

NAZIOARTEKO BIKAINTASUN CAMPUSA CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



CENTRO: ESCUELA TECNICA SUPERIOR DE INGENIEROS INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACION. SANTANDER

Caracterización morfológica y funcional de membranas de PCL/grafeno en configuración de fibra hueca para aplicación en cultivos celulares 3D

TRABAJO FIN DE MASTER (TFM)

MASTER UNIVERSITARIO EN INGENIERIA QUIMICA POR LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA Y LA UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA

Alumno: María de los Ángeles Mantecón Oria

Fecha: 29/10/2019

Firma:

Directores:

María José Rivero Martínez Olga Tapia Martínez Curso Académico: 2019/2020

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

Cultivos celulares 3D; diferenciación celular; fibra hueca; grafeno; ingeniería tisular; membranas biocompatibles: PCL/G; policaprolactona

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Lograr la regeneración de tejido del Sistema Nervioso Central (SNC) in vitro para su uso como modelo neuronal sería un avance extremadamente importante para el diagnóstico, comprensión y tratamiento de enfermedades traumáticas y neurodegenerativas. Sin embargo, es uno de los desafíos más ambiciosos para Ingeniería Tisular (IT). Entre las estrategias disponibles, se encuentra la utilización de membranas como materiales de soporte en cultivos celulares para la regeneración *ex vivo* de un órgano y/o tejido (Ikada, 2006).

La hipótesis de trabajo se basa en que la policaprolactona (PCL), polímero biocompatible apto en aplicaciones biomédicas y crecimiento celular, ve mejoradas sus propiedades con la incorporación del grafeno (G). Este nanomaterial, gracias a sus propiedades electroactivas, podría inducir una mejora en la proliferación y diferenciación hacia células específicas (Diban y cols., 2017).

El objetivo principal del trabajo es realizar la caracterización de las membranas en configuración de fibra hueca funcionalizadas con grafeno (PCL/G) y de las membranas de PCL sin grafeno para poder controlar y mejorar sus propiedades físico-químicas, mecánicas, eléctricas y de transporte aplicando conceptos ingenieriles. Esto se realiza con el fin de evaluar su potencial para ser utilizadas como soportes para cultivos celulares 3D en IT e incorporarlas en biorreactores de perfusión.

Una posible aplicación práctica de las membranas en fibra hueca sería el co-cultivo celular 3D de astrocitos sobre tejido vascular, dos tipos celulares que mantienen una asociación directa en la barrera hematoencefálica del SNC.

RESULTADOS

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la caracterización físicoquímica, morfológica y biofuncional de las membranas polímero/grafeno (PCL/G) y de las membranas de PCL en configuración de fibra hueca incluyendo un análisis estadístico de las propiedades estudiadas para evaluar si existen diferencias significativas entre ambas.

Con la caracterización morfológica se encontró que ambas membranas presentaban una morfología tipo esponja en la superficie interna y una morfología tipo dedo en la superficie externa. Además, la alta porosidad (alrededor de 85%) resultante en ambas membranas puede facilitar el transporte de materia presentando a su vez poros interconectados que imitan una red de vascularización que puede favorecer los cultivos celulares 3D. Asimismo, mediante la técnica de espectroscopia Raman se confirmó la correcta dispersión del nanomaterial incorporado en la matriz polimérica con una presencia uniformemente distribuida a lo largo de la longitud de la fibra hueca compuesta y se corroboró que el grafeno mantenía íntegras sus propiedades químicas y de deslaminación.

A partir de los ensayos mecánicos, se puede considerar que las membranas funcionalizadas mantuvieron su estructura e integridad resultando más elásticas que las membranas de PCL. Igualmente, presentaron propiedades mecánicas suficientes como para mantener las presiones transmembranales necesarias en biorreactores de perfusión. Con el análisis de las propiedades eléctricas se determinó que, a bajas frecuencias, la conductividad eléctrica mejora al incorporar grafeno en las membranas duplicando el valor obtenido para las fibras de PCL. Esto puede proporcionar a las membranas la capacidad de soportar tejidos biológicos que presentan respuestas bioactivas electroconductoras (Vijayavenkataraman y cols., 2019) pudiendo favorecer el crecimiento y diferenciación celular. Por otro lado, las membranas funcionalizadas PCL/G presentan una permeabilidad hidráulica significativamente mayor a las de PCL pudiendo atribuirse al tamaño medio de poro mayor en la superficie de las membranas.

Finalmente, se estudió la funcionalidad biológica de las fibras huecas PCL y PCL/G mediante ensayos experimentales de adhesión, proliferación y diferenciación de células glioma C6 y células endoteliales HUVEC a astrocitos y tejido vascular, respectivamente. Resultó que las membranas de PCL promueven la adhesión y crecimiento de las células HUVEC, mientras que las membranas funcionalizadas PCL/G inducen la diferenciación de las células C6 a astrocitos.

CONCLUSIONES

Tras la caracterización realizada a lo largo del trabajo y con los resultados obtenidos se justificaría la potencial aplicabilidad de las membranas funcionalizadas (PCL/G) y de las membranas de PCL en configuración de fibra hueca en cultivos de células 3D pudiendo incorporarse en biorreactores de perfusión para IT.

Además, los resultados biológicos obtenidos abren la posibilidad de desarrollar nuevas fibras huecas con ausencia de grafeno en la zona interna de la fibra, donde se sembrarían las células HUVEC, y la presencia de grafeno en la superficie externa, donde se sembrarían las células C6 siendo viable un co-cultivo 3D HUVEC/C6 con aplicaciones biomédicas directas.

Este trabajo ha contribuido a avanzar en el desarrollo de modelos celulares confiables *in vitro* para el estudio de patologías o enfermedades neurodegenerativas en IT a través del uso de membranas biocompatibles utilizadas como *scaffolds*.

<u>BIBLIOGRAFÍA</u>

- Diban, N., Sánchez-González, S., Lázaro-Díez, M., Ramos-Vivas, J. and Urtiaga, A. (2017). Facile fabrication of poly(ε-caprolactone)/graphene oxide membranes for bioreactors in tissue engineering. Journal of Membrane Science, 540(23), 219–228.
- Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. Journal of the Royal Society Interface, 3(10), 589–601.
- Vijayavenkataraman, S., Thaharah, S., Zhang, S., Lu, W. F. and Fuh, J. Y. H. (2019). 3D-Printed PCL/rGO Conductive Scaffolds for Peripheral Nerve Injury Repair. Artificial Organs, 43(5), 515–523.

SUMMARY

KEYWORDS

3D cell cultures; biocompatible membranes: PCL/G; cell differentiation; graphene; hollow fiber; polycaprolactone; tissue engineering

<u>SCOPE</u>

Achieving regeneration of tissue from the Central Nervous System (CNS) in vitro to be used as a neuronal model would be an extremely important advance for the diagnosis, understanding and treatment of both traumatic and neurodegenerative diseases. However, it is one of the most ambitious challenges for Tissue Engineering (TE). Among the available strategies, the use of membranes as scaffolds in cell cultures for the *ex vivo* regeneration of an organ and/or tissue appears as an option (Ikada, 2006).

This proposal has as starting point that polycaprolactone (PCL), a biocompatible polymer suitable for biomedical applications and cell growth, improves its properties with the incorporation of graphene (G). This nanomaterial, thanks to its electroactive properties, could induce an improvement in proliferation and differentiation towards specific cells (Diban y cols., 2017).

The project focuses on carrying out a characterization of the functionalized membranes (PCL/G) and the PCL without graphene in hollow fiber (HF) configuration to be capable of controlling and improving their physicochemical, mechanical, electrical and transport properties by applying engineering concepts in order to evaluate their potential to be used as supports for 3D cell cultures in TE. Moreover, they could be incorporated into perfusion bioreactors.

A possible practical application of the hollow fiber membranes would be 3D cell coculture of astrocytes on vascular tissue, two cell types that maintain a direct association in the blood brain barrier of the CNS.

RESULTS

The present work has complied with the physicochemical, morphological and biofunctional characterization of polymer/graphene membranes (PCL/G) and PCL membranes in hollow fiber configuration including a statistical analysis of the properties studied to assess if there are the significant differences between both membranes.

With the morphological characterization it was found that both membranes presented sponge-like morphology on the inner surface and finger-like morphology on the external surface. In addition, the high porosity (around 85%) resulting in both membranes could facilitate the mass transport while interconnected pores mimic a vascularization network that could favor 3D cell cultures. Likewise, by means of the Raman spectroscopy technique, the correct dispersion of the nanomaterial incorporated in the polymer matrix was confirmed with a uniformly distributed presence along the length of the composite hollow fiber and it was confirmed that graphene maintained its chemical and delamination properties.

From the mechanical tests, it can be considered that functionalized membranes maintained their structure and integrity being more elastic than PCL membranes. They also had sufficient mechanical properties to maintain the necessary transmembrane pressures in perfusion bioreactors. With the analysis of the electrical properties it was determined that, at low frequencies, the electrical conductivity improves by incorporating graphene in the membranes doubling the value obtained for PCL fibers. This could provide membranes with the ability to support biological tissues that have electroconductive bioactive responses (Vijayavenkataraman y cols., 2019) being able to favor cell growth and differentiation. On the other hand, the PCL/G functionalized membranes have a significantly greater hydraulic permeability than those of PCL and it could be attributed to the larger average pore size on the surface of the membranes.

Finally, the biological functionality of the hollow fibers PCL and PCL/G was studied through experimental tests of adhesion, proliferation and differentiation of glioma C6 cell and endothelial HUVEC cells to astrocytes and vascular tissue, respectively. It turned out that PCL membranes promote the adhesion and growth of HUVEC cells, while PCL/G functionalized membranes induce differentiation of C6 cells to astrocytes.

CONCLUSIONS

The results obtained throughout the work carried out would justify the application of functionalized PCL/G hollow fibers and those of PCL in 3D cell cultures and could be incorporated into perfusion bioreactors for IT.

In addition, the biological results obtained open the possibility of developing a 3D HUVEC/C6 co-culture in the same hollow fiber specimen with possible biomedical applications. Intra-luminal HUVEC cell attachment in absence of graphene and external surface C6 cell attachment in the presence of graphene would be ensured the 3D co-culture.

With this project, it has been possible to progress towards the objective of developing reliable *in vitro* cellular models for studying pathologies or neurodegenerative diseases in TE through the use of biocompatible membranes used as *scaffolds*.

REFERENCES

- Diban, N., Sánchez-González, S., Lázaro-Díez, M., Ramos-Vivas, J. and Urtiaga, A. (2017). Facile fabrication of poly(ε-caprolactone)/graphene oxide membranes for bioreactors in tissue engineering. Journal of Membrane Science, 540(23), 219–228.
- Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. Journal of the Royal Society Interface, 3(10), 589–601.
- Vijayavenkataraman, S., Thaharah, S., Zhang, S., Lu, W. F. and Fuh, J. Y. H. (2019). 3D-Printed PCL/rGO Conductive Scaffolds for Peripheral Nerve Injury Repair. Artificial Organs, 43(5), 515–523.

ÍNDICE

1. IN	FRODUCCIÓN	1
1.1.	INGENIERÍA DE TEJIDOS	2
1.2.	MEMBRANAS COMO SOPORTES PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS	3
1.2.1.	Funcionalización de las membranas para inducir diferenciación celular	4
1.2.2.	Configuración de las membranas y técnicas de procesado	5
1.3.	ANTECEDENTES	7
1.4.	HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	9
2. MF	TODOLOGÍA EXPERIMENTAL	10
2.1.	FABRICACIÓN DE MEMBRANAS 3D (FIBRAS HUECAS)	11
2.2.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y QUÍMICA	12
2.2	1. Microscopía Electrónica de Barrido	12
2.2	2. Porosidad de las membranas	13
2.2	3. Espectroscopía Raman	13
2.3.	CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS, ELÉCTRICA	AS Y
DE T	RANSPORTE	14
2.3	1. Propiedades mecánicas de las fibras huecas	14
2.3	2. Propiedades eléctricas de las fibras huecas	14
2.3	.3. Propiedades de transporte de las fibras huecas: permeabilidad hidraulica	16
2.4.	Carac l'ERIZACION FUNCIONAL BIOLOGICA	/ I
2.4	2 Descongeleción de cólulos	10
2.4	 Método do requesto y subcultivo colular 	19
2.4	A Preparación y esterilización para el crecimiento celular	20
2.4	5 Configuración experimental	20
2.4	.6. Fijación celular	
2.4	 Marcaje de los filamentos de actina y del ADN 	22
2.4	8. Microscopía confocal	23
2.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
3. RE	SULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y QUÍMICA	
3.1	1. Caracterización morfológica de las fibras huecas	26
3.1	2. Caracterización química de las fibras huecas: espectroscopía Raman	28
3.2.	CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS, ELÉCTRICA	AS Y
DE T	RANSPORTE	30
32	1. Propiedades mecánicas de las fibras huecas	

	3.2.2.	Propiedades eléctricas de las fibras huecas	31
	3.2.3.	Propiedades de transporte de las fibras huecas: permeabilidad hidráulica	
	3.3. FU PCL Y P	UNCIONALIDAD BIOLÓGICA DE LAS MEMBRANAS DE FIBRA H CL/G: ADHESIÓN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELUI	UECA LAR 34
	3.3.1.	Línea celular C6	
	3.3.2.	Línea celular HUVEC	
4.	CONC	LUSIONS AND FUTURE CHALLENGES	40
	4.1. CO	DNCLUSIONS	41
	4.2. FU	JTURE CHALLENGES	
5.	NOME	NCLATURA	43
6.	BIBLIC	DGRAFÍA	46
7.	ANEX	DS	53
	Anexo A:	Caracterización del grafeno comercial av-PLAT 7	54
	Anexo B:	Ficha técnica de las líneas celulares utilizadas	55
	Línea co	elular C6	55
	Línea co	elular HUVEC	57
	Anexo C:	Cámara de Neubauer para el recuento celular	
	Anexo D:	Funcionalidad biológica de la línea celular C2C12	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del concepto Ingeniería Tisular utilizando soportes	2
Figura 2. Estructura química de la PCL.	4
Figura 3. Nanomateriales como el grafeno y sus derivados se utilizan en soportes para	a la
proliferación y diferenciación hacia tejidos específicos.	5
Figura 4. Adhesión y proliferación celular en una membrana de fibra hueca	6
Figura 5. Montaje experimental para la síntesis de fibras huecas (dry-jet wet spinning)	11
Figura 6. Secciones transversales (A) y laterales (B) de un spinneret común utilizado en la técn	nica
dry-jet wet spinning	12
Figura 7. Sistema de cocodrilos utilizado para medir la impedancia.	15
Figura 8. Dimensiones para calcular el área de contacto	15
Figura 9. Sistema experimental de flujo tangencial para la caracterización del flujo de agua	con
módulo PCL/G	16
Figura 10. Imagen de microscopía óptica invertida que muestra cultivo de células C6	18
Figura 11. Micrografía celular de las células HUVEC a una escala 100 µm	19
Figura 12. Configuración del pocillo donde se siembran las células.	21
Figura 13. Escala temporal para el análisis celular	21
Figura 14. Proceso experimental seguido en los cultivos de las células gliales C6	22
Figura 15. Proceso experimental seguido en los cultivos de las células capilares HUVEC	22
Figura 16. Análisis de muestras y reconstrucción de imágenes (microscopía confocal)	24
Figura 17. Imágenes SEM de la sección transversal de las fibras PCL y PCL/G.	26
Figura 18. Imágenes SEM de la superficie externa de las fibras PCL y PCL/G incluyendo tam	año
medio de poro	27
Figura 19. Espectro Raman de las fibras PCL/G y PCL, así como del grafeno comercial	28
Figura 20. Espectro Raman de las fibras PCL/G y PCL, así como del grafeno comercial	30
Figura 21. Conductividad relativa entre las membranas de PCL/G y PCL	32
Figura 22. Caracterización del flujo hidráulico vs presión transmembranal para las membra	inas
de PCL/G y PCL.	33
Figura 23. Imágenes representativas de microscopía confocal donde se observa la densidad	(A)
y morfología celular de las C6 (B-D) 24h después de la siembra (día 0)	35
Figura 24. Imágenes representativas de microscopía confocal donde se observa la densidad	(A-
B en PCL, D-E en PCL/G) y morfología celular de las C6 (C en PCL y F en PCL/G)	36
Figura 25. Ensayo de adhesión de las células C6 sobre los sustratos indicados	36
Figura 26. Estudio de diferenciación a astrocitos durante 72h en (A-C) membranas de PCL y	(D-
F) membranas de PCL/G	37
Figura 27. Ensayo de diferenciación de células C6 sobre los sustratos indicados	37
Figura 28. Cultivo celular en mosaico del modelo endotelial HUVEC	38
Figura 29. Imágenes de microscopía confocal de células HUVEC crecidas en la superficie	e de
membranas de PCL (A) o PCL/G (C) en configuración de fibra hueca	38
Figura 30. A) Análisis SEM y B) TEM del grafeno av-PLAT 7.	54
Figura 31. Mecanismo de funcionamiento de la cámara de Neubauer para el recuento celular	: 59
Figura 32. (A-C) Ejemplo cultivo de mioblastos y proceso típico de diferenciación a miotu	ibos
sobre cristal. (D-F) Cultivo sub-confluente de mioblastos para diferentes sustratos	61
Figura 33. (A-C) Cultivo confluente de mioblastos (día $0 = 24$ h) para la PCL y (D-F) par	a la
PCL/G	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales resultados reportados en bibliografía sobre fabricación de estructura	is de PCL
y grafeno	8
Tabla 2. Características morfológicas de las fibras huecas PCL y PCL/G	
Tabla 3. Análisis mecánico a tracción de las fibras huecas PCL y PCL/G.	
Tabla 4. Comparación de las permeancias hidráulicas obtenidas en el presente trabajo	con datos
reportados en bibliografía	

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INGENIERÍA DE TEJIDOS

Uno de los problemas más difíciles y costosos a los que se enfrenta la medicina actual es la pérdida o fallo funcional de órganos y/o tejidos. Las estrategias terapéuticas disponibles hasta la fecha son la reconstrucción quirúrgica, el trasplante de órganos y tejidos y el implante de sustitutos sintéticos supliendo la función del órgano o tejido en cuestión. Estas técnicas son eficientes, sin embargo, han demostrado ser insuficientes para la solución óptima del problema, limitadas por la baja disponibilidad de donantes, el alto riesgo de incompatibilidad y las complicaciones quirúrgicas (Ikada, 2006). Por estos motivos surge la ingeniería de tejidos o ingeniería tisular (IT), rama de la medicina regenerativa, como una solución prometedora para este tipo de patologías.

La IT consiste en la reconstrucción de tejidos funcionales mediante el empleo de células, materiales usados como soporte celular y factores bioactivos combinados en distintos modos, de forma que sean capaces de reparar la estructura de un tejido dado. La IT se presenta como un campo multidisciplinario. A través de la ciencia de los materiales e ingeniería química se proporciona el conocimiento adecuado para el diseño y fabricación de los soportes así como el estudio de los mecanismos de transporte de nutrientes y fundamentos de diseño de biorreactores. Por otro lado, aplica los principios de biología y ciencias de la vida que proporcionan la base necesaria para comprender los sistemas biológicos (Langer y Vacanti, 1993).

La descripción del principio de IT, adaptado al contexto expuesto, se presenta brevemente en la Fig. 1. Los tejidos *in vitro* se obtienen de la extracción, aislamiento y expansión de las células del paciente que se cultivan en un soporte celular. La estructura o soporte, en inglés denominado *scaffold*, sembrado con células se transfiere a un biorreactor de perfusión donde las células proliferan hasta que se diferencian en el tejido objetivo, creciendo *in vitro* hasta obtener la funcionalidad del órgano a reproducir. Finalmente, el tejido construido podría ser trasplantado en el paciente.



Figura 1. Esquema del concepto Ingeniería Tisular utilizando soportes.

Otra de las aplicaciones recientes en IT consiste en el uso del tejido regenerado como modelo alternativo al de los animales para estudiar mecanismos biológicos y terapéuticos. Como ejemplo, se presenta la idea de conseguir regenerar tejido del Sistema Nervioso Central (SNC) *in vitro* para su uso como modelo neuronal. Esto supondría un avance de suma importancia para el diagnóstico, comprensión y tratamiento de enfermedades tanto traumáticas como neurodegenerativas. También, el desarrollo de modelos celulares *in vitro* permitiría el estudio y detección de nuevos fármacos abriendo la puerta al desarrollo de tratamientos personales o a medida creados para el paciente (Langer y Vacanti, 1993).

Las estrategias exitosas de la ingeniería de tejidos *in vitro* requieren de una fuente adecuada de células, la optimización de la estructura de los soportes y el diseño de biorreactores. De esta forma, el crecimiento de las células sobre el *scaffold* y la consiguiente introducción a un biorreactor podría recrear una estructura similar al tejido u órgano deseado.

Entre las estrategias disponibles, se encuentra la utilización de membranas como materiales de soporte para las células, a modo de "andamiajes", para la recreación *ex vivo* de un órgano y/o tejido. La IT puede utilizar membranas porosas de distinta naturaleza para llevar a cabo la proliferación y diferenciación celular así como el crecimiento de tejidos para su regeneración con fines terapéuticos (Montuenga y cols., 2009).

1.2. MEMBRANAS COMO SOPORTES PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS

Los *scaffolds* son elementos fundamentales en IT. Estos soportes son estructuras compuestas de una variedad de materiales naturales o sintéticos, procesados por diferentes técnicas para generar diversos formatos (geles, sólidos porosos y fibras) con el fin de soportar cultivos celulares para la formación de tejidos (Sánchez-González, 2019). En este contexto, varios estudios se han centrado en los últimos años en la fabricación de materiales porosos 3D, lo que puede garantizar una mejor imitación de las condiciones *in vivo*, en comparación con los cultivos de células 2D (Knight y Przyborski, 2015; Lee y cols., 2008).

En base a las propiedades estructurales y morfológicas, las membranas poliméricas, tradicionalmente empleadas como filtros en aplicaciones industriales de separación en medios acuosos, han mostrado su alto potencial para ser utilizadas como soportes en IT ya que cumplen con los requisitos estructurales y funcionales exigidos. En particular, para que las membranas poliméricas puedan ser empleadas como *scaffolds* o soportes de crecimiento celular en IT deben ser altamente porosas facilitando el transporte de materia con poros interconectados imitando una red de vascularización para suministrar nutrientes celulares, oxígeno y factores bioquímicos a su través (Lee y cols., 2008). Las membranas también facilitarán la eliminación de productos de desecho en cultivos celulares 3D pudiendo incorporarse con éxito en biorreactores de perfusión. Estos biorreactores ayudan a la construcción de tejidos funcionales tridimensionales, siendo su función principal proporcionar un entorno biomecánico y bioquímico adecuado, reduciendo el estrés celular, y favorecer el intercambio de nutrientes y productos metabólicos a través de las membranas utilizadas como soportes celulares (Pörtner y cols., 2005).

En cuanto a las propiedades mecánicas, las membranas idóneas deben mantener su estructura e integridad dentro de un tiempo determinado asegurando la formación y

maduración de nuevos tejidos hasta su degradación. Según la funcionalidad biológica, las membranas utilizadas en cultivos celulares en IT deben tener la capacidad de promover un entorno adecuado para la adhesión y crecimiento celular así como inducir la diferenciación celular sobre sí mismas, sin generar rechazos inmunológicos en los cultivos celulares 3D (Knight y Przyborski, 2015).

Con todo ello, las membranas utilizadas como *scaffolds* deben estar diseñadas para imitar el tejido nativo y los polímeros a utilizar deben ser biocompatibles y, según las distintas aplicaciones, fácilmente reabsorbidos por el cuerpo humano. Idealmente, deberían ser inductivos, es decir, capaces de proporcionar las señales adecuadas para el correcto crecimiento y diferenciación de las células sembradas (Montuenga y cols., 2009). Así pues, la elección de los biomateriales, utilizados en la fabricación de membranas porosas para el cultivo de las células *in vitro*, es clave para inducir su diferenciación hacia un tejido específico.

1.2.1. Funcionalización de las membranas para inducir diferenciación celular

Se han estudiado numerosos polímeros para su uso como membranas en IT. Entre ellos, la ε -policaprolactona (PCL) (Fig. 2), poliéster alifático biocompatible con buena resistencia al agua, disolventes y aceites y sintetizado por la polimerización de apertura del anillo de ε -caprolactona, ha sido ampliamente adoptado debido a su gran biocompatibilidad y facilidad de procesado (Woodruff y Hutmacher, 2010). Las excelentes propiedades mecánicas y químicas de este polímero la convierten en un material muy interesante y con un extenso desarrollo comercial en lo que a aplicaciones biomédicas y materiales se refiere. Este polímero ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para su uso en el cuerpo humano como dispositivo de suministro, liberación de medicamentos y material de sutura, además de ser ampliamente utilizado para la ingeniería de tejidos neuronales (Cipitria y cols., 2011).



Figura 2. Estructura química de la PCL.

Muchos de los materiales poliméricos, como la PCL, reproducen los microambientes fisiológicos de las células contribuyendo a su proliferación. Sin embargo, estos polímeros no son capaces de inducir la diferenciación hacia un tejido concreto (Kenry y cols., 2018).

Por este motivo, las tendencias actuales en investigación se dirigen a desarrollar membranas compuestas funcionalizadas formadas por polímeros sintéticos biocompatibles y biodegradables que contienen en su matriz polimérica diferentes nanomateriales. La introducción de la nanotecnología, a través del uso de diferentes estructuras como nanopartículas (0D), nanotubos (1D), nanoláminas (2D) y nanoespumas (3D), ha jugado un papel fundamental en IT.

Concretamente, el grafeno (G) es uno de los nanomateriales que ha generado mayor interés en los últimos años en IT. Se trata de un material grafítico bidimensional de una

sola capa. Los átomos de carbono, que se encuentran empaquetados densamente en una red cristalina, se unen mediante enlaces covalentes formando una especie de panal de abeja. Este nanomaterial cuenta con espectaculares propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas, térmicas y magnéticas (Goenka y cols., 2014).

Entre sus numerosas aplicaciones en el campo de la ingeniería biomédica destacan el suministro de fármacos (Goenka y cols., 2014), terapias contra el cáncer (Akhavan y cols., 2012), biosensores (Shao y cols., 2010) y fabricación de *scaffolds* para cultivos celulares (Fig. 3) (Akhavan, 2016; Pan y cols., 2019). Los resultados obtenidos indican que el grafeno no solo no afecta negativamente a la viabilidad celular, sino que mejora el crecimiento, la proliferación y diferenciación celular (Kenry y cols., 2018; Ryoo y cols., 2010). Concretamente, se ha demostrado que las nanoláminas de grafeno fomentan la diferenciación de las células madre hacia tejidos neuronales (Park y cols., 2011). También, se han realizado pruebas de citotoxicidad in vitro en *scaffolds* que contienen estos nanomateriales verificando su biocompatibilidad celular (Sayyar y cols., 2013). De hecho, en estudios recientes, el grafeno ha sido declarado como un material no citotóxico y, además, altamente biocompatible y estable (Lee y cols., 2018).



Figura 3. Nanomateriales como el grafeno y sus derivados se utilizan en soportes para cultivar células madres reforzando la proliferación y diferenciación hacia tejidos específicos. Modificado de Kenry y cols. (2018).

Estudios previos (Diban y cols., 2017; Kumar y Chatterjee, 2016; Sánchez-González y cols., 2018), han confirmado que las membranas funcionalizadas formadas por PCL y grafeno y sus derivados forman un soporte biodegradable y citocompatible muy apto para su aplicación en el campo de la medicina. La PCL proporciona buenas propiedades funcionales y crea un entorno favorable para el crecimiento celular, mientras que la incorporación de los nanomateriales de origen grafítico induce propiedades eléctricas en la membrana y mejora la diferenciación celular.

Con la revisión previa, se muestra que la adición de nanomateriales como grafeno y sus derivados en una matriz polimérica no supone ningún tipo de toxicidad en los cultivos celulares y además, abre la puerta a una serie de aplicaciones adicionales, como sintetizar membranas con propiedades electro-activas para el crecimiento de células estimuladas eléctricamente, como por ejemplo tejido nervioso (Srikanth y cols., 2019; Vijayavenkataraman y cols., 2019) y muscular (Vannozzi y cols., 2017).

1.2.2. Configuración de las membranas y técnicas de procesado

La configuración de las membranas utilizadas en IT es un punto importante a tener en cuenta. A pesar de los numerosos artículos que demuestran que las láminas de grafeno

(como membranas 2D) exhiben excelentes capacidades en la proliferación y diferenciación celular (Shah y cols., 2014), en los últimos años, la configuración en 3D está ganando protagonismo.

Recientemente, las fibras huecas se han utilizado como soportes para la proliferación celular y diferenciación de tejidos que requieren una forma tubular, como el intestino, uretra, vasos sanguíneos o nervios. Estas membranas también se han usado para la regeneración de tejidos como el cartílago, lo que demuestra que la estructura 3D puede preservar el fenotipo de las células de condrocitos y favorecer la producción de macromoléculas de la matriz extracelular (Chen y cols., 2014). Igualmente, se han empleado en otras aplicaciones biomédicas como sistemas de perfusión (Bettahalli y cols., 2011) o dispositivos de purificación de sangre (Saito, 2003) o para mejorar la vascularización (Novosel y cols., 2011). Aunque, las aplicaciones más populares de estas fibras han sido la regeneración de vasos sanguíneos y nervios de pequeño calibre.

Una de las ventajas de las membranas en fibra hueca es que permiten una alta penetración de nutrientes así como la eliminación de desechos en la proliferación y diferenciación celular al operar imitando redes vasculares fisiológicas y brindando más beneficios debido a la perfusión tangencial (Diban y Stamatialis, 2014). Asimismo, este tipo de membranas ayudan a resolver las limitaciones de transporte de oxígeno y nutrientes a los tejidos artificiales y la neovascularización de los tejidos vivos teniendo en cuenta el efecto de las condiciones de flujo y el estrés por tensiones de cizalla generado en las células (Diban y cols., 2018).

Lo ideal es incorporar estas membranas en configuración de fibra hueca en biorreactores de perfusión creando un sistema de cultivo versátil con elevado transporte de masa en el que se puedan alcanzar altas densidades celulares. Asimismo, las células cultivadas en estos sistemas tienden a reproducir perfectamente la morfología de las células o tejidos vivos y responder mejor a las señales inducidas (Storm y cols., 2016).

Finalmente, la configuración 3D permitiría la siembra y cultivo de células tanto en el lumen o superficie interna o en la superficie externa de la fibra hueca (Fig. 4) lo que facilitaría su aplicación en sistemas de co-cultivos, permitiendo superar las limitaciones de los experimentos tradicionales de monocultivo, y la interconectividad de células de funcionalidades complementarias, siendo útiles herramientas para el descubrimiento de nuevos fármacos, estudio de patologías y múltiples aplicaciones en medicina regenerativa (De Giglio y cols., 2018).



Figura 4. Adhesión y proliferación celular en una membrana de fibra hueca. Modificado de Wung y cols. (2014).

La técnica tradicional de procesado de membranas de fibra hueca es la extrusión y coagulación mediante inversión de fases, ya que es un método fácil y versátil para fabricar membranas con una porosidad, morfología y topografía de superficie controladas. Igualmente, la elevada porosidad generada y la interconectividad de los poros permiten una correcta adhesión, proliferación y diferenciación de las células neuronales (Diban y cols., 2017). Además, esta técnica es idónea debido a su versatilidad y simplicidad experimental, sin necesidad de utilizar reactivos tóxicos o condiciones de operación extremas.

Esta técnica consiste en hacer pasar el polímero desde una fase líquida a una fase sólida. Para ello, el polímero, disuelto en un disolvente orgánico, precipita en un baño de coagulante en el que el polímero no es soluble. Esta precipitación ocurre ya que el disolvente orgánico pasa de la disolución polimérica al baño de coagulación en el que es soluble mezclándose con él.

Utilizando la técnica de hilado en seco con chorro húmedo o *dry-jet wet spinning*, que hace uso de la inversión de fases, se pueden fabricar prometedoras membranas de PCL/G en configuración de fibra hueca para desarrollar cultivos celulares 3D incorporadas en biorreactores de perfusión tangencial.

1.3. ANTECEDENTES

Varios estudios se centran en la modificación de los soportes poliméricos utilizados en IT. La introducción de grafeno y sus derivados promueve mejoras considerables en las respuestas celulares obtenidas gracias a las propiedades que proporciona a la matriz polimérica (Kumar y Chatterjee, 2016). El grado de mejora de las propiedades está influenciado por las condiciones de procesamiento que se utilizan, como la cantidad de grafeno introducida o la afinidad de los componentes involucrados en el proceso (Sánchez-González, 2019).

Para proporcionar una visión general, aparte de los diversos estudios expuestos previamente, en la Tabla 1 se van a mostrar los principales resultados encontrados en la literatura con respecto a membranas de PCL y grafeno con el fin de aplicarse en ingeniería de tejidos. La Tabla 1 muestra los diferentes *scaffolds* sintetizados así como la técnica utilizada en la fabricación de los mismos. Se han recogido también en esta tabla las técnicas de caracterización utilizadas para las distintas membranas así como el tipo de tejido o célula estudiado en cada trabajo. Finalmente, se muestran los resultados obtenidos en los diferentes estudios.

Con el análisis realizado se ve la carencia de diferentes técnicas para la fabricación de membranas en 3D ya que la mayoría de estas membranas se sintetizan a partir de la técnica de electrohilado o *electrospinning*. Además, algunos de los estudios de membranas, aunque se pretenden aplicar en IT, únicamente caracterizan el material sin evaluar su comportamiento en cultivos celulares.

Scaffold/Técnica/Ref.	Ensayos celulares	Caracterización	Resultados principales
PCL/rGO, impresión electro- hidrodinámica 3D (Vijayavenkataraman y cols., 2019)	PC-12	SEM, ángulo de contacto, ensayos mecánicos, Raman	Diferenciación neuronal y reparación de lesiones nerviosas
Nanofibras PCL/rGO, electrospinning (Marrella y cols., 2018)	NIH-3T3	SEM, porosidad, AFM, FTIR, ensayos mecánicos	Regeneración de tejido óseo
Nanofibras PCL/G, electrospinning 2D (Srikanth y cols., 2019)	Astrocitos	Ángulo de contacto, SEM, rayos X, FTIR, caracterización dieléctrica	Análisis toxicidad para regeneración de tejido neuronal
Nanofibras PCL/rGO, electrospinning 2D (Seonwoo y cols., 2018)	Células madre (pulpa dental)	SEM, morfología, espectrometría Raman	Neurogénesis
Nanofibras PCL/rGO, electrospinning 2D (Correa y cols., 2019)	-	Rayos X, TGA, DSC, SEM, ensayos mecánicos, absorción agua conductividad eléctrica	Caracterización a diferentes voltajes
Nanofibras PCL/rGO, electrospinning 2D (Ramazani y Karimi, 2016b)	-	SEM, TEM, FTIR, ensayos mecánicos	Estudio de la estructura molecular
Nanofibras PCL/G, electrospinning 2D (Patel y cols., 2016)	C2C12	SEM, ángulo de contacto, impedancia eléctrica, ensayos mecánicos	Diferenciación a tejido muscular, no citotoxicidad
Nanofibras PCL/G, electrospinning 2D (Holmes y cols., 2016)	Células madres (médula ósea)	SEM, ensayos mecánicos, absorción de fibronectina	Diferenciación condrogénica
PCL/rGO 2D, inversión de fases (Kumar y cols., 2015)	Células madres (médula ósea)	Rayos X, SEM, ángulo de contacto, ensayos mecánicos	Proliferación células madre, diferenciación osteogénica
PCL rGO 2D, inversión de fases (Sánchez-González, 2019; Sánchez-González y cols., 2018)	Células madre neuronales	SEM, permeabilidad hidráulica y de nutrientes, porosidad, TGA, DSC, FTIR, Raman, ángulo de contacto, ensayos mecánicos	Diferenciación células neuronales

Tabla 1. Principales resultados reportados en bibliografía sobre fabricación de estructuras de PCL y grafeno.

1.4. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El presente trabajo se desarrolla en el grupo de investigación Tecnologías Medioambientales y Bioprocesos (TAB) del Departamento de Ingenierías Química y Biomolecular en estrecha colaboración con el Grupo de Biología Celular del Núcleo (BCN) del Departamento Anatomía y Biología Celular, ambos de la Universidad de Cantabria. Éste se enmarca en el contexto de dos proyectos de investigación, en el INNVAL 17/20 del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla en Cantabria (IDIVAL) y en el proyecto internacional X-MEM PCI2018-092929 por parte del Ministerio de Economía y Competitividad de España y de la convocatoria europea EIG-Concert Japan 2018.

La hipótesis de trabajo se basa en que la policaprolactona (PCL), polímero biocompatible apto en aplicaciones biomédicas y crecimiento celular, ve reforzadas y mejoradas sus propiedades gracias a la incorporación del grafeno (G) como nanomaterial pudiendo inducir una mejora en la proliferación y diferenciación hacia células específicas.

Las membranas empleadas en este trabajo fueron sintetizadas en Tecnalia Research & Innovation mediante la técnica *dry-jet wet spinning* haciendo uso de la inversión de fases.

El objetivo principal del trabajo es realizar la caracterización de las membranas de PCL funcionalizadas con grafeno (PCL/G) y de las membranas de PCL sin grafeno en configuración de fibra hueca con el fin de evaluar su potencial para ser utilizadas como soportes para cultivos celulares 3D en ingeniería tisular (IT) e incorporarlas en biorreactores de perfusión. Además, se analizará estadísticamente si existen diferencias significativas entre los resultados de caracterización obtenidos para ambas membranas.

Para el análisis crítico del efecto de la incorporación de grafeno sobre las propiedades de estas membranas se presentan los siguientes objetivos parciales:

- Caracterización química y morfológica de las membranas PCL y PCL/G para analizar la estructura porosa de las fibras huecas y determinar parámetros como el tamaño medio de poro y porosidad. Además, mediante la técnica de espectroscopía Raman se estudiará cómo influye la química del nanomaterial incorporado en la matriz polimérica y se analizará su grado de laminación y dispersión en la misma.
- Se llevará a cabo una caracterización de las propiedades mecánicas evaluando parámetros característicos de los ensayos a tracción, como la elasticidad; de las propiedades eléctricas y finalmente, las propiedades de transporte de las membranas mediante la permeabilidad hidráulica.
- Se estudiará la funcionalidad biológica de las fibras huecas PCL y PCL/G mediante ensayos experimentales de adhesión, proliferación y diferenciación celular evaluando las respuestas celulares obtenidas mediante técnicas analíticas de caracterización celular como la microscopía confocal e inmunofluorescencia.

Con esto, será posible correlacionar las respuestas celulares obtenidas con las propiedades de las membranas de fibra hueca evaluadas PCL y PCL/G y así, comprobar si son aptas para su uso como soporte celular y su posible integración en biorreactores de perfusión tangencial.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. FABRICACIÓN DE MEMBRANAS 3D (FIBRAS HUECAS)

Las membranas de fibra hueca (3D) se han fabricado en colaboración con Tecnalia Research & Innovation (San Sebastián). Se sintetizaron dos tipos de membranas; fibras huecas de PCL, y fibras huecas composite formadas por PCL y grafeno (PCL/G).

Primero, se prepararon ambas disoluciones poliméricas. Para la membrana PCL/G, la disolución estaba formada por el polímero policaprolactona (PCL, Sigma-Aldrich, MW: 80000 Da) al 15% m/m con grafeno comercial (av-PLAT-7, Avanzare, Innovación Tecnológica S.L.) al 0,1% m/m y etanol (EtOH, >99.8%, Honeywell) al 5% m/m empleando N-metil-2-pirrolidona (NMP, 99%, Extra Pure, Across Organic) como disolvente orgánico. Para el caso de la fibra de PCL la composición era la misma pero sin introducir el nanomaterial. La caracterización del nanomaterial aportada por el suministrador Avanzare Innovación Tecnológica S.L se recoge en el *Anexo A: Caracterización del grafeno comercial av-PLAT* 7.

Para obtener la disolución polimérica con el nanomaterial (membrana PCL/G) el procedimiento experimental consistió en:

- 1. Dispersión del grafeno en NMP en un vaso de precipitados. Esta disolución se sonicó mediante ultrasonidos durante 30 min a 20 kHz.
- 2. Con la dispersión homogénea se añadió la masa correspondiente de PCL a un bote de plástico que se cerró y selló con parafilm. Después, la disolución se puso en un agitador de rodillos (Roller Shaker 6 Basic, IKA) donde se mantuvo a 37°C aproximadamente durante 24 h para conseguir la disolución uniforme del polímero.

La disolución polimérica preparada en el departamento de Ingenierías Química y Biomolecular de la UC se envió a Tecnalia Research & Innovation que dispone del montaje experimental necesario para la síntesis de las membranas mediante la técnica *dry-jet wet spinning* (Fig. 5).

Solución polimérica



Figura 5. Montaje experimental para la síntesis de fibras huecas (dry-jet wet spinning).

Brevemente, la disolución polimérica preparada se extruyó a una velocidad de 2,5 mL·min⁻¹ a través de un spinneret cuyo funcionamiento se visualiza en la Fig. 6. El líquido de perforación utilizado como coagulante interno se bombeó por el tubo interior del spinneret, circulando la disolución polimérica por el exterior.

Como liquido de perforación se ha utilizado una mezcla NMP (80% m/m) y H₂O ultrapura (20% m/m) (UP, MilliQ, Millipore) a 1,1 mL·min⁻¹. El espacio de aire fijado entre el spinneret y el baño de coagulación fue de 1,5 cm. El baño de coagulación consistió en una mezcla de NMP al 10% m/m y un 90% m/m de H₂O ultrapura a 25°C. Tras la síntesis, las membranas se lavaron en tres baños de agua destilada y un último baño de EtOH al 25% m/m. Las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente durante la noche.



Figura 6. Secciones transversales (A) y laterales (B) de un spinneret común utilizado en la técnica dry-jet wet spinning. Modificado de Mohamed, 2014.

Esta técnica de fabricación presenta como inconveniente que puede no ser reproducible, por lo que se obtienen fibras huecas que pueden presentar propiedades y características diferentes. Las membranas pueden diferenciarse en la estructura, morfología o en diversas propiedades intrínsecas como las eléctricas, mecánicas, etc. y en el comportamiento funcional. Estos cambios producen efectos muy distintos en su aplicación a IT y, por ello, se necesita caracterizarlas. Se aplicarán diversas técnicas con el fin de predecir las prestaciones y funcionamiento de las fibras en condiciones experimentales similares a las que se prevean en la aplicación de las mismas.

2.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y QUÍMICA

2.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica permite obtener imágenes de la superficie y/o de secciones transversales y/o longitudinales de la membrana. Dichas imágenes se obtienen al bombardear el material con electrones altamente energéticos. Con ello, se producen interacciones entre el material y el rayo electrónico que permiten identificar los materiales presentes en la muestra así como una caracterización física de la misma (Palacio, 1999).

La estructura y morfología de la superficie y sección transversal de las fibras PCL y PCL/G se ha analizado mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM, QuantaTM 250 FEG) en Tecnalia aplicando un voltaje de 5 kV.

A partir de las imágenes SEM de la superficie de las membranas y usando un programa de procesamiento de imágenes Fiji (ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesa, Mayland, USA) se ha estimado el tamaño medio de poro. Igualmente, con las imágenes de la sección transversal se ha determinado el diámetro interno, externo y el espesor de las fibras huecas.

2.2.2. Porosidad de las membranas

La porosidad (*p*) global o bulk de las membranas se puede definir como la fracción de huecos, esto es, el volumen de poros dividido entre el volumen total de la membrana. Es un parámetro característico de los materiales porosos y está estrechamente relacionado con las propiedades de transporte de nutrientes hacia las células y la eliminación de los productos de desecho. La alta porosidad es uno de los requisitos más importantes en la selección de membranas como soportes en cultivos celulares 3D para IT (Salehi-Nik y cols., 2013).

Existen diversos métodos independientes para la determinación de la porosidad. En este caso se hizo uso del método de las densidades aparentes para calcular la porosidad bulk de las membranas de manera aproximada (Ecuación 1) (Wan y Chen, 2011):

$$p = \left(1 - \frac{\rho_b}{\rho}\right) \cdot 100 \tag{(1)}$$

 ρ_b es la densidad bulk o aparente de la fibra hueca. Esta densidad se obtiene por el cálculo de la relación masa-volumen de cada membrana. Se pesaron tres muestras de cada fibra hueca (PCL y PCL/G) y se halló el volumen de las mismas según la Ecuación (2):

$$V = \pi \cdot l \cdot (r_{ext}^2 - r_{int}^2) \tag{2}$$

Por otro lado, ρ es la densidad del material no poroso, con un valor de 1,145 g·cm⁻³ para las membranas de PCL (Wan and Chen, 2011) y 1,139 g·cm⁻³ para las de PCL/G. Esta última se calculó teniendo en cuenta la relación PCL-G en la membrana compuesta (Ecuación 3).

$$\rho = \frac{w_1 + w_2}{\frac{w_1}{\rho_1} + \frac{w_2}{\rho_2}}$$
(3)

 w_1 y w_2 son las fracciones másicas de cada material en el composite. Se asumió que el volumen total de los materiales no cambia antes y después de la formación de la membrana compuesta.

2.2.3. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona un análisis de la morfología química molecular. Es un método de caracterización rápido y no destructivo ampliamente utilizado en el estudio e identificación de materiales carbonáceos. Con esta técnica, se puede obtener información sobre la estructura y química del material compuesto.

En el presente trabajo se evaluó la calidad de la dispersión, laminación y localización del grafeno comercial av-PLAT 7 en la matriz polimérica de la fibra PCL/G. Para ello, se empleó la medida del espectro Raman en una línea de 10 mm de longitud sobre la superficie externa e interna de las membranas en intervalos de 1 mm. También, se realizó la espectroscopía Raman de la fibra PCL. Para estos análisis, se utilizó un espectrómetro triple T64000 (Horiba) equipado con un microscopio confocal y un detector con un dispositivo de carga acoplada (Jobin Yvon Symphony) enfriado con nitrógeno líquido. Se hizo incidir un haz de longitud de onda de 514 nm desde un láser iónico criptón-argón con un objetivo de 100X para la detección. Se empleó una potencia efectiva del láser de 2 mW para todas las mediciones. Cada pico de las curvas espectrales obtenidas se ajustó usando funciones lorentzianas simples y múltiples empleando el software Origin 8.0 (OriginLab Corporation). Este análisis se llevó a cabo en el Departamento de Ciencias de la Tierra y Física de la Materia Condensada de la UC.

2.3. CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS, ELÉCTRICAS Y DE TRANSPORTE

2.3.1. Propiedades mecánicas de las fibras huecas

La caracterización mecánica a través de ensayos de tracción se lleva a cabo con el fin de determinar si las fibras huecas presentan las propiedades mecánicas requeridas para la regeneración de tejidos así como para evaluar su manejabilidad.

Los ensayos de tracción, llevados a cabo en Tecnalia, se realizaron con muestras de las fibras huecas de 50 mm de longitud con una capacidad de la celda de carga de 100 N a una velocidad constante de 50 mm \cdot min⁻¹. Se realizaron 5 repeticiones estos ensayos.

A partir de las curvas tensión-elongación de dichos ensayos se determinaron los siguientes parámetros:

- Límite elástico del material (σ_E) en MPa. Representa la tensión máxima que un material puede soportar sin sufrir deformaciones permanentes.
- La tensión de rotura o resistencia a tracción (σ_R) en MPa. Indica la máxima tensión que un material puede soportar antes de romperse.
- La elongación (ε) en porcentaje. Representa el alargamiento total que sufre el material a lo largo del ensayo.
- El módulo de Young (E) en MPa. Éste expresa la relación entre la tensión aplicada y la deformación elástica proporcional del diagrama de tracción.

2.3.2. Propiedades eléctricas de las fibras huecas

En este apartado, se pretende determinar la conductividad eléctrica de ambas fibras huecas (PCL y PCL/G) con el fin de analizar el carácter conductor o no de las mismas. En el campo de IT, es importante conocer las propiedades eléctricas de la membrana utilizada como soporte para los cultivos celulares 3D ya que ciertos tejidos biológicos ven favorecido su crecimiento y diferenciación en soportes conductores (Ahad y cols., 2009).

Para determinar la conductividad eléctrica de las membranas se ha utilizado la medida de la impedancia eléctrica, definida como como la oposición que ofrece un material ante el paso de la corriente eléctrica.

Estas medidas se realizaron por la investigadora Sandra Sánchez en el programa de Doctorado en Ingeniería Química, de la Energía y de Procesos (UC) en una colaboración entre el Grupo TAB y el grupo de investigación del Departamento de Química Física liderado por el profesor Francisco Vicente de la Universidad de Valencia (UV).

Se utilizó el equipo PM6304 RCL meter (Philips) para la medida de la impedancia con ayuda de pinzas de cocodrilo colocadas a 0,5 cm de distancia (Fig. 7). Las medidas se han realizado a 28°C aproximadamente y variando la frecuencia de la perturbación del potencial desde 100Hz hasta 100000Hz siguiendo el protocolo de medida. El equipo proporciona valores del módulo de impedancia (*Z*) en Ω y del ángulo de fase (ϕ). Para el análisis se hicieron 3 repeticiones de la medida de impedancia para las fibras de PCL y 6 repeticiones para las fibras de PCL/G.



Figura 7. Sistema de cocodrilos utilizado para medir la impedancia.

La conductividad eléctrica (σ , $\Omega^{-1} \cdot m^{-1}$) se define como la capacidad de un material o sustancia para dejar pasar la corriente eléctrica a su través. Se calculó siguiendo la Ecuación (4) como la inversa de la resistividad (∂):

$$\sigma = 1/\partial \tag{4}$$

La resistividad de las muestras se calculó a partir de la Ecuación (5):

$$\partial = R \cdot \frac{S}{l_c} \tag{5}$$

Donde *R* es la resistencia (Ω), *S* es el área de contacto o sección transversal de la fibra (m²) y *l_c* es la longitud o distancia entre cocodrilos (m). El esquema de la fibra se presenta en la Fig. 8.



Figura 8. Dimensiones para calcular el área de contacto.

La resistencia eléctrica representa la oposición al flujo de corriente eléctrica y se halló siguiendo la Ecuación (6):

$$R = Z \cdot \cos\phi \tag{6}$$

Mientras que la sección transversal de la fibra se calculó siguiendo la Ecuación (7):

$$S = 2\pi \cdot r_{ml} \cdot l_c \tag{7}$$

Donde r_{ml} hace referencia al radio medio logarítmico de las fibras.

2.3.3. Propiedades de transporte de las fibras huecas: permeabilidad hidráulica

Se evaluaron las propiedades de transporte de agua en las membranas dado que elevadas permeabilidades beneficiarían el suministro de nutrientes en cultivos celulares 3D e incentivarían el uso de estas fibras huecas como soportes incorporadas en biorreactores de perfusión para IT.

Los experimentos de filtración de agua para la determinación de la permeabilidad hidráulica de las membranas PCL y PCL/G se realizaron en el sistema de filtración tangencial mostrado en la Fig. 9.



Figura 9. Sistema experimental de flujo tangencial para la caracterización del flujo de agua con módulo PCL/G.

El sistema mostrado en la Fig. 9 constaba de un tanque de agua ultrapura (MilliQ, Millipore) presurizado de 0,8 L de capacidad (Amicon®, Millipore), una válvula manorreductora de presión de aire comprimido (0-10 bar) fijado a 2,8 bares, un manorreductor de líquido (0-2,5 bar), y un módulo de membranas compuesto por dos fibras huecas del mismo material.

El módulo de membranas se ha fabricado utilizando tubo de Teflón (PTFE) en ambos extremos de las fibras y rellenando los mismos con una resina bicomponente (Klebfix). Con esto se cerró la parte final de la fibra dejando únicamente libre la entrada de flujo de agua al módulo de fibras huecas tras el manorreductor de líquido. Así, se consiguió el flujo de permeado a través de las fibras. Cada módulo de membranas presentaba una longitud determinada ($l_{PCL} = 13,3\pm0,9$ cm y $l_{PCL/G} = 24,2\pm2,3$ cm). Esta longitud se ha de tener en cuenta junto con el radio medio logarítmico de las fibras, calculado a partir del análisis SEM, ya que con ambos datos se puede calcular el área efectiva de filtración (A_e) de los diferentes módulos.

Se varió la presión en ciclos cerrados ascendentes y descendentes entre 0,4-0,8-1,2-1,5 bar con ayuda del manorreductor de líquido para cada módulo de membranas. El flujo de permeado se recogió en un vaso de precipitados dispuesto sobre una balanza analítica que mide la masa de permeado obtenida con el tiempo.

Antes de realizar los ensayos de filtración de agua las fibras huecas se introdujeron 40 min en EtOH al 70% v/v con el fin de hidrofilizarlas, eliminando posibles preservantes y simulando el protocolo de esterilización que se sigue al llevar a cabo cultivos celulares sobre las membranas (ver apartado 2.4.4. Preparación y esterilización para el crecimiento celular).

Para determinar la permeabilidad hidráulica (K_w), primero se calculó el flujo de permeado de agua a través de las membranas (J_w). Los datos de masa de agua (W) con el tiempo a cada valor de presión fijado, que se han registrado en un software (Pomiar Win) asociado a la balanza, se graficaron, haciendo la conversión a través de la densidad del agua, obteniendo los diferentes valores de flujo de agua.

De esta forma, dividiendo el flujo entre el área efectiva de la membrana, se obtuvo el flujo de permeado para cada presión (Ecuación 8). Después, graficando los flujos de permeado obtenidos a cada valor de presión frente a la presión transmembranal (ΔP) y realizando una regresión lineal, se extrajo el valor de la pendiente de la gráfica que corresponde a la permeabilidad hidráulica de cada membrana (Ecuación 9). Para la determinación de este parámetro, se analizaron 3 módulos de membrana para cada material, es decir, 6 fibras de PCL y 6 fibras de PCL/G.

$$J_{w} (L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}) = \frac{W(L)}{A_{e} (m^{2}) \cdot \Delta t(h)}$$
(8)

$$J_w (L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}) = K_w (L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1} \cdot bar^{-1}) \cdot \Delta P (bar)$$
(9)

2.4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL BIOLÓGICA

En el presente trabajo, se han llevado a cabo los ensayos de adhesión, proliferación y diferenciación de diferentes líneas celulares sobre las fibras huecas de PCL y PCL/G, con el fin de evaluar el comportamiento celular en las membranas 3D. Los experimentos se realizaron en la Facultad de Medicina de la UC con el Grupo Biología Celular del Núcleo y los resultados se analizaron en el IDIVAL.

El trabajo experimental se llevó a cabo en condiciones de asepsia, reduciendo al máximo la probabilidad de contaminación de los cultivos. Por ello, se trabajó en una campana de flujo laminar de nivel de bioseguridad 2 utilizando material estéril en todo momento. Por otro lado, las células deben crecer en un medio con un control de la temperatura, de la presión parcial de CO₂, y con una humedad elevada a fin de reducir la evaporación de agua del medio de cultivo. Por eso, los cultivos celulares se hicieron en un incubador HERA CELL 150i (Thermo Scientific) que mantiene una temperatura constante de 37° C, una atmosfera controlada con 5% de CO₂ y una humedad relativa del 95%.

2.4.1. Cultivos de las líneas celulares

Para el desarrollo de este proyecto se ha trabajado con 2 líneas celulares obtenidas comercialmente de la ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, USA). Su ficha técnica se recoge en el *Anexo B: Ficha técnica de las líneas celulares utilizadas*. A continuación se detalla cada una de ellas.

• <u>Cultivo de la línea celular C6</u>

Las células C6 (ATCC® CCL-107TM) fueron aisladas a partir de un glioma de rata Wistar inducido por la inyección del carcinogénico N-nitrosometilurea. Estas células crecen adheridas al fondo de una placa Petri mostrando una morfología fusiforme, con una tasa de crecimiento elevada y donde apenas existen uniones intercelulares (Fig. 10).



Figura 10. A) Imagen de microscopía óptica invertida que muestra cultivo de células C6 al 80-90% de confluencia. Escala 100 μm. B) Imagen de microscopía confocal que muestra células gliales C6 con una morfología fusiforme típica. Escala 10 μm.

Para el cultivo rutinario de las células C6, se utilizó como medio de crecimiento DMEM *"high glucose" (Dulbecco's Modified Eagle Media*, GibcoTM) suplementado con:

- 10% de suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*, FBS, GibcoTM)
- 4 mM de L-glutamina
- 1% de penicilina y estreptomicina (P/S, GibcoTM)
- 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA, GibcoTM)

Para la diferenciación de las células C6 en astrocitos se utilizó como medio de diferenciación DMEM "*high glucose*" (*Dulbecco's Modified Eagle Media*, GibcoTM) suplementado con:

- 0,25% de suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*, FBS, GibcoTM)
- 4 mM de L-glutamina
- 1% de penicilina y estreptomicina (P/S, GibcoTM)
- 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA, GibcoTM)
- 1mM dibutiril adenosin monofosfato cíclico (dbc-AMP, Sigma)

La administración de dbc-AMP (dibutyryl cyclic Adenosin monophosphate) inhibe drásticamente su proliferación e induce cambios morfológicos que incluyen la formación de prolongaciones celulares y neuritas (Hu y cols., 2008).

• <u>Cultivo de la línea celular HUVEC</u>

Las células HUVEC (ATCC[®] CRL-1730[™]) (Fig. 11) son células endoteliales de la vena umbilical humana que forman capilares. Se utilizan como un sistema modelo de laboratorio para el estudio de la función y la patología de las células endoteliales.



Figura 11. Micrografía celular de las células HUVEC a una escala 100 µm. A la izquierda baja densidad celular, a la derecha alta densidad celular. Fuente: ATCC.

Para el cultivo rutinario de las células HUVEC se utilizó medio basal de células vasculares (VCBM) suplementado con el kit de crecimiento de células endoteliales-BBE (González-González y cols., 2018). Este kit consiste en:

- 2% de suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*, FBS, GibcoTM)
- 0,2% de extracto de cerebro bovino
- 10 mM de L-glutamina
- $0,75 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ de sulfato de heparina
- $50 \,\mu g \cdot m l^{-1}$ de ácido ascórbico
- 20 U·ml⁻¹ de penicilina y 20 μ g·ml⁻¹ de estreptomicina (P/S, Sigma-Aldrich)

2.4.2. Descongelación de células

Las células hasta el momento de su manipulación y cultivo se mantienen crioprotegidas a -80°C en medio DMEM suplementado con un 10% de agente preservante, dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), para evitar la formación de cristales intracelulares de agua que puedan dañar las células. El criotubo se descongeló tras introducirlo 30 s en un baño a 37°C. La suspensión celular se diluyó con medio de crecimiento y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Por acción de la fuerza centrífuga, se forma un pellet de células que se resuspendió suavemente en medio libre de DMSO sobre una placa Petri de 10 cm de diámetro (CorningTM). Como la placa está cargada negativamente con iones oxigenados las proteínas adherentes presentes en el FBS del medio de crecimiento, fibronectina y vitronectina, se adhieren a la superficie de poliestireno (PE) formando una matriz extracelular que facilita la adhesión de las células. La placa Petri se cubrió con 10 mL de medio de crecimiento y se introdujo en el incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Para la observación rutinaria diaria de los experimentos celulares se utilizó un microscopio óptico de luz invertida (Axio, ZEISS) con el fin de controlar el crecimiento y diferenciación celular.

Pasadas 24 h se renovó el medio de crecimiento con el fin de eliminar detritus celulares. El cultivo se mantuvo en el incubador hasta alcanzar el 80-90% de confluencia para llevar a cabo los subcultivos.

2.4.3. Método de recuento y subcultivo celular

Para realizar los experimentos, se interrumpió la adhesión celular con la matriz extracelular en la placa Petri añadiendo una solución al 0,25% de la enzima proteolítica (peptidasa) tripsina-EDTA (GibcoTM) en una solución tampón (PBS, phosphate buffered saline) durante 5 min a 37°C. Esta enzima rompe los enlaces peptídicos formados por las proteínas transmembrana de las células con la fibronectina y vitronectina, que forman una matriz extracelular fibrosa en el fondo de la placa Petri para mantener las células adheridas. La acción de la enzima se inhibe añadiendo medio de cultivo con FBS al presentar éste una composición rica en proteínas que satura la actividad enzimática evitando la degradación celular (Gori, 1964). De esta forma, las células se despegaron del fondo de la placa y se resuspendieron para realizar el recuento celular. Este recuento es imprescindible para conocer el número de células en cada cultivo y sembrar la cantidad de células deseada sobre las fibras.

El recuento celular se consigue mediante instrumentos como el hemocitómetro, porta especial con una zona milimetrada de área conocida de manera que, tras colocar el cubreobjetos correctamente, se crea una cámara de volumen conocido que permite el contaje y calcular la concentración de células en la muestra tras ser depositada por capilaridad (Montuenga y cols., 2009). En este caso se utilizó la cámara de Neubauer como método de recuento celular (ver apartado *Anexo C: Cámara de Neubauer para el recuento celular*).

Tras el recuento, se utiliza la cantidad de suspensión celular necesaria en cada experimento y el sobrante se transfiere a una placa Petri añadiendo 10 mL de medio de crecimiento para mantener la línea celular en cultivos.

2.4.4. Preparación y esterilización para el crecimiento celular

Antes de realizar el sembrado de las células, las membranas 3D se prepararon y esterilizaron. Las fibras huecas se cortaron con una longitud aproximada de 0,5 cm y se pegaron a un cubreobjetos de vidrio con silicona biocompatible (Tipo A, Dow, CorningTM) para evitar la flotación. Cada cubre se colocó al fondo de un pocillo de placas

de 6 "*multi-well*" (CorningTM). Con las fibras ya dispuestas, se hicieron 3 lavados de 15 min con etanol al 70% v/v.

Después, en seco, las membranas se exponen a una lámpara con luz UV-C desinfectante durante 15 min. Finalmente, las membranas se lavaron con PBS para eliminar los restos de etanol que pudieran quedar y que son tóxicos para las células.

2.4.5. Configuración experimental

Para el desarrollo de los experimentos celulares, se introdujeron dos fibras huecas de PCL, dos fibras huecas de PCL/G y dos cubreobjetos de cristal como control del experimento en cada pocillo de la placa de 6 (Fig. 12). Sobre cada pocillo se añadió la cantidad de suspensión celular que resulta para la siembra de 250.000 células y la cantidad de medio de crecimiento correspondiente hasta cubrirlo. Después, la placa con el cultivo celular se trasladó al incubador. Se realizaron un mínimo de dos experimentos para cada línea celular, incluyendo en cada caso un mínimo de 2 réplicas experimentales, siguiendo un protocolo de actuación diferente para cada una de ellas (composición de medios, días de proliferación y/o diferenciación, etc.). En la Fig. 12 también se presenta de forma esquemática el proceso de siembra y adhesión celular sobra la fibra de PCL.



Figura 12. A) Configuración del pocillo donde se siembran las células. B) Sembrado y adhesión celular.

Para llevar a cabo los experimentos celulares se tiene en cuenta una escala temporal en la que a partir del sembrado se presentan diferentes días en los que se analizan diferentes estadios en la adhesión, proliferación y diferenciación celular siguiendo el esquema que se muestra en la Fig. 13. Para cada línea celular se seguirá un análisis diferente.



Figura 13. Escala temporal para el análisis celular.

Para las células C6 se siguió el esquema experimental presentado en la Fig. 14. Una vez sembradas las células, se deja que se adhieran 24 h antes de comenzar el proceso de diferenciación. Al día siguiente (día 0), se cambóa el medio de cultivo a medio de diferenciación cuya composición se ha descrito en el apartado 2.4.1. Cultivos celulares y

se fijaron las muestras destinadas a los estudios a día 0, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4.6. *Fijación celular*. Transcurridas 72 horas del comienzo del proceso de diferenciación, se fijaron las muestras en este estadio (día 3).



Figura 14. Proceso experimental seguido en los cultivos de las células gliales C6.

Para las células HUVEC se siguió el esquema presentado en la Fig. 15. Una vez sembradas las células sobre las membranas 3D, transcurren 24 horas para que las células se adhieran y se fija el día 0 para analizar la adhesión. Estas células se dejan 48 horas más en cultivos para luego analizar la proliferación celular fijando el siguiente estadio (día 2).



Figura 15. Proceso experimental seguido en los cultivos de las células capilares HUVEC.

2.4.6. Fijación celular

Para poder analizar los cambios morfológicos y cuantificar el grado de proliferación y diferenciación celular se necesita fijar las muestras. Al fijar las muestras, se detienen los procesos de degradación y se insolubilizan los componentes celulares, preservándose las características bioquímicas y moleculares del tejido además de facilitar las técnicas de análisis posteriores (Montuenga y cols., 2009).

Para la fijación, se utilizó una solución de paraformaldehído (PFA) al 3,7% diluido en PBS preparada justo en el momento de uso por descongelación en un baño de 60°C. Esta solución fijadora presenta un pH de 7,5, de modo que la osmolaridad y pH no afecten al tejido. El PFA penetra de forma rápida y eficaz y fija fundamentalmente proteínas y ácidos nucleicos para mantener la forma y volumen de las estructuras celulares que se van a estudiar, además de preservar las características bioquímicas y moleculares del tejido. En concreto, el PFA une con gran afinidad las aminas primarias (-NH₂) de los aminoácidos de lisina. Por otro lado, produce bajos niveles de autofluorescencia siendo esto útil para analizar posteriormente los resultados con microscopía. Las células fueron fijadas a temperatura ambiente con agitación suave durante 15 minutos.

2.4.7. Marcaje de los filamentos de actina y del ADN

Para el análisis de la morfología celular, se marcaron los filamentos finos de actina presentes en la corteza celular a través de la molécula Faloidina (Sigma) conjugada al fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína). Esta toxina natural, presente en la

Amanita phalloides, se une directamente a los filamentos de actina de las células evitando su despolimerización e inhibiendo su dinamismo. El fluorocromo FITC absorbe la luz a una determinada longitud de onda y el fluoróforo que forma parte del mismo emite fluorescencia (luz verde) al ser excitado con luz azul de longitud de onda 488 nm de la lámpara de Hg (microscopía de epifluorescencia) o del láser de Ar-433 (microscopía confocal) para la visualización directa de la corteza celular. Por otro lado, para el análisis del volumen nuclear se ha marcado el ADN contenido en el núcleo celular con la molécula DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).

Para comenzar, se permeabilizaron las células presentes en las muestras fijadas. Las muestras se lavaron con una solución del detergente no iónico Tritón-X al 0,5% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave. El Tritón-X rompe los enlaces proteína-lípido de las células al solubilizar los lípidos de la membrana y genera microporos por donde penetran las moléculas marcadoras (Johnson, 2013). Las muestras de los cubreobjetos de cristal se incubaron con 15 μ l de marcador y las fibras huecas con 200 μ l durante 30 minutos. Finalmente, se lavaron en PBS y las muestras de los cubreobjetos de cristal se montaron con medio de montaje ProLong (Invitrogen) en un portaobjetos para ver al microscopio. Sin embargo, las fibras huecas al no poderse montar en el porta se pusieron en una placa Petri Ibidi con fondo de cristal donde se añadió medio de montaje Vectashield en el momento de analizar las muestras.

Para el análisis de resultados preliminar se utilizó el microscopio de fluorescencia (Axioskop 2 Plus, ZEISS) acoplado con una cámara (Axiocam HRC) que cuenta con una lámpara de mercurio para la visualización de imágenes. También se utilizó el software ZEN 2012 para la captura de las mismas.

2.4.8. Microscopía confocal

El microscopio confocal combina partes de un microscopio óptico (MO), al que se adapta un equipo de fluorescencia con un sistema de barrido en el que se emplea un rayo láser. Este rayo permite elegir un plano de iluminación de poco espesor de forma que el sistema integrado logra imágenes de la muestra a diferentes profundidades, como si se observara el material biológico capa por capa. A través del software se puede reconstruir una imagen tridimensional completa de la célula observada (Montuenga y cols., 2009).

Para la presentación de resultados se utilizó este sistema de microscopía ya que permite obtener imágenes de excelente definición y de una resolución 30% superior a la de un MO común. Las muestras se examinaron en la unidad de Microscopía del IDIVAL con un microscopio confocal láser (Nikon A1R), controlado por el software NIS Elementos, equipado con tres líneas de láser (Argon 488 nm, 405 nm y 514 nm, HeNe 561 nm y HeNe 638 nm) y con un objetivo de 63X oil de apertura numérica 1,4 NA.

Este microscopio permite detectar compuestos autofluorescentes o inmunomarcados, pudiéndose captar hasta tres fluorocromos diferentes en forma simultánea. Para obtener las imágenes de las muestras con marcaje doble, se grabaron imágenes secuenciales de distintos planos focales pudiendo generarse así una reconstrucción tridimensional (Fig. 16). Para cada reconstrucción se tomaron 37 imágenes con 15 μ m de paso. El resultado fue una imagen con alta resolución espacial en diferentes planos.



Figura 16. Análisis de muestras y reconstrucción de imágenes (microscopía confocal).

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de caracterización se mostrarán como valores promedio \pm desviación estándar para los dos tipos de membranas (PCL y PCL/G). Se realizó un análisis estadístico de significancia para todos los resultados obtenidos en la caracterización. El nivel de significancia se estableció en *p<0,05. El número de muestras de cada población varía según la propiedad de la membrana caracterizada.

Para los ensayos de adhesión, proliferación y diferenciación celular se han realizado análisis cuantitativos como el conteo de los núcleos celulares, a través del software de procesamiento de imágenes Fiji con el canal azul a través del marcador DAPI, hallando de esta forma la densidad celular. Además, para el proceso de diferenciación con las células gliales se ha llevado a cabo un análisis morfométrico con la cuantificación del número medio de proyecciones emitido por célula, así como su longitud media. Esto se ha realizado con el fin de distinguir y cuantificar si la célula esta diferenciada o no. Las células gliales se consideran diferenciadas cuando al menos un proceso o proyección citoplasmática presenta una longitud mayor al cuerpo celular. En este caso se utilizó el canal verde del software a través del marcador Faloidina para el contaje.

Para todas las cuantificaciones se utilizaron las imágenes tomadas a través de la microscopía confocal para los distintos experimentos realizados. Con ello, se obtiene una media de los resultados así como sus desviaciones que se representarán en un gráfico de barras. En estos resultados, también se empleó el análisis estadístico de la t de Student para conocer si existen diferencias significativas entre los grupos experimentales. El nivel de significación de estableció de nuevo en *p<0,05. Para los cálculos y representaciones estadísticas se utilizó el programa Prism 7 (Graph Pad).

3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>

3.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y QUÍMICA

En este apartado, se van a analizar los resultados de la caracterización morfológica y química obtenidos para las membranas de fibra hueca de PCL y para los composite de PCL/G, comparándolos con los valores reportados en la literatura.

3.1.1. Caracterización morfológica de las fibras huecas

En esta caracterización se estudia la morfología de las membranas, mediante microscopía SEM obteniendo el tamaño medio de poro, y su porosidad a través del método de densidades aparentes. Esta caracterización permite conocer la estructura porosa de las membranas que se podrá relacionar con el mecanismo de transporte de nutrientes necesario para su empleo en biorreactores de perfusión y cultivos celulares 3D.

A través de la microscopía SEM se analiza la sección transversal de las fibras huecas (Fig. 17), obteniendo valores de los diámetros y espesores, y la superficie externa (Fig. 18), de donde se extrae el tamaño medio de poro. Los datos obtenidos para las características morfológicas de las membranas PCL y PCL/G se recogen en la Tabla 2.



Figura 17. Imágenes SEM de la sección transversal de las fibras PCL y PCL/G.

En la Fig. 17 se observa la sección transversal de ambas fibras, PCL y PCL/G, con una morfología asimétrica. Asimismo, se aprecia una porosidad interconectada tipo esponja en la superficie interna de la fibra hueca mientras que en la superficie externa aparece una porosidad tipo dedo. A partir de esta figura se obtuvieron los espesores de ambas fibras, $\delta_{PCL}=273\pm44 \ \mu m \ y \ \delta_{PCL/G}=304\pm74 \ \mu m$. El análisis estadístico llevado a cabo indica que no existen diferencias significativas en los espesores de ambas fibras.

La morfología observada puede ser resultado del proceso de extrusión de la fibra mediante la técnica *dry-jet wet spinning* en el que influyen múltiples variables. Por ejemplo, la tasa de intercambio relativa entre el solvente y el no solvente, la composición y temperatura del baño de coagulación, la composición, temperatura y velocidad de flujo del fluido de perforación, el esfuerzo cortante dentro del spinneret, etc., son variables que pueden contribuir en la conformación final de las fibras (Diban y cols., 2013b). Igualmente, las estructuras esponjosas (sponge-like) o tipo dedo (finger-like) detectadas en la Fig. 17 son usuales en membranas que emplean el método de inversión de fases en su síntesis. La interconectividad de los poros observada en las membranas puede considerarse beneficiosa al ser un requisito para inducir el crecimiento completo de tejidos y permitir su conexión y vascularización (Van Tienen y cols., 2002).

Figura 18. Imágenes SEM de la superficie externa de las fibras PCL y PCL/G incluyendo tamaño medio de poro.

En la Fig. 18 se aprecian los poros en la superficie externa de ambas fibras huecas pudiendo estimar su tamaño medio. Este valor resulta $0.72\pm0.16 \mu$ m para la membrana de PCL y $0.90\pm0.20 \mu$ m para la membrana de PCL/G. Realizando el análisis estadístico (Tabla 2), se puede decir que existen diferencias significativas en el tamaño medio de poro. Según se recoge en la bibliografía (Mulder, 1996; Yin y Deng, 2015), las disoluciones poliméricas al estar mezcladas con grafeno disminuyen su viscosidad haciendo que el proceso de intercambio solvente-no solvente se acelere durante la inversión de fases. Esto conlleva la formación de poros de mayor tamaño en la superficie como se ha observado en este trabajo.

Para evaluar la porosidad de las membranas se hace uso del método de densidades aparentes explicado en el apartado 2.2.2. *Porosidad de las membranas*. El valor de porosidad obtenido es de $84,75\pm0,84\%$ para la membrana de PCL y de $83,56\pm0,44\%$ para la fibra PCL/G, sin diferencias significativas entre ambos valores.

Superficie externa



En cualquiera de ambos casos, los valores obtenidos sugieren una elevada porosidad, similar a la obtenida en otros polímeros fabricados por separación de fases (Karande y cols., 2004), y suficiente como para garantizar el suministro uniforme de nutrientes a las células justificando su aplicación en cultivos celulares 3D.

Fibra hueca	Espesor (µm)	Tamaño medio de poro (µm)	Porosidad, p (%)
PCL	273±44	0,72±0,16	84,75±0,84
PCL/G	304±74	0,90±0,20 *	83,56±0,44

Tabla 2. Características morfológicas de las fibras huecas PCL y PCL/G.

Análisis estadístico de significancia (t de Student): comparación PCL/G vs PCL (control), n = 4 en espesor, n = 3 en porosidad, n = 30 en tamaño medio de poro, *p<0,05

3.1.2. Caracterización química de las fibras huecas: espectroscopía Raman

Para la caracterización química de las membranas se realiza el análisis Raman a las fibras huecas de PCL y PCL/G. Con este análisis se pretende determinar la incorporación del grafeno comercial en la matriz polimérica de la membrana así como características de este nanomaterial como son la presencia de defectos y número de capas.

Los espectros que se presentan en la Fig. 19 corresponden al nanomaterial comercial grafeno av-PLAT 7 y a las membranas en configuración de fibra hueca PCL y PCL/G. En la membrana compuesta se analiza tanto la superficie interna como la externa. Se analizan los picos característicos en cada espectro para los materiales puros (PCL y el grafeno comercial). Luego, se hace la comparativa y análisis con la membrana compuesta que incorpora en su matriz polimérica de PCL el grafeno como nanomaterial.



Figura 19. Espectro Raman de las fibras PCL/G y PCL, así como del grafeno comercial.

En el espectro Raman del grafeno av-PLAT 7 (Fig. 21), extraído del espectro suministrado por el fabricante, se observan varios picos característicos correspondientes al nanomaterial:

- Banda D (1350 cm⁻¹), asociada a la presencia de átomos de carbono con hibridación sp³, pliegue de monocapas u otros desordenes estructurales en la red grafítica (Ferrari, 2007).
- Banda G (1580 cm⁻¹), atribuida a la energía de los enlaces sp² de los átomos de C (Correa y cols., 2019).
- Banda D' (1620 cm⁻¹), especie de hombro que aparece en la banda G debido a los defectos inducidos de borde relacionados con el gran número de carbonos sp². Tanto la banda D' como D están relacionadas con la presencia de defectos en el material
- Banda 2D (2700 cm⁻¹). La variación en su forma e intensidad indican si el nanomaterial es multicapa o no (Ferrari y cols., 2006).

Comparando el espectro Raman del nanomaterial con la bibliografía (Ferrari y Basko, 2013), se puede ver que el grafeno utilizado no es monocapa y además, presenta diferentes bandas que pueden estar asociadas a defectos por hibridación de enlaces o a su naturaleza multicapa. Esto confirmaría la información suministrada por el fabricante del grafeno (Avanzare Innovación Tecnológica S.L) que indica en su caracterización que se trata de un material multicapa (5-10 capas) (*Anexo A: Caracterización del grafeno comercial av-PLAT 7*).

En cuanto al espectro correspondiente a la superficie externa de la membrana de fibra hueca de PCL se observan la presencia de picos a 900-1000 cm⁻¹ y 1109 cm⁻¹ que se atribuyen a las vibraciones de estiramiento de la matriz polimérica y de los enlaces C-C (grupo C-COO). Por otro lado, los picos a 1270-1300 cm⁻¹, 1415-1440 cm⁻¹ y 2919 cm⁻¹ representan las vibraciones de los enlaces característicos CH₂ de la estructura polimérica, los dos primeros por flexión y el último por estiramiento. Mientras que el pico a 1724 cm⁻¹ corresponde al enlace C=O del polímero (Song y cols., 2015; Zeng y cols., 2006).

El espectro obtenido para las superficies interior y exterior de la membrana PCL/G muestra la presencia de los picos correspondientes a la PCL. Además, aparecen claramente diferenciadas la banda G y la banda 2D, aunque esta última desplazada (de 2700 cm⁻¹ a 2637 cm⁻¹) debido a las tensiones residuales por tracción entre la cadena polimérica y el nanomaterial (Polyzos y cols., 2015). También, aparece una intensificación del pico a 1300 cm⁻¹ por un solapamiento de la banda D del grafeno con un pico de la PCL. Finalmente, se aprecia que la intensidad y forma de los picos característicos es semejante tanto en la superficie externa como interna de la fibra por lo que se puede asumir que la proporción de grafeno es similar en la transversalidad de la fibra hueca PCL/G.

La relación I_D/I_G se relaciona con el grado de grafitización y con la cantidad de defectos presentes en el grafeno. Debido al solapamiento de la banda D con un pico característico de la PCL, el análisis de este parámetro se ha descartado en el composite.

Por otra parte, la relación I_{2D}/I_G permite evaluar el grado de laminación del nanomaterial estimando su número de capas (Ferrari y Basko, 2013). Realizando el tratamiento de datos del espectro Raman y las convoluciones de los picos 2D y G en las membranas compuestas, se obtiene que la relación promedio I_{2D}/I_G equivale a 0,42. Este parámetro se compara con el análisis aproximado realizado a partir del espectro del grafeno comercial que resulta igual a 0,46. Con esta comparativa se puede deducir que el proceso

de preparación de las membranas no afecta al número de capas del nanomaterial al no inducir cambios en el espectro. Además, el valor obtenido se puede relacionar con el número de capas identificando que el nanomaterial presenta 6-7 capas (Cascales, 2016), como había indicado el fabricante.

Por último, empleando la medida del espectro Raman en una línea de 10 mm de longitud sobre la superficie externa de la membrana compuesta en intervalos de 1 mm para la banda G característica del nanomaterial, se representa la Fig. 20. Esta figura refleja la distribución del nanomaterial grafeno en la superficie exterior de la fibra hueca PCL/G pareciendo indicar que la dispersión del grafeno ha sido uniforme en la matriz polimérica mediante la técnica de síntesis empleada.



Figura 20. Espectro Raman de las fibras PCL/G y PCL, así como del grafeno comercial.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS, ELÉCTRICAS Y DE TRANSPORTE

En este apartado, se van a analizar y comparar los resultados obtenidos de las propiedades mecánicas, eléctricas y de transporte para las membranas de fibra hueca de PCL y para las membranas compuestas de PCL/G. Se evaluarán como propiedades mecánicas los parámetros de elongación, resistencia a tracción, límite elástico y módulo de Young; como propiedades eléctricas la conductividad y finalmente, la permeabilidad hidráulica como propiedad de transporte.

3.2.1. Propiedades mecánicas de las fibras huecas

Los ensayos mecánicos de caracterización de las fibras huecas sometidas a tracción se realizan con el objetivo de identificar si éstas presentan propiedades elásticas comparables a los tejidos a regenerar en cultivos celulares 3D, y si además son adecuadas para su manipulación y sutura durante la cirugía. Esto significa que las propiedades mecánicas conferidas deben permitir mantener la estructura e integridad de las fibras huecas asegurando la formación y maduración de nuevos tejidos hasta su degradación (Sánchez-González, 2019).

En la Tabla 3 se recogen los resultados obtenidos en los ensayos mecánicos. En general, se ve que la presencia de grafeno en la matriz polimérica reduce las propiedades mecánicas de la membrana existiendo una diferencia significativa en todos los parámetros analizados salvo en el módulo de Young (E).

Fibra hueca	Módulo de Young E (MPa)	Límite elástico σ_E (MPa)	Resistencia a tracción σ_R (MPa)	Elongación ε (%)
PCL	17,34±0,79	0,20±0,03	1,65±0,03	488,54±46,43
PCL/G	16,62±0,97	0,24±0,02 *	1,40±0,13 **	327,09±50,17 **

Tabla 3. Análisis mecánico a tracción de las fibras huecas PCL y PCL/G.

Análisis estadístico de significancia (t de Student): comparación PCL/G vs PCL (control), n = 5, *p < 0.05, **p < 0.005

Según Wang y cols., (2013), en las interacciones entre el nanomaterial y la cadena polimérica puede ocurrir un efecto plastificante que restringe el movimiento de las cadenas de PCL por la presencia de nanomateriales derivados del grafeno. Esto podría explicar la disminución en los valores de los parámetros de resistencia a tracción ($\sigma_{R, PCL} = 1,65 \pm 0,03$ MPa y $\sigma_{R, PCL/G} = 1,40 \pm 0,13$ MPa) y elongación ($\varepsilon_{PCL} = 488,54 \pm 46,43$ % y $\varepsilon_{PCL/G} = 327,09 \pm 50,17$ %) de las fibras PCL/G con respecto a la PCL, presentando diferencias significativas.

Por otro lado, el límite elástico de la fibra de PCL/G aumenta con respecto al valor para la PCL con diferencias significativas según el estudio estadístico realizado ($\sigma_{E,PCL} = 0,20\pm0,03$ MPa y $\sigma_{E,PCL/G} = 0,24\pm0,02$ MPa). Este aumento puede atribuirse a la buena dispersión del nanomaterial en la matriz polimérica, como se vio en el apartado 3.1.2. *Caracterización química de las fibras huecas: espectroscopía Raman*, con la presencia de ciertos enlaces químicos entre la PCL y el nanomaterial que consigue disipar la energía y reforzar las fibras (Patel y cols., 2016).

La disminución de la resistencia a tracción y elongación así como el aumento en el valor del límite elástico con la incorporación de grafeno podría resultar provechoso. Se ha reportado la necesidad de utilizar soportes con propiedades mecánicas elásticas, capaces de soportar los ciclos repetidos de compresión y relajación de la actividad muscular, con el fin de evitar desajustes mecánicos y conseguir la regeneración de tejido muscular esquelético (Vannozzi y cols., 2017). Del mismo modo, en cultivos neuronales se prefieren soportes más blandos, imitando tejidos como el cerebro, pero con resistencia estructural suficiente para la regeneración neuronal (Vijayavenkataraman y cols., 2019). Comparando las propiedades mecánicas a tracción en diferentes vasos sanguíneos nativos (humanos y animales) analizadas por Diban y cols., (2013b) con los resultados obtenidos en este estudio, las propiedades mecánicas requeridas para la regeneración de tejidos vasculares pueden considerarse conseguidas en ambas membranas PCL y PCL/G.

Con todo ello, se podría justificar el uso de membranas compuestas (PCL/G) en configuración de fibras hueca en biorreactores de perfusión para IT manteniendo cultivos celulares 3D en cuanto a sus propiedades mecánicas se refiere.

3.2.2. Propiedades eléctricas de las fibras huecas

La hipótesis de partida se basa en que los tejidos biológicos que presentan respuestas bioactivas electroconductoras, como el tejido nervioso, cardiaco o muscular, ven favorecido su crecimiento y diferenciación sobre soportes conductores. Por tanto, en este apartado se va a determinar la conductividad como propiedad eléctrica de las membranas de fibra hueca PCL y PCL/G.

A partir del módulo de impedancia y ángulo de fase obtenidos, aplicando las Ecuaciones (4-7) del apartado 2.3.2. *Propiedades eléctricas de las fibras huecas*, se obtienen los valores de conductividad eléctrica relativa de la PCL/G frente a la PCL (Fig. 21).



Figura 21. Conductividad relativa entre las membranas de PCL/G y PCL.

Se observa que a 100 Hz la conductividad eléctrica del composite casi duplica la conductividad de la membrana de PCL, mientras que a frecuencias mayores es en torno a un 25% menor. En este trabajo, únicamente a bajas frecuencias (100 Hz) el 0,1% m/m de grafeno introducido en la matriz polimérica genera una mayor conductividad en las membranas de PCL/G con diferencias significativas respecto a las fibras huecas de PCL ($\sigma_{PCL/G}/\sigma_{a PCL} = 1.9$) pudiéndose comparar con la bibliografía (Patel y cols., 2016). Sin embargo, a frecuencias más altas las diferencias de conductividad entre ambos tipos de materiales no son significativas.

Patel y cols., (2016) ha reportado que a bajas concentraciones de grafeno (0,3-0,6 % m/m) en nanofibras de PCL/G no se encuentran diferencias significativas con respecto a nanofibras de PCL (σ fibra PCL/G/ σ fibra PCL = 1,1). Se necesita un 2% m/m en G para que la conductividad relativa entre ambos materiales sea de 1,5.

La conductividad eléctrica inducida en las membranas compuestas PCL/G se puede explicar por dos fenómenos. En primer lugar, los electrones pueden propagarse libremente en la matriz debido a la creación de microtúneles entre las nanopartículas próximas. De esta forma, se obtiene una red interna que genera un aumento en la conductividad eléctrica de la membrana (Jyoti y cols., 2018). En segundo lugar, se puede producir una movilidad de los iones en las membranas debido a los grupos funcionales que presenta la matriz polimérica, dando lugar a una conductividad iónica (Diwan y cols., 2012).

De esta forma, a bajas frecuencias, se logra un mayor contacto entre las nanocapas del grafeno obteniendo una red interna que permite una mayor movilidad de electrones e iones. Mientras que a altas frecuencias, se produce una mayor movilidad de las cadenas poliméricas por la estructura porosa del polímero puro induciendo la conductividad iónica. Además, a altas frecuencias, también se puede producir un movimiento excesivo de las nanocapas del grafeno provocando una pérdida de contacto entre las mismas evitando la propagación de electrones. Es decir, a altas frecuencias la conductividad iónica producida por el material poroso compite con la conductividad eléctrica producida por el material compuesto resultando valores semejantes de conductividad eléctrica. Es así que las diferencias no significativas entre las fibras huecas de PCL y PCL/G pueden atribuirse a estos fenómenos.

3.2.3. Propiedades de transporte de las fibras huecas: permeabilidad hidráulica

Las membranas deben permitir la accesibilidad de nutrientes y eliminación de productos de desecho hacia y desde la zona de cultivo celular. Por tanto, se procede a caracterizar la permeabilidad hidráulica de las membranas con el fin de estimar si son aptas para su uso en biorreactores de perfusión con cultivos celulares en 3D para IT.

En la Fig. 22 se representa el flujo de permeado de agua frente a la presión transmembranal. Como se puede ver, las membranas de PCL/G proporcionan flujos de permeado significativamente más altos que las membranas de PCL.



Figura 22. Caracterización del flujo hidráulico vs presión transmembranal para las membranas de PCL/G y PCL. Análisis estadístico de significancia (t de Student): comparación PCL/G vs PCL (control), n = 6, *p < 0.05

Este incremento en la permeabilidad hidráulica de las membranas puede deberse a la diferencia significativa en el tamaño medio de poro en la superficie externa para la membrana de PCL/G con respecto a la PCL. Además, los poros en la membrana de PCL/G presentan una mayor interconexión entre sí (ver Fig. 17 y Tabla 2).

Adicionalmente, se estimó el espesor de la capa selectiva en la superficie externa de ambas membranas. Es importante conocer la estructura de la membrana porosa en la que se llevan a cabo los experimentos celulares ya que esto puede influir en las respuestas obtenidas. Este conocimiento permite proponer diferentes modelos de flujo o transporte de fluido por el interior de los poros. En este caso, se asume flujo laminar así como una estructura porosa compuesta por poros cilíndricos paralelos. Este modelo se describe por la ecuación de Hagen-Poiseuille (Álvarez, 2018), determinando el espesor de la capa activa (δ) como:

$$\delta = \frac{p \cdot d_p^2}{32 \cdot K_w \cdot \mu \cdot \tau} \tag{10}$$

En la Ecuación (10), d_p hace referencia al diámetro del poro en la superficie externa de la membrana, μ es la viscosidad dinámica del fluido a través de la membrana a 22°C y τ hace referencia a la tortuosidad del material. Este parámetro considera que los poros no son paralelos a la superficie de la membrana. Se aplicará la correlación empírica de la Ecuación (11) para el cálculo de la tortuosidad en materiales porosos en función de la porosidad (Suhaimi, 2015), resultando un valor de 1,08 para la PCL y 1,09 para la PCL/G.

$$\tau = 1 - 0.49 \cdot \ln(p) \tag{11}$$

Aplicando la Ecuación (10), con los parámetros calculados previamente, se estiman los valores de 1,45 μ m y de 0,62 μ m para la capa activa de las membranas de PCL y PCL/G. Estos valores se encuentran en consonancia con las imágenes de SEM de la sección transversal (Fig. 17).

La permeabilidad de la membrana de PCL es similar a los valores reportados para fibras huecas de PLGA, ácido poli (láctico-co-glicólico), y PEEK-WC, polieteretercetona, (Morelli y cols., 2012; Shearer y cols., 2006) tal y como se muestra en la Tabla 4. Las membranas PCL/G presentan permeabilidades similares a las fibras huecas de PLA, poliácido láctico, y PAN, poliacrilonitrilo, reportadas en la literatura (Morelli y cols., 2016; Moriya y cols., 2009) para aplicación en biorreactores de perfusión para IT. En particular, las membranas de fibra hueca de PAN mostraron una permeabilidad suficiente (120 L·m⁻²·h⁻¹·bar⁻¹) para el correcto crecimiento y diferenciación de células SHSY5Y (neuroblastoma) y su uso como modelos neuronales.

 Tabla 4. Comparación de las permeancias hidráulicas obtenidas en el presente trabajo con datos reportados en bibliografía para otras membranas de fibra hueca para su uso en biorreactores de perfusión para IT.

Fibras huecas	Permeabilidad hidráulica, $K_w (\mathbf{L} \cdot \mathbf{m}^{-2} \cdot \mathbf{h}^{-1} \cdot \mathbf{bar}^{-1})$	Referencia
PCL	33,29±6,54 (0,4-1,5 bar)	Trabajo actual
PCL/G	$118,73\pm12,75~(0,4-1,5~bar)$	Trabajo actual
PLGA	20-700 (0,75-1,75 bar)	(Shearer et al., 2006)
PEEK-WC	30,40 <i>(0,3 bar)</i>	(Morelli et al., 2012)
PLA	120 (0,5-1 bar)	(Moriya et al., 2009)
PAN	146 (0,3 bar)	(Morelli et al., 2016)

A partir de los resultados analizados y habiendo comparado con la bibliografía, la alta permeabilidad hidráulica obtenida supone un avance para el uso de las fibras huecas y, en concreto, las membranas compuestas, como prometedoras para su incorporación en biorreactores de perfusión para cultivos celulares 3D en IT.

3.3. FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA DE LAS MEMBRANAS DE FIBRA HUECA PCL Y PCL/G: ADHESIÓN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar soportes biopoliméricos que permitan llevar a cabo co-cultivos celulares 3D de manera sencilla. La configuración de fibra hueca permitiría la siembra independiente de células en el lumen y en el exterior de la fibra otra línea celular. Un posible aplicación práctica sería el co-cultivo astrocitos sobre tejido vascular (células endoteliales), dos tipos celulares que mantienen una asociación directa en la barrera hematoencefálica del sistema nervioso central. Por esta razón, en esta fase preliminar del estudio, se decide evaluar la capacidad de adhesión, proliferación y diferenciación de dos líneas celulares, las C6 (modelo de astrocito) y las células HUVEC (modelo de célula endotelial) sobre las nuevas membranas en fibra hueca PCL de manera

independiente. Además, dadas las propiedades de conductividad eléctrica que confiere la funcionalización con grafeno a las fibras PCL (PCL/G) (Fig. 21), se ha comparado si los parámetros analizados del cultivo celular se ven influenciados por el grafeno de las fibras huecas PCL/G frente a las membranas de PCL. En todos los estudios se incluye un control positivo de crecimiento celular óptimo (cristal).

3.3.1. Línea celular C6

Como se ha descrito anteriormente, en las células C6, procedentes de un glioma de rata, el aumento de los niveles intracelulares de dbcAMP inhibe su proliferación y las células comienzan a sufrir una serie de importantes cambios morfológicos dirigidos a adquirir su fenotipo de astrocito (Hu et al., 2008). Para evaluar la capacidad de las fibras huecas de PCL y PCL/G como soporte biocompatible para el crecimiento y diferenciación de células C6 a astrocitos se determinó, en primer lugar sobre cristal, las condiciones de siembra de las células C6 que permitan alcanzar una densidad celular de subconfluencia (60-70%) tras su adhesión al sustrato (24 h). Además, se validó el protocolo de diferenciación glial añadiendo 1mM dbcAMP al medio de cultivo durante 72 h. Como se observa en la Fig. 23, en cultivos subconfluentes (Fig. 23A), las células C6 no diferenciadas, exhiben una morfología plana poligonal o fusiforme con numerosas fibras de estrés que facilitan la motilidad (Fig. 23B-D). Por su parte, cuando se suplementa el medio de cultivo con 1 mM dbcAMP durante 72h (Fig. 23E) se inducen cambios morfológicos asociados con la diferenciación de las células gliales a astrocitos y caracterizados por la formación de prolongaciones o proyecciones citoplasmáticas (Fig. 23F-H).



Figura 23. Imágenes representativas de microscopía confocal donde se observa la densidad (A) y morfología celular de las C6 (B-D) 24h después de la siembra (día 0). En este momento se añadió 1mM dbcAMP al medio de cultivo para inducir la diferenciación a astrocitos durante 72h. En E, se observa una mayor densidad celular pero que en ningún caso llegó a confluencia (100%). En este estadío las células han reducido dramáticamente su tamaño celular y nuclear además de presentar numerosas proyecciones o procesos citoplasmáticos. Para la obtención de las imágenes se han utilizado técnicas citoquímicas con Faloidina-FITC (verde), marcador directo del citoesqueleto de actina, y DAPI (azul), para el núcleo celular. Barra de medida: 100 μm (A y E) y 30μm (B-D y F-H).

A continuación se realiza el **ensayo de adhesión** de las células C6 sobre las fibras huecas de PCL y PCL/G siguiendo el mismo protocolo de siembra que para el cristal. La observación microscópica de la superficie apical de las fibras huecas PCL reveló una aparente disminución de la densidad celular (Fig. 24 A-B) en comparación con el cristal y las fibras PCL/G. Además, las células C6 crecidas sobre PCL habían perdido la característica morfología fusiforme y no exhibían formación de fibras de estrés, lo cual debe afectar a su capacidad de migración. Por su parte, en las fibras PCL/G, tanto la

densidad celular (Fig. 24D-E) como la morfología celular (Fig. 24F) estaban preservadas si se compara con el control (cristal, Fig. 23D).



Figura 24. Imágenes representativas de microscopía confocal donde se observa la densidad (A-B en PCL, D-E en PCL/G) y morfología celular de las C6 (C en PCL y F en PCL/G) 24h después de la siembra (día 0). Barra de medida: 100 μm (A-B y D-E) y 20μm (C y F).

Para evaluar la capacidad de adhesión de modo cuantitativa se realiza un recuento comparativo del número de células por unidad de superficie en los tres sustratos, control, PCL y PCL/G (Fig. 25). El estudio confirmó que la presencia de grafeno en las membranas PCL aumenta sus propiedades de adherencia celular y permite el desarrollo de un fenotipo celular correcto.



Figura 25. Ensayo de adhesión de las células C6 sobre los sustratos indicados. Las barras representan la media $\pm SD$ (n=4). *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,005.

A continuación se lleva a cabo el **estudio de diferenciación** de las células C6 sobre las fibras huecas PCL y PCL/G. Transcurridas 72 h tras la inducción de la diferenciación con 1mM dbcAMP, la densidad celular presente sobre la membrana PCL (Fig. 26A-B) era muy inferior al día 0 y morfológicamente presentaban una dramática reducción del citoesqueleto de actina. Cabe señalar que en ningún caso se observaron proyecciones citoplasmáticas (Fig. 26C). Por el contrario, en la membrana de PCL/G la densidad celular era equiparable al control (cristal, Fig. 23E) y las células presentaban una correcta morfología de astrocitos con largas proyecciones (Fig. 26D-F). Cabe señalar que en la vista lateral de la fibra PCL/G se puede apreciar como las células han migrado a una mayor distancia a lo largo de la fibra. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la funcionalización del PCL con grafeno mejora la biocompatibilidad de la superficie del material PCL, permitiendo no sólo la correcta diferenciación celular de las C6 a astrocitos sino también su capacidad migratoria.



Figura 26. Estudio de diferenciación a astrocitos durante 72h en (A-C) membranas de PCL y (D-F) membranas de PCL/G. En F, se observa una mayor densidad celular pero que en ningún caso llegó a confluencia (100%). En este estadío las células han reducido dramáticamente su tamaño celular y nuclear además de presentar numerosas proyecciones o procesos citoplasmáticos. Barra de medida: 100 μm (A-B, D-E) y 20μm (C y F).

El análisis cuantitativo del porcentaje de células con morfología característica de astrocitos, aquellas con al menos una proyección citoplasmática de longitud superior al cuerpo celular, presentes en la superficie de los sustratos analizados confirma las diferencias observadas con microscopía confocal (Fig. 27). En la membrana de PCL las células C6 no consiguen diferenciarse a astrocitos mientras que en la membrana PCL/G el porcentaje de diferenciación es muy alto $(38,5\pm4,8\%)$, aunque significativamente menor que en la superficie del control-cristal $(66,4\pm8,7\%)$.



Figura 27. Ensayo de diferenciación de células C6 sobre los sustratos indicados. Las barras representan la media $\pm SD(n=4)$. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005.

3.3.2. Línea celular HUVEC

Una vez establecida la idoneidad de las membranas PCL/G en configuración de fibra hueca para el cultivo y diferenciación de astrocitos en su superficie, se quiso avanzar en el objetivo realizando un estudio comparativo de las membranas de PCL vs PCL/G para el cultivo en monocapa de células endoteliales.

Para ello, se ha utilizado como modelo células HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), que ofrece un sistema muy fácil y reproducible de producir un modelo de tejido epitelial. Así, las HUVEC se siembran y se mantienen en cultivo hasta llegar a confluencia (día 0) y se mantienen durante 48 h adicionales. En este trabajo se ha comparado la capacidad de adhesión y proliferación de las HUVEC sobre la superficie de las fibras huecas de PCL y de PCL/G.

En primer lugar se procede a estandarizar las condiciones de siembra sobre cristal y definir la cantidad de células correcta para obtener un cultivo en monocapa confluente tras la adhesión celular (Fig. 28A-C). El marcaje citoquímico con Faloidina-FITC y DAPI

permite contrastar las HUVEC, analizar su morfología celular y contar el número de células presentes. Así, el estudio con microscopía confocal demuestra como las HUVEC cultivadas son células poliédricas, planas y acopladas entre sí formando un mosaico celular, de manera análoga al tejido vascular *in vivo*.



Figura 28. Cultivo celular en mosaico del modelo endotelial HUVEC. Barra de medida 100µm.

A continuación se quiso reproducir el modelo de células endoteliales HUVEC utilizando como soporte de crecimiento las fibras huecas de PCL cuya morfología tubular se piensa que debería favorecer la formación de tejido vascular in vitro. En la Fig. 29 se observan imágenes de microscopía confocal representativas de las monocapas de células HUVEC sobre la superficie apical de las fibras PCL (Fig. 29A) y PCL/G (Fig. 29C). Utilizando estas imágenes se ha realizado un análisis cuantitativo del número de células por unidad de superficie 24h y 48h después de la siembra (Fig. 29E-F). La densidad celular, medida indirecta de las propiedades de superficie del sustrato que permiten la adhesión celular, es significativamente menor en las fibras PCL que en el sustrato control (<50%) y la presencia de grafeno en el PCL potencia este fenómeno de forma dramática (<20%) (Fig. 29E). Además el número de células 48 h después ha permitido comparar el crecimiento celular sobre cada sustrato (Fig. 29F). Como se muestra en la gráfica, el PCL puro permite un crecimiento celular similar al control $(18,5\pm7,2\%)$ vs $20,7\pm1,7\%$), mientras que la presencia de grafeno en las fibras huecas provoca un crecimiento negativo, es decir el número de células es significativamente menor que tras la siembra. Este resultado sugiere que la incorporación de grafeno en la matriz PCL ejerce un efecto citotóxico sobre las células HUVEC, y por tanto, imposibilita su uso como sustrato para la síntesis in vitro de tejido vascular.



Figura 29. Imágenes de microscopía confocal de células HUVEC crecidas en la superficie de membranas de PCL (A) o PCL/G (C) en configuración de fibra hueca. Vista lateral de las fibras PCL (B) y PCL/G (D). E) Cuantificación de la densidad celular en el estadío de adhesión (24h tras la siembra). F) Ensayo de proliferación celular donde se expresa, en porcentaje, el aumento del número de células/mm² 48 h después del estadío de adhesión. Barra de medida 200 μm.

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante esta segunda caracterización con ensayos de biocompatibilidad de las membranas de PCL para la generación, en este caso de tejido vascular *in vitro*, están en consonancia con trabajos previos (Diban y cols., 2013a, 2013b) donde se utilizaron ensayos con células madre adiposas y membranas de PCL de fibra hueca dirigidos a obtener la regeneración de tejido vascular. Además, abren la posibilidad de desarrollar nuevas fibras huecas que aseguren la ausencia de grafeno en la zona interna o lumen de la fibra donde se sembrarían las HUVEC y la presencia de grafeno en la superficie externa donde se sembrarían las C6. Con esta nueva configuración sería viable un co-cultivo 3D HUVEC/C6 en un mismo espécimen de fibra hueca, con posibles aplicaciones biomédicas directas como evaluar la capacidad de nuevos fármacos dirigidos contra dianas celulares del SNC de superar la barrera hematoencefálica. Cabe por tanto seguir evaluando la forma de procesar una fibra hueca con estas características, por ejemplo usando técnicas de co-extrusión y llevar a cabo el posterior ensayo de caracterización celular.

4. <u>CONCLUSIONS AND FUTURE</u> <u>CHALLENGES</u>

4.1. CONCLUSIONS

In the present work, the composite membranes PCL/G and the PCL membranes in hollow fiber (HF) configuration have been physically-chemically, morphologically and functionally characterized in order to use them as scaffolds for 3D cell cultures in tissue engineering (TE) and integrate them into perfusion bioreactors.

The morphological properties of the HFs were analyzed by SEM microscopy. Porosity was determined through the bulk density method. From this characterization, significant differences were seen in the average pore size for both HFs ($0.72 \pm 0.16 \mu m$ for the PCL membrane and $0.90 \pm 0.20 \mu m$ for the PCL/G membrane). Both membranes presented interconnected porosity with sponge-like morphology on the inner surface and finger-like morphology on the external surface. Similar high porosity was obtained (aprox. 85%) for both membranes. The Raman spectroscopy confirmed the correct dispersion of commercial graphene incorporated into the polymeric matrix of the membrane as well as the expected characteristic spectrum of the commercial nanomaterial (6-7 layers) were confirmed.

After performing the tensile mechanical tests, a decrease in the mechanical properties (elongation and tensile strength) is observed with the incorporation of graphene, however the PCL/G HFs still preserve the mechanical properties to facilitate their manipulation and sustain the transmembrane pressures needed during the perfusion conditions once implemented in the bioreactor.

At low excitation frequencies (100 Hz) PCL/G HFs showed a significantly 1.8 times higher electrical conductivity than the PCL membranes.

With the characterization of water flux, it is obtained that the PCL/G membranes provide significantly higher permeate fluxes than the PCL membranes ($K_{W, PCL} = 33,29 \pm 6,54$ L·m⁻²·h⁻¹·bar⁻¹ and $K_{W, PCL/G} = 118,73 \pm 12,75$ L·m⁻²·h⁻¹·bar⁻¹). This could be attributed to the larger average pore size in the functionalized membrane together with a smaller thickness of the active layer. These results suggest that the membranes, particularly the PCL/G HFs, could guarantee uniform supply of nutrients to cells.

In the biological functional analysis, good adhesion and differentiation of C6 cells to astrocytes on the PCL/G composite membrane has been obtained. On the other hand, for the regeneration of vascular tissue, PCL membranes are responsible for successfully promoting the adhesion and proliferation of HUVEC endothelial cells. These results open the possibility of developing a 3D HUVEC/C6 co-culture in the same hollow fiber specimen with possible biomedical applications. Intra-luminal HUVEC cell attachment in absence of graphene and external surface C6 cell attachment in the presence of graphene would be ensured the 3D co-culture.

The results obtained throughout the work carried out would justify the application of functionalized HFs (PCL/G) and those of PCL in 3D cell cultures and could be incorporated into perfusion bioreactors for IT.

4.2. FUTURE CHALLENGES

As future work it is proposed to perform permeability tests with model solutions (BSA, bovine serum albumin) or with culture medium to be more realistic in the study of the mass transport properties through HFs. The fouling mechanism in the membranes due to the proteins present in the medium could also be evaluated. In this way, it could be determined if the PCL and PCL/G membranes are still suitable for incorporation into perfusion bioreactors.

Another task in the future consisted in the study of the long-term hydrolytic degradation of PCL/G composite membranes compared to those of PCL. In vitro conditions would be simulated and the degradation products obtained would be monitored to elucidate potential effects on cell cytotoxicity.

It is also proposed to evaluate the processing method of a hollow fiber that ensures the absence of graphene in the inner surface of the fiber and the presence of graphene on the external surface to perform 3D HUVEC/C6 co-cultures, for example by co-extrusion techniques.

The potential results of the co-cultures could pave the way to open new applications of great interest in IT for these PCL and PCL/G HF membranes. In example as miniaturized physiological models of blood-brain barrier model (HUVEC/C6) and neuromuscular junction (NMJ) model (co-cultures of differentiated cells to muscle tissue and motor neurons (MNs) of the spinal cord (C2C12/MN)). These 3D models would allow to study in detail multiple aspects of the bi-directional regulatory mechanisms that exist in the blood-brain barrier as well as between the MNs and the muscle cell to test drugs or therapeutic applications aimed at the neuromuscular synapse and/or different neurodegenerative diseases.

For the 3D C2C12/MN co-culture, very preliminary studies have been carried out evaluating the behavior of the C2C12 cells on the HFs PCL and PCL/G as it has been done throughout the work with the lines C6 and HUVEC. The preliminary results obtained are shown in *Anexo D: Funcionalidad biológica en la línea celular C2C12*, but work must continue on it.

5. <u>NOMENCLATURA</u>

A _e	Área efectiva de la membrana (m^2)
dp	Diámetro de poro (μm)
E	Módulo de Young (MPa)
J_{w}	Flujo de permeado $(L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1})$
K _w	Permeabilidad hidráulica $(L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1} \cdot bar^{-1})$
l	Longitud de la fibra hueca (cm)
l _c	Distancia entre cocodrilos (cm)
p	Porosidad (%)
ΔP	Presión transmembranal (bar)
R	Resistencia eléctrica (Ω)
r _{ext}	Radio externo de la fibra hueca (m)
r _{int}	Radio interno de la fibra hueca (m)
r _{ml}	Radio medio logarítmico de la fibra hueca (m)
S	Sección transversal de la fibra (m^2)
<i>w</i> ₁	Fracción másica PCL (-)
<i>w</i> ₂	Fracción másica G (-)
Z	Impedancia eléctrica (Ω)
<u>Acrónimos</u>	
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BCN	Biología Celular del Núcleo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dbc-AMP	Dibutiril Adenosin Monofosfato Cíclico
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Media
DMSO	Dimetilsulfóxido
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein IsoTioCyanate
G	Grafeno
HFs	Hollow Fibers
IDIVAL	Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla
IT	Ingeniería de Tejidos

Motor Neurons

MNs

NEAA	Non-Essential Amino Acid
NMJ	Neuromuscular Junction
NMP	N-metilpirrilidona
PAN	Poliacrilonitrilo
PBS	Phosphate buffered saline
PCL	Policaprolactona
PE	Poliestireno
PEEK-WC	Polieteretercetona
PFA	Paraformaldehído
PLA	Poliácido láctico
PLGA	Ácido poli (láctico-co-glicólico)
PTFE	Politetrafluoroetileno
SEM	Scanning Electron Microscopy
SNC	Sistema Nervioso Central
TAB	Tecnologías Medioambientales y Bioprocesos
TEM	Transmission Electron Microscopy
UC	Universidad de Cantabria
UP	Ultrapura
UV	Universidad de Valencia
VCBM	Vascular Cell Basal Medium

<u>Símbolos griegos</u>

δ	Espesor de la capa activa de la membrana (μm)
8	Elongación (%)
μ	Viscosidad de agua a 22°C ($kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$)
ρ	Densidad del material no poroso $(kg \cdot m^{-3})$
$ ho_b$	Densidad bulk o aparente $(kg \cdot m^{-3})$
$ ho_1$	Densidad del material no poroso: PCL $(kg \cdot m^{-3})$
$ ho_2$	Densidad del material no poroso: G $(kg \cdot m^{-3})$
σ	Conductividad ($\Omega^{-1} \cdot m^{-1}$)
σ_E	Limite elástico del material (MPa)
σ_R	Tensión de rotura o resistencia a tracción (MPa)
τ	Tortuosidad (-)
ϕ	Ángulo de fase (°)
∂	Resistividad ($\Omega \cdot m$)

6. **<u>BIBLIOGRAFÍA</u>**

- Ahad, M., Fogerson, M., Rosen, G., Narayanaswami, P. and Rutkove, S. (2009). Electrical characteristics of rat skeletal muscle in immaturity, adulthood and after sciatic nerve injury, and their relation to muscle fiber size. *Physiological Measurement*, 30(12), 1415–27.
- Akhavan, O. (2016). Graphene scaffolds in progressive nanotechnology/stem cellbased tissue engineering of the nervous system. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(19), 3169–3190.
- Akhavan, O., Ghaderi, E., Aghayee, S., Fereydooni, Y. and Talebi, A. (2012). The use of a glucose-reduced graphene oxide suspension for photothermal cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry*, 22(27), 13773–13781.
- Álvarez, S. (2018). Determinación de la viscosidad de líquidos nanoconfinados. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Valladolid.
- Bettahalli, N., Steg, H., Wessling, M. and Stamatialis, D. (2011). Development of poly(l-lactic acid) hollow fiber membranes for artificial vasculature in tissue engineering scaffolds. *Journal of Membrane Science*, *371*(1–2), 117–126.
- Cascales, J. (2016). Estudio de capas nanométricas de h-BN y grafeno para su apilamiento en multicapas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Madrid.
- Chen, J. L., Duan, L., Zhu, W., Xiong, J. and Wang, D. (2014). Extracellular matrix production in vitro in cartilage tissue engineering. *Journal of Translational Medicine*, *12*(1).
- Cipitria, A., Skelton, A., Dargaville, T. R., Dalton, P. D. and Hutmacher, D. W. (2011). Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - A review. *Journal of Materials Chemistry*, 21(26), 9419–9453.
- Correa, E., Moncada, M., Gutiérrez, O., Vargas, C. and Zapata, V. (2019). Characterization of polycaprolactone/rGO nanocomposite scaffolds obtained by electrospinning. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 103, 109773.
- De Giglio, E., Bonifacio, M. A., Ferreira, A. M., Cometa, S., Yuan Ti, Z., Stanzione, A., Dalgarno, K. and Gentile, P. (2018). Multi-compartment scaffold fabricated via 3D-printing as in vitro co-culture osteogenic model. *Scientific Reports - Nature*, 8, 15130.
- Diban, N., Gómez-Ruiz, B., Lázaro-Díez, M., Ramos-Vivas, J., Ortiz, I. and Urtiaga, A. (2018). Factors Affecting Mass Transport Properties of Poly(ε-caprolactone) Membranes for Tissue Engineering Bioreactors. *Membranes*, 8(51).
- Diban, N., Haimi, S., Bolhuis-Versteeg, L., Teixeira, S., Miettinen, S., Poot, A., Grijpma, D. and Stamatialis, D. (2013a). Development and characterization of poly(ε-caprolactone) hollow fiber membranes for vascular tissue engineering. *Journal of Membrane Science*, 438, 29–37.
- Diban, N., Haimi, S., Bolhuis-Versteeg, L., Teixeira, S., Miettinen, S., Poot, A., Grijpma, D. and Stamatialis, D. (2013b). Hollow fibers of poly(lactide-co-glycolide) and poly(ε-caprolactone) blends for vascular tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 9(5), 6450–8.

- Diban, N., Sánchez-González, S., Lázaro-Díez, M., Ramos-Vivas, J. and Urtiaga, A. (2017). Facile fabrication of poly(ε-caprolactone)/graphene oxide membranes for bioreactors in tissue engineering. *Journal of Membrane Science*, 540(23), 219–228.
- Diban, N. and Stamatialis, D. (2014). Polymeric hollow fiber membranes for bioartificial organs and tissue engineering applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89, 633–643.
- Diwan, P., Harms, S., Raetzke, K. and Chandra, A. (2012). Polymer electrolytegraphene composites: Conductivity peaks and reasons thereof. *Solid State Ionics*, 217, 13–18.
- Ferrari, A. C., Meyer, J. C., Scardaci, V., Casiraghi, C., Lazzeri, M., Mauri, F., Piscanec, S., Jiang, D., Novoselov, K. S., Roth, S. and Geim, A. K. (2006). Raman spectrum of graphene and graphene layers. *Physical Review Letters*, 97(18).
- Ferrari, Andrea C. (2007). Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron-phonon coupling, doping and nonadiabatic effects. *Solid State Communications*, 143(1–2), 47–57.
- Ferrari, Andrea C. and Basko, D. M. (2013). Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene. *Nature Nanotechnology*, 8(4), 235–246.
- Goenka, S., Sant, V. and Sant, S. (2014). Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 173(1), 75–88.
- González-González, A., González, A., Alonso-González, C., Menéndez-Menéndez, J., Martínez-Campa, C. and Cos, S. (2018). Complementary actions of melatonin on angiogenic factors, the angiopoietin/Tie2 axis and VEGF, in co-cultures of human endothelial and breast cancer cells. *Oncology Reports*, 39(1), 433–441.
- Gori, G. B. (1964). Trypsinization of animal tissue for cell culture: theoretical considerations and automatic apparatus. *Applied Microbiology*, *12*, 115–21.
- Holmes, B., Fang, X., Zarate, A., Keidar, M. and Zhang, L. G. (2016). Enhanced human bone marrow mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation in electrospun constructs with carbon nanomaterials. *Carbon*, 97, 1–13.
- Hu, W., Onuma, T., Birukawa, N., Abe, M., Ito, E., Chen, Z. and Urano, A. (2008). Change of morphology and cytoskeletal protein gene expression during dibutyryl cAMP-induced differentiation in C6 glioma cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 28(4), 519–28.
- Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. Journal of the Royal Society Interface, 3(10), 589–601.
- Johnson, M. (2013). Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. *Materials and Methods*, *3*.
- Jyoti, J., Kumar, A., Dhakate, S. R. and Singh, B. P. (2018). Dielectric and impedance properties of three dimension graphene oxide-carbon nanotube acrylonitrile butadiene styrene hybrid composites. *Polymer Testing*, *68*, 456–466.
- Karande, T. S., Ong, J. L. and Agrawal, C. M. (2004). Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: Design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing. *Annals of Biomedical Engineering*, *32*(12), 1728–

1743.

- Kenry, Lee, W. C., Loh, K. P. and Lim, C. T. (2018). When stem cells meet graphene: Opportunities and challenges in regenerative medicine. *Biomaterials*, *155*, 236–250.
- Knight, E. and Przyborski, S. (2015). Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of Anatomy*, 227(6), 746–56.
- Kumar, S. and Chatterjee, K. (2016). Comprehensive Review on the Use of Graphene-Based Substrates for Regenerative Medicine and Biomedical Devices. ACS Applied Materials and Interfaces, 8(40), 26431–26457.
- Kumar, S., Raj, S., Kolanthai, E., Sood, A. K., Sampath, S. and Chatterjee, K. (2015). Chemical functionalization of graphene to augment stem cell osteogenesis and inhibit biofilm formation on polymer composites for orthopedic applications. ACS Applied Materials and Interfaces, 7(5), 3237–3252.
- Langer, R. and Vacanti, J. P. (1993). Tissue Engineering. Science, 260(5110), 920-926.
- Lee, J., Cuddihy, M. and Kotov, N. A. (2008). Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 14(1), 61–86.
- Lee, Y.-J., Seo, T. H., Lee, S., Jang, W., Kim, M. J. and Sung, J.-S. (2018). Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells in response to the domain size of graphene substrates. *Journal of Biomedical Materials Research*. *Part A*, 106(1), 43– 51.
- M. Mulder. (1996). Preparation of synthetic membranes, in: Basic principles of membrane technology. Kluwer, Dordrecht.
- Marrella, A., Tedeschi, G., Giannoni, P., Lagazzo, A., Sbrana, F., Barberis, F., Quarto, R., Puglisi, F. and Scaglione, S. (2018). "Green-reduced" graphene oxide induces in vitro an enhanced biomimetic mineralization of polycaprolactone electrospun meshes. *Materials Science & Engineering C*, 93, 1044–1053.
- Mohamed, K. (2014). Bore Liquid: Solvent and Non-solvent. In *Encyclopedia of Membranes* (pp. 1–3). Springer Berlin Heidelberg.
- Montuenga, L., Esteban, F. and Calvo, A. (2009). *Técnicas en histología y biología celular*. Barcelona: Elsevier España.
- Morelli, S., Piscioneri, A., Salerno, S., Rende, M., Campana, C., Tasselli, F., di Vito, A., Giusi, G., Canonaco, M., Drioli, E. and De Bartolo, L. (2012). Flat and tubular membrane systems for the reconstruction of hippocampal neuronal network. *Journal* of *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6(4), 299–313.
- Morelli, S., Salerno, S., Piscioneri, A., Tasselli, F., Drioli, E. and De Bartolo, L. (2016). Neuronal membrane bioreactor as a tool for testing crocin neuroprotective effect in Alzheimer's disease. *Chemical Engineering Journal*, *305*, 69–78.
- Moriya, A., Maruyama, T., Ohmukai, Y., Sotani, T. and Matsuyama, H. (2009). Preparation of poly(lactic acid) hollow fiber membranes via phase separation methods. *Journal of Membrane Science*, *342*(1–2), 307–312.
- Novosel, E. C., Kleinhans, C. and Kluger, P. J. (2011). Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4), 300–311.

- Palacio Martínez, L. (1999). Caracterización estructural y superficial de membranas microporosas. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
- Pan, H., Yang, Y., Zhang, Q., Tian, Y., Luo, X., Yang, M. and Zhao, X. (2019). Graphene-Based Nanocomposites for Neural Tissue Engineering. *Molecules*, 24(658).
- Park, S. Y., Park, J., Sim, S. H., Sung, M. G., Kim, K. S., Hong, B. H. and Hong, S. (2011). Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. *Advanced Materials*, 23(36), 263–267.
- Patel, A., Xue, Y., Mukundan, S., Rohan, L. C., Sant, V., Stolz, D. B. and Sant, S. (2016). Cell-Instructive Graphene-Containing Nanocomposites Induce Multinucleated Myotube Formation. *Annals of Biomedical Engineering*, 44(6), 2036–48.
- Polyzos, I., Bianchi, M., Rizzi, L., Koukaras, E. N., Parthenios, J., Papagelis, K., Sordan, R. and Galiotis, C. (2015). Suspended monolayer graphene under true uniaxial deformation. *Nanoscale*, 7(30), 13033–13042.
- Pörtner, R., Nagel-Heyer, S., Goepfert, C., Adamietz, P. and Meenen, N. M. (2005). Bioreactor design for tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3), 235–245.
- Ramazani, S. and Karimi, M. (2016). Study the molecular structure of poly(εcaprolactone)/graphene oxide and graphene nanocomposite nanofibers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 61, 484–492.
- Ryoo, S.-R., Kim, Y.-K., Kim, M.-H. and Min, D.-H. (2010). Behaviors of NIH-3T3 fibroblasts on graphene/carbon nanotubes: proliferation, focal adhesion, and gene transfection studies. *ACS Nano*, 4(11), 6587–98.
- Saito, A. (2003). Development of bioartificial kidneys. In Nephrology (Vol. 8).
- Salehi-Nik, N., Amoabediny, G., Pouran, B., Tabesh, H., Shokrgozar, M. A., Haghighipour, N., Khatibi, N., Anisi, F., Mottaghy, K. and Zandieh-Doulabi, B. (2013). Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering. *BioMed Research International*, 2013, 15.
- Sánchez-González, S. (2019). New biocompatible polymer membranes functionalized with graphene based nanomaterials for in vitro neural models. Tesis Doctoral. Universidad de Cantabria.
- Sánchez-González, S., Diban, N., Bianchi, F., Ye, H. and Urtiaga, A. (2018). Evidences of the Effect of GO and rGO in PCL Membranes on the Differentiation and Maturation of Human Neural Progenitor Cells. *Macromolecular Bioscience*, 18(11), 1–8.
- Sayyar, S., Murray, E., Thompson, B. C., Gambhir, S., Officer, D. L. and Wallace, G. G. (2013). Covalently linked biocompatible graphene/polycaprolactone composites for tissue engineering. *Carbon*, 52, 296–304.
- Seonwoo, H., Jang, K.-J., Lee, D., Park, S., Lee, M., Park, S., Lim, K.-T., Kim, J. and Chung, J. H. (2018). Neurogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells on Graphene-Polycaprolactone Hybrid Nanofibers. *Nanomaterials (Basel,*)

Switzerland), 8(7).

- Shah, S., Yin, P. T., Uehara, T. M., Chueng, S.-T. D., Yang, L. and Lee, K.-B. (2014). Graphene: Guiding Stem Cell Differentiation into Oligodendrocytes Using Graphene-Nanofiber Hybrid Scaffolds (Adv. Mater. 22/2014). Advanced Materials, 26(22), 3570–3570.
- Shao, Y., Wang, J., Wu, H., Liu, J., Aksay, I. A. and Lin, Y. (2010). Graphene based electrochemical sensors and biosensors: A review. *Electroanalysis*, 22(10), 1027–1036.
- Shearer, H., Ellis, M. J., Perera, S. P. and Chaudhuri, J. B. (2006). Effects of common sterilization methods on the structure and properties of poly(D,L lactic-co-glycolic acid) scaffolds. *Tissue Engineering*, *12*(10), 2717–27.
- Song, J., Gao, H., Zhu, G., Cao, X., Shi, X. and Wang, Y. (2015). The preparation and characterization of polycaprolactone/graphene oxide biocomposite nanofiber scaffolds and their application for directing cell behaviors. *Carbon*, *95*, 1039–1050.
- Srikanth, M., Asmatulu, R., Cluff, K. and Yao, L. (2019). Material Characterization and Bioanalysis of Hybrid Scaffolds of Carbon Nanomaterial and Polymer Nanofibers. ACS Omega, 4(3), 5044–5051.
- Storm, M. P., Sorrell, I., Shipley, R., Regan, S., Luetchford, K. A., Sathish, J., Webb, S. and Ellis, M. J. (2016). Hollow Fiber Bioreactors for In Vivo-like Mammalian Tissue Culture. J. Vis. Exp, (111), 53431.
- Suhaimi, H. (2015). Glucose Diffusivity in Tissue Engineering Membranes and Scaffolds: Implications for Hollow Fibre Membrane Bioreactor. Loughborough University.
- Van Tienen, T. G., Heijkants, R. G. J. C., Buma, P., De Groot, J. H., Pennings, A. J. and Veth, R. P. H. (2002). Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes. *Biomaterials*, 23(8), 1731–1738.
- Vannozzi, L., Ricotti, L., Santaniello, T., Terencio, T., Oropesa-Nunez, R., Canale, C., Borghi, F., Menciassi, A., Lenardi, C. and Gerges, I. (2017). 3D porous polyurethanes featured by different mechanical properties: Characterization and interaction with skeletal muscle cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 75, 147–159.
- Vijayavenkataraman, S., Thaharah, S., Zhang, S., Lu, W. F. and Fuh, J. Y. H. (2019). 3D-Printed PCL/rGO Conductive Scaffolds for Peripheral Nerve Injury Repair. *Artificial Organs*, 43(5), 515–523.
- Wan, C. and Chen, B. (2011). Poly(ε-caprolactone)/graphene oxide biocomposites: Mechanical properties and bioactivity. *Biomedical Materials*, 6(5).
- Wang, G. S., Wei, Z. Y., Sang, L., Chen, G. Y., Zhang, W. X., Dong, X. F. and Qi, M. (2013). Morphology, crystallization and mechanical properties of poly(εcaprolactone)/graphene oxide nanocomposites. *Chinese Journal of Polymer Science* (*English Edition*), 31(8), 1148–1160.

Woodruff, M. A. and Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer -

Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 35(10), 1217–1256.

- Wung, N., Acott, S. M., Tosh, D. and Ellis, M. J. (2014). Hollow fibre membrane bioreactors for tissue engineering applications. *Biotechnol Lett*, *36*, 2357–2366.
- Yin, J. and Deng, B. (2015). Polymer-matrix nanocomposite membranes for water treatment. *Journal of Membrane Science*, 479, 256–275.
- Zeng, H., Gao, C. and Yan, D. (2006). Poly(ε-caprolactone)-functionalized carbon nanotubes and their biodegradation properties. *Advanced Functional Materials*, *16*(6), 812–818.

7. <u>ANEXOS</u>

Anexo A: Caracterización del grafeno comercial av-PLAT 7



Figura 30. A) Análisis SEM y B) TEM del grafeno av-PLAT 7. Espesor medio 3nm, contenido en oxígeno (XPS)<1%. BET = 70 $m^2 \cdot g^{-1}$, material multicapa (5-10 capas).

Anexo B: Ficha técnica de las líneas celulares utilizadas

Línea celular C6





Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated F-12K Medium, Catalog No. 30-2004. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 2.5%; horse serum to a final concentration of 15%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: C6 (ATCC[®] CCL-107[®])

American Type Culture Collection PO Box 1549 Manassas, VA 20108 USA www.stoc.org

800.638.6597 or 703.365.2700 Fax: 703.365.2750 Email: <u>Tech@atoc.org</u>

Or contect your local distributor

Page 1 of 3

Description

Organism: Rattus norvegicus, rat Tissue: brain Disease: gioma

Cell Type: glai cell

Morphology: fibroblast

Growth Properties: adherent

Cytogenetic Analysis: Stemline number is dipiold. Karyotype is stable within the stemline number and is that of a normal male. Three cells with breaks; one with a secondary constriction, one with a dicentric, one with a rearrangement and four with terminal or centromere associations. Note: Cytogenetic information is based on initial seed stock at ATCC. Cytogenetic instability has been reported in the iterature for some cell lines.

Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.

A SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen viais. It is important to note that some viais leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

Unpacking & Storage Instructions

- 1. Check all containers for leakage or breakage.
- Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

- Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
- Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanoi. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
- Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium and spin at approximately 125 x g for 5 to 7 minutes. Discard supernatant.
- 4. Resuspend the cell pellet with the recommended complete medium and dispense into a 25 cm² culture fask. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).
- Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.

A Handling Procedure for Flask Cultures

The fask was seeded with cells (see specific batch information), grown, and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

- Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still vitable).
- If the cells are still attached, aseptically remove all but 5 to 10 mL of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
- If the cells are not attached, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 mL



C6 (ATCC[®] CCL-107[™])

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated F-12K Medium, Catalog No. 30-2004. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 2.5%; horse serum to a final concentration of 15%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: C6 (ATCC[®] CCL-107[™])

American Type Culture Collection PO Box 1549 Manaseses, VA 20108 USA www.stoc.org

800.638.6597 or 703.365.2700 Fax: 703.365.2750 Email: <u>Tech@atoc.org</u>

Or contact your local distributor

Page 2 of 3

of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.

Subculturing Procedure

Volumes are given for a 75 cm² fask. Increase or decrease the amount of dissociation medium needed proportionally for culture vessels of other sizes.

- 1. Remove and discard culture medium.
- Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum which contains trypsin inhibitor.
- Add 2.0 to 3.0 mL of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes).
- Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal.
- 4. Add 6.0 to 8.0 mL of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.
- Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.
- 6. Incubate cultures at 37°C.

Subouttivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:2 to 1:3 is recommended

Medium Renewal: 2 to 3 times per week

Cryopreservation Medium

Complete culture medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO.Cell culture tested DMSO is available as ATCC® Catalog No. 4-X.

Comments

S-100 production increases ten fold as cells grow from low density to confluency.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Blosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the Blosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at <u>www.atcc.org</u>

Línea celular HUVEC



Product Sheet HUV-EC-C [HUVEC] (ATCC[®] CRL-1730[™])



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is F-12K Medium (ATCC 30-2004). To make the complete growth medium, add the following components to 440 mL of the base medium:

- 5 mL of a 10 mg/mL stock heparin solution (prepared from Sigma catalog #H3393) for a final concentration of 0.1 mg/mL heparin in complete growth medium
 - Dissolve 1 g Heparin In 100 mL basal F-12K and filter to make a 10 mg/mL stock solution
- 5 mL endothelial cell growth supplement (ECGS; BD Biosciences catalog # 354006)
- Rehydrate 1 vial using 5 mL basal F-12K
 50 mL fetal bovine serum (FB8; ATCC 30-2020)

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: HUV-EC-C [HUVEC] (ATCC[®] CRL-1730[®])

American Type Culture Collection PO Box 1549 Manassas, VA 20108 USA www.sloc.org

800.638.6597 or 703.365.2700 Fax: 703.365.2750 Email: <u>Tech@etoc.org</u>

Or contact your local distributor

Page 1 of 3

O Description

Organism: Homo sapiens, human Tissue: umbilical vein/vascular endothellu Disease: normal Cell Type: endothelial Morphology: endothelial Growth Properties: adherent **DNA Profile:** Amelogenin: X CSF1PO: 11.12 D138317: 9,11 D168539: 11,12 D58818: 11.12 D78820:812 THO1:6.9.3 TPOX: 8.11 VWA: 16

Cytogenetio Analysis: Karyology performed for one batch of CRL-1730 in 1996 reflected a hypodipioid human cell line with a modal chromosome number of 45 occurring in 72% of the cells counted, all of which had monosomic N13. The rate of polypioid cells among this population was 15.8%. This karyology differed from earlier work-ups performed on the cells that showed approximately 60% of the cells retained 2 chromosomes 13. The apparent clonal variation in cultures of CRL-1730 (most likely dependent upon passage and growth conditions) has also been noted in STR profiles with unstable alleles at D136317 allele #9, D136317 allele #11, and D78820 allele #12. Other coexisting subclones include those with 46,XX,-11,-13,I(19),I(110) and 46,XX,+11,-13 karyotypes. For all karyotypes performed, both X chromosomes appear normal.

Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.

A SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worm when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploiding or blowing off fits cap with dangerous force creating flying debris.

Unpacking & Storage Instructions

- 1. Check all containers for leakage or breakage.
- Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

- Thaw the vial by gentle agilation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
- Remove the viai from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
- Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium, and spin at approximately 125 x g for 5 to 7 minutes.
- 4. Resuspend cell peliet with the recommended complete medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio), and dispense into a new culture flask at a seeding density of 2.0 x 10⁴ to 4.0 x 10⁴ viable cells/cm², it is important to avoid excessive aikalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be piaced into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6), pH (7.0 to 7.6).
- 5. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO2 in air atmosphere is recommended if

7.ANEXOS



Product Sheet HUV-EC-C [HUVEC] (ATCC® CRL-1730[™])

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is F-12K Medium (ATCC 30-2004). To make the complete growth medium, add the following components to 440 mL of the base medium:

- 5 mL of a 10 mg/mL stock heparin solution (prepared from Sigma catalog #H3393) for a final concentration of 0.1 mg/mL heparin in complete growth medium
- Dissolve 1 g Heparin in 100 mL basal F-12K and filter to make a 10 mg/mL stock solution 5 mL endothelial cell growth supplement (ECGS;
- BD Blosciences catalog # 354006) Rehydrate 1 vlai using 5 mL basal F-12K
- 50 mL fetal bovine serum (FBS; ATCC 30-2020)

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: HUV-EC-C [HUVEC] (ATCC® CRL-1730**)

American Type Culture Collecti PO Box 1549 Manassas, VA 20108 USA www.alcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700 Fax: 703.365.2750 Email: Tech@atcc.org

Or contect your local distributor

Page 2 of 3

using the medium described on this product sheet

A Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

- 1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
- 2. If the cells are still attached, aseptically remove all of the growth medium except for approximately 5 to 10 mL to cover the floor of the flask. The old medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% carbon dioxide gas phase until they are ready to be subcultured.
- 3. If the onlis are not attached, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes to spin down the suspended cells into a soft pellet. Remove all but 5 mL of supernatant medium, then resuspend the cells in the remaining medium and add back to a 25 cm² fask. The old medium can be saved for reuse. Incubate at 37°C in a 5% carbon dioxide gas phase until they are ready to be subcultured.

ğ Subculturing Procedure

Volumes are given for a 75 cm² fask. Increase or decrease the amount of dissociation medium needed proportionally for culture vessels of other sizes. Coming@T-75 flasks (catalog #430641U) are recommended for subculturing this product.

Note: A high quality ECGS prepared from bovine neural tissue (BD Biosciences catalog # 354006 or equivalent) should be used to propagate CRL-1730. It is best to initiate the cells with the highest recommended concentration of ECGS. Moderate to heavy debris and numerous floating cells may be routinely observed in cultures of HUV-EC-C cells. Retain the floating cells by gentle centrifugation and add back to the adherent population

CRL-1730 is a slow growing cell line that has a roughly estimated doubling time of 5 to 6 days. Cultures should be fully fluid changed every 48 hours. The cells should only be allowed to go 72 hours without fluid changing when the density is less than 50% confluent. Perform full fluid changes rather than media additions This cell line produces a lot of floaters and debris especially at higher densities. Cells detach before completely filling in to 100% confluence. It is recommended to subculture the cells when 80 to 90% confluent to avoid excessive floaters. Floating cells are viable and if pronounced, they should be spun down and reseeded back into the growing culture.

- 1. Remove and discard culture medium.
- 2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin- 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of m which contains trypsin inhibitor
- 3. Add 2.0 to 3.0 mL of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes).
- Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal.
- Add 6.0 to 8.0 mL of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting. 5. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.
- 6. Incubate cultures at 37°C.

Subouttivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:2 to 1:3 is recommend Medium Renewal: Two to three times per week eding Density: 8.0 x 10³ to 3.0 x 10⁴ viable cells/cm²

Cryopreservation Medium

Complete growth medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO. Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.

Comments

Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) and unidentified factors from bovine pitultary, hypothalamus or whole brain extracts are mitogenic for this line.

The cells have a life expectancy of 50 to 60 population doublings.



References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Anexo C: Cámara de Neubauer para el recuento celular



Figura 31. Mecanismo de funcionamiento de la cámara de Neubauer para el recuento celular.

 A) Introducción de la suspensión celular por capilaridad. B) Suspensión celular en el hemocitómetro. C) Zona de área y volumen conocido. D) Campo del objetivo en la cámara 10x (1 mm²). E) Cuadrícula 4x4 para la cuantificación celular, objetivo 40x (0,4 mm²) (Montuenga et al., 2009).

Anexo D: Funcionalidad biológica de la línea celular C2C12

Una segunda aplicación de las membranas con morfología tubular de fibra hueca donde desarrollar co-cultivos en 3D de gran interés en IT sería un modelo fisiológico miniaturizado de la unión neuromuscular (UNM). El concepto, similarmente al modelo de barrera hematoencefálica (HUVEC/C6), sería desarrollar co-cultivos de células diferenciadas a tejido muscular y motoneuronas (MNs) de la médula espinal (C2C12/MN). Este modelo 3D permitiría estudiar en detalle múltiples aspectos de los mecanismos reguladores bi-direccionales que existen entre las MN y la célula muscular, testar fármacos o aplicaciones terapéuticas dirigidos a la sinapsis neuromuscular. El trabajo in vitro con MNs es extremadamente complejo dado que son células postmitóticas que no se dividen y su obtención a partir de médula espinal embrionaria de ratón es poco eficiente. Por ello se ha decidido comenzar a desarrollar este modelo de UNM analizando si las fibras huecas poliméricas de PCL y las membranas compuestas PCL/G permiten la formación de tejido muscular analizando el crecimiento y diferenciación de una línea murina de mioblastos, las C2C12. El proceso de miogénesis o diferenciación muscular del mioblasto es un proceso que se puede controlar in vitro a través de la suplementación de los medios de cultivo con señales bioquímicas como son los factores de crecimiento, proteínas recombinantes de alto coste. Sin embargo, recientemente, las propiedades características de ciertas membranas porosas sintetizadas se han reconocido de gran importancia en el cultivo y diferenciación de este tipo de células (Patel et al., 2016).

En este contexto, para el desarrollo del modelo de co-cultivo en 3D, se compara la biocompatibilidad de las membranas PCL y PCL/G durante el cultivo en monocapa de mioblastos confluentes haciendo uso de la línea murina C2C12. En la Fig. 32 se ilustra el proceso típico de adhesión (subconfluente) (Fig. 32A), proliferación (confluente o d0) (Fig. 32B), y diferenciación (d5) (Fig. 32C) de los mioblastos para la formación de miotubos musculares. Haciendo uso de este modelo *in vitro* de tejido muscular, se ha definido la cantidad de células necesarias para realizar la siembra subconfluente (densidad celular <70%) sobre los distintos sustratos. Como se observa en la Fig. 32 la siembra de las C2C12 sobre cristal o sobre las membranas PCL o PCL/G tiene una respuesta morfológica diferencial. Las propiedades de la superficie de las membranas PCL provocan un cambio del fenotipo celular, pasando de ser fusiformes con múltiples fibras de estrés en el control a redondeadas y con un tamaño celular drásticamente reducido (Fig. 32D-E). Por su parte, la funcionalización de la PCL con grafeno no altera la morfología de las células si bien éstas parecen estar más alineadas entre sí (Fig. 32F).



Figura 32. (A-C) Ejemplo cultivo de mioblastos y proceso típico de diferenciación a miotubos sobre cristal. (D-F) Cultivo sub-confluente de mioblastos para diferentes sustratos. Barra de medida 100 µm (A-C), 20 µm (D-F).

A continuación se lleva a cabo el ensayo de proliferación manteniendo el cultivo de las células C2C12 hasta que alcanzaron la confluencia sobre el cristal. Como se observa en la Fig. 33, tanto en las membranas PCL (Fig. 33A-C) como las PCL/G (Fig. 33D-F), utilizadas como soporte para el cultivo de las C2C12, se alcanzó la confluencia celular bajo las mismas condiciones. Estudios futuros estarán destinados a evaluar si las fibras de PCL y/o PCL/G permiten la correcta formación de miotubos valorando la expresión de proteínas contráctiles propias del tejido muscular maduro.



Figura 33. (A-C) Cultivo confluente de mioblastos (día 0 = 24 h) para la PCL y (D-F) para la PCL/G. Barra de medida 100 μm (A-B y D-E), 20 μm (C y F).

En su conjunto, los resultados presentados en este segundo bloque sugieren que las membranas de PCL/G en configuración de fibra hueca son un excelente soporte para el desarrollo *in vitro* de tejido muscular. Estudios previos han demostrado que la presencia de grafeno en soportes biocompatibles modula la conductividad y otras propiedades, como las transducto-mecánicas, que inducen la correcta diferenciación de los mioblastos a miotubos incluso en ausencia de medios de diferenciación (Patel et al., 2016). Por esta razón, es muy interesante seguir investigando esta aplicación de IT para determinar cuantitativa y cualitativamente la influencia del grafeno en la diferenciación de los mioblastos reduciendo los costosos suplementos necesarios según los métodos tradicionales con factores de crecimiento.