

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## **EVALUACIÓN PRELIMINAR *IN VITRO* DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO Y DEGRADABILIDAD DE MATERIALES BASADOS EN *POLI (GLICEROL SEBACATO)* DE APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: YOLANDA MORENO SÁEZ

TUTORA: ANA VALLÉS LLUCH

COTUTOR: ÁLVARO CONEJERO GARCÍA

*Curso Académico: 2014-2015*

VALENCIA, 01 DE SEPTIEMBRE DE 2015

## AGRADECIMIENTOS

Es rara la sensación de llegar al final de una etapa, y más cuando ha sido tan especial en tu vida. Una mezcla de sentimientos encontrados donde se unen la alegría de haber logrado el objetivo que te marcaste hace años, y la nostalgia que aparece al pensar que las cosas a partir de ahora serán diferentes. Sin embargo, las ganas de descubrir, de aprender, de conseguir nuevas metas, son si cabe más grandes que cuando empecé. Así que, como dicen por ahí: *que tus sueños sean más grandes que tus miedos*.

En este punto, me gustaría agradecer a aquellas personas que han formado parte de este capítulo particular, mi trabajo final de grado, que aunque puede parecer a priori pequeño, ha sido sin duda muy grande por todo lo que me ha aportado, tanto a nivel académico como personal. En primer lugar, quiero dar las gracias a Ana, mi tutora, porque el optimismo y las ganas que me transmitió desde el principio hicieron que tomara la decisión de realizar en el CBIT este trabajo, y hoy puedo decir que fue una decisión muy acertada. Además, tengo que agradecerle su paciencia y el tiempo que me ha dedicado siempre con una sonrisa, pues esto ha hecho que compaginarlo todo, no haya sido tan complicado como parecía.

En segundo lugar, tengo que agradecer a Álvaro, Héctor, Guillermo y Laura, ya que son los principales responsables de lo mucho que he disfrutado realizando este trabajo final de grado. Porque eso de que los lugares no son sino las personas con las que los compartes, es completamente cierto. Gracias por haberme enseñado tanto, y por los buenos ratos que hemos pasado.

Tampoco puedo olvidarme de dar las gracias a mi familia biotec, entre los que se incluyen aquellos que sólo fueron biotecs por un tiempo, porque han sido cuatro años increíbles, llenos de momentos especiales. Además, también han aportado su granito de arena en esta experiencia, puesto que a algunos los he tenido mareados hasta el final. Gracias por tanto, y por todo lo que significáis para mí.

Finalmente, tengo que dar las gracias a mi familia, y en especial a mis padres, porque sin su esfuerzo nada de esto hubiese sido posible. Además, no es sólo el esfuerzo sino también el apoyo, el estar siempre ahí, el dejar en todo momento en mis manos la decisión de elegir, por lo que se merecen una mención especial en este y en todos los capítulos de mi vida.

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	La ingeniería tisular.....	1
1.1.1.	Ingeniería tisular vascular.....	3
1.2.	Biomateriales en ingeniería tisular.....	4
1.2.1.	Biomateriales empleados en remplazo vascular.....	6
1.3.	Poli (glicerol sebacato).....	8
2.	OBJETIVOS .....	10
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
3.1.	Preparación de los materiales.....	11
3.1.1.	Preparación de films de poli (glicerol sebacato) en condiciones estándar.....	11
3.1.2.	Obtención de <i>films</i> de poli (glicerol sebacato) variando las condiciones de síntesis.....	13
3.1.3.	Lavado de los <i>films</i> de PGS.....	13
3.1.4.	Secado de los materiales.....	15
3.1.5.	Preparación de <i>films</i> de policaprolactona.....	15
3.2.	Caracterización biológica de los materiales.....	15
3.2.1.	Cultivo de fibroblastos.....	16
3.2.2.	Ensayos de viabilidad celular in vitro.....	16
3.2.3.	Estudio de la adhesión y proliferación celular mediante microscopía de fluorescencia .....	18
3.3.	Ensayo de degradación de films de PGS.....	20
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1.	Desempeño biológico de los materiales.....	21
4.1.1.	Viabilidad celular.....	21
4.1.2.	Adhesión y proliferación celular.....	23
4.1.3.	Estudio de la morfología celular mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	26
4.2.	Degradación de films de PGS .....	32
5.	CONCLUSIONES .....	37
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Los tres pilares fundamentales de la ingeniería tisular.....	1
<b>Figura 2.</b> Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de tubos porosos (scaffolds) de policaprolactona (PCL) y colágeno para regeneración vascular. Aspecto macroscópico (a); scaffold completo (b); superficie (c) y sección transversal (d).....	3
<b>Figura 3.</b> Esquema de tipos de biomateriales empleados en ingeniería tisular, sus propiedades y ejemplos de cada uno de ellos.....	5
<b>Figura 4.</b> Reacción de síntesis de poli (glicerol sebacato) en condiciones estándar.....	8
<b>Figura 5.</b> Montaje para la pre-polimerización de poli (glicerol sebacato).....	11
<b>Figura 6.</b> Molde utilizado para la obtención de films de PGS.....	12
<b>Figura 7.</b> Film de PGS obtenido bajo condiciones estándar de síntesis.....	13
<b>Figura 8.</b> Reacción de transformación de la sal de tetrazolio MTT a su producto formazán realizada por las células viables. ....	16
<b>Figura 9.</b> Reacción de transformación de la sal de tetrazolio de MTS a su producto formazán por parte de las células viables.....	17
<b>Figura 10.</b> Aspecto de las distintas réplicas (filas 1, 2 y 3) de los discos de PCL y los de PGS fabricados bajo diferentes condiciones de síntesis cultivados con fibroblastos de la línea celular L929 tras el ensayo de proliferación MTT tras 4 días de cultivo.....	22
<b>Figura 11.</b> Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos cultivados sobre los films de PGS sintetizados en condiciones estándar, tras la tinción con DAPI (marcador del núcleo celular), falacidina (tiñe el citoesqueleto) y anticuerpo anti-vimentina (marca las adhesiones focales entre células vecinas). Las imágenes a, b y c corresponden a la tinción DAPI tras tiempos de cultivo 5 horas, 4 y 7 días, respectivamente. Las imágenes d, e y f pertenecen a la tinción tras 7 días de cultivo con falacidina (d), anticuerpo anti-vimentina (e) y los tres marcadores a la vez (f).....	23
<b>Figura 12.</b> Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos cultivados sobre los films de PGS sintetizados con un tiempo de curado de 96 horas, tras la tinción con DAPI (marcador del núcleo celular), falacidina (tiñe el citoesqueleto) y anticuerpo anti-vimentina (marca las adhesiones focales entre células vecinas). Las imágenes a, b y c corresponden a la tinción DAPI tras tiempos de cultivo 5 horas, 4 y 7 días, respectivamente. Las imágenes d, e y f pertenecen a la tinción tras 7 días de cultivo con falacidina (d), anticuerpo anti-vimentina (e) y los tres marcadores simultáneamente (f).....	24
<b>Figura 13.</b> Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos sembrados sobre los films de PGS sintetizados bajo una temperatura de curado de 150°C después de 7 días de cultivo y tras la tinción con DAPI (marcador del núcleo celular) (a), falacidina (tiñe el citoesqueleto) (b) y ambos a la vez (c).....	24
<b>Figura 14.</b> Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos cultivados sobre los films de PGS fabricados con doble proporción de ácido sebácico, tras la tinción con DAPI (que tiñe el núcleo celular) después de 5 horas de cultivo (a) y 4 (b) y 7 días (c), respectivamente.....	25
<b>Figura 15.</b> Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos cultivados sobre los films de PGS fabricados con doble proporción de ácido sebácico, tras la tinción con falacidina (tiñe el citoesqueleto) y anticuerpo anti-vimentina (marca las adhesiones focales entre células vecinas). Las imágenes a y c corresponden a la tinción con falacidina tras tiempos de cultivo de 4 y 7 días,	

respectivamente. Las imágenes b y d pertenecen a la tinción con vimentina para esos tiempos de cultivo y la imagen e corresponde a la tinción con los tres marcadores tras 7 días de cultivo.....25

**Figura 16.** Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos sembrados sobre los films de PCL tras la tinción con DAPI (marcador del núcleo celular) después de 5 horas de cultivo (a) y 4 (b) y 7 días (c), respectivamente.....26

**Figura 17.** Imágenes de SEM de la superficie de los discos de PGS sintetizados siguiendo el protocolo estándar sembrados con fibroblastos de la línea L929 tras 5 horas de cultivo (a, b y c), 4 días (d, e, f) y 7 días (g, h, i), a 100X, 500X y 2000X aumentos.....27

**Figura 18.** Imágenes de SEM de la superficie de los discos de PGS sintetizados bajo un tiempo de curado de 96 horas sembrados con fibroblastos de la línea L929 tras 5 horas de cultivo (a, b y c), 4 días (d, e, f) y 7 días, a 100X, 500X y 2000X aumentos.....28

**Figura 19.** Imágenes de SEM de la superficie de los discos de PGS sintetizados bajo una temperatura de curado de 150°C sembrados con fibroblastos de la línea L929 tras 5 horas de cultivo (a, b y c), 4 días (d, e, f) y 7 días, a 100X, 500X y 2000X aumentos.....29

**Figura 20.** Imágenes de SEM de la superficie de los discos de PGS sintetizados con una composición molar de ácido sebácico/glicerol 2:1, sembrados con fibroblastos de la línea L929 tras 5 horas de cultivo (a, b y c), 4 días (d, e, f) y 7 días, a 100X, 500X y 2000X aumentos.....30

**Figura 21.** Imágenes de SEM de la superficie de los discos de PCL sembrados con fibroblastos de la línea L929 tras 5 horas de cultivo (a, b y c), 4 días (d, e, f) y 7 días, a 100X, 500X y 2000X aumentos.....31

**Figura 22.** Pérdida de masa porcentual de los films de PGS fabricados bajo diferentes condiciones de síntesis en los ensayos de degradación en H<sub>2</sub>O, NaOH y medio de cultivo a las dos semanas (a) y al cabo de un mes (b).....33

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Ejemplos de polímeros sintéticos empleados en ingeniería de tejidos vasculares. Extraída de (Schutte y Nerem, 2013).....7

**Tabla 2.** Parámetros de síntesis de los diferentes films de PGS fabricados.....13

## ABREVIATURAS

<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DPBS</b>	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<b>ePTFE</b>	Teflón expandido
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MTS</b>	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio]
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>P/S</b>	Penicilina/Estreptomicina
<b>PB</b>	<i>Phosphate Buffered</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCL</b>	Policaprolactona
<b>PGA</b>	Ácido poliglicólico
<b>PGS</b>	Poli (glicerol sebacato)
<b>PLA</b>	Ácido poli-láctico
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>SEM</b>	Microscopio electrónico de barrido
<b>T</b>	Temperatura
<b>t</b>	Tiempo
<b>TFG</b>	Trabajo de fin de grado
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La ingeniería tisular

Las enfermedades en las que tiene lugar la pérdida parcial o total de un tejido u órgano constituyen uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. La terapia estándar para el tratamiento de este tipo de patologías es el trasplante (Kim y Mooney, 1998). A pesar de que el número de trasplantes ha aumentado significativamente en los últimos años, esta técnica sigue estando limitada por la escasez de donantes (Bathia y Chen, 1999; Falke y Anthony, 2000). Este hecho, unido a posibles reacciones inmunológicas por parte del receptor, hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento. Existen otras estrategias para reparar los daños tisulares como: la reconstrucción quirúrgica en el caso de determinados órganos, el empleo de fármacos para mejorar la función de un tejido, prótesis sintéticas que lo sustituyen de forma temporal y dispositivos mecánicos. Sin embargo, ninguna de ellas representa una solución ideal al problema, puesto que no consiguen reemplazar todas las funciones del órgano o tejido dañado (Chen *et al.*, 2001).

Con el fin de solucionar las limitaciones de estas técnicas, tuvo lugar a finales de los ochenta el desarrollo de una nueva estrategia: la ingeniería tisular (Yang *et al.*, 2007). Este término fue acuñado por primera vez por Langer y Vacanti para referirse a “un campo interdisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que reparen, mantengan o mejoren la función del tejido” (Langer y Vacanti, 1993; Hutmacher *et al.*, 2007). Se trata de una disciplina prometedora para el tratamiento de múltiples enfermedades que persigue la regeneración del tejido dañado a través de la correcta combinación de células, biomateriales y moléculas bioactivas (Orive *et al.*, 2003). Las estrategias que se enmarcan en el contexto de la ingeniería tisular podrían dividirse en tres. Por un lado, la introducción directa de células aisladas o sustitutos celulares directamente en el tejido dañado, también conocida como terapia celular. Por otro, la liberación de sustancias que inducen la regeneración tisular. El tercer grupo correspondería a los biomateriales, que pueden utilizarse solos o en combinación con células y factores de crecimiento. Este último abordaje, basado en la correcta combinación de los tres factores, es el que se asocia frecuentemente con el término ingeniería tisular (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

Para lograr el objetivo de restaurar, mantener o mejorar la función del tejido dañado, se debe reproducir de la manera más equivalente posible la complejidad celular y de los tejidos *in vivo* tanto a nivel físico-químico como mecánico. Así, el reto de esta aproximación consiste en imitar la estructura tridimensional natural de los tejidos, la matriz extracelular (MEC), y los sistemas de señalización que participan en la formación de los mismos y regulan su función (Badylak *et al.*, 2010). Los tres pilares básicos que emplea la ingeniería tisular para lograr tal fin son (Figura 1): las células, que son las encargadas de la formación del tejido; el andamiaje tridimensional (a partir de ahora *scaffold*, por su nombre en inglés), que sirve como soporte para el crecimiento celular y la formación del nuevo tejido; y las moléculas bioactivas de señalización, encargadas de la regulación de los procesos biológicos de crecimiento y diferenciación celular necesarios para el desarrollo tisular. Estos tres elementos se conocen también como la tríada de la ingeniería tisular (Boeckel *et al.*, 2012).

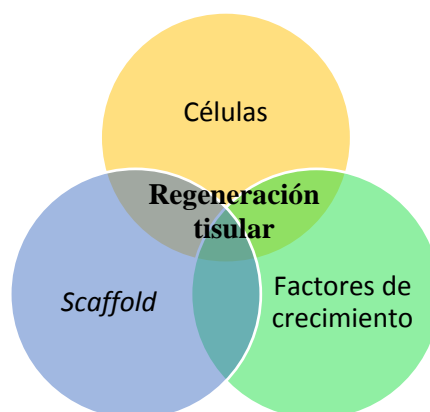


Figura 1. Los tres pilares fundamentales de la ingeniería tisular.

Las células son uno de los componentes fundamentales de los tejidos, participando no sólo en la construcción de los mismos sino también en el mantenimiento de su función. Es por ello que para conseguir el objetivo en cualquier aplicación de ingeniería tisular, la elección de la fuente y el tipo celular es crítica (Chapekar, 2000). En relación al origen, las células pueden ser: autólogas, alogénicas o xenogénicas. En el primer caso se trata de células propias del individuo receptor, lo que reduce el riesgo de rechazo y de infecciones. Por su parte, las células alogénicas no son propias del mismo individuo, aunque pertenecen a un donante de la misma especie, mientras que las xenogénicas proceden de otras especies. Además de la desventaja de la falta de donantes, tanto en alogénicas como xenogénicas las probabilidades de rechazo y transmisión de enfermedades son mayores que si se emplean células autólogas (Sipe, 2002). Por otro lado, en cuanto al tipo celular, existe una amplia variedad de células que se emplean en regeneración tisular. De esta manera, en función de la finalidad se pueden utilizar desde células adultas, completamente diferenciadas, hasta diferentes linajes de células madre embrionarias, con capacidad pluripotente o totipotente (Charles-Harris Ferrer, 2007).

Independientemente del origen y del tipo celular, *in vivo*, todas las células, además de comunicarse con el resto, requieren información del ambiente que las rodea, de manera que cuando se sacan de su hábitat natural se pierde la estabilidad de los comportamientos celulares (Bathia y Chen, 1999). Por ello, en ingeniería tisular es fundamental conseguir reproducir el ambiente nativo en el que se encuentran los tejidos y esto implica mimetizar el material que las rodea y las une en el tejido, la MEC. La MEC es una estructura dinámica compuesta por distintas proteínas funcionales y estructurales como el colágeno, la elastina, la laminina, proteoglicanos, glucosaminoglucanos y otras moléculas que se combinan entre sí formando una estructura que puede ser diferente en función del tejido (Falke y Anghony, 2000; Gálvez *et al.*, 2015). Además de proporcionar soporte mecánico, interacciona con las células participando en respuestas celulares y múltiples procesos entre los que se incluyen la migración, proliferación, diferenciación celular y apoptosis. Por tanto, la morfogénesis del tejido, su función y su regeneración están en parte controladas por esta matriz (Sant y Khademshosseini, 2010; Boeckel *et al.*, 2012). El *scaffold* o andamiaje tridimensional es la estructura artificial que mimetiza el papel de la MEC nativa. Se trata de una matriz microporosa construida a partir de uno o varios biomateriales diseñados para proporcionar el soporte físico y poroso adecuado que consiga que las células puedan adherirse e interactuar con el biomaterial a través de las proteínas que se adsorban en él. Esta estructura debe permitir el transporte de gases, nutrientes y factores de regulación necesarios para la supervivencia, proliferación y diferenciación celular, provocando el mínimo grado de inflamación o toxicidad *in vivo* (Dhandayuthapani *et al.*, 2011). La importancia de la porosidad del *scaffold* radica en la necesidad de la misma para el crecimiento de las células y la vascularización así como el transporte de metabolitos, por lo que debe controlarse tanto el tamaño de poro como la interconectividad y distribución entre ellos. Además, el ratio superficie/volumen ha de ser el adecuado para que las células se adhieran y las propiedades mecánicas han de ser las apropiadas para soportar los esfuerzos fisiológicos a los que se verá sometido *in vivo* (Vats *et al.*, 2003; Charles-Harris Ferrer, 2007). La correcta interacción entre células y *scaffolds* se consigue a través del elemento que completa la tríada de la ingeniería tisular, las moléculas de señalización. Estas moléculas desempeñan una función principal de regulación en el desarrollo del tejido. Entre ellas se incluyen factores de crecimiento, pequeños péptidos y otras moléculas que modulan la adhesión, migración, proliferación y diferenciación de varios tipos celulares y que resultan fundamentales en la regeneración tisular (Place *et al.*, 2009). Por tanto, la señalización proteica es crucial para regular el fenotipo celular y la estructura y función del tejido, resultando imprescindible para conseguir el éxito en este abordaje (Boonthekul y Mooney, 2003).

Finalmente, para que células, scaffolds y factores de crecimiento puedan dar lugar a la regeneración del tejido, se requiere del diseño de biorreactores (Figura 2). Se trata de sistemas o recipientes en los que se combinan estos tres elementos creándose el ambiente *in vitro* adecuado para el cultivo celular. Un biorreactor ideal debería proporcionar un crecimiento rápido y ordenado de las células en el scaffold. De este modo, un diseño adecuado de los biorreactores debe permitir un control de las condiciones de cultivo (temperatura, pH, humedad, concentración de O<sub>2</sub>, etc.), facilitar la transferencia de materia entre las células y el ambiente y proporcionar las señales fisiológicas adecuadas para cada tipo celular en particular (Vunjak Novakovic *et al.*, 2005).



### 1.1.1. Ingeniería tisular vascular

Una de las aplicaciones más relevantes de esta disciplina por su importancia a nivel clínico es la ingeniería de tejidos cardiovasculares. Las enfermedades cardiovasculares que afectan a los vasos sanguíneos de tamaño medio y pequeños constituyen uno de los problemas de salud más importantes a nivel mundial, siendo una de las principales causas de muerte en la sociedad occidental (Ratcliffe, 2000). Dentro de este grupo la más común es la arterioesclerosis, una patología caracterizada por el estrechamiento de las arterias que puede conducir a la oclusión del vaso sanguíneo impidiendo el flujo de sangre a través del mismo. En el caso de las arterias coronarias, este estrechamiento puede producir un debilitamiento del miocardio del corazón y terminar desencadenando un infarto (Sell *et al.*, 2009). En esta situación el tratamiento más común es la cirugía de derivación de la arteria coronaria, donde se emplean fragmentos de una vena de la pierna o una arteria del pecho o la muñeca que se colocan por encima y por debajo de la zona afectada permitiendo que la sangre se desvíe y el flujo continúe. Sin embargo, en muchos pacientes este tratamiento no es posible porque sus vasos nativos están dañados y no pueden utilizarse para la derivación. Existe también la opción de emplear tejidos no autólogos como por ejemplo arterias torácicas bovinas, pero las tasas de éxito con este abordaje son bajas.

Ante estos problemas surgió la necesidad de una alternativa al empleo de vasos sanguíneos naturales, las prótesis vasculares (Figura 2). Estas prótesis también son de utilidad en otras patologías, como los aneurismas. Las prótesis vasculares se pueden definir como elementos de tipo sintético destinados a restablecer la circulación arterial o venosa, reemplazando de forma parcial o total un vaso nativo que no puede ser reparado y debe ser sustituido. En función de la patología se pueden emplear dos tipos de elementos diferentes, fabricados a partir de biomateriales: la endoprótesis vascular (*stent*, por su nombre en inglés) y los injertos vasculares (en inglés *vascular grafts*) (Schutte y Nerem, 2013).

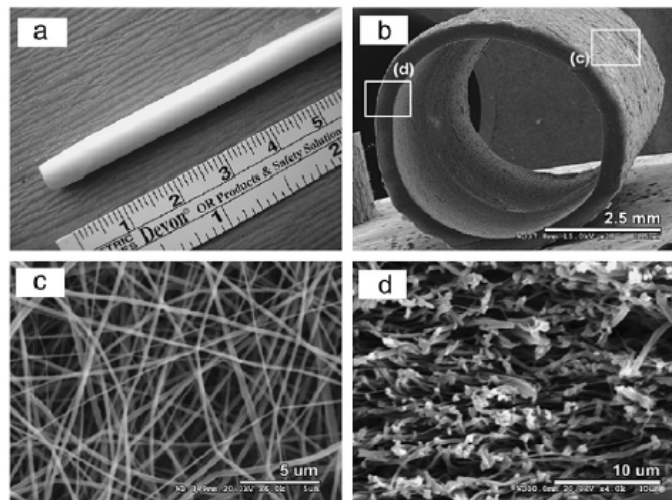


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de tubos porosos (scaffolds) de policaprolactona (PCL) y colágeno para regeneración vascular. Aspecto macroscópico (a); scaffold completo (b); superficie (c) y sección transversal (d). Extraída de (Sell *et al.*, 2009).

La endoprótesis vascular es un elemento sintético que se coloca en el interior del vaso dañado, mediante angiografía e hinchado de balón, para mantenerlo dilatado y reforzar su pared, impidiendo su rotura. Se emplea en patologías como el aneurisma de aorta, una dilatación localizada que produce el debilitamiento de la pared de la arteria. En la mayoría de los casos, los aneurismas de aorta son consecuencia de una de las formas más comunes de arterioesclerosis, la aterosclerosis. La aterosclerosis es un síndrome que se caracteriza por el depósito y la infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias y que da lugar en muchas ocasiones a un importante adelgazamiento de la capa muscular media del vaso, provocando las dilataciones localizadas que originan el aneurisma de aorta. Si este se rompe, se puede producir una fuerte hemorragia interna. El tratamiento clásico para esta patología es la cirugía abierta, donde se sustituye el segmento de aorta dilatado por un injerto vascular de material sintético en forma de tubo. Sin embargo, la aorta es un vaso que presenta

elevadas presiones y volumen sanguíneo, además de que la cirugía torácica es muy invasiva. Por ello, ante los elevados riesgos de este tipo de cirugías, no pueden realizarse en pacientes que no se encuentren en buenas condiciones. De esta manera, el *stent* vascular representa una alternativa menos invasiva y de menos riesgo potencial que el tratamiento quirúrgico que podría ser recomendable para pacientes que son rechazados para la cirugía convencional (AGENCIA DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS, 1997).

Por su parte, en los injertos vasculares lo que se hace es sustituir el tramo de vaso dañado por una prótesis de vaso, suturada en los extremos. En este caso, el elemento sintético no se queda en el interior del vaso como ocurre con el *stent*. Este tipo de prótesis se emplean cuando es necesario reemplazar el segmento de vaso dañado y no se pueden emplear vasos del propio paciente para la derivación, o con el objetivo de evitar las limitaciones que presenta el empleo de tejidos no autólogos. Sin embargo, los materiales más empleados hasta el momento (Dacron y Teflón expandido) en injertos vasculares sólo funcionan bien cuando se trata de reemplazar grandes vasos, mientras que cuando el diámetro de los mismos es menor, como en las arterias coronarias, se producen trombos en la circulación, cerrándolos con rapidez. Además, los injertos vasculares no son lo suficientemente flexibles. Por estos motivos, uno de los principales retos a los que se enfrenta actualmente la ingeniería tisular es el desarrollo de materiales con buena respuesta en el reemplazo de vasos de pequeño diámetro y con la suficiente elasticidad como para conseguir una adecuada reparación de los vasos dañados (Nerem y Seliktar, 2001).

## 1.2. Biomateriales en ingeniería tisular

La creación de los sistemas de andamiaje temporales (*scaffolds*) que se emplean en ingeniería tisular para guiar el crecimiento y la organización del nuevo tejido se lleva a cabo a través de biomateriales (Kim *et al.*, 2000). Un biomaterial podría definirse como un material diseñado para interactuar con un sistema vivo con el objetivo de reparar o reemplazar cualquier tejido u órgano dañado. Por tanto, la función de estos materiales consiste en favorecer la adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular a fin de promover el desarrollo del nuevo tejido, desempeñando un papel fundamental en este tipo de estrategias (Shin *et al.*, 2008; Lutolf y Hubbell, 2005).

Dado que están destinados a implantarse en el organismo, no todos los materiales pueden ser empleados como biomateriales, sino que para ello es imprescindible que cumplan una serie de requisitos (Lizarbe, 2007). Aunque los requerimientos pueden variar en función de la aplicación específica para la que son diseñados, algunos son comunes en todos los casos. La biocompatibilidad o ausencia de cualquier tipo de respuesta biológica adversa es una característica imprescindible. El biomaterial es un elemento extraño para el organismo, de manera que cuando se implanta en el mismo puede desencadenar respuestas inflamatorias o citotóxicas indeseadas. Estas respuestas son en muchos de los casos las responsables del rechazo del material y en consecuencia del fracaso en este tipo de aproximaciones. Es por ello que para evitar reacciones inmunológicas por un reconocimiento de la diferencia entre el tejido y el biomaterial, es prioritario evaluar esta característica en la fabricación de biomateriales (Rezwan *et al.*, 2006; Plazas Bonilla y Perilla, 2011).

En función de la respuesta del cuerpo al implante, se distinguen tres tipos de biomateriales: bioinertes, bioactivos o biodegradables. En el caso de los bioinertes, la interacción con el tejido adyacente es mínima o ausente, por lo que generan poca respuesta. Dichos materiales se utilizan en implantes permanentes (González-Jiménez *et al.*, 2014). A diferencia de los primeros, los materiales bioactivos están diseñados para unirse con el tejido en la zona de implantación produciendo una respuesta específica y beneficiosa. Por su parte, los biodegradables funcionan como un implante temporal, sufriendo una degradación (hidrolítica o enzimática) progresiva tras ser implantados a medida que las células van produciendo su propia matriz para formar el nuevo tejido (Nair y Laurencin, 2007). Las tendencias en el uso de los distintos tipos de biomateriales han experimentado grandes cambios en los últimos años. Cada vez más frecuentemente se emplean materiales bioactivos y biodegradables mientras que los bioinertes han ido perdiendo relevancia. El objetivo ha pasado de ser sustituir el tejido dañado a conseguir su regeneración. De hecho, se espera que en los próximos años, muchas de las prótesis permanentes que se utilizan en aplicaciones terapéuticas temporales serán reemplazadas por dispositivos biodegradables que permitan la regeneración tisular. Como la finalidad es regenerar el tejido dañado, es importante que la degradación se produzca en un tiempo

suficiente que permita que las células generen su propia matriz para constituir el nuevo tejido (Lee *et al.*, 2014). Además, para evitar cualquier tipo de respuesta inmunológica adversa, los materiales biodegradables han de ser además bioabsorbibles, de manera que los productos de degradación no deben provocar inflamación o toxicidad, y deben ser metabolizados por el cuerpo donde son implantados. Por tanto, en función del objetivo perseguido, la biodegradabilidad y la capacidad de los biomateriales de ser absorbidos por el organismo constituyen dos características fundamentales de los biomateriales (Kim *et al.*, 2000).

Otro aspecto clave a tener en cuenta es que las propiedades mecánicas y el diseño han de ser adecuados. En general, el material debe poseer buena resistencia mecánica, densidad y peso. Asimismo, tiene que ser de procesamiento y esterilización fácil y reproducible a gran escala. Sin embargo, es la aplicación final la que determina en última instancia las propiedades que debe poseer el biomaterial, que debe ser siempre lo más parecido posible al tejido que se tiene la intención de reparar para aumentar las probabilidades de éxito en la terapia (Liu *et al.*, 2007). Es por ello que existen diferentes tipos en función de cuál sea la finalidad de su uso. Metales, cerámicas, materiales compuestos y polímeros son los principales (Lizarbe, 2007) (Figura 3). Los materiales metálicos suelen emplearse en implantes en diferentes tipos de cirugías (ortopédica, maxilofacial, etc.) y los cerámicos se han venido usando en odontología para fabricar dentaduras postizas y coronas (Agrawal, 1998). Pero la matriz extracelular *in vivo* no está constituida por una única sustancia, sino que es una combinación de diferentes moléculas. Por ello, a veces también se utilizan materiales co-poliméricos, resultantes de la combinación de dos o más homopolímeros diferentes, para intentar imitar con mayor exactitud las condiciones naturales. Numerosos son también los dispositivos médicos (Dhandayuthapani *et al.*, 2011) y los *scaffolds* (Woodruff y Hutmacher, 2010) que se han fabricado a partir de biomateriales poliméricos, que son cada vez más utilizados.

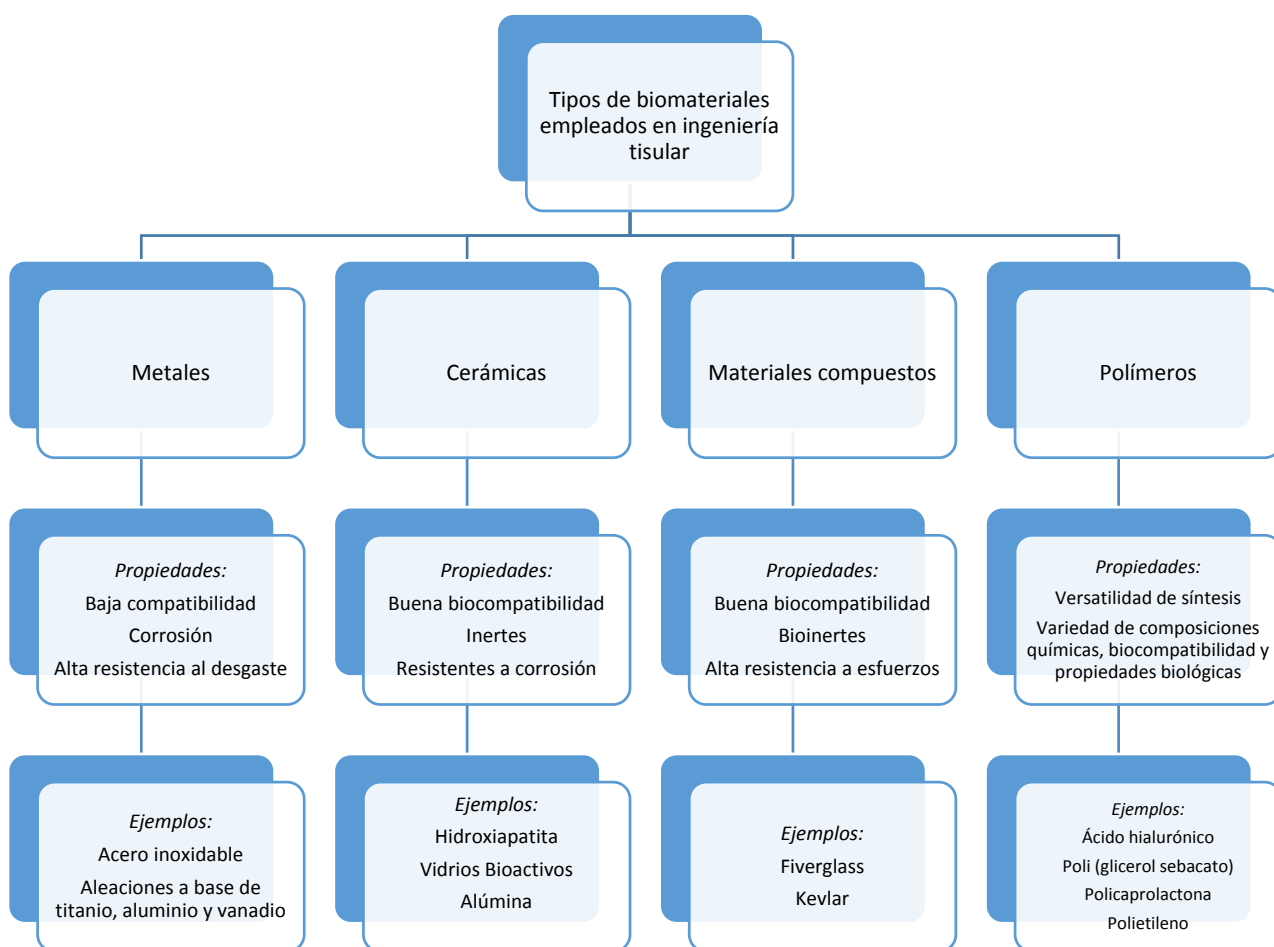


Figura 3. Esquema de tipos de biomateriales empleados en ingeniería tisular, sus propiedades y ejemplos de cada uno de ellos.

El aumento en el empleo y estudio de los biomateriales poliméricos en ingeniería tisular se debe a la gran versatilidad de síntesis de los mismos, que permite que exista un amplio abanico de posibilidades diferentes (González-Jiménez *et al.*, 2014). Los polímeros son moléculas de elevado peso molecular resultantes de la unión por repetición de unidades moleculares más pequeñas denominadas monómeros. La variedad en su composición química, biocompatibilidad y propiedades biológicas los convierten en los más utilizados como biomateriales.

Existen numerosas formas de clasificación de los materiales poliméricos atendiendo a diferentes criterios. Así, en función de si están formados por uno o varios tipos de unidades (monómeros) diferentes se puede distinguir entre homopolímeros, en los que se repite un solo tipo de monómero, y copolímeros, formados por repetición de distintas unidades. Según el mecanismo de polimerización se puede hablar de polímeros de condensación o de adición. En el primer caso los polímeros se forman por reacciones sucesivas reversibles de condensación entre los grupos funcionales de los monómeros, mientras que en los de adición las cadenas se forman por unión de monómeros con enlaces insaturados de tipo carbono-carbono y crecen por adición de un monómero a la cadena polimérica en formación. En este segundo caso se trata de reacciones irreversibles.

Con respecto a su origen, los polímeros pueden ser naturales, producidos por organismos vivos, o sintéticos, obtenidos industrialmente. Dentro de los polímeros naturales se encuentran proteínas estructurales (colágeno, elastina, queratina) y funcionales (fibrina), polisacáridos (celulosa, quitina) y ácidos nucleicos. Entre los polímeros sintéticos se encuentran algunos como el ácido poliglicólico (PGA) o el ácido poli-láctico (PLA). Los primeros ofrecen ventajas tales como la biocompatibilidad, la posibilidad de modificación química o la facilidad de obtención (Plazas Bonilla y Perilla, 2011). Sin embargo, son los segundos los más demandados para aplicaciones biomédicas porque permiten el control en su fabricación en cuanto a composición, porosidad, tiempo de degradación y características mecánicas. Además, por lo general son más económicos y muchos de ellos presentan gran similitud con los tejidos naturales (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

La arquitectura de las cadenas que constituyen los polímeros es también una forma de clasificación. De esta manera, existen polímeros lineales, con cadenas simples resultantes de la unión de unidades repetidas, ramificados, donde hay una cadena principal conectada lateralmente a cadenas secundarias, entrecruzados, en los que cadenas lineales se unen transversalmente en varias posiciones, y reticulados, que tienen cadenas y ramificaciones entrelazadas en las tres direcciones del espacio.

Según su comportamiento térmico los polímeros pueden dividirse en dos grandes grupos: termoestables y termoplásticos. Estos últimos presentan una estructura rígida a temperatura ambiente pero pueden ser moldeados después de fundirse. Por el contrario, los termoestables cuentan con una estructura entrecruzada con enlaces covalentes que los hace infusibles, aunque sí son moldeables a temperatura ambiente. Dentro de ellos uno de los grupos de mayor importancia en ingeniería tisular son los polímeros elastómeros, aquellos capaces de recuperar su forma original después ser sometidos a grandes deformaciones (Lizarbe, 2007). Finalmente, según el grado de empaquetamiento de las cadenas, los polímeros pueden clasificarse como amorfos o cristalinos. Los polímeros cristalinos se caracterizan por una ordenación espacial regular de sus cadenas, mientras que en los amorfos las cadenas no se disponen de forma ordenada.

### **1.2.1. Biomateriales empleados en remplazo vascular**

En el caso particular de la ingeniería tisular cardiovascular, los materiales más empleados en la actualidad para la fabricación de vasos sanguíneos artificiales de gran tamaño, como la arteria aorta o la ílica, son dos polímeros sintéticos, el Dacron y el Teflón expandido (ePTFE) (Schmidt y Baier, 2000). El Dacron es un poliéster obtenido a partir de ácido tereftálico y etilenglicol, mientras que el Teflón expandido es un fluoropolímero, el politetrafluoretileno. Estos materiales funcionan bien (Ratcliffe, 2000) cuando se trata de reemplazar grandes vasos, de entre 6-10 mm de diámetro. Sin embargo, cuando se emplean para reparar vasos pequeños, como es el caso de las arterias coronarias donde el diámetro es de entre 3-4 mm, se producen trombos en la circulación que los cierran con rapidez (Pagani *et al.*, 2007). Esto es debido a que en los vasos de pequeño diámetro el flujo sanguíneo es bajo y mayor la resistencia, lo que favorece la formación de trombos. Por ello, en estos casos los

requerimientos en la fabricación de prótesis vasculares son mayores. No basta con que los materiales sean biocompatibles y carezcan de reactividad química, sino que, además, no deben ser propensos a la formación de trombos y han de poseer la porosidad y fuerza mecánica apropiada, mimetizando al máximo las características de los vasos nativos para poder reemplazarlos (McClure *et al.*, 2012). Además, ninguno de estos materiales es biodegradable y no tienen la capacidad de promover la regeneración del tejido nativo, permaneciendo de forma permanente en el organismo. De esta manera, siempre existe la posibilidad de reconocimiento como un elemento extraño por parte del sistema inmune y son susceptibles a la infección bacteriana (Sell *et al.*, 2009). Por estos motivos, se han estudiado los andamiajes (comúnmente llamados *scaffolds* por su nombre en inglés) poliméricos biodegradables y bioabsorbibles como una alternativa para este tipo de aplicaciones. Estos materiales ofrecen la ventaja de desaparecer con el tiempo por degradación fisiológica reduciendo la probabilidad de una respuesta inmune indeseada por parte del cuerpo donde son implantados (Gunatillake y Adhikari, 2003).

Uno de los polímeros sintéticos biodegradables más propuestos en ingeniería tisular vascular por su rápida reabsorción en el organismo es el ácido poliglicólico (PGA). Pero no es el único, son muchos los polímeros sintéticos que se han usado solos o en combinación con otros en ingeniería tisular vascular (Tabla 1). Algunos de ellos se encuentran en fase de desarrollo, mientras que otros como el PGA y la policaprolactona (PCL) ya se han empleado en clínica aunque con éxito limitado (Schutte y Nerem, 2013).

Tabla 1. Ejemplos de polímeros sintéticos empleados en ingeniería de tejidos vasculares. Extraída de (Schutte y Nerem, 2013).

Polymer	Comments	Reference
Poly(glycolic acid) (PGA)	Easily modified, can be synthesized in bulk; after dynamic culture provides strong, vasoactive tissue	Niklason et al., 1999
Poly( $\alpha$ , $\omega$ -lactide)-7 co-(1,3-trimethylene carbonate)	Low cost microsponge; after dynamic culture mechanical properties were similar to human artery	Buttafoco et al., 2006b
Polydiioxanone (PDO) – Elastin	PDO has slower resorption rate with low inflammatory response and thrombogenicity. Elastin allows for cell adhesion and growth and improved elasticity	Sell et al., 2006
Poly(ethylene glycerol) (PEG)	Elastic with tunable mechanical properties; resists thrombosis; dissolves in aqueous solution, and can be photopolymerized in presence of cells	Hahn et al., 2007
Poly(1,8-octanediol citrate) (POC)	Elastomer with tunable compliance; can withstand physiological burst pressures	Webb et al., 2007
PGA/Polycaprolactone (PCL)	Two wrapped sheets; similar strength and compliance to native artery	Iwasaki et al., 2008
Poly(glycerol sebacate) (PGS)	Elastomer that promotes cell adhesion and proliferation; promotes elastin deposition in dynamic culture	Gao et al., 2008
Fibrin-Poly(lactide) (PLA)	Strong polymer for initial strength; fibrin for cell adhesion and promotion of ECM synthesis. Led to supraphysiological strength	Tschoeke et al., 2009
Poly(lactide-co- $\beta$ -malic acid) with extended carboxyl arms (PLMA-ECA)	Improved hemocompatibility and cell affinity compared to PLA	Wang et al., 2009

La PCL es un poliéster alifático semicristalino obtenido mediante polimerización por apertura del anillo de monómeros de  $\epsilon$ -caprolactona. Se trata de un polímero hidrófobo que presenta una elevada biocompatibilidad, por lo que es un material de gran interés para aplicaciones biomédicas. La velocidad de degradación de este biomaterial es lenta, menor que la de otros polímeros como el PGA, por lo que también es empleado en aplicaciones como la liberación controlada de fármacos (Liu *et al.*, 2007). Además, sus excelentes propiedades reológicas y viscoelásticas hacen que pueda ser procesado en *scaffolds* de diferentes formas y tamaños, siendo de gran utilidad en ingeniería tisular (Nair y Laurencin, 2007; Woodruff y Huttmacher, 2010). En el caso concreto de diseño de implantes cardiovasculares, los estudios de citotoxicidad de este polímero con fibroblastos murinos de la línea L929 han demostrado una buena adhesión y proliferación celular sobre láminas (*films* de aquí en adelante, debido a su nombre en inglés) de PCL, por lo que puede ser empleado como control positivo de proliferación celular para estudios de este tipo en otros biomateriales (Pagani *et al.*, 2007).

### 1.3. Poli (glicerol sebacato)

Entre los materiales poliméricos que están siendo estudiados para su uso en aplicaciones de ingeniería tisular, uno de los más destacados es el poli (glicerol sebacato) (PGS). El PGS es un polímero elastómero biodegradable y biocompatible obtenido por policondensación de ácido sebácico y glicerol (Figura 4) (Cai y Liu, 2008). El ácido sebácico es un metabolito intermediario natural de la  $\omega$  oxidación de ácidos grasos de cadena larga y el glicerol es uno de los componentes principales de los lípidos. Estos monómeros están aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) y tienen la ventaja de tener un bajo coste económico (Patel *et al.*, 2013). A este hecho ha de añadirse que en la síntesis del polímero no se necesita ningún tipo de aditivo o catalizador para que se produzca la reacción y los productos de degradación, que se encuentran de manera natural en el organismo, son reabsorbidos con facilidad, lo que reduce el riesgo de efectos tóxicos indeseados (Sun *et al.*, 2010).

El proceso de síntesis del PGS comprende dos etapas: una primera fase de pre-polimerización, que da lugar a un pre-polímero viscoso por la formación de cadenas lineales entre los monómeros reaccionantes, y una segunda etapa de curado, en la que las cadenas entrecruzan para formar la red polimérica. La pre-polimerización se puede llevar a cabo a una temperatura de alrededor de 130 °C durante 24 horas, manteniendo una atmósfera inerte normalmente con nitrógeno (Bettinger *et al.*, 2006). Las condiciones de síntesis de la etapa de curado pueden variar, dando lugar a polímeros con propiedades mecánicas diferentes (Chen *et al.*, 2008). En esta etapa, a diferencia de la primera, no se requiere una atmósfera inerte para que se produzca el entrecruzamiento. Las condiciones estándar de curado empleadas en la fabricación del PGS aparecen reflejadas en la Figura 4. Sin embargo, en la bibliografía consultada sobre el tema se observa que no se han correlacionado las propiedades del PGS (en distintos aspectos: físico-químico, mecánico o biológico) con el procedimiento de síntesis variando de manera sistemática alguno de los parámetros. Este TFG pretende contribuir a avanzar en este sentido.

La reacción para la formación del PGS (Figura 4) es una esterificación entre un ácido dicarboxílico, el ácido sebácico, y un alcohol, el glicerol. Son los propios grupos hidroxilo del alcohol los que actúan como iniciadores de la reacción. Así, inicialmente, un grupo hidroxilo primario del glicerol ataca a un grupo carboxilo para formar un monoéster con un grupo carboxilo libre. Este monoéster reaccionará con otro grupo primario del glicerol y posteriormente se separará, formando el monoéster y un subproducto, agua (Maliger *et al.*, 2013). Este proceso ocurre de manera sucesiva con todos los grupos funcionales.

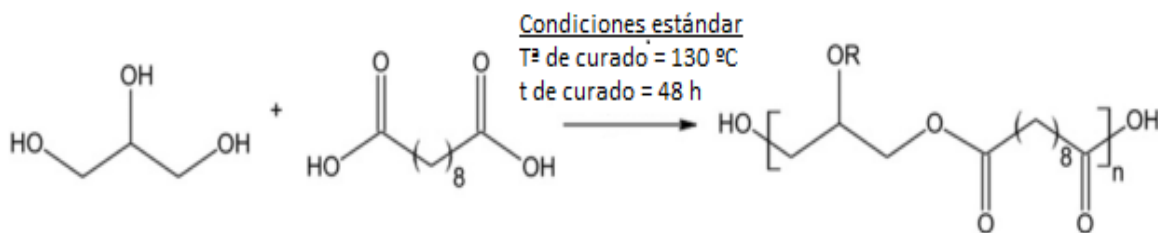


Figura 4. Reacción de síntesis de poli (glicerol sebacato) en condiciones estándar. Modificada de (Patel *et al.*, 2013).

La capacidad del biomaterial de recuperar su forma tras ser sometido a una deformación hacen que sea muy útil cuando se pretende reparar un tejido que se encuentra en un ambiente mecánicamente dinámico, como es el caso de tejidos blandos. En este tipo de tejidos, la elasticidad y la biodegradabilidad son imprescindibles, cumpliendo el PGS con ambos criterios (Chen *et al.*, 2010). Estas propiedades varían en función de las condiciones de síntesis, por lo que se pueden controlar determinados parámetros de fabricación del biomaterial para adaptarlo a la finalidad deseada. Así, la temperatura de curado, el ratio molar de glicerol y ácido sebácico y el tiempo de curado son esenciales para que el material cuente con las cualidades adecuadas (Kemppainen y Hollister, 2010; Rai *et al.*, 2012).

Una característica importante en cualquier tipo de biomaterial es su comportamiento de degradación, sobre todo cuando el objetivo es emplearlo en aplicaciones biomédicas. La progresiva degradación de los materiales afecta con el tiempo a sus propiedades fisicoquímicas. Además, la

posible toxicidad de los productos resultantes también puede hacer que el material no sea apropiado para el objetivo para el que ha sido diseñado (Rai *et al.*, 2012). En este sentido, a diferencia de otros polímeros, el PGS se degrada principalmente por erosión de superficie, debido a su naturaleza hidrófoba, sufriendo una pérdida de masa lineal. Esto permite que el polímero conserve en gran medida su integridad estructural y propiedades mecánicas (Bruggeman *et al.*, 2008), y que se pueda emplear por ejemplo para liberación controlada de fármacos a lo largo del proceso de degradación del mismo.

Asimismo, estudios de hemocompatibilidad del material indican que, en general, los perfiles de coagulación sanguínea son mejores en el PGS que en otros polímeros más utilizados en prótesis vasculares como el ePTFE (Sun *et al.*, 2010; Sant y Khademhosseini, 2010). Esto, unido a las excelentes características de biocompatibilidad y elasticidad que posee este biomaterial hacen del PGS un material con enorme potencial para solucionar los problemas relacionados con los materiales utilizados convencionalmente para la construcción de vasos sanguíneos artificiales de pequeño diámetro. Por ello, resulta fundamental el estudio de las propiedades del polímero (físicoquímicas, mecánicas y biológicas) en función de las condiciones de síntesis.

Además de su uso en ingeniería de tejidos vasculares, el PGS es empleado para un amplio rango de aplicaciones diferentes. Así, se ha utilizado para la fabricación de parches que liberen células en la región infartada o *scaffolds* para el crecimiento celular que son después implantados en la zona dañada para conseguir su reparación. También se ha estudiado la posibilidad de emplearlo en reconstrucción neural, regeneración de la retina, reparación de perforaciones en la membrana del tímpano, y liberación controlada de fármacos (Rai *et al.*, 2012). En definitiva, las propiedades del PGS lo convierten en un biomaterial de creciente interés con un enorme potencial en el campo de la biomedicina.

En este contexto, la hipótesis de partida de este trabajo final de grado es que el PGS, sintetizado a distintas T o t de curado, o incluso empleando diferentes proporciones de reactivos, tiene un comportamiento biológico distinto que se correlaciona con las propiedades físicoquímicas y mecánicas del material en cada caso. Teniendo en cuenta las excelentes propiedades mecánicas del polímero, comentadas anteriormente, el estudio de las propiedades biológicas puede resultar de gran utilidad para evaluar la posible aplicación del PGS como una alternativa a los biomateriales empleados actualmente en ingeniería de tejidos cardiovasculares.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo final de grado (TFG) es el estudio del comportamiento biológico *in vitro* de diferentes láminas (a partir de ahora *films*, por su nombre en inglés) de poli (glicerol sebacato) obtenidas variando distintos parámetros de síntesis del polímero en cuestión: temperatura (T) de curado, tiempo (t) de curado y proporción de reactivos. De esta manera, se pretende determinar la relación existente entre las propiedades biológicas y las condiciones en las que se desarrolla la síntesis del biomaterial, que están a su vez relacionadas con sus propiedades físico-químicas y mecánicas. Asimismo, se persigue conocer el proceso de degradación del polímero por hidrólisis *in vitro*.

Para alcanzar estos objetivos la metodología a seguir será la siguiente:

- Obtener *films* de poli (glicerol sebacato) bajo diferentes condiciones de síntesis, y *films* de PCL (policaprolactona) como material control.
- Estudiar la biocompatibilidad *in vitro* de los materiales basados en láminas de PGS mediante:
  - Ensayos de viabilidad celular de los diferentes materiales polimerizados.
  - Estudios de la adhesión y proliferación celular sobre los materiales a través de microscopía de fluorescencia, y de la morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Comparar el comportamiento biológico de los materiales de PGS y PCL control.
- Correlacionar las propiedades biológicas del material con sus propiedades físico-químicas y mecánicas, ya conocidas de estudios anteriores.
- Estudiar la cinética de degradación hidrolítica de los distintos materiales de PGS en diferentes medios: medio de cultivo, agua y medio básico (degradación acelerada).



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Preparación de los materiales

##### 3.1.1. Preparación de films de poli (glicerol sebacato) en condiciones estándar

El proceso de elaboración de *films* de PGS tiene lugar en dos etapas: una primera fase de pre-polimerización del material, en la que los monómeros de ácido sebácico y glicerol reaccionan formando cadenas lineales o ligeramente entrecruzadas; y una segunda etapa de curado, donde las cadenas entrecruzan formando una red polimérica.

##### *Pre-polimerización*

El montaje necesario para llevar a cabo la pre-polimerización (Figura 5) se compone de un balón esférico de tres vías, en el que se colocan los monómeros que reaccionarán para formar el polímero en cuestión; una columna de refrigeración conectada a un baño, encargada de condensar el agua que se forma como subproducto de la reacción; y un balón de una vía, donde se recoge el agua producida.



Figura 5. Montaje para la pre-polimerización de poli (glicerol sebacato).

En primer lugar, se colocaron las cantidades adecuadas de glicerol y ácido sebácico en el balón de tres vías. La cantidad de reactivos empleados en la reacción viene dada por una mezcla equimolar (Chen *et al.*, 2010; Rai *et al.*, 2012) de los monómeros reaccionantes. De este modo, en función de la cantidad final de polímero que se desee obtener y teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción, la masa necesaria de cada reactivo se calcula a partir de sus pesos moleculares (PM). En este caso se colocaron en el balón 0,21 moles de cada uno de los reactivos, lo que teniendo en cuenta el PM del glicerol (92,09382 g/mol) (VWR International, 24387) y del ácido sebácico (112,12 g/mol) (Sigma-Aldrich, 28258), equivale a 2 y 4,4 g respectivamente.

Tras introducir la cantidad adecuada de los reactivos en el balón, se añadió un agitador magnético para mantener una agitación constante durante la pre-polimerización, condición requerida para que se produzca la reacción.

A continuación, el balón de tres vías se conectó con el resto del montaje. Para que esta primera etapa se desarrolle correctamente, el montaje debe estar cerrado herméticamente. Para ello, la columna de destilación se conecta por un extremo al balón en el que se encuentran los reactivos a través de su apertura al exterior de mayor diámetro, y por otro al balón de una sola vía. Además, el balón con los monómeros se conecta por una de sus aperturas pequeñas a una entrada de nitrógeno, que se encarga de crear la atmósfera inerte necesaria para que la reacción tenga lugar (Sundback *et al.*, 2005). En todas las conexiones se utilizan abrazaderas para fortalecer la unión entre los elementos y asegurar el cierre hermético. Como se debe evitar cualquier contacto con el ambiente, para cerrar

tanto la parte superior del serpentín como tercera vía del balón donde tiene lugar la reacción, se utilizan tapones *septum*. El tapón del serpentín se conecta a través de una aguja a una trampa de nitrógeno que contiene agua, permitiendo la salida de este gas al exterior. De este modo, se asegura que los monómeros no reaccionan con agentes externos al mismo tiempo que se le da escape al flujo continuo de nitrógeno para que no se cree sobrepresión dentro del montaje. Por último, la columna de refrigeración se conecta al baño a través de las gomas, tal y como se observa en la Figura 5.

Una vez comprobado el cierre hermético del montaje, se enciende la placa calefactora (Heidolph MR Hei-Standard) donde se coloca previamente una manta que se ajusta a las dimensiones del balón de tres vías. Para el control de la temperatura, se conecta a la manta un termopar (Heidolph EKT Hei-Con) que se fija a una temperatura de 130°C. Alcanzada la temperatura necesaria, se enciende la agitación a baja velocidad, alrededor de 100 rpm. Manteniendo estas condiciones durante 24 horas, se consigue un material viscoso, el pre-polímero de PGS. Este pre-polímero es el resultado de esterificaciones entre el glicerol y el ácido sebácico formando cadenas con un ligero entrecruzamiento debido a las primeras reacciones de los grupos carboxilo del ácido con grupos hidroxilo secundarios del alcohol (Maliger *et al.*,2013).

### Curado

A fin de conseguir el objetivo de obtener una red bien entrecruzada, es necesaria una segunda fase de curado del material. En este punto se ha de tener en cuenta que antes de que finalice por completo la primera etapa, se deben preparar los moldes en los que se introduce el pre-polímero para el curado. Para ello, se corta una lámina de teflón, con un cuadrado en el centro, y se coloca sobre una placa de vidrio forrada con papel adhesivo. La unión de la lámina de teflón y la placa de vidrio se consigue mediante pinzas (Figura 6).

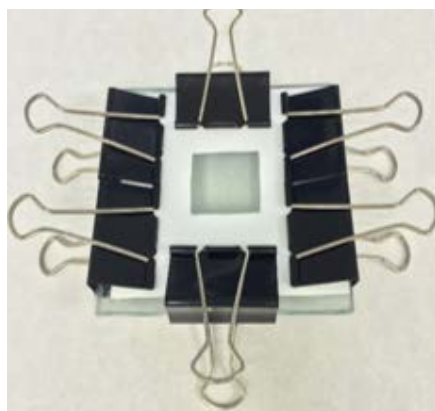


Figura 6. Molde utilizado para la obtención de *films* de PGS.

Con el molde de teflón previamente preparado, tras las 24 horas de la etapa inicial, se extrae el pre-polímero viscoso del interior del balón con ayuda de una pipeta y se dispensa de manera uniforme sobre el cuadrado que queda en el centro del mismo. Una vez rellenado por completo el cuadrado, se introduce el molde en el horno (J.P. Selecta Vaciotem, 4000571) para comenzar el curado. Este proceso consiste en someter al pre-polímero a una temperatura de 130 °C durante 48 horas para que las cadenas entrecrucen formando un *film* sólido y compacto. Tras este tiempo, se extrae el molde del horno y se deja enfriar a temperatura ambiente durante dos horas. Finalmente, se retiran las pinzas, se levanta la lámina de teflón y con ayuda de una espátula se despega el polímero de la placa de vidrio forrada. Empleando las cantidades de reactivos que se utilizaron, se podían obtener en cada polimerización *dos films* de PGS (Figura 7) de dimensiones 32 x 32 x1 mm.



Figura 7. Film de PGS obtenido bajo condiciones estándar de síntesis.

### 3.1.2. Obtención de *films* de poli (glicerol sebacato) variando las condiciones de síntesis

A partir de cambios en determinados parámetros del protocolo estándar de síntesis del poli (glicerol sebacato) se obtienen materiales con propiedades físico-químicas y mecánicas diferentes. En el presente trabajo se fabricaron *films* de PGS variando las siguientes condiciones de síntesis: T de curado, tiempo de curado y proporción inicial de cada uno de los monómeros reaccionantes.

En todos los casos la etapa de pre-polimerización inicial se realiza del mismo modo; manteniendo una temperatura constante de 130°C durante 24 horas, en atmósfera controlada de nitrógeno y con una agitación de alrededor de 100 rpm. Además, toda la instrumentación requerida para la obtención de los *films* es la misma que si se sintetizan siguiendo el protocolo estándar. Por tanto, son solo el tiempo y la temperatura de curado, así como la proporción de cada uno de los reactivos, los que marcan la diferencia en la elaboración de estos *films*. En la Tabla 2 se recogen los parámetros de síntesis de cada uno de los *films* polimerizados, incluyendo los del protocolo estándar. Para cada condición se fabricaron dos *films* de PGS.

Tabla 2. Parámetros de síntesis de los diferentes *films* de PGS fabricados.

Número de muestra	Temperatura de curado (°C)	Tiempo de curado (horas)	Composición molar ácido sebácico: glicerol
1	130	48	1:1
2	130	96	1:1
3	150	48	1:1
4	130	48	2:1

Tal y como se refleja en la Tabla 2, la muestra número 1 se corresponde con el *film* elaborado bajo condiciones estándar: T 130 °C, t de curado 48 h y composición equimolar, misma proporción de cada uno de los monómeros (se emplearon 2,2 g de ácido sebácico y 1 g de glicerol). En la muestra 2 se modifica el tiempo de curado y en la 3 la temperatura de esta etapa, manteniendo el resto de parámetros. La cuarta muestra se corresponde con un *film* fabricado con una proporción distinta a la que indica el protocolo estándar: composición molar doble de ácido sebácico que de glicerol. Así, teniendo en cuenta los pesos moleculares de cada uno de los reactivos, indicados en el apartado 3.1.1 *Preparación de films de poli (glicerol sebacato) en condiciones estándar*, y que la composición debe ser doble, para su fabricación se colocaron en el balón esférico 4,4 g de ácido sebácico y 1 g de glicerol. La temperatura y tiempo de curado en este caso fueron las que establece el protocolo estándar: 130°C durante 48 horas. Cada uno de los *films* se fue almacenando en bolsas zip a medida que se fueron sintetizando, hasta el momento en que se realizó el posterior lavado, que se llevó a cabo una vez que se habían sintetizado todas las muestras.

### 3.1.3. Lavado de los *films* de PGS

Tras la obtención de los *films* de PGS, se requiere de un proceso de lavado de los materiales a fin de eliminar las cadenas que no han entrecruzado en la fase de curado y restos de monómeros no reaccionados.

El protocolo de lavado de los *films* de PGS comprende el paso de los materiales por diferentes disolventes y se desarrolla a lo largo de seis días. Este protocolo fue puesto a punto en un trabajo anterior llevado también a cabo en el Centro de Biomateriales, y se realizó como sigue:

Día 1: Inicialmente los *films* a temperatura ambiente se sumergen en 60 ml de tetrahidrofurano (THF; Sigma-Aldrich, 360589) en un recipiente cerrado herméticamente para evitar la evaporación del disolvente, y se colocan en un agitador a 100 rpm. Este disolvente provoca un hinchado progresivo del material, por lo que es importante introducir la cantidad suficiente del mismo como para que lo cubra en exceso una vez hinchado evitando el contacto con el ambiente. Además, la elección del recipiente apropiado también es fundamental, ya que se ha de evitar que el film contacte con las paredes tras el hinchado, sometiéndose a tensiones indeseadas.

Día 2: Tras 24 horas, se retira el THF con una pipeta y se añaden de nuevo 60 ml de este disolvente. La elevada volatilidad del mismo hace que este paso sea crítico para conseguir un lavado adecuado del material. Si el tiempo que se tarda en renovar el disolvente no es breve, todo el THF se evapora y la muestra se deshincha bruscamente formándose grietas en la estructura del polímero. Para evitar que esto ocurra, se debe ser lo más rápido posible en la renovación, y retirar la máxima cantidad de THF inicial pero asegurando que el film queda cubierto. El recipiente bien cerrado se vuelve a dejar en agitación continua durante 24 horas.

Día 3: Se realiza un cambio progresivo de THF a etanol. La transición no se produce retirando directamente el disolvente en el que se encuentran los *films* y añadiendo etanol, pues de esta manera se produciría la fracturación interna del material. Por este motivo, se realiza un cambio de disolvente progresivo que permite un deshinchado gradual de la muestra. Así, el cambio total de un disolvente a otro se consigue del siguiente modo:

- En primer lugar, se retira con una pipeta un 25% del THF utilizado y se coloca el mismo volumen de etanol. Dado que se añadieron 60 ml al recipiente con los *films*, se retiran 15 ml de THF y se introducen 15 ml de etanol. La mezcla se mantiene en agitación 1 hora.
- Trascorrida esa hora, se retira un 50% del volumen de la mezcla de disolventes del recipiente, y se introduce el mismo volumen, 30 ml, de etanol. El recipiente también se mantiene en agitación durante 1 hora.
- A continuación, se repite el proceso teniendo en cuenta que esta vez se retira un 75 % del volumen de la mezcla de disolventes, 45 ml. De nuevo se coloca en agitación durante 1 hora.
- Por último, se retira todo el volumen de mezcla de disolventes del recipiente y se introducen 60 ml de etanol. Como en etanol el hinchado no es tan acusado como en THF, en este caso no resulta tan crítico dejar el material sin disolvente durante unos segundos porque el film ya se ha deshinchado en gran medida a lo largo del cambio progresivo, por lo que no tiende a fragmentarse. Se deja en agitación hasta completar las 24 horas, es decir, 21 horas más.

Día 4: Se retira el etanol y se añaden 60 ml de etanol nuevo, donde los films se mantienen en continua agitación otras 24 horas.

Día 5: Pasadas 24 horas en etanol limpio, se realiza otro cambio progresivo de disolvente, esta vez desde etanol a agua desionizada. El proceso es idéntico a la transición THF a etanol, pero esta vez con etanol/agua.

Día 6: Finalmente, se retira el medio y se añaden 60 ml de nueva agua desionizada, colocando de nuevo el recipiente en agitación durante 15 minutos.

Aplicando este protocolo a todas las muestras fabricadas, se obtuvieron *films* de PGS libres de las cadenas poliméricas que no entrecruzaron durante el curado.

#### 3.1.4. Secado de los materiales

En los experimentos de caracterización biológica de los *films* de PGS no es necesario secar los *materiales* porque antes de ser usados se deben someter a un proceso de sanitización. Sin embargo, para el ensayo de degradación, que será comentado a posteriori, se requiere que las muestras estén totalmente secas para poder evaluar el peso seco antes y después de este experimento. Por tanto, todos los *films* obtenidos bajo las distintas condiciones se sometieron a este proceso.

Para eliminar cualquier rastro de disolvente en los materiales, una vez lavados, los *films* de PGS se extrajeron del agua desionizada donde estaban sumergidos con ayuda de unas pinzas. Estos *films* se colocaron sobre placas Petri y se dejaron 8 horas secando al aire. Se cubrieron las placas con *Parafilm* agujereado para evitar que se contaminasen las muestras y dejar una vía de salida para la evaporación del disolvente.

Trascurridas las 8 horas, se introdujeron las muestras en un desecador a vacío (J.P. Selecta Vacuo-temp, 4000474), con extracción continua durante 1 hora. Pasado este tiempo, se cerró la llave del desecador para mantener el vacío en su interior, se apagó la bomba y dejó 24 horas para conseguir la deshidratación completa del *film*. De este modo, se consiguieron *films* completamente secos para poder llevar a cabo el ensayo de degradación.

#### 3.1.5. Preparación de *films* de policaprolactona

El objetivo de la preparación de láminas de PCL era disponer de un material que, como ya se ha comentado en el apartado 1.2.1 *Biomateriales empleados en remplazo vascular*, según la bibliografía mostraba una buena adhesión y proliferación celular cuando se empleaban fibroblastos de ratón de la misma línea comercial que se utilizó en el presente trabajo para llevar a cabo los estudios de comportamiento biológico del PGS. De esta forma, se pretendía utilizar los *films* de PCL sembrados con estos fibroblastos como un control positivo de proliferación celular con el que comparar los resultados obtenidos con la siembra en los *films* de PGS.

Para la elaboración de las láminas de este polímero, se colocaron 15 bolas de granza de PCL (19561, Polysciences) sobre una placa de vidrio forrada con papel adhesivo que se introdujo en el horno a 90°C durante 5 minutos para que las bolas comenzaran a fundirse. Pasado este tiempo, se colocó encima de las bolas parcialmente fundidas otra placa de vidrio forrada, quedando la granza entre las dos placas, y se volvió a introducir en el horno a 90 °C durante 2 horas. Finalmente, se sacaron las placas del horno y se dejó enfriar a T ambiente. Cuando la temperatura había disminuido lo suficiente como para poder manipular las placas, se sacó el *film* que se había formado entre ellas con ayuda de una espátula.

### 3.2. Caracterización biológica de los materiales

Antes de comenzar los ensayos de caracterización biológica, se troquelaron los *films* de todos los materiales que se iban a utilizar en los experimentos en discos circulares de 5 mm de diámetro. Además, para evitar contaminaciones, se sometieron todas las muestras a un proceso de sanitización. Para ello, los discos de 5 mm obtenidos para cada uno de los *films* de PGS y PCL, se colocaron en diferentes placas de cultivo multipocillo P48 y se cubrieron con etanol al 70 %. Pasados dos minutos, se retiró el etanol y se añadió a cada uno de los pocillos con los materiales etanol previamente filtrado, esta vez en condiciones de esterilidad. Las muestras se mantuvieron en etanol filtrado durante 2 horas. Pasado este tiempo, se retiró el etanol, se cubrieron las muestras con medio de cultivo, y se colocaron las placas en el incubador (Thermo Fisher scientific modelo 3111) a 37°C y una presión de CO<sub>2</sub> del 5%, donde estuvieron durante 24 horas para conseguir el acondicionamiento de los materiales. El medio de cultivo se preparó a partir de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (10938025, Fisher) rico en glucosa que se suplementó con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Innoprot) y un 1% de penicilina-estreptomina (P/S) (Innoprot). Este medio es el que se utilizó también para los cultivos celulares.

### 3.2.1. Cultivo de fibroblastos

Transcurridas las 24 horas necesarias para que se produjese el acondicionamiento de los materiales, se sembraron las células sobre los discos de PGS obtenidos bajo diferentes condiciones de síntesis (Tabla 2) y los de PCL, que se encontraban en placas multipocillo P48. Para la siembra se partió de un cultivo de fibroblastos de ratón en pase 10 de la línea celular L929 (C34/An connective tissue, Sigma Aldrich). En primer lugar, se retiró el medio de cultivo en que se encontraban las células en un frascón T75 y se realizó un lavado con DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (14200-059, Gibco). A continuación, se añadieron 2 ml de tripsina (Gibco) para separar las células adheridas a la superficie del frasco de cultivo, y se incubó a 37°C durante 2 minutos para permitir actuar al enzima. Transcurridos los 2 minutos, se añadieron 4 ml de medio bloqueo (medio DMEM suplementado con un 10% de FBS) a cada frascón, para bloquear la acción de la tripsina. Tras la adición del medio bloqueo, se recogió el contenido del frasco de cultivo (tripsina + medio bloqueo + células) con una pipeta y se pasó a un tubo de centrifuga. Se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm, se eliminó el sobrenadante (tripsina + medio bloqueo) y el pellet, que contenía las células, se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo. Para conocer el número de células inicial, se colocaron 10 µl de la suspensión celular en la cámara Neubauer (0640110, Marienfeld), donde se realizó el recuento. A partir del recuento, se ajustó la suspensión celular para conseguir obtener una densidad celular de 10000 células por material sembrando 5 µl en cada disco. Se fijó este volumen de siembra porque se consideró que era el ideal para conseguir una distribución uniforme de las células sobre el disco y evitar que, por la hidrofobicidad del material, la suspensión celular fuese repelida por la superficie y las células no quedasen adheridas. Tras la siembra, se introdujeron las placas con los discos en el incubador a 37°C durante 30 minutos para favorecer la adhesión de las células al material. Pasado este tiempo se añadieron a cada pocillo 400 µl de medio de cultivo para fibroblastos. El medio se renovó cada 24 horas.

### 3.2.2. Ensayos de viabilidad celular in vitro

Se llevaron a cabo tres ensayos distintos de viabilidad celular, porque no se habían realizado aún ensayos de este tipo sobre estos materiales, y el primero de ellos (MTT), de uso habitual en cultivos con biomateriales poliméricos, no arrojó resultados satisfactorios en este caso. Esto llevó a decidir llevar a cabo un segundo ensayo similar (MTS), también muy habitual, y en paralelo un tercer ensayo diferente y no destructivo (Alamar Blue). Estos dos últimos sí habían sido usados con este tipo de materiales, según la bibliografía. En la sección de resultados se comentará las imágenes obtenidas y se intentará explicar la razón por la que en algunos casos los resultados no fueron los esperados.

#### Ensayo MTT

El ensayo MTT (1465007, Roche) es un método colorimétrico que permite determinar la viabilidad celular en función de la actividad metabólica de la célula. Se basa en una sustancia, bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), soluble en agua y de color amarillo, que se reduce metabólicamente en las células vivas dando lugar a cristales de color azul-violeta de un compuesto denominado formazán, que absorbe en la zona de ultravioleta (Figura 8). Los cristales de formazán se solubilizan y el color resultante de la solución se cuantifica espectrofotométricamente. La absorbancia de este compuesto está directamente relacionada con el número de células viables presentes en la muestra.

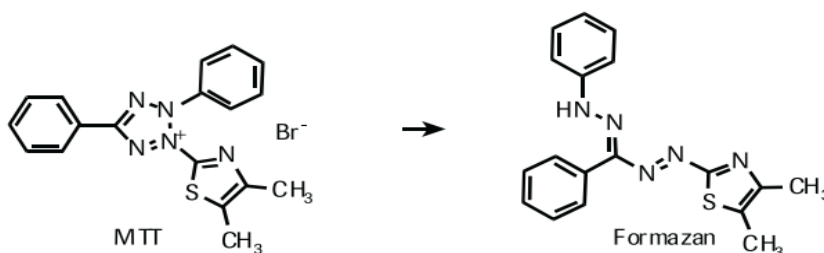


Figura 8. Reacción de transformación de la sal de tetrazolio MTT a su producto formazán realizada por las células viables.

En el presente trabajo, se realizó un ensayo MTT para evaluar la viabilidad de las células cultivadas sobre los 4 tipos de materiales de PGS sintetizados bajo diferentes condiciones y los de PCL a diferentes tiempos de cultivo: 5 horas, 4 días y 7 días. Para cada tiempo se emplearon 3 réplicas de cada material. Además, se preparó una curva patrón sembrando densidades conocidas de células en una placa multipocillo P48 sin materiales, sólo con medio, para poder relacionar la concentración celular con la absorbancia. La curva patrón se construyó sembrando las siguientes densidades celulares en diferentes pocillos: 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000 y 100000 células por pocillo.

Siguiendo el protocolo que proporciona el proveedor del reactivo, en primer lugar se preparó la disolución de MTT añadiendo 10 µl de reactivo MTT por cada 200 µl de medio de cultivo. A continuación, se retiró el medio de cultivo de los pocillos que contenían los materiales cultivados y se añadieron 210 µl de solución MTT a cada uno de ellos, así como a los pocillos de la curva patrón. Las placas se colocaron en el incubador durante 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 200 µl de la solución de solubilización, y se pasó el contenido de los pocillos a una placa multipocillos P96, donde se leyó la absorbancia entre 550 y 600 nm en un espectrofotómetro de placas multipocillo (Victor 3 1420, Perkin-Elmer).

### Ensayo MTS

El ensayo de proliferación celular MTS (G3581, Promega) es otro método colorimétrico que permite determinar el número de células viables que hay en un cultivo o tejido según la actividad metabólica de la célula. Este experimento ha sido empleado en otros trabajos para evaluar la viabilidad celular del PGS (Sundback et al., 2005). Al igual que el ensayo MTT, se basa en utilizar una sal de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio]; MTS], que es reducida por las células viables dando lugar a un compuesto coloreado, en este caso soluble en medio de cultivo, también llamado formazán (Figura 9). Aunque el producto formado se denomine de la misma manera que el que se obtiene en el ensayo MTT, no se trata en ambos casos de la misma sustancia. Esto es debido a que formazán hace referencia a una familia de compuestos que resultan de la reducción de distintas sales de tetrazolio por deshidrogenasas y reductasas. Existe una amplia variedad de colores de estos compuestos dependiendo de la sal de tetrazolio original utilizada como sustrato de la reacción. De este modo, aunque tanto en MTS como en MTT el producto formado reciba la misma denominación, la sal original de partida es diferente y también los productos en los que se transforman. Como en el ensayo MTS se obtiene un producto soluble en medio de cultivo, a diferencia del MTT, en este experimento no se requiere de un segundo paso de solubilización con solventes volátiles, siendo más rápido y en principio seguro para los materiales basados en PGS. La cantidad de formazán que se produce está también relacionada con el número de células viables y se puede conocer midiendo la absorbancia de este compuesto a 490 nm previa realización de una curva patrón que relacione la densidad celular con la intensidad de señal del MTS, como ocurría en el MTT.

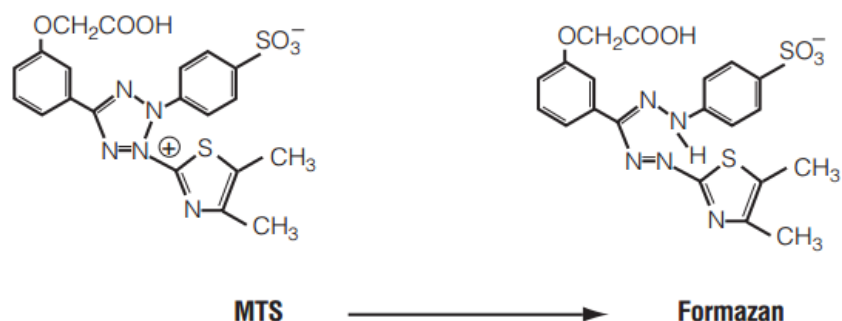


Figura 9. Reacción de transformación de la sal de tetrazolio de MTS a su producto formazán por parte de las células viables.

Con el objetivo de analizar el crecimiento y la supervivencia celular en los materiales de PCL y PGS, se realizó también un ensayo MTS, empleando los mismos tipos de materiales que en el ensayo MTT, esta vez para dos tiempos de cultivo diferentes: 2 y 5 días, por un lado para conocer si esta

técnica era adecuada para este tipo de materiales, y en segundo lugar para evaluar la viabilidad celular. Para comenzar el experimento, a partir del protocolo proporcionado por el fabricante, inicialmente se preparó la disolución MTS empleando la siguiente proporción: 20 µl de MTS por cada 100 µl de medio de cultivo. Seguidamente, se retiró el medio de cada uno de los pocillos donde estaban los materiales cultivados y se añadieron 200 µl de solución MTS a cada uno de ellos. La curva patrón se realizó a partir de las mismas densidades celulares que en el ensayo MTT. A continuación, se dejaron las placas incubando durante 4 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, de cada pocillo se tomaron 100 µl dos veces (2 réplicas de cada medida) y se pasaron a una placa multipocillos P96, donde se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro de placas multipocillo (Victor 3 1420, Perkin-Elmer), que se relaciona directamente con la concentración celular, como ocurría con el MTT.

#### *Test de viabilidad celular Alamar Blue*

Un tercer ensayo que se realizó para estudiar la proliferación celular fue con el kit comercial Alamar Blue (88951, Life Technologies). Este experimento ha sido ya empleado con éxito en materiales de PGS (Chen et al., 2010; Sant y Khademhosseini, 2010) y está basado en la capacidad de las células viables de reducir la forma oxidada del reactivo Alamar Blue, que es de color azul y no fluorescente, a una forma reducida del mismo, que es de color rojo y presenta fluorescencia. De este modo, a través de medidas espectrofotométricas, se puede conocer la cantidad de células viables presentes en la muestra.

El experimento para determinar la proliferación celular de los fibroblastos sobre el PGS, se realizó a tres tiempos de cultivo diferentes: 1, 3 y 5 días. Se emplearon 3 muestras para cada condición, pero como el reactivo Alamar Blue no es tóxico para las células, el ensayo no interrumpe el cultivo, permitiendo continuas medidas de la cinética de proliferación celular. De esta manera, no se necesitaron muestras distintas para cada tiempo sino que con 3 réplicas para cada condición de síntesis fue suficiente. Los materiales empleados fueron los mismos que en MTS y MTT. Como, además de evaluar la viabilidad celular, se pretendía también encontrar un método que fuera adecuado para ello en cultivos de PGS y los fibroblastos son células muy proliferativas, en este ensayo se optó por emplear una densidad de siembra menor, 1500 células por disco.

En primer lugar, se retiró el medio de cultivo de los pocillos donde estaban los materiales sembrados y se añadieron 40 µl del reactivo Alamar Blue (un 10% del medio de cultivo que hay en el pocillo). A continuación, se dejó la placa en el incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. Pasadas las 4 horas, se pasó el contenido de cada pocillo a una placa P96 y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro de placas multipocillo a una longitud de onda de 570 y 600 nm. Con los datos obtenidos, se calculó la reducción porcentual de reactivo Alamar Blue reducido según indica el fabricante. Tras el ensayo, se añadieron 400 µl de medio de cultivo a los pocillos con los materiales en una nueva placa P48. El proceso se repitió para los 3 tiempos de cultivo.

Como control negativo para determinar la señal del fondo, se incluyó en la placa un pocillo en el que únicamente se colocaron 400 µl de medio de cultivo. Como control positivo se colocó un pocillo en el que solo había reactivo Alamar Blue reducido, sin células. Para preparar la forma reducida del reactivo, se autoclavó el mismo en medio de cultivo (1 volumen de reactivo Alamar Blue: 10 volúmenes de medio de cultivo) durante un ciclo de 15 minutos. En estos pocillos también se midió la absorbancia a 570 y 600 nm.

#### **3.2.3. Estudio de la adhesión y proliferación celular mediante microscopía de fluorescencia**

Con el objetivo de evaluar la adhesión celular sobre los *films* de PGS fabricados bajo diferentes condiciones de síntesis y los *films* de PCL, se realizó el marcaje de las células empleando tres marcadores diferentes: anticuerpo anti-vinculina, falacidina y DAPI. La vinculina es una proteína de membrana-citoesqueleto de las células de mamíferos que se localiza en las adhesiones focales participando en el anclaje de las moléculas de integrina al citoesqueleto de la actina. En el caso de la falacidina, se trata de una toxina que se une específicamente a la F-actina del citoesqueleto, mientras que el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) es un marcador fluorescente que tiñe el núcleo de las células.



El experimento se realizó empleando tres muestras de cada condición para tres tiempos de cultivo diferentes: 5 horas, 4 días y 7 días. El paso inicial para llevar a cabo estos ensayos fue la fijación de las células sobre los materiales. Para ello, se retiró el medio de cultivo de los pocillos con los discos sembrados y realizó un lavado con DPBS 0,1 M. Seguidamente, las células se fijaron sobre los materiales añadiendo una disolución de paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos. A continuación, se realizaron varios lavados con DPBS en frío.

Tras los lavados, antes de incubar con los marcadores, fue necesario someter los materiales a una tinción con Sudan Black (19,966-4, Sigma Aldrich). Este compuesto se utiliza para evitar que la propia autofluorescencia de los materiales interfiriese con el experimento (Jaafar et al., 2011). Para ello, los materiales sembrados con los fibroblastos en placas P48 se incubaron con Sudan Black al 0,3 % en etanol al 70 %. Esta solución se filtró antes de ser añadida a los diferentes pocillos. Tras incubar a 37°C durante 15 minutos con este compuesto, se realizaron 4 lavados con DPBS. A continuación, se añadieron 200 µl de una solución de tampón bloqueo, compuesta por PBS 0, 1 M, 1% de Tritón X 100 (T8787, Sigma Aldrich) y 10 % de FBS Qualified, y se incubó durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se incubó con el anticuerpo primario, anticuerpo anti-vinculina producido en ratón (V9131, Sigma Aldrich), a 4°C durante toda la noche. El anticuerpo primario se utilizó a una dilución 1/500 con respecto a la concentración comercial.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados con PBS durante cinco minutos y se incubaron las muestras durante 2 horas en oscuridad con el anticuerpo secundario para la vinculina, anti-ratón procedente de ratón (A21236, Invitrogen), y con falacidina (B607, Life Technologies). Tanto la falacidina como el anticuerpo secundario para la vinculina se utilizaron en diluciones 1/500 con respecto al stock. Pasado este tiempo, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS para eliminar la falacidina residual y se añadió DAPI (D9564, Sigma Aldrich), en una dilución 1/5000 con respecto a la concentración inicial. Finalmente, se realizaron 2 lavados de 5 minutos en PBS y se observaron las muestras al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) a 461, 512 y 647 nm (longitudes de onda de emisión de DAPI, falacidina y anticuerpo secundario para vinculina, respectivamente).

### **3.2.4 Estudio de la morfología celular mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La caracterización morfológica de las células crecidas sobre los distintos *films* de PGS y los de PCL se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). El SEM utiliza un haz de electrones para interactuar con la muestra, a diferencia de los microscopios ópticos que emplean radiación electromagnética. Este haz de electrones barre la superficie de la muestra, y los electrones que la superficie devuelve son recogidos por un detector.

El experimento se realizó empleando una muestra de cada condición para tres tiempos de cultivo diferentes: 5 horas, 4 y 7 días. Se emplearon los mismos tipos de materiales que en los ensayos MTS y los experimentos de adhesión. El primer paso para poder observar las células crecidas sobre los materiales en el SEM (JSM-6300, JEOL) es la fijación de las mismas. Las células se fijaron sobre los materiales empleando una disolución de glutaraldehído al 3,5% en PBS 0,1 M que se añadió a los materiales cultivados con los fibroblastos. La placa con los materiales se colocó en el incubador a 37°C durante 1 hora. Tras este tiempo, se retiraron los 400 µl de la disolución de cada pocillo y se realizó un lavado con DPBS no estéril. A continuación, se retiró el DPBS y se añadieron 400 µl más de este compuesto por pocillo.

Una vez fijadas, las muestras se sometieron a un protocolo para poderlas observar al microscopio electrónico de barrido. En primer lugar, se retiró el DPBS donde estaban sumergidas y se realizaron dos lavados de diez minutos con PB 0,1 M. Tras los lavados, las muestras fueron postfijadas incubando con tetraóxido de osmio al 2% en PB 0,2 M durante 1 hora. En el proceso, las muestras permanecieron en oscuridad y con agitación constante. Transcurrido ese tiempo, se retiró el tetraóxido de osmio y llevaron a cabo cuatro lavados con H<sub>2</sub>O destilada a 4°C de 10 min cada uno.

Seguidamente, se realizó la deshidratación de las muestras, paso imprescindible para la observación al SEM. Para ello, se sometieron los materiales cultivados a un gradiente creciente de concentración de alcoholes etílicos hasta etanol absoluto. De esta manera, tras retirar el H<sub>2</sub>O destilada, se añadieron a cada pocillo 400 µl de etanol al 30% a 4°C que se dejó actuar durante 10 minutos. A

continuación, se repitió el proceso empleando etanol primero al 50 % y después al 70 %. Después se añadió etanol al 96% también durante 10 minutos a 4°C, pero esta vez se repitió el proceso 3 veces.

El siguiente paso consistió en el secado de las muestras para evitar que el resto de agua u otros líquidos que pudiesen quedar deformasen la estructura original. El secado se consiguió realizando el punto crítico de cada una de ellas en el Servicio de Microscopía de la UPV. Para ello, se montaron las muestras sobre unos moldes especiales, con cuidado de colocar los materiales de manera que las células quedasen hacia arriba y se colocaron sobre unas cubetas con etanol, para que las muestras estén siempre impregnadas en él y evitar que se sequen.

A continuación, se montaron las muestras desecadas en el portamuestras de SEM. Estos portamuestras son de cobre y las muestras quedan pegadas en ellos con cinta adhesiva. Para que las muestras fuesen conductoras se realizó un puente de carbono sobre cada una de ellas. Finalmente, se observaron en el microscopio electrónico de barrido aplicando una tensión de 15 kV de voltaje y a 9 mm de distancia de trabajo.

### **3.3. Ensayo de degradación de films de PGS**

Para conocer el comportamiento de degradación del poli (glicerol sebacato) en determinados medios, se realizaron estudios *in vitro* y acelulares de los materiales preparados empleando distintas condiciones de síntesis. De esta forma, en el presente trabajo se llevaron a cabo ensayos de degradación de este material por hidrólisis (en agua ultrapura de tipo I, Mili-Q), en el medio de cultivo de fibroblastos que se había preparado para los cultivos y de manera acelerada en medio básico (disolución acuosa al 0,01% en peso de NaOH).

En el ensayo de degradación, que tuvo una duración de un mes, se emplearon discos de 5 mm de diámetro de los *films* de PGS. Inicialmente, se colocaron los discos en placas de 48 pocillos. A continuación, se tomó el peso seco de cada una de las muestras en una balanza analítica (Mettler Toledo AE-240, sensibilidad de 0.01 mg). Tras tomar el peso inicial seco, se añadieron 2 ml de cada uno de los medios a los pocillos de su placa correspondiente que contenían los materiales. Estas placas se introdujeron en un incubador a 37°C, donde permanecieron durante una semana.

Transcurridas las dos semanas desde la toma inicial del peso seco, se volvieron a secar y pesar las muestras. Para ello, se retiró el medio de cada uno de los pocillos y se sometieron los discos a un proceso de secado como el de las muestras iniciales tras el lavado para que se encontraran en las mismas condiciones. En el caso particular de las muestras que se encontraban en NaOH, estas deben ser lavadas antes del proceso de secado con el objetivo de eliminar los restos de sosa y sales que pudiesen quedar en el material y detener por completo la degradación. Con este fin, las muestras de NaOH se colocaron en una nueva placa de pocillos donde se añadieron 2 ml de agua Mili-Q en aquellos pocillos donde se pusieron estas muestras. Se dejaron en agitación durante 1 hora, se renovó el agua Mili-Q y se volvió a colocar en agitación otra hora más. Después, se realizó el secado según lo expuesto en el apartado 3.1.4 *Secado de los materiales*, y la pesada correspondiente. Este proceso se repitió de nuevo a las 4 semanas.

#### *Análisis estadístico*

Los resultados obtenidos en el ensayo de degradación en cada medio para cada tipo de material fueron expresados como la media  $\pm$  SD (desviación estándar). Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de múltiples rangos con el software *Statgraphics Centurion XVI*, considerando un *p* valor  $< 0,05$  como significativo. En caso de existir diferencias estadísticamente significativas, se indica en las figuras correspondientes mediante un asterisco (\*).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

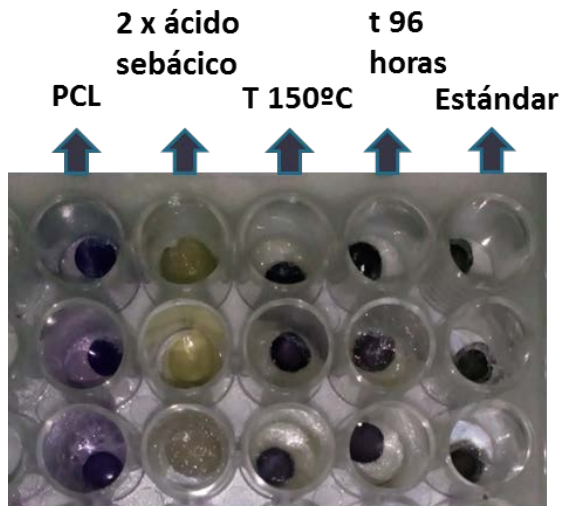
### 4.1. Desempeño biológico de los materiales

El estudio de la biocompatibilidad de los materiales potencialmente útiles en aplicaciones de ingeniería tisular resulta esencial para evaluar los efectos del entorno fisiológico en el que serán implantados sobre estos biomateriales, así como los que éstos puedan inducir sobre el ambiente que los rodea. El primer paso en los estudios de biocompatibilidad es la evaluación de la citotoxicidad, a través de ensayos en los que se estudia tanto la adhesión y proliferación celular como el mantenimiento de la morfología característica de cada tipo celular. Estos ensayos se realizan generalmente con líneas celulares establecidas, como es el caso de los fibroblastos murinos L929. En el presente trabajo, se eligió esta línea como referencia para llevar a cabo los ensayos de evaluación de la biocompatibilidad de los diferentes materiales basados en poli (glicerol sebacato) y poder comparar los resultados obtenidos con un material control que se sabe por bibliografía que da buenos resultados en estos estudios, la policaprolactona.

Las características de la superficie de los materiales cultivados (hidrofobicidad, carga, topografía, etc.) y las propiedades físico-químicas de los mismos, pueden influir en gran medida sobre estos procesos de adhesión y proliferación celular y sobre la morfología de las células. Es por ello que en la búsqueda del material basado en PGS más adecuado para su utilización en ingeniería tisular (y en cada aplicación en particular) es necesaria la caracterización biológica de los diferentes *films* de PGS fabricados que poseen distintas propiedades físico-químicas. Así, se pretende determinar cuáles son las condiciones de síntesis más apropiadas para conseguir un buen crecimiento de las células sobre los materiales. De esta manera, en este TFG, se realizaron distintos experimentos para estudiar el comportamiento biológico de los fibroblastos cultivados sobre la superficie de los distintos materiales de PGS con el objetivo de establecer una correlación entre las propiedades físico-químicas características de cada material, que dependen a su vez de condiciones de síntesis, y dicho comportamiento biológico. Los resultados de los experimentos se muestran a continuación.

#### 4.1.1. Viabilidad celular

Aunque se probaron tres ensayos distintos para determinar la viabilidad celular de los fibroblastos de la línea celular L929 cultivados sobre los materiales de PGS fabricados siguiendo diferentes condiciones de síntesis, y los de PCL, ninguno de ellos permitió finalmente conseguir este objetivo. En el ensayo MTT, el primero de los experimentos realizados con este fin, los resultados de absorbancia no se muestran en el presente documento porque los cristales de formazán que se formaron como resultado de la transformación de la sal de MTT por parte de las células vivas, se depositaron sobre los materiales quedando impregnados sobre su superficie. Esto impidió que la disolución de solubilización que se añadió posteriormente, consiguiera disolver los cristales para dar lugar al producto soluble cuya absorbancia se mide para conocer el número de células viables presentes en la muestra. En la Figura 10 se muestra el aspecto de los materiales tras añadir la solución de solubilización, donde se visualiza el producto en forma de cristales depositados sobre la superficie los materiales.



*Figura 10.* Aspecto de las distintas réplicas (filas 1, 2 y 3) de los discos de PCL y los de PGS fabricados bajo diferentes condiciones de síntesis cultivados con fibroblastos de la línea celular L929 tras el ensayo de proliferación MTT tras 4 días de cultivo.

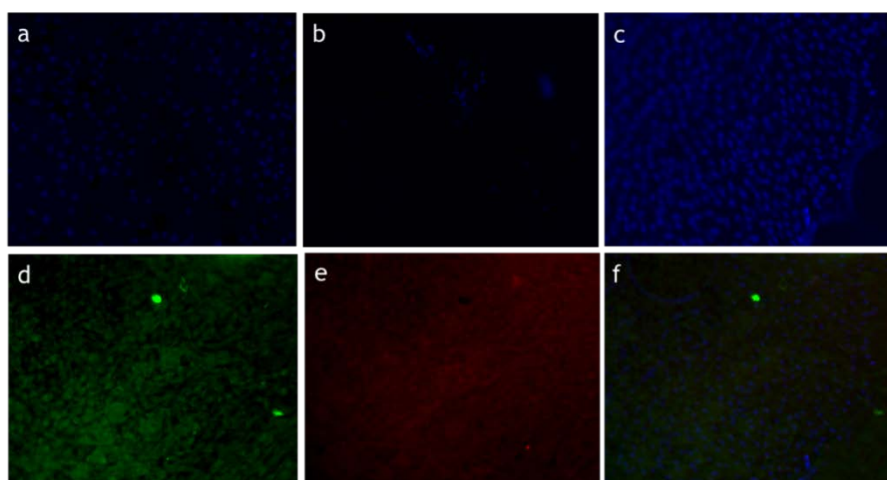
Dado que el ensayo MTT no permitió determinar la proliferación celular sobre los materiales, se decidió utilizar otro experimento que ya había sido previamente empleado en otros trabajos con este fin para materiales basados en PGS, el kit de proliferación celular MTS. En este experimento, se decidió reducir los tiempos de cultivo, manteniendo el número de réplicas, porque los materiales de los que se disponía no eran suficientes como para realizar un ensayo a tres tiempos de cultivo diferentes con tres réplicas para cada uno de ellos. El experimento se realizó a dos tiempos de cultivo intermedios: 2 y 5 días, para conocer la evolución de la proliferación celular a lo largo del tiempo, y, sobre todo, de si este tipo de ensayo era realmente útil con este polímero. La base de este experimento es muy similar a la del ensayo MTT, pero en este caso se forma un compuesto soluble, lo que llevó a pensar que los resultados serían mejores que con el anterior ensayo, puesto que no se formaban cristales que pudiesen quedar impregnados sobre la superficie de los materiales. No obstante, tampoco se obtuvieron los resultados esperados ya que cuando se midió la absorbancia del producto formado en los diferentes pocillos, era en todos los casos idéntica. De esta manera, no se podía establecer una relación entre la absorbancia y el número de células presentes en cada material. Dado que en otros trabajos había funcionado bien, cabe pensar que el hecho de que no se obtuviesen los resultados esperados se debiera a errores experimentales, lo cual se debería corroborar en un estudio posterior (fuera ya de este TFG).

Por último, como el ensayo MTS tampoco había permitido conocer la viabilidad celular sobre los distintos materiales, se utilizó el kit comercial Alamar Blue, que también había sido empleado en otros trabajos con PGS. Se hizo así porque este ensayo no es destructivo, lo que quiere decir que una vez realizado, se puede retirar el reactivo y continuar el cultivo sobre los materiales, ya que las células no se ven afectadas. Es por ello que como se disponía ya de pocos materiales, se decidió emplear este experimento. Como en este caso se podía realizar el experimento a tantos tiempos de cultivo como se quisiera, sin necesidad de utilizar más materiales, el ensayo se llevó a cabo a tres tiempos de cultivo distintos. Dado que ya se sabía por los resultados de SEM y de microscopía de fluorescencia que los fibroblastos son muy proliferativos sobre la mayoría de los materiales, en este ensayo se redujeron los tiempos de cultivo (1, 2 y 5 días) con respecto al experimento MTT, y se partió de una densidad de siembra inferior (1500 células por disco), porque para 7 días en muchos de los casos, los materiales estaban casi totalmente tapizados. Sin embargo, tampoco este experimento permitió evaluar la proliferación celular sobre los materiales. Al igual que ocurrió con el MTS, la absorbancia de los pocillos era muy similar en todos los casos, y no logró determinar diferencias entre ellos. Sería conveniente repetir este ensayo y, como se ha comentado previamente, también el anterior, para descartar errores experimentales o que el reactivo empleado en alguno de estos estudios estuviera en mal estado, y así determinar cuál de ellos es útil para conocer la proliferación celular en este tipo de materiales.

#### 4.1.2. Adhesión y proliferación celular

Para estudiar la adhesión y proliferación de las células sobre los distintos materiales, se tomaron imágenes de microscopía de fluorescencia a 20X aumentos, previa tinción con dos marcadores fluorescentes (DAPI y falacidina) y una tinción inmunocitoquímica (anticuerpo anti-vinculina). Este ensayo, al igual que el MTT, se realizó a tres tiempos de cultivo diferentes: 5 horas, 4 días y 7 días. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software de análisis de imagen *Fiji (ImageJ)*. A pesar de que las condiciones en las que se prepararon todas las muestras fueron las mismas, no se consiguió obtener imágenes de todos los materiales para los distintos marcadores. Para algunos materiales a determinados tiempos de cultivo, estas eran demasiado oscuras o presentaban un elevado ruido de fondo. En estos casos, se muestran en el apartado de Anexos.

Las imágenes obtenidas para las células cultivadas sobre los *films* de PGS fabricados siguiendo el protocolo estándar se muestran en la Figura 11.



**Figura 11.** Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos cultivados sobre los *films* de PGS sintetizados en condiciones estándar, tras la tinción con DAPI (marcador del núcleo celular), falacidina (tiñe el citoesqueleto) y anticuerpo anti-vimentina (marca las adhesiones focales entre células vecinas). Las imágenes a, b y c corresponden a la tinción DAPI tras tiempos de cultivo 5 horas, 4 y 7 días, respectivamente. Las imágenes d, e y f pertenecen a la tinción tras 7 días de cultivo con falacidina (d), anticuerpo anti-vimentina (e) y los tres marcadores a la vez (f).

Tal y como se observa en la figura anterior, en el cultivo a 7 días se consiguieron imágenes de las células con los 3 marcadores, pero en los cultivos a tiempos más cortos, 5 horas y 4 días, sólo se obtuvieron de DAPI. A la vista de los resultados de la tinción DAPI (Figura 11 a, b y c), que tiñe el núcleo de las células vivas y de células fijadas, la proliferación celular sobre estos materiales es buena independientemente del tiempo de cultivo. Aunque el número de núcleos azules teñidos con este marcador parece ser inferior tras 4 días, lo más probable es que al ser el PGS un material hidrófobo, dado que el medio de cultivo es un medio acuoso, inicialmente en la siembra las células se resbalasen del material y no quedasen bien adheridas sobre el mismo. De esta manera se observaron sólo algunos núcleos azules correspondientes a aquellas células que sí consiguieron adherirse sobre los discos. A la vista de las imágenes para tiempos de cultivo de 5 horas y 7 días (Figura 11, a y c, respectivamente), parece ser que la proliferación celular es mayor conforme aumenta el tiempo de cultivo, puesto que el número de núcleos marcados es también superior. En la imagen d, correspondiente a la tinción con falacidina para tiempo de cultivo 7 días, se visualiza el citoesqueleto de las células a través del marcaje de la actina. Junto con la imagen e, donde se marca la vimentina, que se encuentra en las uniones focales de las mismas, se visualiza una clara interconexión entre ellas. En la imagen f, que fue obtenida a partir de los 3 marcadores, la vimentina no se visualiza, pero con DAPI y falacidina a la vez, se muestra cómo las células no están totalmente en contacto unas con otras, sino que existen espacios libres entre ellas, aunque sí están perfectamente conectadas a través de sus citoesqueletos. Por tanto, a través de los resultados de microscopía de fluorescencia se puede afirmar que los fibroblastos presentan una buena adhesión y proliferación sobre los materiales de PGS sintetizados siguiendo el protocolo estándar. Así mismo, el número de células es mayor cuanto más

largo es el tiempo de cultivo, sin llegar a entrar en confluencia para un tiempo de cultivo de 7 días, pues aún siguen quedando espacios libres para que el crecimiento celular continúe.

La Figura 12 recoge las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia para los fibroblastos cultivados sobre los *films* de PGS sintetizados bajo un tiempo de curado de 96 horas, superior al del protocolo estándar.

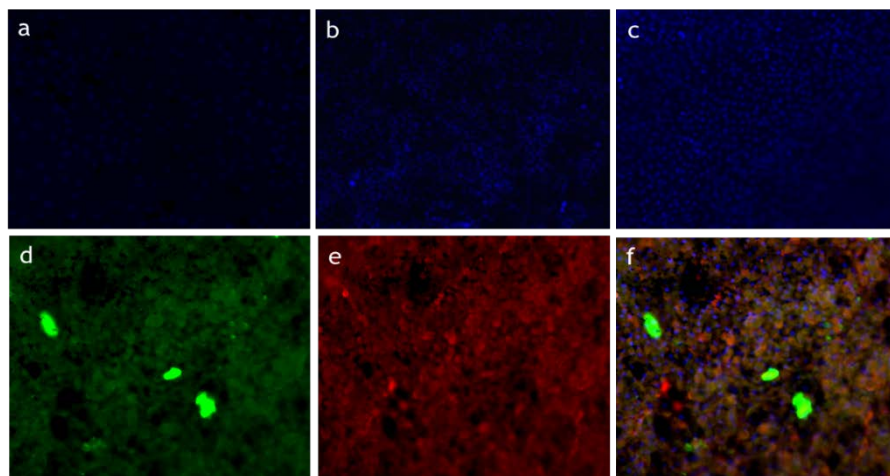


Figura 12. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos cultivados sobre los *films* de PGS sintetizados con un tiempo de curado de 96 horas, tras la tinción con DAPI (marcador del núcleo celular), falcídina (tiñe el citoesqueleto) y anticuerpo anti-vimentina (marca las adhesiones focales entre células vecinas). Las imágenes a, b y c corresponden a la tinción DAPI tras tiempos de cultivo 5 horas, 4 y 7 días, respectivamente. Las imágenes d, e y f pertenecen a la tinción tras 7 días de cultivo con falcídina (d), anticuerpo anti-vimentina (e) y los tres marcadores a la vez (f).

En este caso, la tinción DAPI revela resultados similares a los obtenidos para los *films* sintetizados siguiendo el protocolo estándar, observándose un claro incremento en el número de células conforme aumenta el tiempo de cultivo. Al igual que ocurría en el caso anterior, sólo pudieron obtenerse buenas imágenes para actina y vimentina (d y e, respectivamente) en el experimento a 7 días de cultivo. Sin embargo, para este tiempo de cultivo en los materiales de PGS sintetizados bajo un curado de 96 horas sí que se obtuvo una imagen con los 3 marcadores simultáneamente (Figura 12 f). Este hecho podría ser debido a que el número de células es mayor, encontrándose más cerca unas de otras, aumentando el número de adhesiones focales entre ellas y permitiendo así que la vimentina también aparezca representada en la imagen. En definitiva, dadas las similitudes con los resultados obtenidos para las muestras estándar mediante microscopía de fluorescencia, no puede afirmarse que un incremento del tiempo de curado durante la síntesis afecte en gran medida a la proliferación y adhesión celular de los fibroblastos sobre los materiales de PGS.

En relación con el marcaje fluorescente para los materiales de PGS fabricados manteniendo una temperatura de curado de 150°C, superior a la del protocolo estándar, sólo se consiguieron imágenes para el experimento a 7 días de cultivo y para dos marcadores, DAPI y falcídina. En la Figura 13, se muestran los resultados obtenidos de la tinción DAPI (imagen a), de la tinción con falcídina (imagen b) y con ambos marcadores simultáneamente (imagen c).

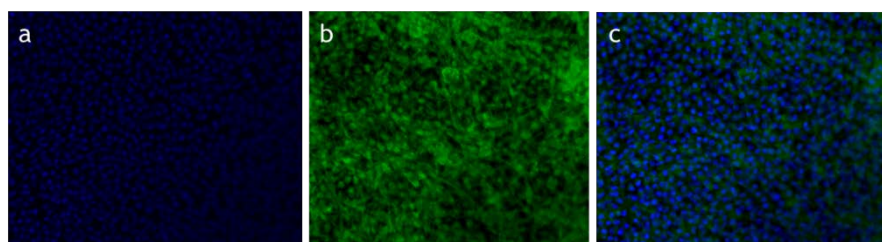


Figura 13. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos sembrados sobre los *films* de PGS sintetizados bajo una temperatura de curado de 150°C después de 7 días de cultivo y tras la tinción con DAPI (marcador del núcleo celular) (a), falcídina (tiñe el citoesqueleto) (b) y ambos a la vez (c).

Como en este caso sólo se obtuvieron imágenes para el experimento a 7 días de cultivo, únicamente se puede observar que para este tiempo la proliferación celular y la interconexión entre los fibroblastos a través de su citoesqueleto es elevada, similar a los materiales donde el tiempo de curado era de 96 horas y los materiales estándar. De esta manera, a la vista de las imágenes de microscopía de fluorescencia, tampoco puede afirmarse que un aumento de la temperatura de curado con respecto al protocolo estándar de síntesis tenga un efecto significativo sobre el comportamiento de las células sobre los *films* de PGS.

En cuanto a los materiales fabricados con una composición molar doble de ácido sebácico que de glicerol, las imágenes obtenidas para la tinción DAPI a los diferentes tiempos de cultivo a los que se realizó el experimento se recogen en la Figura 14.

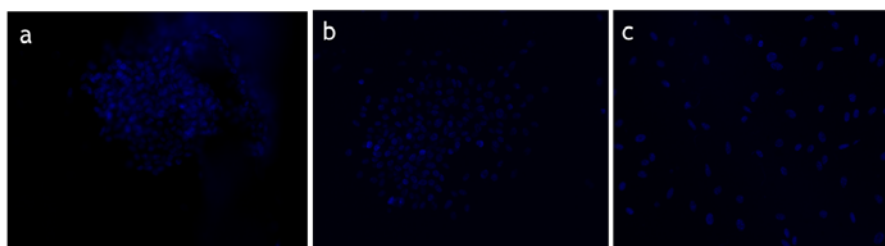


Figura 14. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos cultivados sobre los *films* de PGS fabricados con doble proporción de ácido sebácico, tras la tinción con DAPI (marcador del núcleo celular) después de 5 horas de cultivo (a) y 4 (b) y 7 días (c), respectivamente.

Como se observa en la figura, a diferencia de lo que ocurría en los materiales comentados anteriormente, el número de células disminuye a medida que aumenta el tiempo de cultivo, siendo la separación entre ellas cada vez mayor.

En la Figura 15, se muestran las imágenes obtenidas de estos *films* tras la tinción con falacidina (a y c) y anticuerpo anti-vimentina (b y d). Las imágenes a y b corresponden a tiempo de cultivo 4 días, mientras que c y d fueron obtenidas en el experimento a 7 días de cultivo. Para este tiempo también se muestra una imagen de los tres marcadores simultáneamente (e).

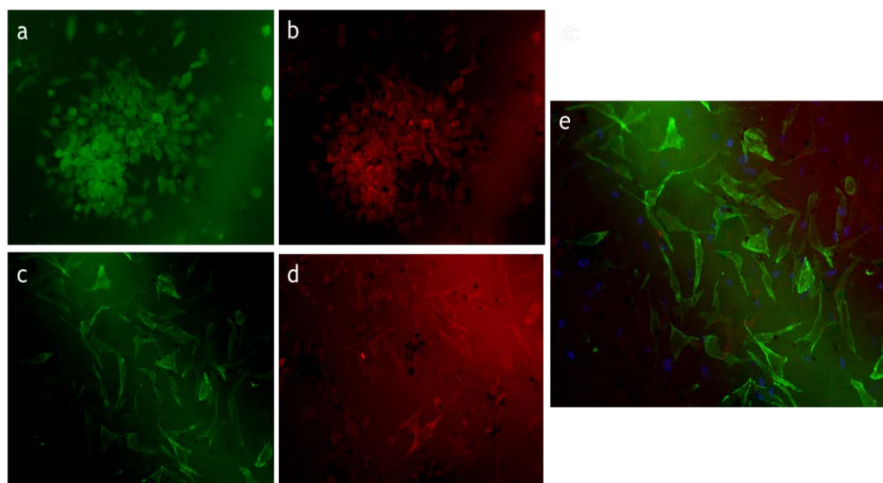


Figura 15. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos cultivados sobre los *films* de PGS fabricados con doble proporción de ácido sebácico, tras la tinción con falacidina (tiñe el citoesqueleto) y anticuerpo anti-vimentina (marca las adhesiones focales entre células vecinas). Las imágenes a y c corresponden a la tinción con falacidina tras tiempos de cultivo de 4 y 7 días, respectivamente. Las imágenes b y d pertenecen a la tinción con vimentina para esos tiempos de cultivo y la imagen e corresponde a la tinción con los tres marcadores tras 7 días de cultivo.

Comparando los resultados obtenidos tanto para el marcaje de la actina como de la vimentina, se observa claramente que las células, a tiempo de cultivo 4 días, se encuentran muy unidas entre sí, formando agrupaciones celulares (a partir de ahora *clusters*, por su nombre en inglés) sobre la superficie del *film*. Por el contrario, cuando el tiempo de cultivo aumenta a 7 días, la proliferación celular es menor y las células se disponen más separadas. Teniendo en cuenta estos resultados, el

aumento en la proporción de ácido sebáico durante la síntesis del PGS provoca que para tiempos largos de cultivo la proliferación celular sea menor y la distribución celular cambie, estando las células más separadas entre ellas.

Con el objetivo de disponer de un material en el que, como se ha comentado en el apartado 1.2.1 *Biomateriales empleados en el reemplazo vascular*, las células utilizadas en el presente trabajo muestren una adecuada proliferación, se decidió emplear policaprolactona para los experimentos. La PCL es un material muy empleado in vivo (como hilo de sutura, placas y tornillos de fijación ósea, etc.) (Woodruff y Hutmacher, 2010) y el comportamiento biológico es bueno incluso para tiempos de cultivo largos, por lo que se pretendía usarlo para poder comparar ambos materiales. En los ensayos de tinción fluorescente sólo se obtuvieron imágenes de DAPI, ya que para los otros marcadores eran muy oscuras y no se visualizaban las células. La Figura 16 recoge las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos cultivados sobre los *films* de PCL tras la tinción DAPI para los experimentos de 5 horas de cultivo (a), 4 días (b) y 7 días (c).

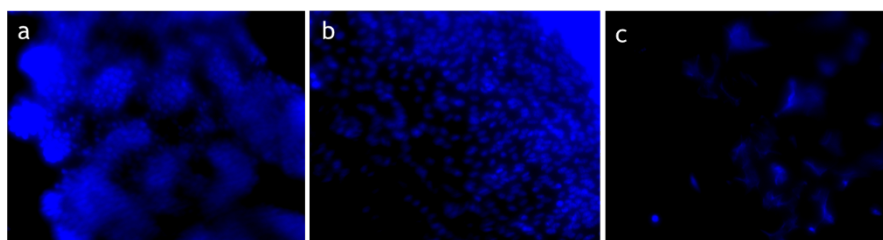


Figura 16. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los fibroblastos sembrados sobre los *films* de PCL tras la tinción con DAPI (marcador del núcleo celular) después de 5 horas de cultivo (a) y 4 (b) y 7 días (c), respectivamente.

Tal y como se observa en esta figura, para tiempos de cultivo cortos, la proliferación celular de los fibroblastos sobre estos materiales es buena, pero tras 7 días de cultivo, a diferencia de los resultados esperados, no se observan apenas células. Una posible explicación a este hecho podría ser que los *films* de PCL no se lavaron de manera intensa (sólo se sanitizaron), y quizás podían contener de origen trazas de algún otro componente (por ejemplo para evitar su degradación en el envase) que podría haber difundido en el medio de cultivo afectando de manera negativa al crecimiento y adhesión celular.

#### 4.1.3. Estudio de la morfología celular mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

El estudio de la morfología de los fibroblastos sembrados sobre los *films* de PGS fabricados bajo diferentes condiciones de síntesis y los de PCL, se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido. Además, este experimento también permitió evaluar la adhesión y proliferación celular sobre los distintos materiales. De este modo, resulta complementario a los ensayos de tinciones fluorescentes comentados en el apartado anterior y permitiendo obtener información sobre estos parámetros en aquellos casos en los que no se lograron tomar imágenes mediante microscopía de fluorescencia. Para cada tiempo de cultivo y cada material, se tomaron imágenes de SEM a 100X, 500X y 2000X aumentos. Los resultados de cada experimento se muestran a continuación.

En la Figura 17, se recogen las imágenes de SEM de la superficie de los *films* de PGS fabricados siguiendo el protocolo estándar cultivados con los fibroblastos murinos L929.



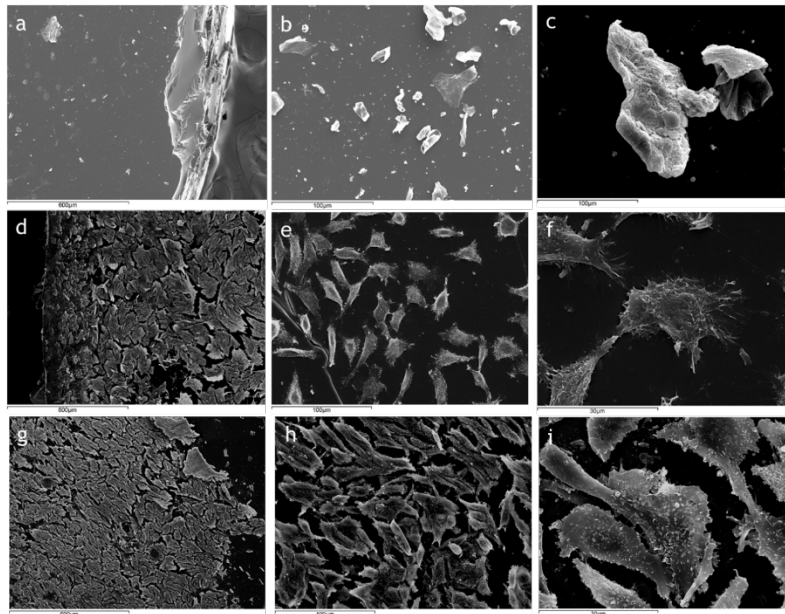


Figura 17. Imágenes de SEM de la superficie de los discos de PGS sintetizados siguiendo el protocolo estándar sembrados con fibroblastos de la línea L929 tras 5 horas de cultivo (a, b y c), 4 días (d, e, f) y 7 días (g, h, i), a 100X, 500X y 2000X aumentos.

Para un tiempo de cultivo corto (imágenes a, b y c), no se observan apenas células sobre los materiales sino que lo que parece visualizarse son las rugosidades propias de la superficie de los mismos. En un principio, se podría pensar que la ausencia de células se debe a que no ha pasado el tiempo suficiente como para que se produzca la adhesión celular. Sin embargo, en las imágenes de microscopía de fluorescencia tras la tinción DAPI, se muestra una adecuada proliferación de las células tras un tiempo de cultivo de 5 horas. Esto hace pensar que en alguna de las réplicas empleadas para SEM la siembra no se realizase correctamente, o, más probable, que durante la preparación de los materiales cultivados para su observación al microscopio electrónico se colocasen en el portamuestras por el lado contrario al que se encontraban los fibroblastos, impidiendo su observación. Para un tiempo de cultivo intermedio (imágenes d, e y f) se observa una adecuada adhesión y proliferación celular. Las células aún no han tapizado por completo la superficie del *film*, existiendo huecos libres entre las mismas. Además, mantienen la morfología característica de los fibroblastos; células alargadas, fusiformes y heterogéneas. A tiempos de cultivo más largos (imágenes g, h, i), la superficie del material está casi completamente tapizada. Las células se encuentran muy unidas entre sí, aunque mantienen la morfología característica de los fibroblastos, por lo que parece que el cultivo aún no ha entrado en confluencia. Los resultados de SEM para estos materiales se correlacionan con los obtenidos en las tinciones fluorescentes. Así, se confirma que cuando el PGS es fabricado bajo las condiciones estándar de síntesis, la proliferación celular aumenta conforme se incrementa el tiempo de cultivo, manteniéndose la morfología típica de los fibroblastos tras 7 días de cultivo. Además, las imágenes de microscopía fluorescente tras tinción DAPI indican una buena adhesión de los fibroblastos sobre la superficie de los materiales, pues tan sólo después de 5 horas de cultivo, el número de células sobre la superficie es elevado. Por tanto, los fibroblastos utilizados muestran una buena respuesta en el cultivo sobre *films* de PGS sintetizados bajo condiciones estándar para los tres tiempos de cultivo, mostrando mayor proliferación a tiempos de cultivo largos que permiten un mayor crecimiento celular.

Al igual que ocurre con los *films* sintetizados en condiciones estándar, las imágenes de SEM de la superficie de los materiales de PGS fabricados bajo un tiempo de curado de 96 horas cultivados con los fibroblastos de ratón (Figura 18), también se correlacionan con las que se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia.

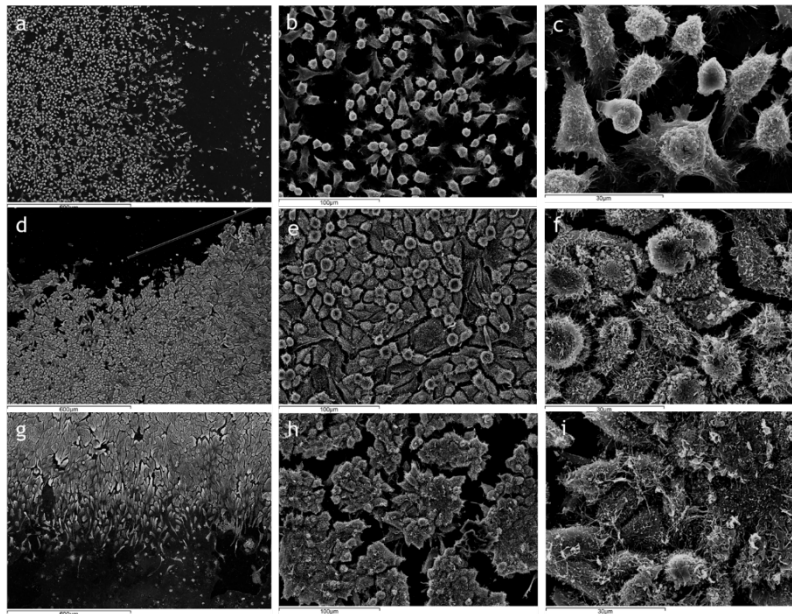


Figura 18. Imágenes de SEM de la superficie de los discos de PGS sintetizados bajo un tiempo de curado de 96 horas sembrados con fibroblastos de la línea L929 tras 5 horas de cultivo (a, b y c), 4 días (d, e, f) y 7 días, a 100X, 500X y 2000X aumentos.

Para un tiempo de cultivo de 5 horas (imágenes a, b, c) la proliferación celular sobre estos materiales es también muy elevada. La forma redondeada se debe a que no se ha dejado el tiempo suficiente como para que se produzca una adecuada adhesión de las células sobre la superficie de los materiales y adopten la morfología propia de los fibroblastos. Éstos han comenzado a unirse a las proteínas y macromoléculas del medio de cultivo que se encuentran adsorbidas sobre la superficie del material, pero aún no lo han conseguido en su totalidad. En las imágenes obtenidas tras 4 días de cultivo, se observa cómo ya se ha tapizado casi por completo la superficie del *film*, quedando menos espacios libres entre las células que a este mismo tiempo de cultivo en los materiales estándar. Aparecen algunas células redondeadas, pero en otras se mantiene la morfología característica de los fibroblastos. En este caso, la forma redondeada no se debe a que aún no han conseguido adherirse, sino que se trata de células que han entrado en senescencia como consecuencia de que el cultivo ha llegado a confluencia. Los resultados tras 7 días de cultivo a 100X aumentos (imagen g) parecen mostrar una buena proliferación celular de los fibroblastos tras este tiempo de cultivo, observándose escasos espacios libres entre las células. Sin embargo, las imágenes a 500X y 2000X aumentos (imágenes e y f), revelan la entrada del cultivo en confluencia debido a que hay demasiadas células sobre los materiales, y entonces éstas se agrupan en *clusters* perdiendo su morfología característica.

A partir de estos resultados, y teniendo en cuenta también las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia, no puede afirmarse que el tiempo de curado de los materiales sea un factor de gran influencia sobre la adhesión, proliferación y morfología celular para tiempos de cultivo cortos. El aumento en el tiempo de curado del PGS permite una buena adhesión de los fibroblastos sobre la superficie de los materiales, aunque como no se obtuvieron imágenes de SEM para un tiempo de cultivo de 5 horas en los materiales estándar, y las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran resultados similares en ambos casos, no pueden establecerse con claridad diferencias entre ellos. Sin embargo, tras 7 días de cultivo, en los materiales fabricados con un aumento del tiempo de curado, se observa la entrada en confluencia del cultivo y la senescencia celular perdiendo su morfología característica. Por tanto, para tiempos de cultivo largos, parece ser que este cambio en las condiciones de síntesis sí tiene una influencia sobre el comportamiento biológico de los materiales, favoreciendo una entrada más temprana en confluencia de las células que lleva a la pérdida de la morfología típica de los fibroblastos.

En el caso de los *films* de PGS sintetizados bajo una temperatura de curado de 150°C, las imágenes se recogen en la Figura 19. Mientras que mediante microscopía de fluorescencia sólo se obtuvieron imágenes de las células para el experimento a 7 días de cultivo, mediante SEM, se consiguieron para todos los experimentos.

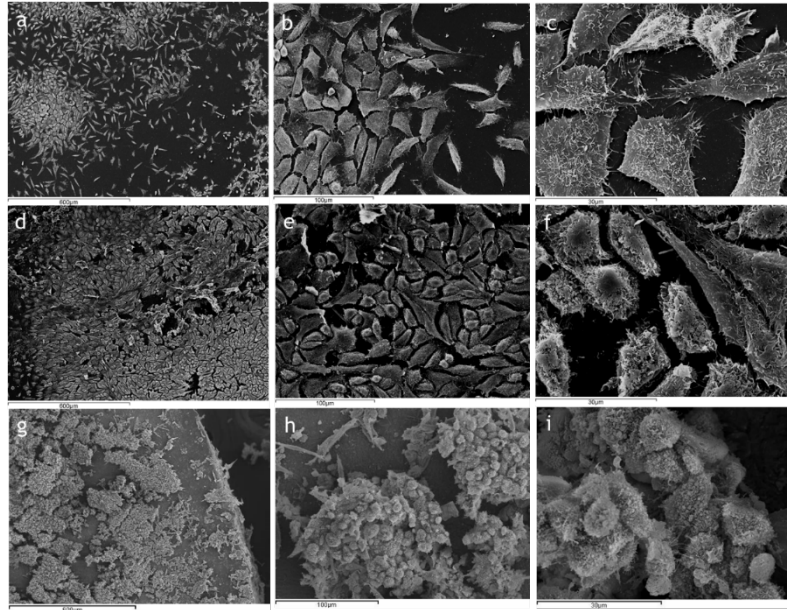


Figura 19. Imágenes de SEM de la superficie de los discos de PGS sintetizados bajo una temperatura de curado de 150°C sembrados con fibroblastos de la línea L929 tras 5 horas de cultivo (a, b y c), 4 días (d, e, f) y 7 días, a 100X, 500X y 2000X aumentos.

Tal y como se observa en la Figura 19, para tiempos de cultivo cortos (imágenes a, b y c), estos materiales, al igual que los anteriores, presentan una adecuada adhesión de los fibroblastos sobre su superficie.

Además, las células mantienen la morfología característica de los fibroblastos. En el experimento realizado a 4 días de cultivo (imágenes d, e y f) se observa que la superficie del material se encuentra muy tapizada, existiendo pocos espacios libres entre las células. En general, las células también mantienen la morfología de los fibroblastos pero ya aparecen algunas células más redondeadas que son el resultado de la entrada en confluencia del cultivo que hace que estas comiencen a entrar en senescencia, al igual que ocurría con los materiales en los que el tiempo de curado era superior al estándar. Del mismo modo, para tiempos de cultivo más largos (imágenes g, h, e i) las células se agrupan en *clusters* y pierden la morfología típica de los fibroblastos. Además, parece que las células se hayan despegado de la superficie del material. Por tanto, los resultados obtenidos para los materiales donde la T de curado es mayor que la T estándar de síntesis son muy similares a los correspondientes a los materiales en los que el tiempo de curado era superior, observándose una adecuada adhesión celular y una entrada en confluencia tras 7 días de cultivo que no se produce en los materiales estándar y que provoca un cambio en la morfología y distribución celular.

Las imágenes obtenidas mediante SEM de la superficie de los materiales fabricados con una proporción doble de ácido sebácico con respecto a la síntesis estándar cultivados con los fibroblastos de ratón se recogen en la Figura 20.

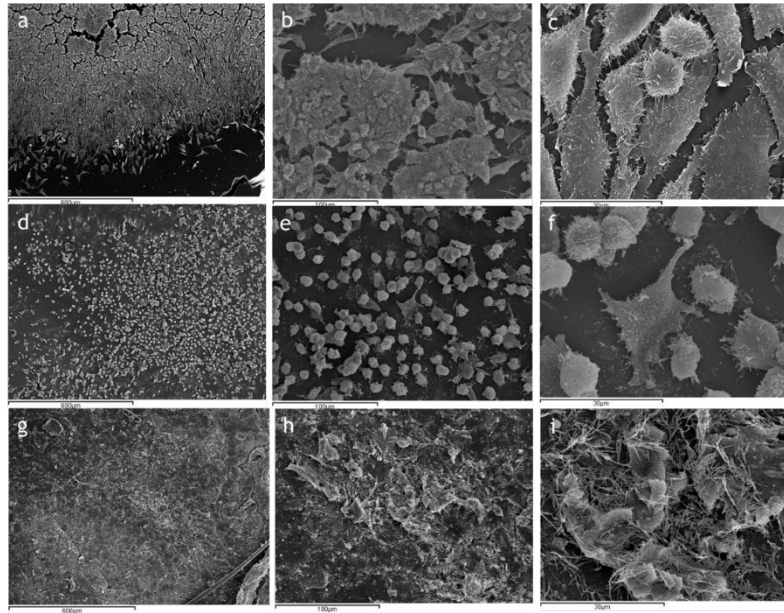


Figura 20. Imágenes de SEM de la superficie de los discos de PGS sintetizados con una composición molar de ácido sebáico/glicerol 2:1, sembrados con fibroblastos de la línea L929 tras 5 horas de cultivo (a, b y c), 4 días (d, e, f) y 7 días, a 100X, 500X y 2000X aumentos.

A la vista de las imágenes obtenidas, parece ser que la adhesión celular es peor en estos materiales que en los que fueron fabricados siguiendo el protocolo estándar y aquellos en los que se aumentó el tiempo o la temperatura de curado. La superficie del *film* se encuentra casi completamente tapizada incluso para tiempos de cultivo cortos (imágenes a, b y c), lo que provoca una entrada en confluencia temprana que lleva a las células a agruparse en *clusters* perdiendo su morfología característica. Sin embargo, a diferencia del resto de *films* de PGS, a medida que aumenta el tiempo de cultivo, el número de células sobre la superficie de estos materiales disminuye y éstas se encuentran más separadas, existiendo más espacios libres entre ellas. Para un tiempo de cultivo de 7 días, han perdido completamente su morfología y forman una especie de maraña de células alargadas donde parece que hayan entrado en apoptosis. Por tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante SEM, que se correlacionan a su vez con las imágenes obtenidas a través de microscopía de fluorescencia, un aumento en la proporción de ácido sebáico durante la síntesis de los materiales de PGS influye negativamente sobre la adhesión celular y desencadena a tiempos de cultivo más largos la entrada de las células en apoptosis.

En lo referido a las imágenes obtenidas mediante SEM de la superficie de los films de PCL cultivados con los fibroblastos murinos L929 (Figura 21), cabe decir que los resultados no fueron los esperados. Como se ha comentado anteriormente, se decidió utilizar este material como control positivo de adhesión, proliferación y mantenimiento de la morfología de los fibroblastos de la línea celular utilizada en los experimentos con PGS. Sin embargo, tal y como se observa en la Figura 21, el crecimiento celular no fue bueno para ninguno de los tiempos de cultivo a los que se realizó el ensayo.

En todos los casos, la morfología parece indicar que las células se encuentren muertas o en desarrollo de procesos apoptóticos. Estos resultados son compatibles con los obtenidos en las tinciones fluorescentes y podrían deberse a un lavado inadecuado de los materiales en el que no se consiguiera eliminar las trazas de algún componente que contuviese en origen la PCL y que difundiese al medio de cultivo teniendo un efecto negativo sobre el crecimiento celular. Ante este hecho, sería conveniente *a posteriori* repetir el experimento con estos materiales sometidos a un lavado más intenso para determinar si fue este el motivo por el que las células no mostraron un comportamiento biológico adecuado sobre estos materiales.

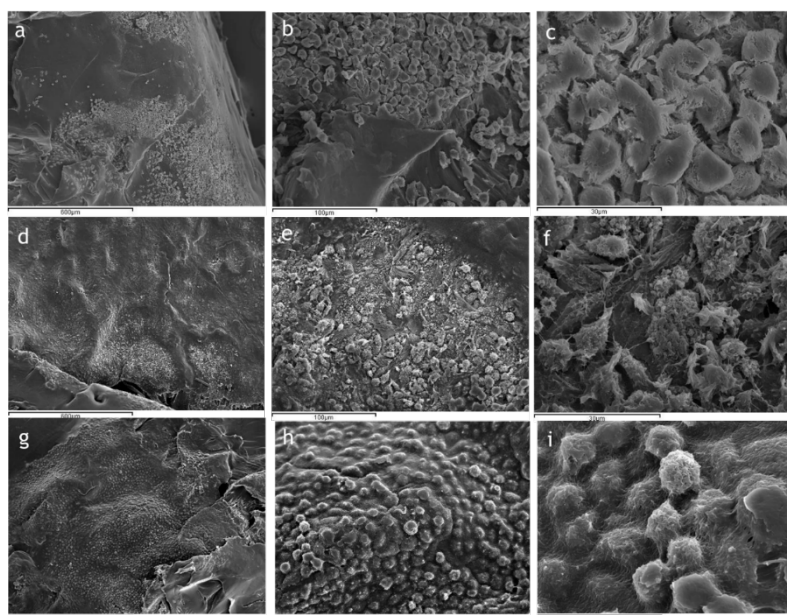


Figura 21. Imágenes de SEM de la superficie de los discos de PCL sembrados con fibroblastos de la línea L929 tras 5 horas de cultivo (a, b y c), 4 días (d, e, f) y 7 días, a 100X, 500X y 2000X aumentos.

En resumen, no se puede afirmar que el aumento en el tiempo o la temperatura de curado de los *films* PGS con respecto a los parámetros estándar de síntesis, tenga un efecto importante sobre la adhesión de los fibroblastos murinos L929 cultivados en su superficie. Por el contrario, un incremento en la proporción de ácido sebácico en la fabricación, sí parece tener una influencia relevante sobre la misma. Así, los materiales en los que la composición de ácido sebácico es doble que la de glicerol muestran una elevada adhesión celular que resulta peor para el cultivo puesto que provoca que este entre en confluencia incluso para tiempos de cultivo cortos.

De acuerdo con los resultados de experimentos de caracterización físico-química y mecánica del polímero PGS realizados con anterioridad en el Centro de Biomateriales de la UPV, los *films* sintetizados a temperaturas y tiempos de curado mayores presentan un menor grado de hinchado en medio acuoso y medio básico. Por tanto, estos materiales resultan más hidrofóbicos que el resto. Esto se debe a que conforme aumenta la temperatura y el tiempo de curado, se incrementa la energía para la formación de enlaces. De este modo, se forma una red más compacta, con más entrecruzamientos y menor movilidad molecular que dificulta la adsorción de las proteínas y macromoléculas del medio de cultivo, ralentizando la adhesión celular sobre los materiales.

No obstante, esta adhesión celular resulta más adecuada que la que tiene lugar en los *films* sintetizados con el doble de cantidad de ácido sebácico. Estos materiales experimentan un mayor grado de hinchado siendo más hidrofílicos. La hidrofiliidad de los mismos se debe a que al haber un exceso de ácido, los entrecruzamientos son menores quedando más grupos ácido terminales libres, siendo los enlaces más laxos y la red menos compacta. Las superficies moderadamente hidrofílicas permiten la adsorción de las proteínas del medio de cultivo a través de enlaces débiles y reversibles. De esta manera, las células cultivadas sobre los materiales pueden depositar sus propias proteínas de adhesión en la superficie de los *films* para interaccionar con las proteínas del medio que se encuentran adsorbidas. Es por ello que estas superficies más hidrofílicas características de los *films* sintetizados con una proporción doble de ácido sebácico, permiten una adhesión celular mayor. Este hecho resulta inadecuado para el cultivo ya que como los fibroblastos son células muy proliferativas, se produce una entrada temprana en confluencia. Además, al experimentar un mayor grado de hinchado se produce el levantamiento de las células y, también, la presencia de grupos ácido terminales libres resulta negativa para las células cultivadas sobre la superficie de estos materiales.

Por su parte, en los experimentos realizados a tiempos de cultivo superiores, tanto la superficie de los materiales fabricados de acuerdo con las condiciones estándar de síntesis como aquellos en los que se mantuvo una temperatura o tiempo de curado mayores está muy tapizada. Sin embargo, en los

materiales estándar aún queda algún espacio libre que permite que el crecimiento celular continúe y las células mantengan la morfología característica de los fibroblastos incluso después de 7 días de cultivo.

Por tanto, podría concluirse que los materiales fabricados bajo condiciones estándar son los que resultan más adecuados para el cultivo de fibroblastos de la línea celular empleada a cualquier tiempo de cultivo. Por el contrario, los que muestran un comportamiento biológico menos apropiado son aquellos en los que la composición de ácido sebácico es doble que la de glicerol, donde las células crecidas sobre la superficie son más escasas y se disponen en forma de una maraña celular, de manera que para tiempos de cultivo mayores, el número de células sobre la superficie de los materiales es reducido.

## 4.2. Degradación de films de PGS

Dado que el PGS es un polímero biodegradable por hidrólisis, al encontrarse en medio biológico es de esperar que sus propiedades vayan evolucionando con el tiempo (pérdida de propiedades mecánicas, acortamiento de cadenas, y pérdida de peso en última instancia). Además, de acuerdo con la bibliografía, la cinética de degradación del PGS y el aspecto de las muestras tras la realización de este ensayo en distintos medios, es diferente en función de las condiciones en las que el polímero se ha sintetizado y del medio utilizado (Chen *et al.* 2008). Por ello, se consideró conveniente realizar ensayos de degradación *in vitro* y acelulares de los materiales preparados empleando distintas condiciones de síntesis para estudiar el comportamiento de degradación de este material en determinados medios: por hidrólisis en agua, en el medio de cultivo de fibroblastos, y en medio básico para acelerar el proceso de hidrólisis.

En el ensayo, se analizó la pérdida de masa de los materiales en los diferentes medios a lo largo del tiempo para determinar el porcentaje de degradación que habían sufrido. El porcentaje de pérdida de masa se calculó a partir de la Ecuación 1:

$$\% \text{ pérdida de masa} = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \cdot 100 \quad \text{Ec.1}$$

donde:

$m_0$  = masa inicial de las muestras secas

$m_t$  = masa de las muestras secas tras el tiempo de duración del experimento

Como se emplearon tres réplicas de cada material para cada medio, se calculó el porcentaje promedio de pérdida de peso en cada caso y la desviación típica. Los resultados se muestran en la Figura 22.

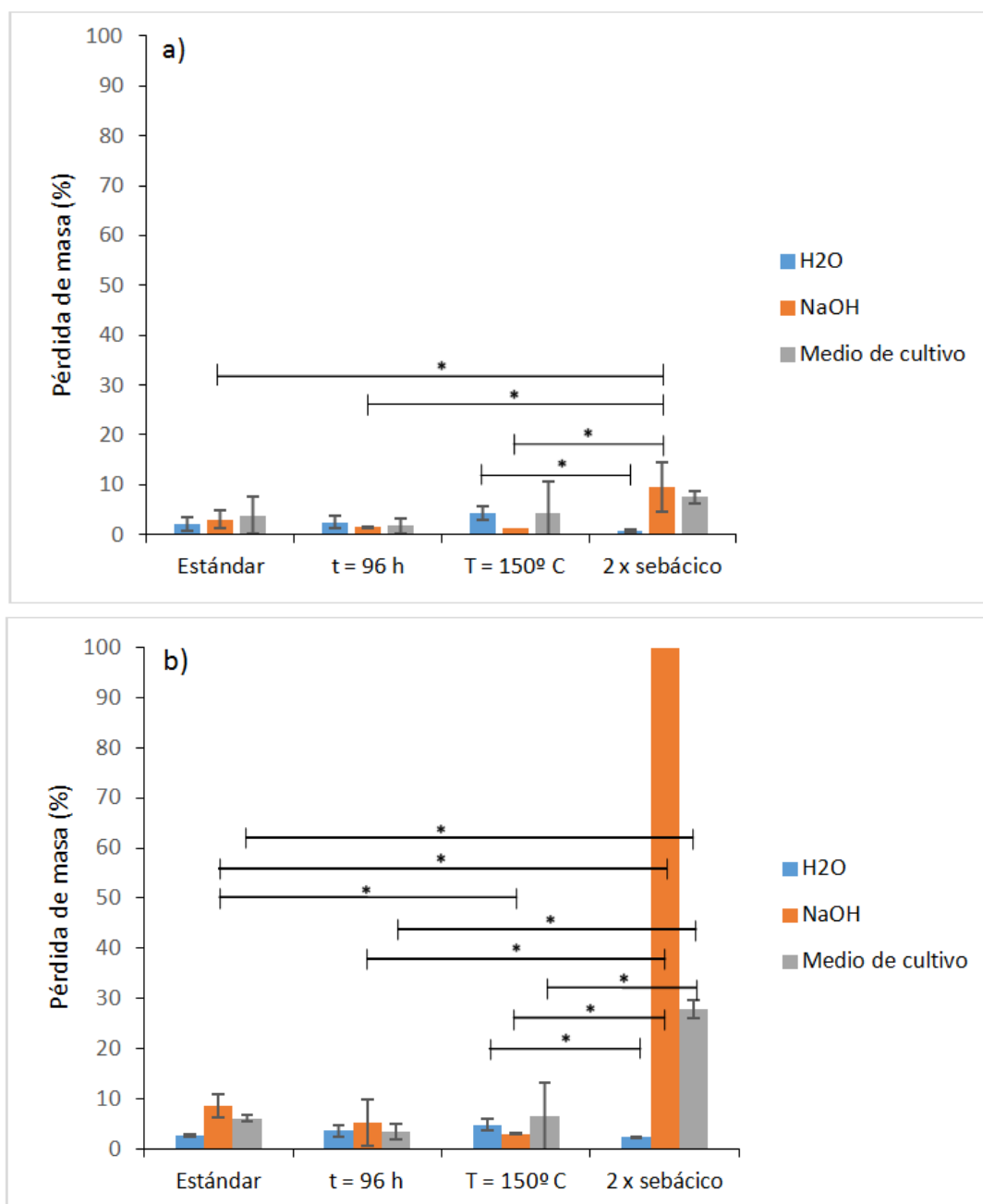


Figura 22. Pérdida de masa porcentual de los films de PGS fabricados bajo diferentes condiciones de síntesis en los ensayos de degradación en H<sub>2</sub>O, NaOH y medio de cultivo a las dos semanas (a) y al cabo de un mes (b). La existencia de diferencias estadísticamente significativas se indica en los gráficos mediante un asterisco (\*).

Tal y como se observa en la Figura 22 (imagen a), los valores del porcentaje promedio de pérdida de masa en el ensayo de degradación en agua son en general bajos, encontrándose entre el 0.72 y 4.26%, por lo que la interacción de este material con el agua es reducida. Sin embargo, el p valor es de 0.0357, lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos *films* de PGS. Según los resultados, la degradación es mayor en las muestras en las que la temperatura de curado fue de 150°C, superior a la del protocolo estándar. Sin embargo, en este caso la variación entre las distintas muestras empleadas en también fue mayor, obteniéndose un valor de desviación estándar de 1.45. Por el contrario, las muestras que experimentan menor degradación son aquellas en las que la composición molar de ácido sebácico era doble que la de glicerol con respecto a la reacción equimolar, coincidiendo con que entre las distintas muestras de esta condición la desviación estándar también fue la más baja, con un valor de 0.75. Entre los *films* sintetizados siguiendo el protocolo estándar y aquellos en los que el t de curado fue mayor, no se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la degradación en agua a dos semanas,

obteniéndose valores de  $2.15 \pm 1.3$  y  $2.46 \pm 1.21$ , respectivamente. Por tanto, las mayores diferencias se presentan entre los *films* sintetizados a una temperatura de curado mayor y aquellos en los que la proporción de ácido sebácico es doble que la de glicerol con respecto al protocolo estándar.

En cuanto al ensayo de degradación en NaOH 0,01M a dos semanas (Figura 22 a), las mayores diferencias se encuentran entre los *films* sintetizados bajo una temperatura de curado de 150°C, con un valor de  $1.22 \pm 0.04$ , y aquellos en la composición de ácido sebácico es doble que la de glicerol, donde se obtuvo un porcentaje promedio de degradación de  $9.57 \pm 4.39$ . En este segundo caso, la variabilidad entre las réplicas es bastante elevada, aunque en las tres réplicas los valores del porcentaje de degradación son superiores a los del resto de *films*, siendo mayores al 5%. Por tanto, a pesar de la variabilidad, se observa una mayor degradación en los *films* con proporción de monómeros distinta a la estándar. Además, el análisis estadístico indica que existen diferencias significativas entre estas muestras y el resto de *films*. Por su parte, en las muestras en las que el t de curado fue mayor (96 horas), se obtuvieron resultados similares a aquellas en las que la T de curado fue superior (150°C), mostrando una degradación menor, en este caso de  $1.41 \pm 0.23$ . Los *films* fabricados de acuerdo al protocolo estándar, mostraron una degradación intermedia con respecto al resto.

En el ensayo de degradación en medio de cultivo a dos semanas, de acuerdo con los resultados del análisis estadístico, no existen diferencias significativas entre los valores promedio del porcentaje de degradación de los distintos *films* de PGS, obteniéndose un p valor de 0,3275. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados dos a dos, parece que sí existen diferencias entre las muestras. De nuevo, las que sufren una mayor degradación son aquellas en las que la composición es distinta a la del protocolo estándar, habiendo sido fabricadas a partir de una composición molar doble de ácido sebácico que de glicerol. En las muestras en las que el proceso de curado tuvo una duración de 96 horas, la degradación fue menor, mientras que las muestras sintetizadas siguiendo el protocolo estándar y aquellas donde el curado se realizó a 150°C mostraron una degradación más similar entre ellas, e intermedia entre los otros dos *films*. Sin embargo, en todos los *films*, a excepción de los que presentaban doble composición molar de ácido sebácico, la variación entre réplicas fue elevada. Por tanto, no puede afirmarse que las diferencias entre ellas se deban a las distintas condiciones de síntesis. Es más, en este caso, se observó crecimiento de microorganismos en el medio de cultivo donde estaban los distintos discos de PGS donde la degradación fue mayor, incluso en el propio medio stock que estaba guardado para utilizar en las dos semanas siguientes, por lo que ese aumento en la velocidad de degradación de las muestras podría ser debido a la presencia de contaminación que acelerase este proceso.

Con lo que respecta al ensayo de degradación en agua a 4 semanas, los resultados siguen la misma tendencia que el experimento a dos semanas. De nuevo, la degradación en agua en todas las muestras es baja, encontrándose entre el 2.31 y el 4.83 %. En todos los casos, el porcentaje de pérdida de masa aumenta, aunque el incremento es reducido para todas las muestras, siendo mayor, aunque también reducido, en las muestras que presentan doble proporción de ácido sebácico, donde el incremento del % de degradación es del 2.31%. Las desviaciones estándar son menores para todos los *films* que en el ensayo a dos semanas, lo que puede deberse a un secado más uniforme de las muestras a las cuatro semanas, puesto que se dejaron más tiempo en el desecador para asegurar un secado total de las mismas.

De acuerdo con los resultados tanto a 2 como a 4 semanas, parece que la interacción del PGS con el agua es en general baja, siendo en todos los casos inferior al 5%. En relación a las comparaciones dos a dos en este experimento, se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los *films* sintetizados en condiciones estándar y los de T de curado 150°C, y también entre estos últimos y los de doble proporción de ácido sebácico. Por tanto, aunque parece que el material no interacciona en gran medida con el agua, independientemente de las condiciones de síntesis, las muestras de T de curado 150°C presentan una mayor degradación. Estos resultados no se ajustan a lo esperado, ya que teniendo en cuenta que, como se ha comentado en el apartado 4.1.3 *Estudio de la morfología celular mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)*, la red polimérica es más compacta cuanto mayor es la temperatura y el tiempo de curado de los materiales, se esperaba que la degradación en estos materiales fuese menor. De forma inversa, dado que en los materiales fabricados con una composición molar doble de ácido sebácico, los entrecruzamientos son menores y la red es más laxa, se esperaba que la degradación fuese superior. No obstante, al tratarse



de pérdidas de masa tan pequeñas podría estar afectando el error experimental, y sería conveniente repetir el ensayo para confirmar esta hipótesis.

En lo referido al ensayo de degradación en medio básico a 4 semanas, el incremento de pérdida de masa es mayor para todos los *films* que en el experimento con agua. Tal y como sucede en el ensayo con NaOH 0,01M a 2 semanas, las muestras que presentan mayor degradación son aquellas fabricadas con una proporción doble de ácido sebácico. En estas muestras se produjo una degradación total. Por su parte, las que menor degradación sufren son las que corresponden a los *films* fabricados manteniendo una T de curado de 150°C y aquellos en los que el tiempo de curado fue superior al estándar, 96 horas, que presentan resultados similares. En este caso, los resultados sí se ajustan a lo esperado, ya que cuanto mayor es el entrecruzamiento entre las cadenas que constituyen el polímero, menor es la degradación que sufre el material, y viceversa.

Los resultados del experimento de degradación en medio de cultivo a 4 semanas siguen también la misma tendencia que después de dos semanas. Las muestras que sufren mayor degradación siguen siendo las de doble proporción de ácido sebácico, mientras que las que menos pérdida de masa experimentan son las de mayor t de curado. Los porcentajes promedio de pérdida de masa para los *films* donde la T de curado fue de 150°C y los que se sintetizaron siguiendo el protocolo estándar muy similares (6.41 y 6.14, respectivamente), aunque la desviación estándar en el primer caso es bastante elevada. A pesar de que, como en los ensayos anteriores, se esperaban resultados similares entre los *films* fabricados con un aumento en el tiempo y la temperatura de curado, el hecho de que la desviación estándar sea tan elevada en aquellas donde la T era superior, parece indicar que las diferencias entre estas muestras podrían deberse a errores experimentales. No obstante, para confirmar que el comportamiento de degradación de las mismas en medio de cultivo es similar, sería necesario repetir el experimento reduciendo la variabilidad.

El hecho de que en general la degradación en NaOH sea mayor en todos los *films* que en agua se debe a que el hinchado del material en este medio es también superior. El NaOH es capaz de introducirse en la estructura del material aumentando la superficie de contacto con el mismo, y esto permite que actúe sobre el material degradándolo por todos los puntos por los que contacta. De esta manera aumenta la degradación y la pérdida de masa. De acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización físico-química previa de los materiales, en los *films* sintetizados a T de curado mayores que las del protocolo estándar el hinchado del material es menor, y en consecuencia, la pérdida de masa es también más reducida. El aumento de la temperatura de curado de los materiales favorece la reacción de policondensación entre los grupos terminales de los monómeros que intervienen en la síntesis del PGS, y esto permite la formación de cadenas con mayor grado de entrecruzamiento dando lugar a una red polimérica más compacta que dificulta la entrada del NaOH y, por tanto, la degradación en este medio. En el caso de los materiales en los que el t de curado fue de 96 horas la degradación también fue menor que en los que se sintetizaron siguiendo el protocolo estándar, pero las diferencias no son tan acusadas como cuando el parámetro que se modifica es la T de curado. Sin embargo, la desviación estándar en este caso es elevada, cercana al valor promedio de porcentaje de pérdida de masa en estos *films*, por lo que no puede afirmarse que el tiempo de curado sea un factor menos influyente que la temperatura para la degradación del material. De hecho, sería de esperar que el aumento del tiempo de curado y la T tuviesen un efecto similar, puesto que un aumento del t de reacción permitiría que más grupos terminales reaccionasen entre sí formando una red más compacta, como ocurre al aumentar la T. Por su parte, los materiales en los que la composición molar de ácido sebácico era doble, sufrieron una degradación total en NaOH tras 4 semanas de ensayo. El aumento en la proporción de este monómero, incrementa el número de grupos ácido (COOH) disponibles para reaccionar con los grupos OH del glicerol. Pero al ser menor la proporción del alcohol, el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas es menor formándose cadenas lineales a las que les faltan grupos OH que las unan entre sí. De esta manera, la red polimérica es menos compacta y permite la entrada del NaOH con mayor facilidad a su interior, favoreciendo la degradación.

A diferencia de lo que ocurre con el NaOH, el agua no puede entrar en el interior de la estructura del polímero, los materiales son en general muy hidrofóbicos, y apenas experimentan hinchado en este medio. De hecho, los diferentes *films* de PGS en agua sufren un proceso de degradación por erosión, que afecta únicamente a las cadenas de la superficie y da lugar a una pérdida de masa menor que en medios que sí consiguen entrar en la red polimérica.

Por su parte, la degradación en medio de cultivo también es en general superior a la que sufren los materiales en agua. Los resultados siguen una tendencia similar a la de los obtenidos en el ensayo de degradación en NaOH. No obstante, en general, la degradación es en todos los casos inferior a la que sufren los materiales en este medio. Esto podría ser debido a que el medio de cultivo empleado contiene grandes moléculas orgánicas (glucosa y piruvato sódico entre otras) que podrían adherirse a la superficie de los materiales impidiendo la difusión de los iones al interior de la red polimérica, dificultando así la degradación de los *films* de PGS.

## 5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha demostrado la influencia de los parámetros de síntesis de los *films* de poli (glicerol sebacato), sobre las propiedades biológicas del polímero y se han correlacionado con sus propiedades físico-químicas.

Se ha comprobado que los *films* fabricados siguiendo los parámetros estándar de síntesis establecidos en el Centro de Biomateriales de la UPV, resultan más adecuados para el cultivo celular de los fibroblastos de la línea comercial L929 que los materiales sintetizados variando la temperatura, el tiempo de curado o la proporción de ácido sebácico empleada en la polimerización.

Con respecto a las variaciones en los parámetros estándar, se puede afirmar que los materiales que muestran un comportamiento biológico menos apropiado para esta línea celular son aquellos en los que la proporción de ácido sebácico es doble con respecto al protocolo estándar.

Por su parte, los *films* sintetizados a mayores temperaturas y tiempos de curado no presentan diferencias significativas entre ellos, mostrando propiedades biológicas similares a los materiales estándar para tiempos de cultivo cortos. Sin embargo, para tiempos largos el cultivo entra en confluencia, a diferencia de lo que ocurre en los *films* sintetizados siguiendo el protocolo estándar.

En lo referido al ensayo de degradación, aunque los resultados obtenidos en el experimento con agua mili-Q no se ajusten en todos los casos a lo esperado, las pérdidas de masa son tan reducidas que las diferencias con respecto a lo esperado podrían ser debidas a errores experimentales. Sin embargo, la degradación en NaOH y medio de cultivo, tal y como era de esperar, fue superior en los materiales fabricados con una proporción doble de ácido sebácico, dado que la red polimérica es más laxa. Fue menor en los materiales fabricados a una T o t de curado superiores a lo que indica el protocolo estándar, puesto que en estos casos el entrecruzamiento entre las cadenas es mayor, y la red es más compacta.

Finalmente, se debe destacar que se trata de un ensayo preliminar, donde se pretendía conocer cuáles son a priori las condiciones de síntesis del PGS que favorecen el crecimiento de una línea celular establecida que ha dado buenos resultados en otros materiales como la PCL . Por tanto, a partir del presente trabajo final de grado, no se pueden establecer conclusiones categóricas sobre cuáles serían las condiciones más adecuadas para el desarrollo de implantes vasculares. Serían necesarios ensayos posteriores con otros tipos celulares característicos de los vasos sanguíneos como células endoteliales y musculares, así como el desarrollo de andamiajes tridimensionales basados en este polímero, para poder confirmar la posible utilización de este material para la fabricación de vasos sanguíneos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

AGENCIA DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS (AETS). (1997) *Prótesis Endovasculares (Stent Grafts) en el Tratamiento de los Aneurismas de Aorta Abdominal*. Madrid: AETS. Instituto de Salud Carlos III.

AGRAWAL, C. M. (1998). Reconstructing the human body using biomaterials. *The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society*, 50(1): 31–35.

BADYLAK, S. F.; TAYLOR, D., & UYGUN, K. (2010). Whole Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13(1): 27-53.

BETTINGER, C. J.; ORRICK, B.; MISRA, A.; LANGER, R., & BORENSTEIN, J. T. (2006). Microfabrication of poly (glycerol-sebacate) for contact guidance applications. *Biomaterials*, 27(12): 2558–2565.

BHATIA, S. N., & CHEN, C. S. (1999). Tissue Engineering at the Micro-Scale. *Biomedical Microdevices*, 2(2): 131–144.

BOECKEL, D. G.; SHINKAI, R. S. A.; GROSSI, M. L. & TEIXEIRA, E. R. (2012). Cell Culture-Based Tissue Engineering as an Alternative to Bone Grafts in Implant Dentistry: A Literature Review. *Journal of Oral Implantology*, 37: 538-545.

BOONTHEEKUL, T. & MOONEY, D. J. (2003). Protein-based signaling systems in tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5): 559–565.

BRUGGEMAN, J. P.; DE BRUIN, B. J.; BETTINGER, C. J. & LANGER, R. (2008). Biodegradable poly(polyol sebacate) polymers. *Biomaterials*, 29(36): 4726–4735.

CAI, W. & LIU, L. (2008). Shape-memory effect of poly (glycerol-sebacate) elastomer. *Materials Letters*, 62(14): 2175–2177.

CHAPEKAR, M. S. (2000). Tissue engineering: challenges and opportunities. *Journal of Biomedical Materials Research*, 53(6): 617–620.

CHARLES-HARRIS FERRER, M. (2007). *Development and Characterisation of Completely Degradable Composite Tissue Engineering Scaffolds*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, España.

CHEN, G.; USHIDA, T. & TATEISHI, T. (2001). Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 17(1-2): 63–69.

CHEN, Q. Z.; BISMARCK, A.; HANSEN, U.; JUNAID, S.; TRAN, M. Q.; HARDING, S. E.; ALI, N. N. & BOCCACCINI, A. R. (2008). Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue. *Biomaterials*, 29(1): 47–57.

CHEN, Q. Z.; ISHII, H.; THOUAS, G. A.; LYON, A. R.; WRIGHT, J. S.; BLAKER, J. J.; CHRZANOWSKI, W.; BOCCACCINI, A. R.; ALI, N. N.; KNOWLES, J. C. & HARDING, S. E. (2010). An elastomeric patch derived from poly(glycerol sebacate) for delivery of embryonic stem cells to the heart. *Biomaterials*, 31(14): 3885–3893.

DHANDAYUTHAPANI, B.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T. & KUMAR, D. S. (2011). Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *International Journal of Polymer Science*, 2011(2): 1-19.

FALKE, G. & ANTHONY, A. (2000). Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 98(2): 103–115.

GÁLVEZ-MONTÓN, C.; PRAT-VIDAL, C.; ROURA, S.; SOLER-BOTIJA, C. & BAYES-GENIS, A. (2015). Ingeniería tisular cardiaca y corazón bioartificial. *Revista Española de Cardiología*, 66(5): 391–399.

GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, A.; ALONSO MALMIERCA, M.; POSADAS BERNAL, P.; MARCOS-FERNÁNDEZ, Á.; RODRIGUEZ DÍAZ, A. & LÓPEZ VALENTÍN, J. (2014). Biomateriales elastoméricos en ingeniería tisular. *Revista de plásticos modernos*, 107: 21–24.

GUNATILLAKE, P. A. & ADHIKARI, R. (2003). Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*, 5: 1–16.

HUTMACHER, D. W.; SCHANTZ, J. T.; LAM, C. X. F.; TAN, K. C. T. & LIM, T. C. (2007). State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1: 245-460.

KEMPPAINEN, J. M. & HOLLISTER, S. J. (2010). Tailoring the mechanical properties of 3D-designed poly(glycerol sebacate) scaffolds for cartilage applications. *Journal of Biomedical Materials Research*, 94(1): 9–18.

KIM, B. S.; BAEZ, C. E. & ATALA, A. (2000). Biomaterials for tissue engineering. *World Journal of Urology*, 18: 2-9.

KIM, B. S. & MOONEY, D. J. (1998). Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 16(5): 224–230.

LANGER, R. & VACANTI, J. P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260: 920–926.

LEE, E. J.; KASPER, F. K. & MIKOS, A. G. (2014). Biomaterials for tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(2): 323–337.

LIU, C.; XIA, Z. & CZERNUSZKA, J. T. (2007). Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chemical Engineering Research and Design*, 85(7): 1051–1064.

LIZARBE, M. A. (2007). Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 101: 227-249.

LUTOLF, M. P. & HUBBELL, J. A. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotechnology*, 23(1): 47–55.

MALIGER, R.; HALLEY, P. J. & COOPER-WHITE, J. J. (2013). Poly(glycerol-sebacate) bioelastomers-kinetics of step-growth reactions using Fourier Transform (FT)-Raman spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, 127(5): 3980–3986.

MCCLURE, M. J.; SIMPSON, D. G. & BOWLIN, G. L. (2012). Tri-layered vascular grafts composed of polycaprolactone, elastin, collagen, and silk: Optimization of graft properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 10: 48–61.

NAIR, L. S. & LAURENCIN, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 32(8-9): 762–798.

NEREM, R. M. & SELIKTAR, D. (2001). Vascular Tissue Engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 3: 225–243.

ORIVE, G., HERNÁNDEZ, R. M., GARCÓN, A. R.; IGARTÚA, M. & PEDRÁZ, J. L. (2003). Ingeniería Tisular: Retos Y Realidades. *Vitae*, 10(2): 46–51.

PAGANI, R.; SERRANO, M. C.; COMAS, J. V.; TRIVIÑO, G. & PORTOLÉS, M. T. (2007). Ingeniería de tejidos: aplicaciones en el diseño de implantes cardiovasculares. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 73(4): 873–900.

PATEL, A.; GAHARWAR, A. K.; IVIGLIA, G.; ZHANG, H.; MUKUNDAN, S.; MIHAILA, S. M.; DEMARCHI, D. & KHADEMHOSEINI, A. (2013). Highly elastomeric poly(glycerol sebacate)-co-poly(ethylene glycol) amphiphilic block copolymers. *Biomaterials*, 34(16): 3970–3983.

PLACE, E. S.; EVANS, N. D. & STEVENS, M. M. (2009). Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature Materials*, 8(6): 457–470.

PLAZAS BONILLA, P. E. & PERILLA, J. E. (2011). Pasado, presente y futuro cercano de los materiales para uso en implantes óseos biodegradables. *Ingeniería e investigación*, 31(2): 124–133.

RAI, R.; TALLAWI, M.; GRIGORE, A. & BOCCACCINI, A. R. (2012). Synthesis, properties and biomedical applications of poly(glycerol sebacate) (PGS): A review. *Progress in Polymer Science*, 37(8): 1051–1078.

RATCLIFFE, A. (2000). Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biology*, 19(4): 353–357.

REZWAN, K.; CHEN, Q. Z.; BLAKER, J. J. & BOCCACCINI, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18): 3413–3431.

SANT, S. & KHADEMHOSEINI, A. (2010). Fabrication and characterization of tough elastomeric fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 10: 3546–3548.

SCHMIDT, C. E. & BAIER, J. M. (2000). Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*, 21(22): 2215–2231.

SCHUTTE, S. C. & NEREM, R. M. (2013). Blood vessel tissue engineering, en *Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press. San Diego, Estados Unidos, 1237-1246.

SELL, S. A.; MCCLURE, M. J.; GARG, K.; WOLFE, P. S. & BOWLIN, G. L. (2009). Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(12): 1007–1019.

SHIN, H.; JO, S. & MIKOS, A. G. (2008). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24: 4353–4364.

SIPE, J. D. (2002). Tissue engineering and reparative medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961: 1–9.

SUN, Z. J.; WU, L.; HUANG, W.; CHEN, C.; CHEN, Y.; LU, X. L.; ZHAN, X. L.; YANG, B. F. & DONG, D. L. (2010). Glycolic acid modulates the mechanical property and degradation of poly(glycerol, sebacate, glycolic acid). *Journal of Biomedical Materials Research*, 92(1): 332–339.

SUNDBACK, C. A.; SHYU, J. Y.; WANG, Y.; FAQUIN, W. C.; LANGER, R. S.; VACANTI, J. P. & HADLOCK, T. A. (2005). Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material. *Biomaterials*, 26(27): 5454–5464.

VATS, A.; TOLLEY, N. S.; POLAK, J. M. & GOUGH, J. E. (2003). Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: A review of clinical applications. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences*, 28(3): 165–172.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; MEINEL, L.; ALTMAN, G. & KAPLAN, D. (2005). Bioreactor cultivation of osteochondral grafts. *Orthodontics and Craniofacial Research*, 8(3): 209–218.

WOODRUFF, M. A. & HUTMACHER, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 35(10): 1217–1256.

YANG, J.; YAMATO, M.; SHIMIZU, T.; SEKINE, H.; OHASHI, K.; KANZAKI, M.; OHKI, T.; NISHIDA, K. & OKANO, T. (2007). Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials*, 28(34): 5033–5043.