones mayores de PGS (20%, 40%, 60% y 80%) pero no se consiguió el curado en ninguna de ellas, por lo que se concluyó que el DMF podía tener un efecto inhibitor de la policondensación durante el curado, aunque un estudio más riguroso al respecto estaba fuera del alcance de este trabajo.

Las muestras en atmósfera de agua sí curaron, y las dispuestas en placas Petri tapadas también, pero en las destapadas la evaporación del DMF dio lugar a films demasiado finos. En cualquier caso, el problema principal que se encontró fue que, aunque se consiguió obtener films muy finos, resultó muy complicado despegarlos de la base de la placa Petri utilizada para el curado, y cuando se conseguía se rompían en trozos.

Para resolver el problema del despegado, se pensó en utilizar un hidrogel como soporte para el curado. Se entiende como hidrogel un polímero que puede absorber una considerable cantidad de moléculas de agua, sin llegar a disolverse en esta. Como tras el curado el PGS no se disuelve en agua, y el hidrogel es capaz de hinchar en agua, se pensó que tras el curado se podría sumergir el conjunto en agua y, al hincharse el hidrogel, separaría la capa de PGS formado.

Se preparó un hidrogel de polihidroxietil acrilato (PHEA) para emplearlo como soporte. Para ello se preparó una mezcla de monómero hidroxietil acrilato (HEA, Sigma-Aldrich), etilenglicol dimetacrilato (EDGMA, Sigma-Aldrich) como entrecruzador al 0.5% (los % siempre son en peso) y benzoína como iniciador al 0.5% (Sigma). Todo ello se mezcló en un frasco, se agitó y se introdujo con ayuda de una pipeta Pasteur en 4 moldes preparados como el de la figura 9, que consistían en dos placas de vidrio sujetas con 5 pinzas, y un segmento de cable de 1 mm de espesor que servía como barrera física para que la mezcla preparada no se escapase del molde, al tiempo que fijaba el espesor del film a obtener.



*Figura 9 - Montaje realizado para la polimerización del hidrogel de PHEA empleado después como soporte para el curado del PGS y despegado sencillo.*

Una vez realizado el montaje, los moldes se introdujeron durante 24 horas en un horno de rayos ultravioleta (UV), que provocó la formación de radicales libres por efecto de la benzoína y el inicio de la síntesis. Tras este periodo, se dispusieron durante otras 24 horas en una estufa a 90°C para realizar la postpolimerización, asegurando así que no quedase ningún radical libre.

Finalizada la síntesis del hidrogel, se procedió a su lavado, necesario para eliminar los posibles restos de monómero que pudiesen quedar remanentes. Se utilizó una mezcla de etanol y agua a partes iguales en volumen, en un montaje con una manta calefactora y un serpentín de condensación. La mezcla de disolventes se renovó cada 24 horas durante 3 días, para asegurar el correcto lavado del hidrogel.

A continuación, se troqueló el film de PHEA en círculos de 10 mm de diámetro, para emplearlos como soporte en la obtención de las membranas de PGS. Una parte de ellos se pusieron en una placa Petri y se cerraron en un recipiente hermético con atmósfera de agua, a 90°C y durante 48 horas, para asegurar su hinchado en agua en equilibrio. Con ello se pretendía que el agua, al evaporarse y difundir hacia arriba, crease poros pequeños pasantes, además de los que pudiera crear la DMF. El resto de soportes de PHEA se pusieron a secar en un desecador de vacío.

Se preparó una disolución de pre-PGS y DMF al 10% en peso, y se realizaron en paralelo distintas pruebas de curado: sobre hidrogel seco (xerogel) y sobre hidrogel pre-acondicionado en agua, tanto en el recipiente hermético con la atmósfera húmeda, y en placa Petri tapada, todo ello para evitar la evaporación y garantizar la presencia de disolvente a lo largo del proceso de curado (y con ello la obtención de membranas porosas). Todas las muestras se pusieron a curar durante 48 horas a 130°C.

Los resultados fueron los siguientes: tanto en placa Petri tapada como en atmósfera húmeda, el PGS sí curó pero no sobre el PHEA, sino que se desparramó por su distinta naturaleza hidrófobo (PGS)-hidrófilo (PHEA). A simple vista no se observaron diferencias significativas entre las muestras sobre hidrogel acondicionado y hidrogel seco, lo que ambas tenían en común fue que no se formaron 2 capas como se esperaba (PHEA abajo y PGS curado encima), sino que el pre-PGS había difundido antes de curar y se había mezclado con el PHEA, con lo que se tenían dos redes interpenetradas imposibles de separar.

Tras estos resultados, se decidió probar otra vez con el hidrogel acondicionado a 90°C durante 24 horas, y en vez de depositar el PGS en la parte de arriba, depositar unas gotas de PGS puro sobre una base de teflón (para que no se adhiriese a la placa Petri) y colocar encima el PHEA, para evitar en lo posible la difusión del pre-PGS a su través. Se puso a curar en el recipiente hermético con atmósfera húmeda de agua. Tras las 48 horas del curado, se observó que tampoco se había formado un film, el PGS había difundido a través del hidrogel, por lo que la opción de utilizar un hidrogel se descartó finalmente. Esto es así porque, como hemos sabido después, el

pre-PGS tarda unas 40 horas en aumentar notablemente su viscosidad durante el proceso de curado, y en este tiempo no es más que una disolución de oligómeros, capaz de difundir a través de la red de PHEA.

Otra de las pruebas que se realizó fue con mallas de Nylon como soporte, de manera que el prepolímero podía depositarse sobre ellas por ser suficientemente viscoso, y podía curar mientras vapor de agua difundía a su través desde un baño colocado debajo. De esta manera de nuevo se pretendía conseguir poros pasantes, provocados por el vapor de agua. Para ello se depositaron unas gotas de pre-PGS de PGS sobre dos mallas de Nylon, y ambas mallas se colocaron encima de una rejilla metálica. Esta rejilla se colocó sobre un recipiente que contenía agua. En una primera etapa se puso en estufa durante 24 horas a 95°C para arrancar el curado y al tiempo evitar la evaporación total del agua del baño, y tras este período se pusieron a curar a 130°C. El resultado tampoco fue favorable, pues el PGS difundió a través de las mallas y se quedó atrapado en ellas, con lo que no se pudo despegar las membranas.

### ***3.4.2 Ensayos preliminares para obtener membranas microporosas empleando sólidos como porógeno***

Los siguientes experimentos que se realizaron para conseguir los poros del tamaño deseado fue empleando otro polímero como porógeno. Inicialmente, se escogió la policaprolactona (PCL Polyscience), ya que su temperatura de fusión es de 60°C, por lo que a la temperatura de curado del PGS (130°C) estaría líquida y se mezclaría bien con el pre-PGS. Se preparó una disolución de PGS y PCL al 50% en peso. Se realizaron dos pruebas, una con la PCL sin disolver y otra añadiendo un volumen de 600 µL de DMF, para comprobar si la disolución de PCL en otro líquido aumentaba la miscibilidad de PGS y PCL. Con tal de conseguir una disolución homogénea se calentaron ambos a unos 90°C, temperatura a la cual la PCL era totalmente líquida y el pre-PGS era lo suficientemente líquido para poder manipularlo. Tras conseguir una mezcla macroscópicamente homogénea se puso a curar. El resultado no fue el que se esperaba, ya que se observaron, en los dos experimentos, dos fases diferenciadas a escala macroscópica, una rica en PGS y otra rica en PCL. Este resultado sugiere que, a pesar de la alta viscosidad de la mezcla, los diferentes componentes se separaron no solo por el curado de las cadenas de PGS (que desplaza a las de PCL) sino también por su diferente densidad. Por ello, esta opción también se descartó.

En este punto se pudo disponer de un molino ultracentrífugo (Retsch, ZM 200, figura 10) con el que moler sal común hasta tamaños de partícula varios órdenes de magnitud más pequeños de lo que se habrían obtenido sin ningún procesado o mediante técnicas de molienda convencionales. Por ello se decidió probar a formar estas capas utilizando esta sal, de ahora en adelante *nanosal*, como porógeno.

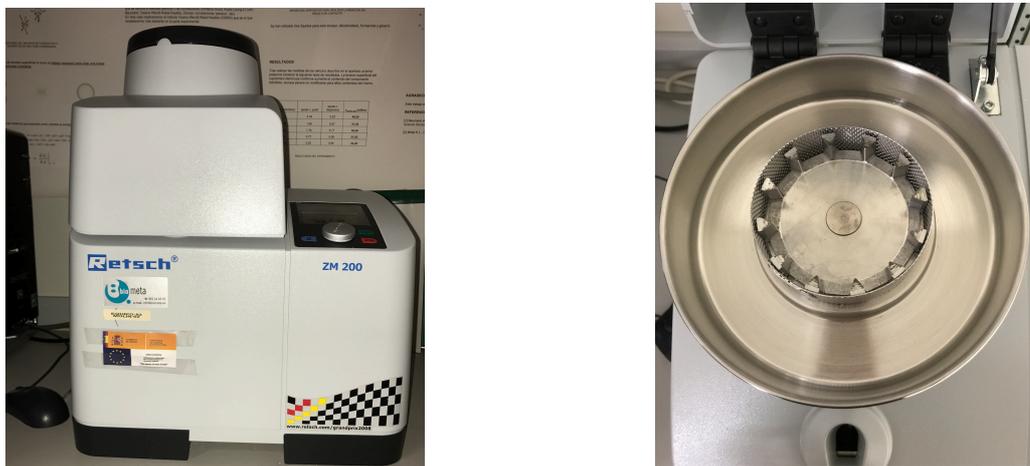
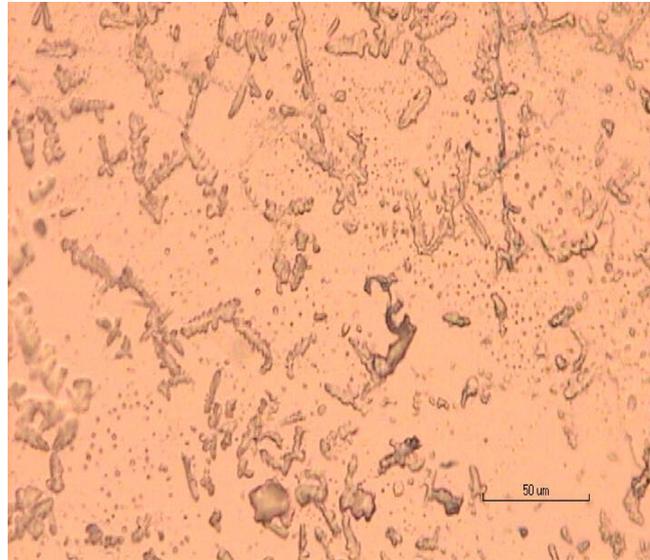


Figura 10 - Molino Ultracentrífugo. Izquierda) Aspecto equipo. Derecha) Detalle del interior del molino.

En este caso, empleando sal como porógeno, se podía emplear trozos de film de PGS (sin poros) como soporte para obtener estas membranas, y sobre ellos depositar la solución de pre-PGS mezclado con la sal molida para su curado. Esto no habría podido hacerse en el caso de emplear disolventes como porógeno porque hubieran difundido hacia el PGS provocando su hinchado. En caso de éxito, se pasaría a emplear los *scaffolds* descritos en el apartado 3.3, antes de la eliminación de la sal como soporte.

Se prepararon dos mezclas, al 20 y 40% de nanosal en peso con respecto a la masa de pre-PGS, respectivamente. Además, se decidió realizar cada experimento 3 veces: la primera sin sumergir previamente el film con la mezcla en agua, la segunda sumergiéndolo en agua destilada durante 1 minuto, y la tercera sumergiéndolo durante 5 minutos. Con ello, se pretendía evitar que en la cara superior quedase solamente pre-PGS y no sal, y con ello evitar que la capa externa no fuese porosa.

Las 6 muestras se colocaron sobre una placa Petri con una base de teflón, y se curaron 48 horas a 130°C. Estas primeras membranas se observaron al microscopio óptico (Figura 11), a una magnificación de 20x, observando algunas estructuras que podían ser poros, y sirvieron para avanzar en la experimentación en esta línea.



*Figura 11 - Imagen de microscopio óptico de las primeras membranas microporosas. Magnificación 20x, barra de escala 50 micras.*

Se repitió el experimento, intentando depositar sobre el film curado una mayor cantidad de la mezcla en cada caso, porque se había visto que parte de la disolución difunde hacia el film. Además, para las muestras sumergidas en agua, en vez de sumergirlas en agua destilada, se sumergieron idénticos periodos de tiempo en una disolución saturada de NaCl y se pusieron a curar. De esta manera, se garantiza que los poros afloran a la superficie al tiempo que se evita un lavado del porógeno antes de tiempo. Tras el curado, a simple vista, se observó que la proporción del 40% favorecía que el film preparado estuviese más extendido, cubriendo mayor superficie que el de 20%. De entre las tres condiciones de inmersión en agua no se observaron diferencias cualitativas.

La siguiente tabla resume los distintos experimentos llevados a cabo:

*Tabla 1 - Resumen de las pruebas realizadas para obtener membranas microporosas.*

EXPERIMENTO	PROCEDIMIENTO	RESULTADOS
<b>Pre-PGS + N-Octano</b>	Proporciones 10,20,30,40 y 50% en peso de pre-PGS	Inmiscibles
<b>Pre-PGS + DMF</b>	Proporciones 10,20,30,40 y 50% en peso de pre-PGS	Film no uniforme – Cantidad insuficiente
	Triplicando cantidad inicial	Evaporación de DMF – Cantidad insuficiente para formar un film
	Placas Petri tapadas	Suficiente cantidad – No es posible despegarlo de la base
	Recipiente hermético con atmósfera de DMF	El curado no se realiza
	Recipiente con atmósfera de H <sub>2</sub> O	Suficiente cantidad – No es posible despegarlo de la base
<b>Pre-PGS + DMF al 10% en peso de PGS sobre hidrogel de PHEA</b>	Xerogel / Hidrogel preacondicionado en recipiente con atmósfera de H <sub>2</sub> O	El PGS difunde a través del hidrogel – Red interpenetrada
	Xerogel / Hidrogel preacondicionado en placa Petri tapada	Se desparrama el PGS por distinta naturaleza
<b>Pre-PGS + DMF al 10% en peso de PGS debajo de hidrogel de PHEA</b>	Hidrogel preacondicionado en recipiente con atmósfera de H <sub>2</sub> O	El PGS difunde a través del hidrogel – Red interpenetrada
<b>Pre-PGS sobre mallas de Nylon</b>	Sobre un recipiente con agua	Difusión del PGS a través de las mallas
<b>PGS+PCL</b>	Disolución 50% peso	Formación de dos fases distintas, una rica en PGS y una rica en PCL.
<b>PGS+PCL+DMF</b>	Disolución 50% peso + 600µL de DMF	
<b>Film PGS + PGS con nanosal</b>	Proporciones 20 y 40% de nanosal, distintos tiempos de inmersión en agua (sin inmersión, 1 minuto y 5 minutos)	Resultado favorable.

Con tal de eliminar la sal que actuaba como porógeno se lavaron todas las muestras con agua destilada, realizando un total de 6 cambios, cada vez más espaciados en el tiempo (aumentando el intervalo media hora cada vez en los tres primeros, y aumentándolo 24 horas en los tres últimos), puesto que durante las primeras inmersiones es cuando más sal se elimina pues, de acuerdo a la ley de Fick, la difusión de NaCl hacia el medio líquido es más rápida por ser mayor el gradiente de concentración. Previamente se partieron por la mitad todas las muestras, ya que para secarlas se decidió secar una parte de manera lenta (primero al aire y después en desecador a vacío) y la otra parte en una liofilizadora (Telestar, modelo LyoQuest-85), para así poder estudiar si el método de secado confería distinta morfología a las membranas.

Para ello, la mitad de las muestras se dejaron 24 horas sobre una Petri secando al aire, y pasado este tiempo se pusieron al desecador de vacío. Por otra parte, la mitad restante se metieron en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  para poder después liofilizarlas durante 24 horas. Una vez finalizado este proceso las muestras se almacenaron en bolsas autosellables para su posterior visualización microscópica por FESEM.

### **3.5 Fabricación del *scaffold* estratificado**

Una vez estuvo establecido el procedimiento para la obtención de las distintas capas del *scaffold* estratificado por separado, se procedió a la fabricación del mismo. Para ello, se elaboró en primer lugar la zona intersticial, siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 3.3.1 y 3.3.2. Una vez obtenidos estos *scaffolds*, y sin realizarles el procedimiento de lavado y secado, debido a que el tamaño de cada *scaffold* obtenido era mayor al deseado para la capa central, se cortaron transversalmente cada uno en 4 partes, con ayuda de una cuchilla, obteniendo *scaffolds* de unos 2 milímetros de espesor. A continuación, se preparó una disolución de prepolímero de PGS y nanosal al 40%, y con ayuda de una varilla de vidrio se depositó una capa, lo más fina posible, en una de las superficies de los *scaffolds*. Tras el curado durante 48 horas a  $130^{\circ}\text{C}$ , se procedió a depositar otra capa en la otra superficie de los *scaffolds*, creando así el que sería el *scaffold* estratificado. Se puso a curar de nuevo durante 48 horas a  $130^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.5.1 Lavado de los *scaffolds* estratificados**

Una vez se tenían los *scaffolds* estratificados, se les sometió a un procedimiento de lavado, para eliminar la sal que se había utilizado como porógeno en las distintas capas, así como cualquier monómero o residuo que pudiese haber quedado remanente tras el proceso de curado.

- **Etapa 1:** Se sumergieron los *scaffolds* estratificados en agua destilada, con un volumen equivalente al utilizado en el procedimiento de lavado descrito en el apartado 3.3.3; y se dejaron en agitación continua. Se renovó el 100% del volumen cada hora durante 4 horas, y se dejaron 20 horas más en agitación.
- **Etapa 2:** Se realizó un cambio progresivo a etanol, cambiando cada 10 minutos un 25, 50, 75 y 100% del volumen. Se dejó en agitación durante 24 horas más.
- **Etapa 3:** Se renovó el 100% del volumen por etanol nuevo, y se dejó durante 24 horas en agitación.
- **Etapa 4:** Se realizó un cambio progresivo a agua mili-Q, con los porcentajes análogos a la etapa 2.
- **Etapa 5:** Se renovó el 100% del volumen por agua mili-Q nuevo, y se dejó 24 horas en agitación.

### 3.5.2 Secado de los *scaffolds* estratificados

Tras el lavado, se procedió a un proceso de secado para extraer el agua retenida en los *scaffolds*. Este procedimiento se realizó exactamente igual que el de secado de films, descrito en el apartado 3.1.3.

## 3.6 Caracterización de los *scaffolds* estratificados

### 3.6.1 Caracterización morfológica - Observación de la morfología porosa mediante FESEM

Para poder visualizar las muestras en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, por sus siglas en inglés) en los Servicios de Microscopía de la UPV, la superficie de estas debía ser conductora. Para ello, se prepararon las muestras con un recubrimiento de partículas de platino metálico, puesto que el FESEM tiene una resolución muy elevada que requiere partículas con un tamaño de grano muy pequeño.

Se visualizaron las muestras con una distancia entre la muestra y el colector de 4.1-4.2 mm y un voltaje de 2 kV. Se observaron, en primer lugar los *scaffolds* y las membranas por separado, y, cuando el procedimiento para la obtención de los *scaffolds* con porosidad estratificada estuvo implementado, se observaron también en cortes transversales para poder estudiar dichos estratos.

### 3.6.2 Caracterización mecánica - Ensayo a compresión

Como ya se ha comentado con anterioridad, el *scaffold* estratificado está pensado para que forme parte de un dispositivo que simulará el fallo renal, sometido a fuerzas de compresión.

Por ello, se realizaron ensayos a compresión tanto de *scaffolds* como de films no porosos que servirían como control, 3 réplicas o muestras en cada caso. Se utilizó el equipo de análisis termodinámico y las condiciones fueron: temperatura ambiente, muestras en seco, una carga aplicada de 0 a 1500 mN y una velocidad de aplicación de 100mN/min.

Para tener las mismas condiciones tanto de *scaffolds* como de films, las 6 muestras se troquelaron con el mismo troquel. Sin embargo, al tratarse de elastómeros, al troquelar no todas las muestras tenían exactamente el mismo diámetro, por lo que se utilizó un pie de rey digital y se realizaron 3 medidas del diámetro de cada muestra en distintas posiciones para obtener la media.

Una vez realizados los ensayos, se calcularon la tensión,  $\sigma_x$ , y la deformación unitaria,  $\varepsilon_x$ , para cada instante, siguiendo las ecuaciones IV y V, donde  $F_x$  es la fuerza aplicada por el equipo,  $d$  el diámetro de la muestra,  $l_x$  el espesor en el instante  $x$  y  $l_0$  el espesor inicial.

$$\sigma_x = \frac{F_x}{\pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2} \quad (IV)$$

$$\varepsilon_x = \frac{\Delta l}{l_0} = \frac{l_x - l_0}{l_0} \quad (V)$$

### 3.6.3 Caracterización biológica - Cultivo celular

Con tal de analizar los *scaffolds* biológicamente, se realizó un cultivo celular con fibroblastos de ratón L929 (Sigma-Aldrich). Se realizaron dos siembras en paralelo, una siembra en el interior de la zona intersticial del *scaffold*, y una siembra en el fondo del pocillo de la placa celular para poner en contacto con las células la zona externa del *scaffold*. Estas siembras tenían como objetivo demostrar que las capas externas cumplen con su función de barrera física en el *scaffold*, puesto que se pretende evitar el movimiento celular bidireccional, es decir, que las células sembradas en la parte central no migren a las capas externas, y que células externas tampoco migren a la capa central.

### 3.6.3.1 Descongelación y expansión de fibroblastos

Los fibroblastos L929 que se utilizaron para el cultivo se encontraban congelados para su conservación. Tras descongelarlos, se pasaron a dos tubos Eppendorf y se pusieron en una centrífuga (Eppendorf, modelo Centrifuge 5804) a 1200 rpm durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, se añadió a cada Eppendorf 1mL de medio de cultivo previamente preparado, para poder resuspender adecuadamente las células con el medio. A continuación se introdujo el contenido de los Eppendorfs y 13 mL de medio de cultivo en un frasco de cultivo celular de 75 cm<sup>3</sup>. Se dejó el frasco en un incubador (Termofisher, model 3111) a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 90% de humedad durante un período de 3 días. Pasado este tiempo se renovó el medio de cultivo y se dejó durante 2 días más en el incubador.

El medio de cultivo utilizado se preparó con 44,5 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, en inglés) con alto contenido en glucosa (Biowest), un 10% en volumen respecto del total de FBS (*Fetal Bovine Serum*, en inglés) y un 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco), como antibiótico.

Tras los 5 días de cultivo, se observó al microscopio óptico la correcta evolución de las células, ya que habían llegado a confluencia, tal y como se aprecia en la figura 12.

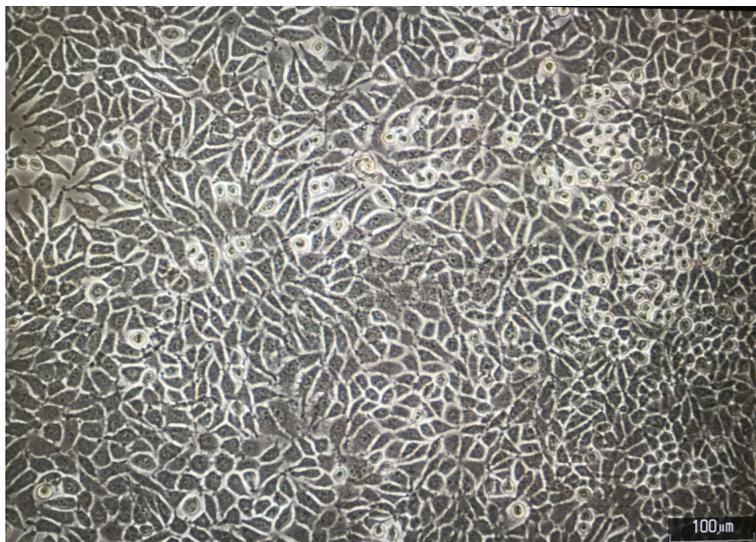


Figura 12 - Fibroblastos L929 en confluencia vistos al microscopio óptico antes de su siembra en los materiales preparados. Barra de escala: 100 μm.

### 3.6.2.3 Sanitización de los materiales y siembra de fibroblastos

Para poder sembrar los *scaffolds* con fibroblastos, hay que someterlos previamente a un proceso de sanitización, para evitar cualquier contaminación biológica y, además, acondicionarlos para el cultivo que se va a realizar.

Por ello, se sumergieron los *scaffolds* en etanol 70% y se dejaron durante una hora. Pasado este tiempo se cambió el etanol 70% por etanol 70% filtrado con un filtro estándar de 0,2  $\mu\text{m}$  de luz de malla, y se dejó durante 1 hora más. A continuación, se intercambió el contenido por etanol 50%, pasados 10 minutos por etanol 30% y pasados 10 minutos más por agua Mili-Q. Una vez lavados se dispuso cada *scaffold* en un pocillo de una placa P6, se añadió 1 mL de medio de cultivo a cada pocillo y se puso al incubador. De este modo, se buscaba acondicionar la superficie libre de los *scaffolds*, para proporcionar un entorno osmóticamente equilibrado a las células al proceder a su siembra.

Antes de sembrar las células se tuvo que ajustar la densidad celular. Para ello, se retiró el medio de cultivo del frasco donde se habían sembrado las células, se añadió DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, en inglés), un tampón fosfato libre de cloruro de calcio y de magnesio, para que las proteínas cadherinas (unión célula-célula) e integrinas (unión célula-material) se vuelvan afuncionales. Para seguir, se añadieron 2 mL tripsina para conseguir levantar las células del frasco, y se puso el frasco en el incubador a 37°C durante 2 minutos para maximizar la actividad de la tripsina. Transcurrido este tiempo, se añadió el doble de volumen de medio de cultivo (4mL) para frenar la actividad de la tripsina.

A continuación se tomaron 10  $\mu\text{L}$  para realizar el conteo en una cámara Neubauer, y se añadió el volumen necesario para tener la densidad celular deseada, que en el caso de la siembra en el fondo de los pocillos fue de 500 células / $\mu\text{L}$  (L929 en pase número 22). Se introdujeron 20  $\mu\text{L}$  en cada pocillo de una placa P48, añadiendo medio de cultivo después y se dispuso la placa en el incubador durante 24 horas para favorecer la adhesión de las células al fondo del pocillo. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio de cultivo, se colocaron los *scaffolds* en el fondo del pocillo y se sujetaron con inserts para que la membrana porosa quedase en contacto con las células. Se les añadió 1 mL de medio de cultivo a cada uno.

Paralelamente, se realizó la inyección celular en la zona central de los *scaffolds*, con una densidad celular de 1000 células/ $\mu\text{L}$ . Para conseguir esta densidad se siguieron los mismos pasos que se han detallado anteriormente. Con ayuda de una jeringuilla de dispensación de insulina de 1mL, se introdujeron por el lateral del *scaffold* 20 $\mu\text{L}$  (Figura 13) de suspensión celular, y se dejaron incubar durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, se cambiaron de pocillo y tras añadir medio de cultivo se dejaron en el incubador.

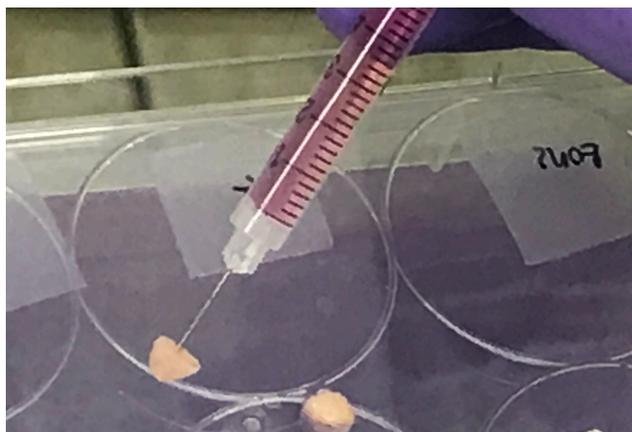


Figura 13 - Inyección de los fibroblastos L929 en el interior del scaffold.

Pasadas 48 horas se realizó un cambio de medio de cultivo, retirando el que había y reemplazándolo con medio fresco. Pasadas 96 horas se dio por finalizado el cultivo y se procedió al acondicionamiento de los materiales celulares para poder analizar los resultados.

Para poder visualizar las células, se retiró el medio de cultivo y se lavaron los pocillos con DPBS. Se añadió formaldehído (Panreac) para fijar las células, dejándose actuar durante 20 minutos. Seguidamente, para lavar el formaldehído se preparó una disolución de DPBS y azida sódica (Sigma-Aldrich) al 0,05% w/v. Tras retirarlo, se añadió a cada pocillo una disolución de sacarosa y agua Mili-Q al 30% en volumen. Se dejó actuar durante 2 horas para que la disolución penetrara por completo en los poros de los *scaffolds*.

Seguidamente, para poder realizar posteriormente cortes finos de los materiales con un criostato, se incluyó cada muestra en unos 2 mL de O.C.T *Compound*, un compuesto para corte de tejidos congelados (*Embedding medium for frozen tissue specimens to ensure Optimal Cutting Temperature*, en inglés, Surgipath) y se dejó 48 horas en nevera entre 2 y 5°C, para permitir a este fluido tan viscoso introducirse en el interior de los poros y la membrana plasmática de las células. Pasado este tiempo, se pasaron a un congelador a -30°C (temperatura de corte) y se dejaron 24 horas más.

Una vez estaban las muestras preparadas, se utilizó el criostato (Leica, CM 1520) para realizar cortes de 15  $\mu\text{m}$  de espesor. Los cortes se recogieron con portaobjetos de vidrio tratados para poder observarlos al microscopio posteriormente.

Para la visualización al microscopio se realizaron dos tinciones: la mitad de las muestras se tiñeron con tinción Giemsa (Acros) y la otra mitad con tinción azul de Coomassie (Panreac). Antes de realizar estas tinciones, se consideró teñir las células con tintes fluorescentes y visualizarlas al microscopio de fluorescencia. Sin embargo, no fue posible obtener imágenes en las que se distinguiera la localización de las células, porque el PGS presenta una marcada autofluorescencia en todo el espectro ultravioleta-visible. Para poder teñir bien las células, primero se realizaron 2 lavados de DPBS durante 5 minutos cada uno a las muestras, con el objetivo de eliminar los restos de *O.C.T Compound* que quedaban en el portaobjetos. A continuación se preparó en el caso de la tinción Giemsa, una disolución 1/10 en volumen, 1 mL de Giemsa y 9 mL de tampón fosfato GDH (*Glutamate Dehydrogenase*, en inglés) de pH=6,8. Se añadieron 400µL de esta disolución a cada portaobjetos, y el mismo volumen a las muestras que tiñeron con azul de Coomassie. Se dejó actuar la tinción durante 15 minutos en el caso de Giemsa y 30 minutos en el caso de Coomasie. Transcurrido este tiempo, se realizaron sucesivos lavados con DPBS en el caso de Giemsa, y con una disolución preparada al 40% de metanol, 10% de ácido acético glacial y 50% agua destilada, en volumen, en el caso de Coomassie.

Una vez lavadas, las muestras se montaron con un medio de montaje preparado con 80% de glicerol y 20% de agua, añadiendo 10µL de dicha disolución a cada muestra, y se cubrió cada una con un cubreobjetos para visualizarlas en el microscopio óptico.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización morfológica

A continuación se muestran los resultados correspondientes a la caracterización morfológica realizada con microscopía FESEM, tanto del *scaffold* estratificado como de las membranas microporosas obtenidas independientemente. Así mismo se adjuntan también imágenes de la nanosal, que han servido para poder observar su aspecto y determinar sus dimensiones tanto macro como microscópicamente.

En primer lugar, se presentan en la figura 14 las membranas microporosas obtenidas empleando films de PGS no poroso como soporte para fabricarlas, con las distintas condiciones que se han descrito en el apartado 3.4.2. Aunque existen diferencias entre los experimentos, se puede apreciar que la mayoría de los poros tienen una morfología ovalada o esférica, observándose un reducido número de poros con morfología alargada (como el poro de mayor tamaño de la condición 20% porógeno, secado en liofilizadora, 1 minuto de inmersión en agua antes del curado, figura 14). En cuanto a las dimensiones de estos poros, se observan algunos poros de tamaño mayor que pueden deberse a agregados en la nanosal o defectos en la superficie. Sin embargo, el diámetro de una gran proporción de los poros está alrededor de las 20  $\mu\text{m}$  (longitud equivalente a la barra de escala). En cuanto a las diferencias entre las condiciones, se aprecia que las muestras secadas en liofilizadora tienen un mayor número de poros que las secadas en desecador, donde seguramente parte de los poros habrán colapsado, es decir, se habrán cerrado, por un secado más lento. Además, si se pone el punto de mira en el tiempo de inmersión en agua, cuanto mayor tiempo están sumergidas en agua se observa una mayor cantidad de poros. Esto se debe a que al sumergir en agua queda algo más de porógeno expuesto a la superficie.

Considerando las tres variables posibles en el procedimiento de síntesis de las membranas microporosas, y atendiendo a estos resultados, se decidió escoger para la fabricación del *scaffold* con porosidad estratificada las condiciones de 40% en peso de nanosal, sin inmersión en agua y secando en liofilizadora. Estas condiciones se escogieron teniendo en cuenta que la porosidad de la membrana debe ser elevada para que pueda existir un intercambio de fluidos entre las diferentes capas del *scaffold*, pero no demasiado ya que si existen demasiados poros pueden fusionarse entre ellos creando un poro de un tamaño superior al celular, permitiendo así a las células el movimiento entre la capa intersticial y las externas. Además, la posibilidad de no tener que introducir el *scaffold* en agua resultaba ventajoso de cara a la fabricación del *scaffold* completo, pues para la zona intersticial también se utilizó la sal como porógeno, y exponer el conjunto al agua podía provocar un lavado parcial del porógeno de la zona central en un momento en que aún no era conveniente, antes del curado de las membranas. En cuanto al procedimiento de secado, se escogió en desecador por su mayor facilidad. En vistas a la fabricación de productos de este tipo, se intenta siempre que los procedimientos impliquen el mínimo consumo de productos tóxicos que podrían quedar retenidos y por tanto se han de eliminar, los tiempos sean los más cortos posible y la tecnología usada la más sencilla, porque eso abarata el precio final.

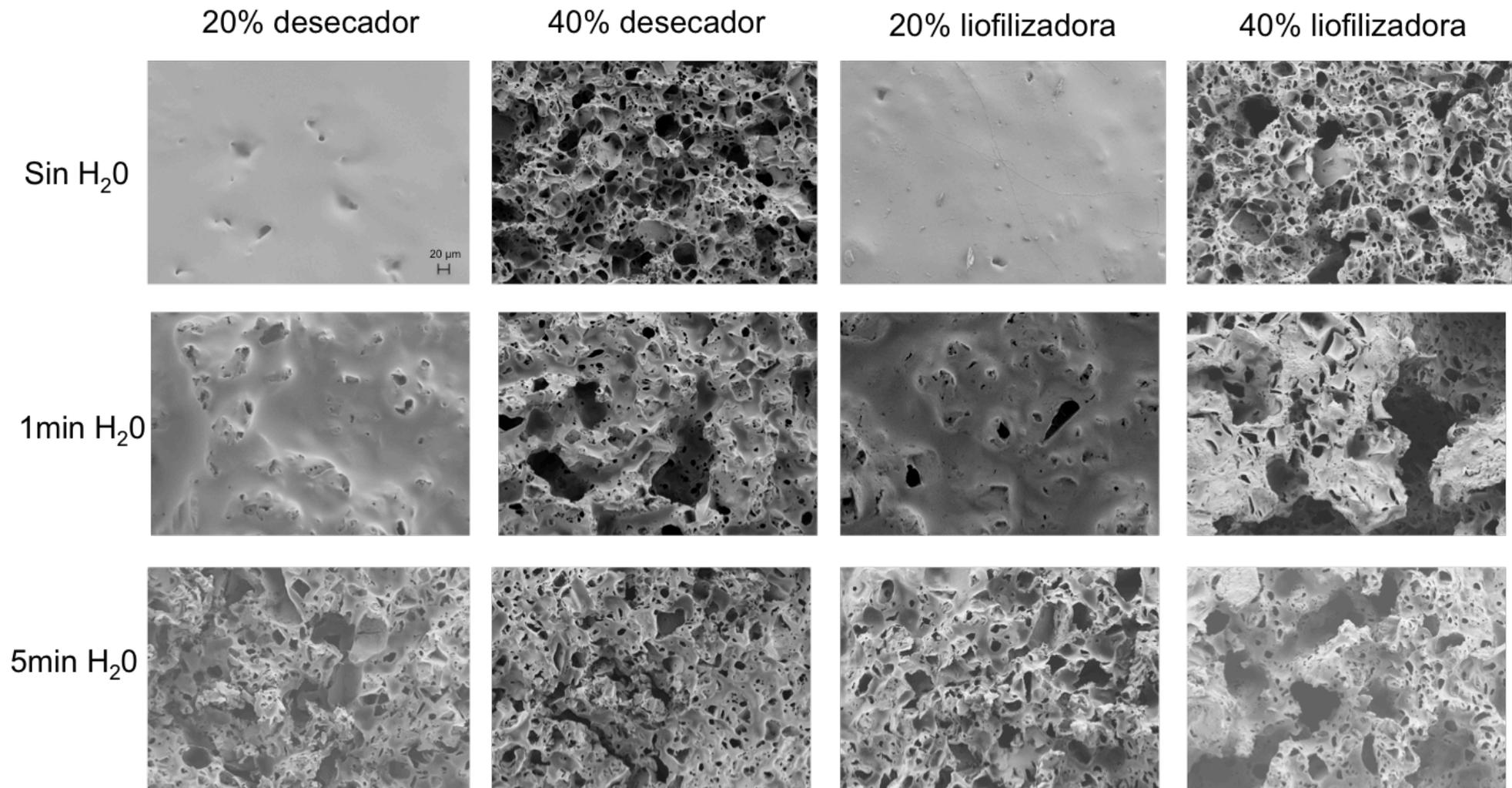


Figura 14 - Imágenes FESEM de la superficie de las membranas obtenidas con un 20 y 40% de nanosal como porógeno, variando el tiempo de inmersión en agua y el secado tras el curado. La barra de escala, en la primera imagen, es la misma para las demás.

A continuación, en la figura 15 se muestran imágenes del porógeno, utilizado para crear las membranas microporosas, la nanosal.

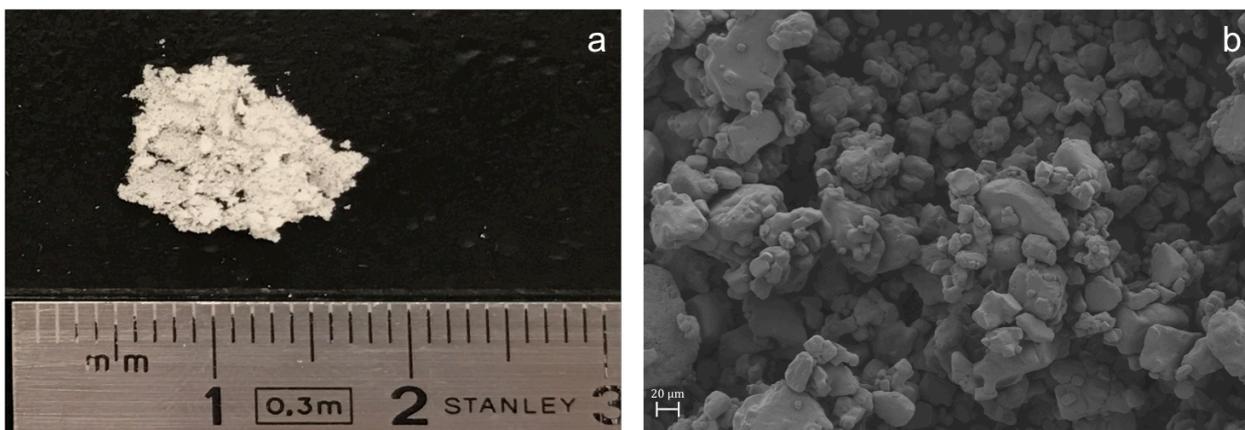


Figura 15 - Imágenes de la nanosal. (a) Imagen macroscópica del aspecto de la nanosal. (b) Imagen FESEM de la nanosal a 200 aumentos. Barra de escala: 20 micras.

Para determinar el diámetro de las partículas de esta nanosal, se ha utilizado el programa de análisis de imágenes ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos), que permite introducir una distancia conocida en la imagen (en este caso la barra de escala) y a partir de ella realizar medidas sobre la imagen. En la figura 16a se muestra la zona de la imagen en la que se tomaron las medidas, y en la figura 16b se muestran los resultados obtenidos para la medida de 20 partículas.

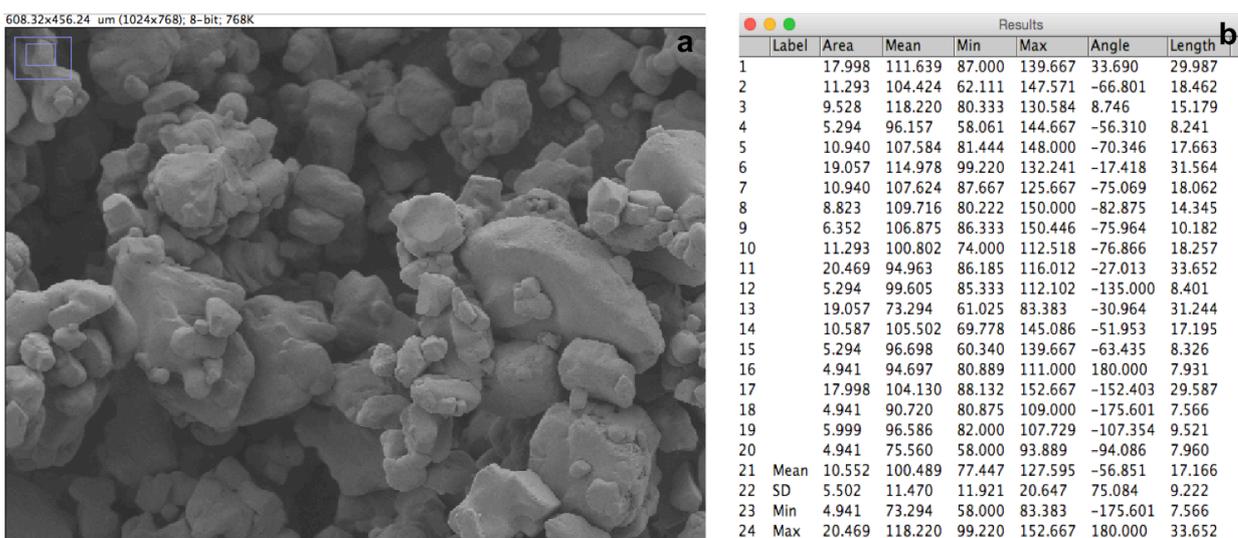
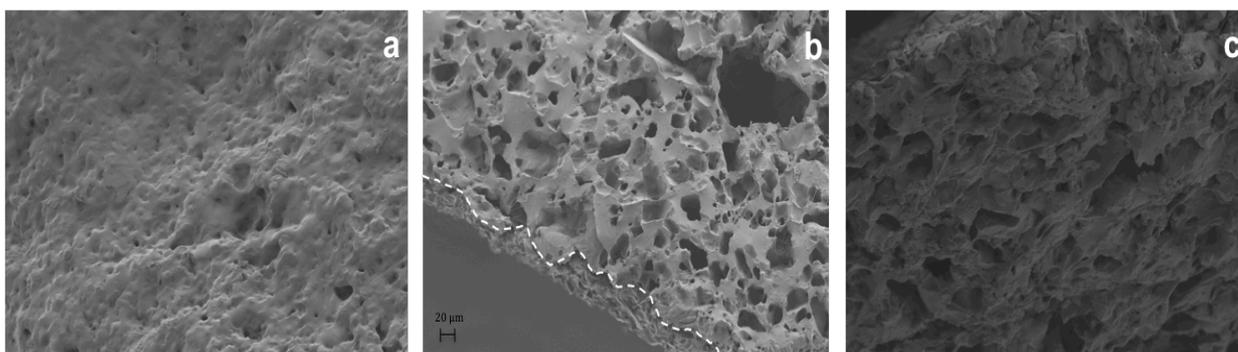


Figura 16 - Análisis del tamaño de las partículas de nanosal con ImageJ. (a) Zona de la imagen seleccionada para realizar la medición. (b) Resultados de la medición

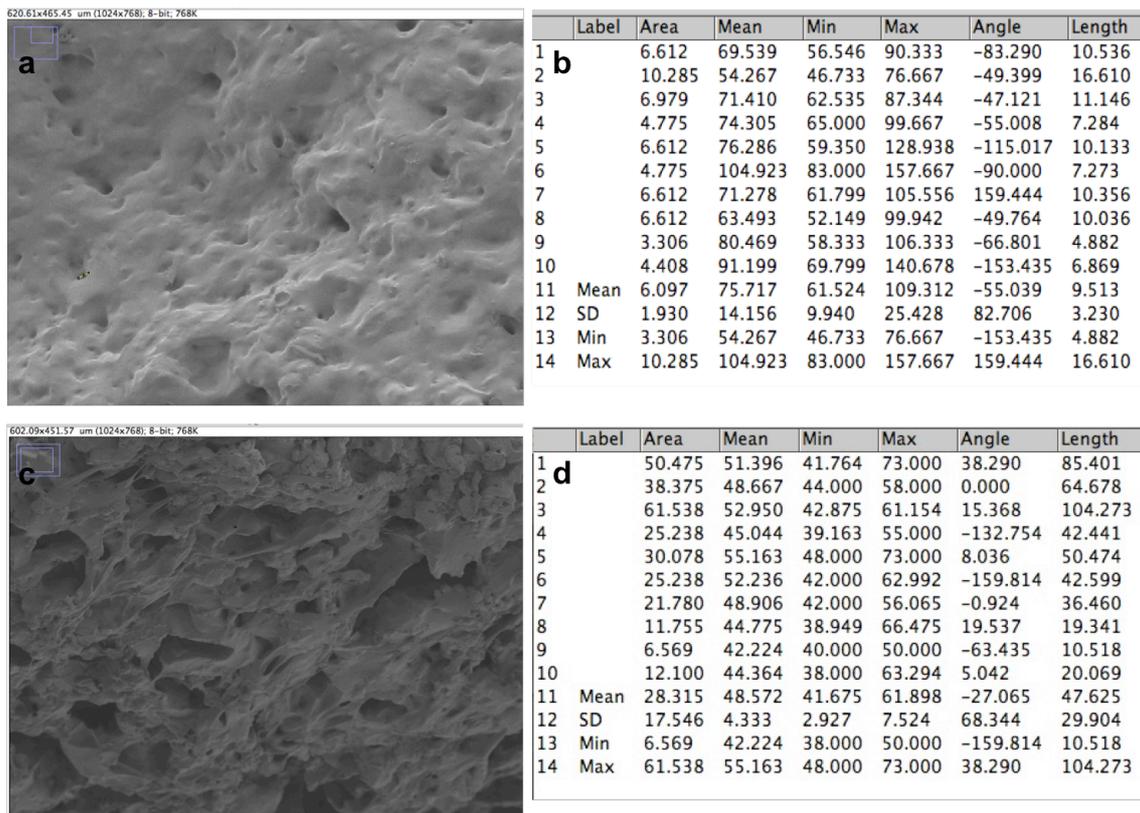
En la figura 16b, la columna de interés es la última, puesto que muestra la longitud en micrómetros de la línea que se trazó cada vez para medir el diámetro equivalente que circunscribe las partículas. Por ello, cada valor en esta columna representa el diámetro de una de las partículas. El programa ImageJ realiza también la media de las medidas realizadas, situada en la fila 21, siendo la media de los diámetros de las partículas de nanosal de 17,188  $\mu\text{m}$ .

En cuanto al *scaffold* estratificado, su morfología se muestra en la figura 17 en la que se ilustra un corte transversal con una línea punteada (Figura 17b) que muestra dónde se encuentra la intercara entre la membrana microporosa (en la parte de abajo) y la zona central (en la parte de arriba), entre las que hay continuidad. En dicha imagen se puede observar con claridad la diferencia de tamaños entre los poros de la membrana microporosa (Figura 17a) y los poros de la zona central (Figura 17c). Se aprecia que el tamaño de poro es inferior en la membrana microporosa, y para tener una medida más objetiva de estos tamaños se ha utilizado un procedimiento equivalente a la cuantificación del diámetro de las partículas de nanosal.



*Figura 17 - Imágenes FESEM del scaffold estratificado a 200 aumentos. (a) Detalle de la membrana microporosa. (b) Corte transversal en el que se observa a la izquierda de la línea punteada la membrana microporosa y a la derecha la zona central del scaffold estratificado. (c) Detalle de la zona central. Barra de escala: 20 micras.*

En la figura 18 se presentan los resultados para las membranas externas y para el *scaffold* central, de la misma manera que en la figura 16.



*Figura 18 - Análisis del tamaño de los poros con ImageJ. Región de la imagen de la membrana microporosa (a) o la zona central (c) seleccionadas para realizar la medición. Resultados de las mediciones de los poros de la membrana microporosa (b) y la zona central (d).*

Los resultados de la medición realizada con ImageJ confirman lo que antes se había observado cualitativamente, puesto que el diámetro promedio de los poros medidos en la membrana microporosa es de 9,513  $\mu\text{m}$ , siendo inferior al de la zona central, que es de 47,625  $\mu\text{m}$ . Los poros de la membrana microporosa pueden, por tanto, considerarse de tamaño subcelular, puesto que el tamaño de las células de mamífero es de, en promedio, entre 15 y 60  $\mu\text{m}$ . (Geneser, Brüel, Christensen, Trantum-Jensen & Qvortrup, 2014)

En cuanto a la morfología de los poros, existen diferencias entre los de la membrana microporosa y los de la zona central; ya que los de la membrana microporosa tienen una morfología más parecida entre ellos, siendo todos prácticamente esféricos, mientras que los poros de la membrana central tienen una mayor dispersión en cuanto a su forma, existiendo poros tanto esféricos como alargados, en forma elíptica.

Por último, al analizar la interconectividad entre los poros, se observa que sí existe alta interconectividad cuando el tamaño de poro es elevado, pudiéndose apreciar gargantas de interconexión. Sin embargo, en los poros más pequeños no se aprecian dichas gargantas. La existencia de esta interconectividad depende del grado de compactación del porógeno, siendo éste directamente proporcional al tamaño de estas gargantas de interconexión. Si hay un grado de compactación bajo del porógeno, puede que las partículas no estén en contacto unas con otras, siendo imposible que se cree una conexión entre ellas. A medida que aumenta el grado de compactación, y una vez las partículas de NaCl ya tienen contacto entre ellas, la garganta de interconexión crece puesto que la zona de contacto entre las partículas va aumentando. En el caso del *scaffold* estratificado, la existencia de interconexión en la zona central (poros de mayor tamaño) y la ausencia de esta en las membranas microporosas se debe al proceso de fabricación, ya que para fabricar la zona central se utilizaron varillas de vidrio y pesos que favorecían esta compactación, y en cambio para fabricar las membranas microporosas no había ningún elemento que compactara la nanosal utilizada como porógeno.

Para terminar con la caracterización morfológica, se muestra en la figura 19 una imagen a nivel macroscópico de una sección transversal de un *scaffold* estratificado, teñido con la tinción Giemsa (como se ha descrito en el apartado 3.6.2.2). Esta tinción es una combinación de eosina (que es una sustancia ácida y por tanto tiñe sustancias básicas) y azul de metileno (que es una sustancia básica y por tanto tiñe sustancias ácidas). Aunque esta tinción tiñó todo el *scaffold* y no fue útil para diferenciar las células, sí permite diferenciar macroscópicamente y de manera muy evidente las capas externas del *scaffold* (en magenta) y las internas (en violeta). Cabe destacar que la apariencia de la muestra de la figura 19, era análoga para las muestras en las que se había hecho el cultivo en la zona intersticial y las que se habían sembrado en la zona externa, lo que descartaba la posibilidad de que la coloración heterogénea se debiese a una acumulación local de cuerpos celulares.



Figura 19 - Corte del *scaffold* estratificado teñido con la tinción GIEMSA.

## 4.2 Comportamiento mecánico a compresión

Las curvas tensión-deformación obtenidas tanto para los films como para los *scaffolds* estratificados se muestran en la figura 20. Los films muestran el comportamiento típico de elastómeros, con una zona elástica con deformaciones unitarias bajas, sin el *plateau* típico de los termoplásticos al plastificar. Los *scaffolds*, por su naturaleza porosa, tienen dos zonas diferenciadas en cuanto a la relación tensión-deformación, puesto que en una primera zona, de baja tensión, la aplicación de la tensión provoca que los poros vayan colapsando poco a poco, y la segunda zona, de alta tensión, corresponde al comportamiento una vez los poros han colapsado, y por tanto se asemeja al comportamiento de los films no porosos. Por ello, para el cálculo del módulo de Young se ha diferenciado, en el caso de los *scaffolds*, estas dos zonas distintas, correspondientes a los niveles de tensión entre 0 y 5 KPa para la primera zona (figura 21), y entre 100 y 150 KPa para la segunda zona (figura 22). En el caso de los films, como sólo presentan un comportamiento, se ha calculado el módulo de Young entre 100 y 150 KPa. (figura 23)

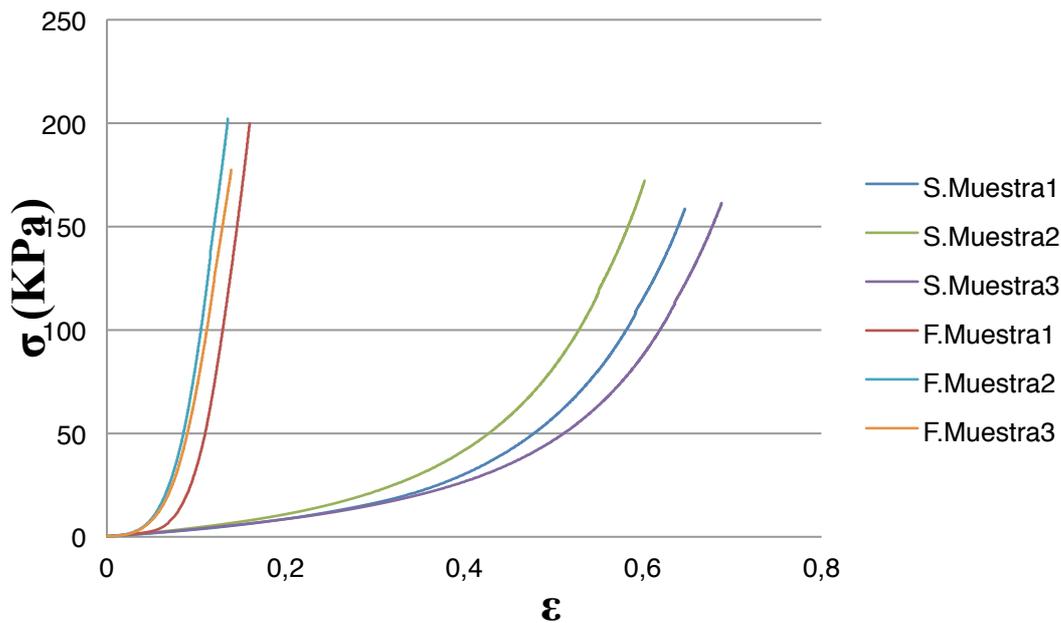


Figura 20 - Curvas tensión-deformación unitaria para scaffolds y films.

Para realizar el cálculo del módulo de Young o módulo elástico se ha obtenido una interpolación lineal de los puntos comprendidos en los rangos de tensión analizados. Así, el módulo de Young corresponde directamente a la pendiente de la recta obtenida para las distintas muestras en cada caso.

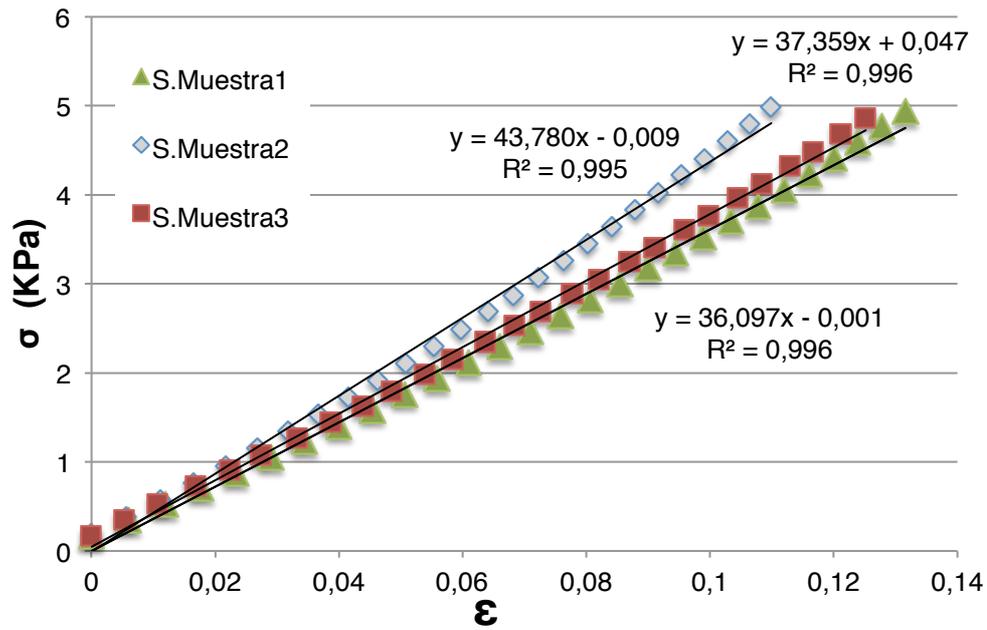


Figura 21 - Tramo lineal en el que se ha calculado el módulo de Young para los scaffolds a tensiones bajas (entre 0 y 5 KPa).

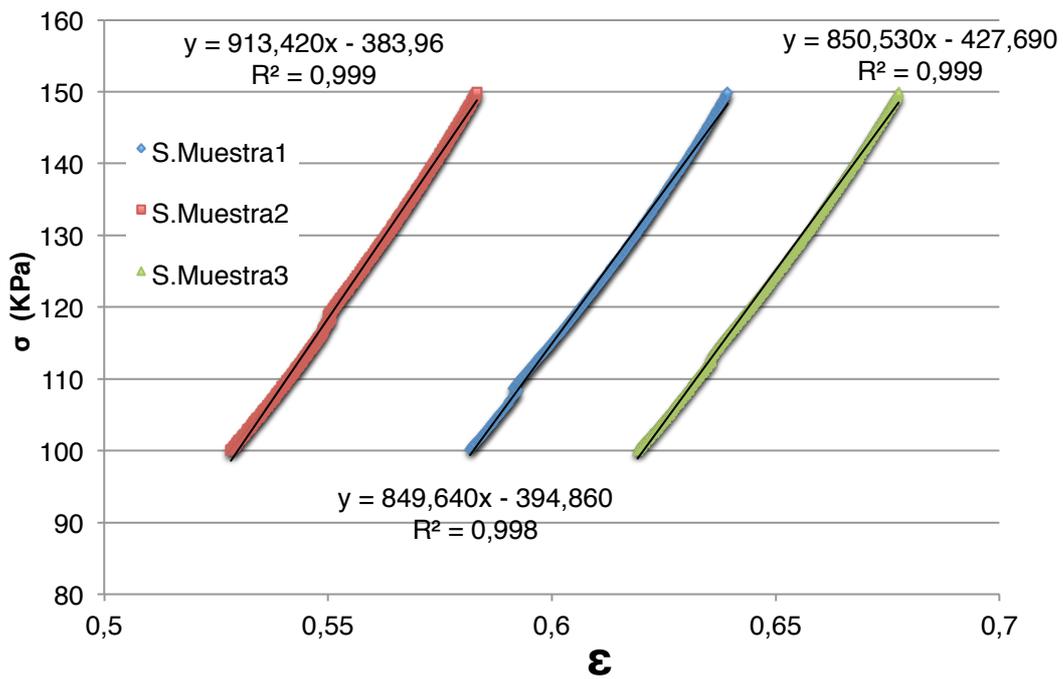


Figura 22 - Tramo lineal en el que se ha calculado el módulo de Young para los scaffolds a tensiones altas (entre 100 y 150 KPa).

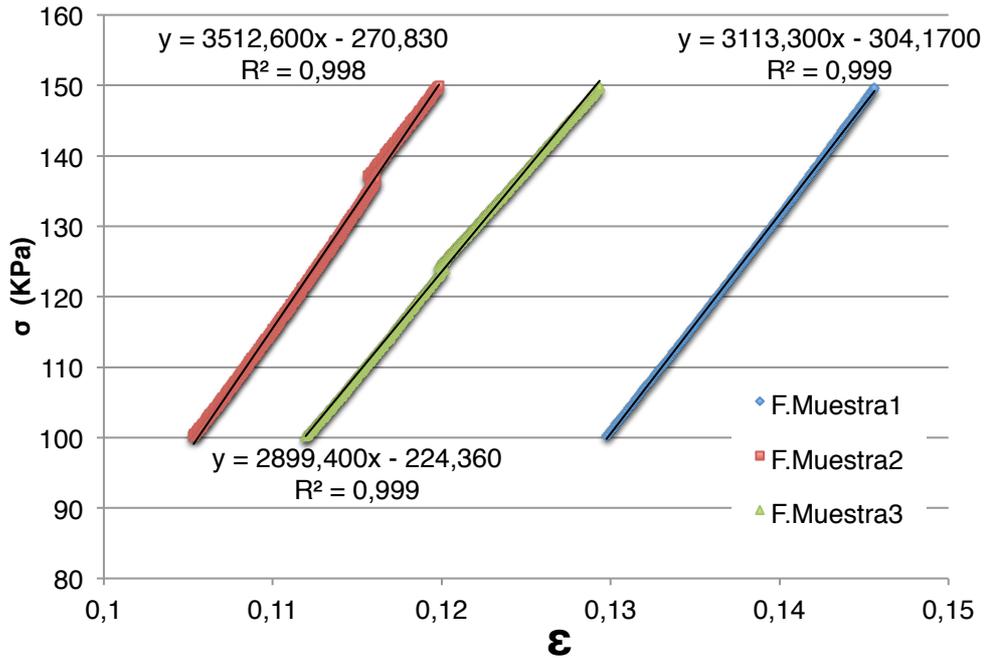


Figura 23 - Tramo lineal en el que se ha calculado el módulo de Young para los films (entre 100 y 150 KPa)

En la tabla 2 se recogen los valores promedio de los módulos de Young (E) calculados para cada muestra, junto con el coeficiente de determinación obtenido en cada uno de los cálculos ( $R^2$ ).

Tabla 2 - Valor promedio del módulo de Young y del coeficiente de determinación para todas las muestras ensayadas.

MUESTRA	E (KPa)	$R^2$
<b>Scaffolds - baja <math>\sigma</math></b>	39,079±4,120	0,996±0,001
<b>Scaffolds - alta <math>\sigma</math></b>	871,97±36,569	0,999±0,001
<b>Films</b>	3175,100±311,236	0,999±0,001

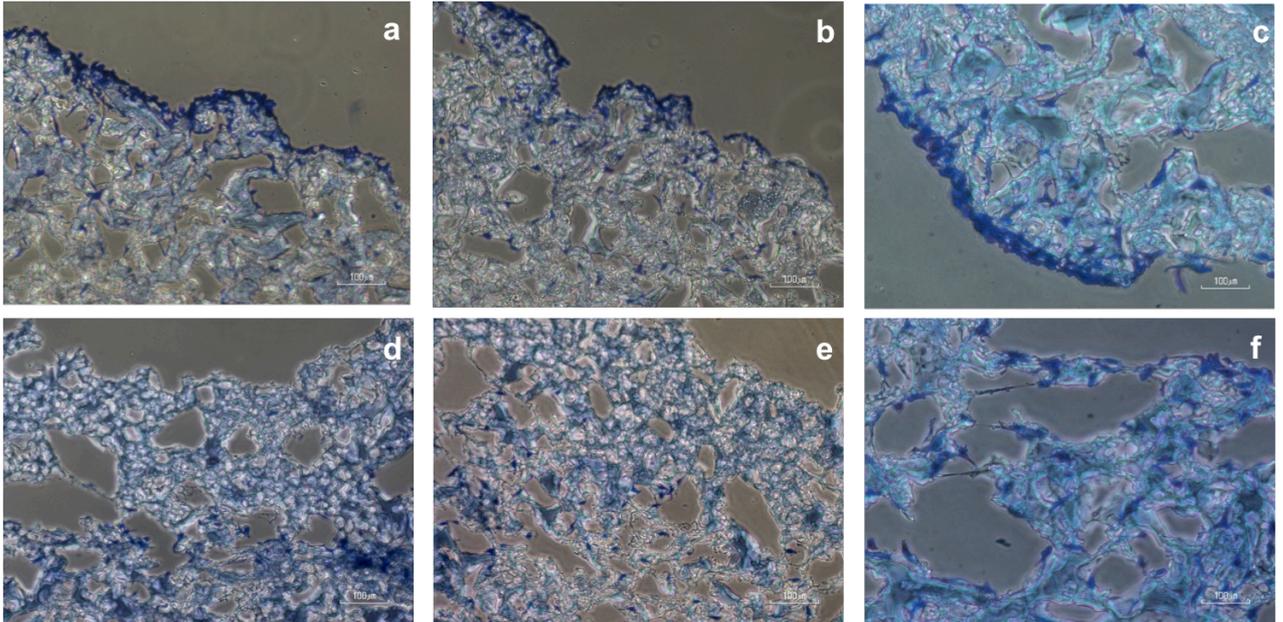
Tal y como muestra la tabla 2, existe una diferencia evidente de comportamiento entre films y *scaffolds*, a pesar de tener una composición idéntica: el módulo elástico de los *scaffolds* es mucho menor que el de los films. Esto ocurre porque los *scaffolds* son porosos, y en cambio los films son materiales no porosos, compactos. A bajas deformaciones, los *scaffolds* presentan un módulo elástico menor debido a la porosidad existente en ellos. A medida que los poros colapsan, cuando se llega a la zona de altas deformaciones, el módulo elástico de los *scaffolds* crece debido a

este colapso. Sin embargo, el módulo elástico de los films sigue siendo más elevado, ya que la no existencia de poros les permite tener una mejor distribución de las fuerzas, por lo que son capaces de soportar un valor de tensión mayor sin aumentar tanto su deformación. En cualquier caso, los módulos elásticos de ambos muestran valores propios de elastómeros, y concuerdan con los descritos en bibliografía para el PGS, que son de entre 0,5 y 4 MPa, dependiendo de las condiciones de síntesis (Conejero-García *et al.*, 2017 y Chen *et al.*, 2008).

### 4.3 Cultivo celular

Como se ha descrito anteriormente, se realizó un primer cultivo exploratorio, para conocer si los *scaffolds* preparados podían ser de utilidad para la aplicación propuesta. Así, se realizó un cultivo disponiendo las células en la cara externa y otro con estas en el interior de los *scaffolds*, con el fin de comprobar que no había migración de un lado al otro de la membrana porosa.

La tinción Coomasie utilizada para teñir el *scaffold* estratificado tras el cultivo es una tinción que tiñe específicamente proteínas. Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes que existen en las células, desempeñando un gran número de funciones, tales como la contracción muscular, proporcionar soporte a las células, almacenamiento de aminoácidos.... (Muñoz *et al.*, 2011). Por ello, como las proteínas están presentes en todas las células, la tinción Coomasie permite discriminarlas. En este caso, el material también se tiñó levemente (en la figura 24, las zonas azul más claro), aunque la tinción es mucho más fuerte en las células (en la figura 24, el azul más oscuro), y permite distinguir claramente dónde se localizan.



*Figura 24 - Imágenes de microscopio óptico de los scaffolds estratificados con la tinción Coomassie. (a, b y c) Cultivo celular en zona externa; (a y b) Magnificación 10x, (c) Magnificación 20x. (d, e y f) Cultivo celular en la zona intersticial; (d y e) Magnificación 20x, (f) Magnificación 20x.*

En el caso del cultivo que se realizó en zona externa y se puso en contacto con la células, estas se localizan preferentemente en la parte externa de la membrana microporosa (Figura 24a, 24b y 24c). Se aprecia un reducido número de células en la parte central del *scaffold*, que pueden haber migrado debido a pequeños defectos en la membrana o agregados de nanosál que han dejado poros de mayor tamaño. En cualquier caso, se observa que una gran parte de la población celular no fue capaz de atravesar la membrana, quedándose adheridas en monocapa a la superficie externa de ésta. Esta distribución en monocapa es característica del tipo celular empleado, fibroblastos L929, así como de otros tipos celulares como las células epiteliales.

En lo referente al cultivo que se realizó en la zona central del *scaffold* (Figura 24d, 24e y 24f) se pone de manifiesto también la eficacia de la membrana microporosa como barrera física, ya que la mayoría de la población celular se concentra donde se había realizado la siembra, no encontrándose cuerpos celulares en la periferia del *scaffold*. También se comprobó durante el cultivo que no había células en el fondo de los pocillos de las placas de cultivo que hubieran podido salir del interior del *scaffold*.

Por todo ello, se puede afirmar que las membranas microporosas que se han diseñado cumplen con el objetivo marcado, puesto que consiguen evitar el movimiento bidireccional de las células, tanto del interior al exterior como del exterior al interior. Es razonable pues, pensar, que si se cultivaran células de distintos tipos celulares en el interior y en el exterior del *scaffold*, interactuarían químicamente, pero no entrarían en contacto físico, que será lo que se deberá probar en un futuro, fuera ya del marco de este TFG.

## 5. CONCLUSIONES

En este Trabajo de Fin de Grado se han obtenido de manera exitosa *scaffolds* de poliglicerol sebacato con porosidad estratificada con los tamaños de poro deseados, siendo el diámetro promedio de poro en las membranas de 9,5  $\mu\text{m}$  y de 47,6  $\mu\text{m}$  en la zona intersticial.

En cuanto al procedimiento de obtención de estos *scaffolds*, se basa en utilizar partículas de sal (cloruro sódico) de distinto tamaño como porógeno en ambas partes del *scaffold* estratificado, lo que permite la preparación del mismo en dos pasos, obteniendo así un *scaffold* sin interfases. Además, facilita el lavado para eliminar el porógeno puesto que al tratarse del mismo porógeno no deben emplearse disolventes diferentes para las distintas zonas del *scaffold*.

El cultivo celular llevado a cabo sobre las membranas, con poros subcelulares, y en la zona central de los *scaffolds*, con poros de tamaño mayor, ha demostrado que estos *scaffolds* estratificados permiten alojar células viables en tanto en el interior como en el exterior de esta, a la vez que se ha conseguido que cumplan el objetivo que se propuso: servir de barrera física, evitando la migración de células hacia o desde el interior, pero permitiendo el paso de medio de cultivo y otros factores quimiotácticos.

En relación al comportamiento mecánico de los *scaffolds* estratificados, gracias a la caracterización a compresión realizada se ha observado que tienen un comportamiento típicamente de elastómeros, con deformaciones mayores en el primer rango de fuerzas aplicadas, debido al colapso parcial de los poros, y menores en la segunda zona. Obviamente, al realizar cultivos con estos *scaffolds* insertados en un dispositivo microfluídico, se habría de evitar llegar a estas tensiones (gobernadas principalmente por la diferencia de presión entre cámaras del dispositivo), que comprometerían la viabilidad de las células cultivadas en su interior.

Tras todas estas consideraciones, se puede afirmar que se ha conseguido desarrollar un *scaffold* de porosidad estratificada, con poros capaces de albergar células en su parte central, y poros de tamaño subcelular en las capas externas actuando como barrera, pudiendo servir así de soporte para un cocultivo celular indirecto.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Areizaga, J., Cortázar, M., Elorza, J., & Iruin, J. (2002). *Polímeros* (2nd ed.). Madrid: Síntesis, D.L.

Conejero-García, Á., Gimeno, H., Sáez, Y., Vilariño-Feltrer, G., Ortuño-Lizarán, I., & Vallés-Lluch, A. (2017). Correlating synthesis parameters with physicochemical properties of poly(glycerol sebacate). *European Polymer Journal*, 87, 406-419. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.001>

Chen, Q., Bismarck, A., Hansen, U., Junaid, S., Tran, M., & Harding, S. et al. (2008). Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue. *Biomaterials*, 29(1), 47-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.09.010>

Engelmayr, G., Cheng, M., Bettinger, C., Borenstein, J., Langer, R., & Freed, L. (2008). Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy. *Nature Materials*, 7(12), 1003-1010. <http://dx.doi.org/10.1038/nmat2316>

Gao, J., Crapo, P., & Wang, Y. (2006). Macroporous Elastomeric Scaffolds with Extensive Micropores for Soft Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, 12(4), 917-925. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.2006.12.917>

Geneser, F., Brüel, A., Christensen, E., Trandum-Jensen, J., & Qvortrup, K. (2014). *Geneser Histología* (4th ed.).

Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal Of Research Of The National Bureau Of Standards Section A: Physics And Chemistry*, 81A(1), 89. <http://dx.doi.org/10.6028/jres.081a.011>

Loh, X., Abdul Karim, A., & Owh, C. (2015). Poly(glycerol sebacate) biomaterial: synthesis and biomedical applications. *J. Mater. Chem. B*, 3(39), 7641-7652. <http://dx.doi.org/10.1039/c5tb01048a>

Muñoz, F., García, R., Martínez-Liarte, J., Martínez, J., Cascales, J., & Teruel, J. (2011). *Bioquímica y Biología Molecular* (3rd ed.). España: McGraw-Hill España.

Radisic, M., Park, H., Martens, T., Salazar-Lazaro, J., Geng, W., & Wang, Y. et al. (2008). Pre-treatment of synthetic elastomeric scaffolds by cardiac fibroblasts improves engineered heart tissue. *Journal Of Biomedical Materials Research Part A*, 86A(3), 713-724. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.31578>

Rai, R., Tallawi, M., Grigore, A., & Boccaccini, A. (2012). Synthesis, properties and biomedical applications of poly(glycerol sebacate) (PGS): A review. *Progress In Polymer Science*, 37(8), 1051-1078. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.02.001>

Ratner, B., Hoffman, A., Schoen, F., & Lemons, J. (2014). *Biomaterials Science* (1st ed.). Saint Louis: Elsevier Science

Redenti, S., Neeley, W., Rompani, S., Saigal, S., Yang, J., & Klassen, H. et al. (2009). Engineering retinal progenitor cell and scrollable poly(glycerol-sebacate) composites for expansion and subretinal transplantation. *Biomaterials*, 30(20), 3405-3414. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.02.046>

Sun, Z., Chen, C., Sun, M., Ai, C., Lu, X., & Zheng, Y. et al. (2009). The application of poly (glycerol-sebacate) as biodegradable drug carrier. *Biomaterials*, 30(28), 5209-5214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.007>

Wang, Y., Ameer, G., Sheppard, B., & Langer, R. (2002). A tough biodegradable elastomer. *Nature Biotechnology*, 20(6), 602-606. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0602-602>

Young, R., & Lovell, P. (2011). *Introduction to polymers* (3rd ed.). Boca Raton: CRC Press



# **DOCUMENTO II: PRESUPUESTO**

## 1. OBJETIVO Y ESTRUCTURA

El objetivo del presupuesto que a continuación se detalla es realizar una valoración económica del presente Trabajo de Fin de Grado.

El presupuesto se ha organizado en 4 capítulos. Los dos primeros son síntesis y caracterización de los materiales, y recogen los reactivos, equipos y material necesario para desarrollar las actividades que en ellos se detallan. Los dos últimos son material de protección individual y personal, que recogen la equipación de protección personal y las horas que han sido necesarias para la realización del proyecto.

También se ha incluido un apartado en el que se ha calculado el coste unitario de los *scaffolds* estratificados.

En cuanto a los equipos utilizados, se han presupuestado en función de la amortización ( $A$ ), calculando el precio unitario por hora en función del coste del equipo ( $C$ ), el tiempo usado ( $t$ ) y el periodo de amortización ( $T$ ), que para todos los equipos se ha considerado de 10 años:

$$A = \frac{t \cdot C}{T} \quad (VI)$$

## 2. PRESUPUESTO DESGLOSADO

### Capítulo 1: Síntesis de materiales

#### 1.1 Prepolimerización de PGS

Cantidad	Unidad	Descripción	Precio Unitario (€)	Total (€)
1	u	Balón de reacción con 3 boquillas	100,00 €	100,00 €
1	u	Trampa de vacío	15,00 €	15,00 €
16,5	g	Glicerol	0,14 €	2,31 €
71,2	g	Ácido sebácico	0,18 €	12,82 €
120	h	Placa calefactora	0,01 €	1,20 €
2	u	Imán de agitación magnética	1,69 €	3,37 €
1	u	Vaso de precipitados 1 L	16,84 €	16,84 €
1	u	Vaso de precipitados 50 mL	2,29 €	2,29 €
1	u	Cuchara-espátula de acero inoxidable	3,32 €	3,32 €
<b>TOTAL</b>				<b>157,15 €</b>

#### 1.2 Films de PGS

Cantidad	Unidad	Descripción	Precio Unitario (€)	Total (€)
3	u	Placas de vidrio cuadradas	8,00 €	24,00 €
1	u	Lámina de teflón	9,00 €	9,00 €
18	u	Pinzas de sujeción	1,05 €	18,90 €
1	u	Pipeta Pasteur	0,04 €	0,04 €
48	h	Horno de ventilación forzada	0,02 €	1,07 €
3	u	Recipiente de plástico 100ml	0,85 €	2,55 €
360	mL	Tetrahidrofurano	0,09 €	32,40 €
210	mL	Etanol	0,01 €	2,10 €
210	mL	Agua Mili-Q	0,01 €	2,10 €
1	u	Placa Petri de vidrio	2,32 €	2,32 €
24	h	Desecador de vacío	0,02 €	0,48 €
<b>TOTAL</b>				<b>94,96 €</b>

### 1.3 Scaffold intersticial

Cantidad	Unidad	Descripción	Precio Unitario (€)	Total (€)
6	g	Cloruro de sodio (NaCl)	0,01 €	0,06 €
2	u	Cuchara-espátula de acero inoxidable	3,32 €	6,64 €
20	g	Sulfato potásico (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,05 €	1,00 €
1	u	Molde circular de teflón con agujeros pasantes	3,00 €	3,00 €
4	u	Varilla de vidrio	0,60 €	2,40 €
96	h	Horno de ventilación forzada	0,02 €	1,73 €
1	u	Pipeta Pasteur	0,04 €	0,04 €
4	u	Recipiente de plástico 100ml	0,85 €	3,40 €
400	mL	Agua Destilada	0,01 €	4,00 €
300	mL	Tetrahidrofurano	0,09 €	27,00 €
210	mL	Etanol	0,01 €	2,10 €
210	mL	Agua Mili-Q	0,01 €	2,10 €
1	u	Placa Petri de vidrio	2,32 €	2,32 €
24	h	Desecador de vacío	0,02 €	0,48 €
<b>TOTAL</b>				<b>56,27 €</b>

#### 1.4 Membranas microporosas

Cantidad	Unidad	Descripción	Precio Unitario (€)	Total (€)
46,01	g	Dimetilformamida	0,12 €	5,52 €
4,84	g	N-Octano	0,57 €	2,76 €
10	u	Vial de vidrio	0,54 €	5,40 €
192	h	Horno de ventilación forzada	0,02 €	3,47 €
7	u	Placa Petri de vidrio	2,32 €	16,24 €
1	u	Portaobjetos	0,04 €	0,04 €
2	u	Recipiente hermético de vidrio	2,74 €	5,48 €
3	u	Tubos de ensayo	9,33 €	27,99 €
49,5	g	2-Hidroxietil acrilato	0,18 €	8,91 €
0,25	g	Etilenglicol dimetacrilato	0,30 €	0,08 €
0,25	g	Benzoína	0,20 €	0,05 €
4	u	Pipeta Pasteur	0,04 €	0,16 €
4	u	Placas de vidrio cuadradas	8,00 €	32,00 €
10	u	Pinzas de sujeción	1,05 €	10,50 €
6	u	Tubos para horno UV	3,07 €	18,42 €
0,1	m <sup>2</sup>	Nylon	1,00 €	0,10 €
0,54	g	Policaprolactona	0,35 €	0,19 €
2	u	Vial de vidrio	0,54 €	1,08 €
144	h	Horno de ventilación forzada	0,02 €	2,60 €
0,6	g	Cloruro de Sodio (NaCl)	0,01 €	0,01 €
24	h	Desecador de vacío	0,02 €	0,48 €
24	h	Congelador (-80°C)	0,14 €	3,48 €
24	h	Liofilizadora	0,11 €	2,64 €
			<b>TOTAL</b>	<b>147,59 €</b>

## Capítulo 2: Caracterización de materiales

### 2.1 Caracterización morfológica

Cantidad	Unidad	Descripción	Precio Unitario (€)	Total (€)
4	h	Servicio de Microscopía	25,00 €	100,00 €
			<b>TOTAL</b>	<b>100,00 €</b>

### 2.2 Caracterización mecánica

Cantidad	Unidad	Descripción	Precio Unitario (€)	Total (€)
1,5	h	TMA SEIKO SS6000	0,30 €	0,45 €
1	h	Pie de rey digital	0,01 €	0,01 €
			<b>TOTAL</b>	<b>0,46 €</b>

## 2.2 Caracterización biológica

Cantidad	Unidad	Descripción	Precio Unitario (€)	Total (€)
5	u	Tubo Falcon estéril 50mL	0,16 €	0,80 €
5	u	Tubo Falcon estéril 25mL	0,14 €	0,70 €
111,5	mL	DMEM High Glucose	0,03 €	3,35 €
12,5	mL	PBS	0,06 €	0,75 €
1,25	mL	Penicilina/Estreptomicina	0,14 €	0,18 €
4	u	Tubo Eppendorf 1,5mL	0,04 €	0,16 €
0,25	h	Centrífuga	0,04 €	0,01 €
10	u	Pipeta serológica de 5mL	4,72 €	47,20 €
30	u	Pipeta serológica de 10mL	8,48 €	254,40 €
20	u	Pipeta serológica de 25 mL	14,40 €	288,00 €
1	u	Propipeta	125,00 €	125,00 €
3	u	Micropipeta	110,00 €	330,00 €
50	u	Punta de micropipeta	0,01 €	0,50 €
3	u	Frasco para siembra celular 75cm <sup>3</sup>	2,50 €	7,50 €
168	h	Incubador de células a 37°C	0,06 €	10,08 €
1	u	Placa celular de 6 pocillos	4,52 €	4,52 €
1	u	Placa celular de 48 pocillos	4,17 €	4,17 €
72	mL	Etanol	0,01 €	0,72 €
100	mL	DPBS -/-	0,05 €	5,00 €
6	mL	Tripsina/EDTA	0,12 €	0,72 €
1	u	Cámara de recuento celular Neubauer	35,00 €	35,00 €
6	h	Microscopio óptico invertido de contraste de fases	0,13 €	0,79 €
1	u	Aguja INSULIN	0,03 €	0,03 €
5	mL	Formaldehído	0,01 €	0,05 €
0,05	g	Azida sódica	0,49 €	0,02 €
6	g	Sacarosa	0,11 €	0,66 €
50	mL	O.C.T Compound	0,20 €	10,00 €
48	h	Criostato	0,20 €	9,58 €
1	mL	Tinción Giemsa	0,08 €	0,08 €
9	mL	Buffer fosfato (GDH)	0,02 €	0,18 €
2	mL	Tinción Coomassie	0,12 €	0,24 €
5	mL	Destaining solution	0,03 €	0,15 €
<b>TOTAL</b>				<b>1.140,53 €</b>

### Capítulo 3: Material de protección individual

Cantidad	Unidad	Descripción	Precio Unitario (€)	Total (€)
1	u	Bata de laboratorio	18,84 €	18,84 €
x100	u	Guantes de látex	7,48 €	7,48 €
x100	u	Guantes de nitrilo	10,17 €	10,17 €
1	u	Máscara de protección de gases	30,34 €	30,34 €
x2	u	Guantes de protección térmica	30,00 €	30,00 €
			<b>TOTAL</b>	<b>96,83 €</b>

### Capítulo 4: Personal

Cantidad	Unidad	Descripción	Precio Unitario (€)	Total (€)
300	h	Ingeniera Biomédica	35,00 €	10.500,00 €
40	h	Tutor del trabajo	60,00 €	2.400,00 €
40	h	Co-tutor del trabajo	60,00 €	2.400,00 €
			<b>TOTAL</b>	<b>15.300,00 €</b>

### 3. PRESUPUESTO TOTAL DEL PROYECTO

En primer lugar se presenta un resumen de los presupuestos parciales, correspondientes a cada uno de los capítulos. La suma de todos ellos constituye el presupuesto de ejecución material.

---

<i>Capítulo 1 - Síntesis de materiales</i>	
<b>1.1 Prepolimerización de PGS</b>	157,15 €
<b>1.2 Films de PGS</b>	94,96 €
<b>1.3 Scaffold intersticial</b>	56,27 €
<b>1.4 Membranas microporosas</b>	147,59 €
<b>TOTAL</b>	<b>455,97 €</b>

---

---

<i>Capítulo 2 - Caracterización de materiales</i>	
<b>2.1 Caracterización morfológica</b>	100,00 €
<b>2.2 Caracterización mecánica</b>	0,46 €
<b>2.3 Caracterización biológica</b>	1.140,53 €
<b>TOTAL</b>	<b>1.240,99 €</b>

---

---

<i>Capítulo 3 - Material de Protección Individual</i>	
<b>TOTAL</b>	<b>96,83 €</b>

---

---

<i>Capítulo 4 - Trabajo y reuniones</i>	
<b>TOTAL</b>	<b>15.300,00 €</b>

---

A continuación se detalla el presupuesto total. Para calcularlo, se obtiene primero el presupuesto de ejecución por contrata, que se calcula sumando el presupuesto de ejecución material más los gastos generales (un 12% del precio de ejecución material) y más el beneficio industrial (un 6% del precio de ejecución material). Finalmente, el presupuesto total es el de ejecución por contrata más el 21% del I.V.A.

<b>Presupuesto de ejecución material</b>	<b>18.790,75 €</b>
<b>Gastos generales (15%)</b>	<b>2.818,61 €</b>
<b>Beneficio industrial (6%)</b>	<b>1.127,45 €</b>
<b>Presupuesto de ejecución por contrata</b>	<b>22.736,81 €</b>
<b>I.V.A (21%)</b>	<b>4.774,73 €</b>
<b>PRESUPUESTO TOTAL</b>	<b>27.511,54 €</b>

El presupuesto total de este proyecto asciende a **veintisiete mil quinientos once euros con cincuenta y cuatro céntimos** (27.511,54 €).

## 4. PRESUPUESTO UNITARIO

Una vez ha sido establecido un procedimiento para la obtención de *scaffolds* con porosidad estratificada, se ha realizado un cálculo para tener una idea de cuál sería el precio de fabricación unitario por *scaffold*.

Con el procedimiento que se ha explicado en el apartado 3.5, se pueden obtener 10 *scaffolds*, con forma circular y de 0,27 centímetros de diámetro cada uno, por lo que para calcular el presupuesto unitario se han tenido en cuenta los reactivos, equipos, material de laboratorio y personal; y después se ha dividido el total entre 10 unidades.

<b>Scaffold estratificado</b>				
<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>	<b>Descripción</b>	<b>Precio Unitario (€)</b>	<b>Total (€)</b>
1	u	Balón de reacción con 3 boquillas	100,00 €	100,00 €
1	u	Trampa de vacío	15,00 €	15,00 €
2	g	Glicerol	0,14 €	0,28 €
4,4	g	Ácido sebácico	0,18 €	0,79 €
24	h	Placa calefactora	0,01 €	0,24 €
2	u	Imán de agitación magnética	1,69 €	3,37 €
1	u	Vaso de precipitados 1 L	16,84 €	16,84 €
1	u	Vaso de precipitados 50 mL	2,29 €	2,29 €
1	u	Cuchara-espátula de acero inoxidable	3,32 €	3,32 €
2,5	g	Cloruro de sodio (NaCl)	0,01 €	0,03 €
10	g	Sulfato potásico (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,05 €	0,50 €
1	u	Molde circular de teflón con agujeros pasantes	3,00 €	3,00 €
4	u	Varilla de vidrio	0,60 €	2,40 €
192	h	Horno de ventilación forzada	0,02 €	3,47 €
1	u	Vial de vidrio	0,54 €	1,08 €
1	u	Pipeta Pasteur	0,04 €	0,04 €
4	u	Recipiente de plástico 100ml	0,85 €	3,40 €
800	mL	Agua Destilada	0,01 €	7,00 €
700	mL	Etanol	0,01 €	7,00 €
700	mL	Agua Mili-Q	0,01 €	7,00 €
1	u	Placa Petri de vidrio	2,32 €	2,32 €
24	h	Desecador de vacío	0,02 €	0,48 €
15,5	h	Ingeniera Biomédica	35,00 €	542,50 €
<b>TOTAL</b>				<b>722,35 €</b>

A continuación se detalla el presupuesto total unitario, teniendo en cuenta los gastos generales, el beneficio industrial y el I.V.A.

<b>Presupuesto de ejecución material</b>	72,23 €
<b>Gastos generales (15%)</b>	10,84 €
<b>Beneficio industrial (6%)</b>	4,33 €
<b>Presupuesto de ejecución por contrata</b>	87,40 €
<b>I.V.A (21%)</b>	18,35 €
<b>PRESUPUESTO TOTAL UNITARIO</b>	<b>105,76 €</b>

El presupuesto de fabricación unitario por *scaffold* asciende a un total de **ciento cinco euros con setenta y seis euros** (105,76 €).