



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE SALUD Y RENDIMIENTO HUMANO

***Respuesta del macrófago a superficies de CoCr
funcionalizadas: estudio de la biocompatibilidad y la
respuesta inflamatoria***

TRABAJO FIN DE GRADO

Autora: María Rubio Álamo

**Tutoras: D^a Rosa María Lozano Puerto
D^a Ana Belén Peinado Lozano**

Septiembre de 2020



POLITÉCNICA



**E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

Respuesta del macrófago a superficies de CoCr funcionalizadas: estudio de
la biocompatibilidad y la respuesta inflamatoria

TRABAJO FIN DE GRADO

María Rubio Álamo

MADRID, 2020

Directora: Rosa María Lozano Puerto



POLITÉCNICA



**E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

**TITULO DEL TFG- Respuesta del macrófago a superficies
de CoCr funcionalizadas: estudio de la biocompatibilidad y
la respuesta inflamatoria**

**Memoria presentada por MARÍA RUBIO ÁLAMO para la obtención del título
de Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid**

Fdo.: María Rubio Álamo

VºBº Tutor y Director del TFG

Dra. Rosa María Lozano Puerto

Grupo Reconocimiento Célula-Biomaterial

Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas

VºBº Tutor UPM

Dra. Ana Belén Peinado Lozano

Dpto. de Salud y Rendimiento Humano

INEF - Universidad Politécnica de Madrid

**Madrid, 16 de
septiembre, 2020**

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ABSTRACT.....	X
CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	
1.1 Introducción	
1.1.1 El empleo de materiales metálicos como implantes ostearticulares: logros y retos a resolver.....	1
1.1.2 Recubrimientos de materiales metálicos: óxido de grafeno reducido y ácido hialurónico.....	3
1.1.3 El macrófago en la respuesta inmediata al material implantado.....	8
1.2 Objetivos.....	12
CAPÍTULO 2- MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Técnica de cultivo celular	
2.1.1 Procedimiento de trabajo en condiciones de esterilidad.....	13
2.1.2 Preparación del medio de cultivo y condiciones de crecimiento.....	14
2.1.3 Recuento de la densidad celular: cámara Neubauer.....	15
2.2 Muestras metálicas: materiales en estudio y método de esterilización...17	
CAPÍTULO 3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Cultivo de la línea celular de macrófagos de ratón J774A.1: descongelación de la línea celular. Siembra, mantenimiento y congelación.....	18
3.2 Curva de crecimiento de la línea celular de macrófagos de ratón J774A.1.....	20

3.3 Ensayo de biocompatibilidad de los materiales metálicos en cultivos de macrófagos.....	24
CAPÍTULO 4- CONCLUSIONES.....	29
CAPÍTULO 5- BIBLIOGRAFÍA.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Cels	Células
CoCr	Cobalto-cromo
GO	Óxido de grafeno
rGO	Óxido de grafeno reducido
ErGO	Óxido de grafeno reducido electroquímicamente
HA	Ácido hialurónico
CoCrErGO	Cobalto-cromo con óxido de grafeno reducido
CoCrErGOHA	Cobalto-cromo con óxido de grafeno reducido y ácido hialurónico
CoCrMo	Cobalto-cromo-molibdeno
CoCrW	Cobalto-cromo-tungsteno
IL	Interleuquina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
hMSCs	Células madre mesenquimales humanas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
KClO ₃	Clorato de potasio
HNO ₃	Ácido nítrico
KMnO ₄	Permanganato de potasio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HClO ₄	Ácido perclórico
IFN- γ	Interferón gamma
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
iNOS	Óxido nítrico sintasa
CD	Antígeno de diferenciación
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Densidad celular de la línea celular de macrófagos J774A.1 las 24, 48, 72 y 96 horas en cultivo siendo la siembra inicial 20.000, 25.000 y 30.000 células/ml.....21

Tabla 2. Densidad celular a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo de la línea celular de macrófagos J774A.1 tras la siembra inicial de 15.000, 20.000 y 25.000 cels/ml.....23

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura del óxido de grafeno (GO). Variación del modelo de Lerf-Klinowski. Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W., & Ruoff, R. S. (2010). The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 228-240. doi:10.1039/B917103G.** El GO está constituido por una red hexagonal de carbono 2D constituyendo una sola capa de átomos sp^2 , con grupos funcionales oxigenados (hidroxilos y epoxi) en su plano basal y grupos carboxilo en los extremos.....4
- Figura 2. Ruta del óxido de grafito para la síntesis de grafeno. Rozada-Rodríguez, R. Grafenos procesables en fase líquida con características optimizadas mediante el control microscópico de su estructura. (Universidad de Oviedo, 2014).** Las láminas que componen el grafito son oxidadas inicialmente para dar lugar al óxido de grafito. A continuación, el óxido de grafito se exfolia obteniendo una única lámina oxidada, el óxido de grafeno (GO). Finalmente, el GO se reduce, consiguiendo óxido de grafeno reducido (rGO).....4
- Figura 3. Rutas de señalización involucradas en la apoptosis inducida por materiales basados en grafeno (GBM). Ou, L., Lin, S., Song, B., Liu, J., Lai, R., & Shao, L. (2017). The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *International journal of nanomedicine*, 12, 6633–6646. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140526>.** Estos materiales pueden inducir apoptosis a través de rutas mitocondriales y rutas mediadas por kinasas y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). La mitocondria actúa como punto de control en la regulación de la apoptosis. Las caspasas (caspasa-3, caspasa-8), PARP (poli-ADP ribosa polimerasa) y proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Bim y Bax) son activadas y se produce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial.....10
- Figura 4. Efecto de diferentes estructuras de grafeno en macrófagos. Dudek, I., Skoda, M., Jarosz, A., & Szukiewicz, D. (2016). The Molecular Influence of Graphene and Graphene Oxide on the Immune System Under In Vitro and In Vivo Conditions. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 64(3), 195–215. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0369-3>** El efecto de la interacción del grafeno con los macrófagos depende del tamaño, estructura y calidad de la partícula de grafeno. Las partículas pequeñas e irregulares desencadenaron apoptosis en las células; las partículas regulares desencadenaron la producción y secreción de citoquinas; el grafeno en estructura 3D promovió la proliferación celular.....11
- Figura 5. Cámara Neubauer y figura ampliada del retículo de las zonas de recuento. Fundamental Techniques in Cell Culture. Laboratory Handbook 4th Edition. Publicado por Sigma-Aldrich Lab and production materials (SigmaAldrich.com/ecacc).** En el panel izquierdo, se observa la cámara Neubauer con las dos áreas de recuento centrales, superior e inferior, y las dos zonas de soporte a ambos lados. Los cubreobjetos se colocan sobre la zona de recuento previamente a la carga de la muestra. En el panel derecho, se muestra el área de recuento que, mediante el microscopio, permite observar la zona reticular dividida en cuadrantes. El recuento se realiza en los cuadrados pequeños de los cuatro cuadros de las esquinas.....16
- Figura 6. Imágenes de microscopio invertido de la línea celular de macrófagos J774A.1 creciendo en frascos de cultivo.** El panel izquierdo de la figura 1, a menor aumento 10X, muestra el aspecto del cultivo celular, en el que se observan los macrófagos en cultivo con huecos en la superficie del frasco que permiten a las células seguir proliferando. El panel derecho de la Figura 1, a mayor aumento 32X, permite observar la morfología celular de los macrófagos. Se puede apreciar la forma alargada característica de este tipo celular y las prolongaciones, llamadas filopodios, que se desarrollan en los extremos de algunas células.....19
- Figura 7. Curva de crecimiento de la línea celular de macrófagos J774A.1 a lo largo de 96 horas en cultivo (de lunes a viernes) tras la siembra inicial de 20.000, 25.000 y 30.000 cels/ml.** Se llevó a cabo el recuento de las células a las 24, 48, 72 y 96 horas de iniciar el cultivo.....22

Figura 8. Curva de crecimiento de la línea celular de macrófagos J774A.1 a lo largo de 96 horas en cultivo (de lunes a viernes) tras la siembra inicial de 15.000, 20.000 y 25.000 cels/ml. Se llevó a cabo el recuento celular a las 24, 48, 72 y 96 horas de iniciar el cultivo.....23

Figura 9. Esquema de la placa de 24 pocillos utilizada en el ensayo de biocompatibilidad de 96 horas de los materiales metálicos en la línea celular de macrófagos J774A.1. Se sembraron las células en contacto con discos de CoCr, CoCrErGO y CoCrErGOHA (columna 2, 3 y 4 respectivamente), las células sin material como control (columnas 1 y 5) y el medio DMEM completo sin células ni material como blanco (columna 6).....24

Figura 10. Efecto del CoCr y el CoCrErGO en la biocompatibilidad de los macrófagos J774A.1. Escudero, M. L., Llorente, I., Pérez-Maceda, B. T., San José-Pinilla, S., Sánchez-López, L., Lozano, R. M., ... & García-Alonso, M. C. (2020). Electrochemically reduced graphene oxide on CoCr biomedical alloy: Characterization, macrophage biocompatibility and hemocompatibility in rats with graphene and graphene oxide. *Materials Science and Engineering: C*, 109, 110522. Los macrófagos fueron cultivados en presencia de CoCr y de CoCrErGO y sin ningún material (control). Las barras etiquetadas con diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas y las barras etiquetadas con las mismas letras muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas.....26

ABSTRACT

Culture cell methodology is a useful experimental technique that makes possible to evaluate the behavior of the biomaterial in study. As macrophages are the specialized cells involved in the primary response to a material, a J774A.1 mouse macrophages culture cell was selected. It has been here established the suitable conditions for the maintenance of the macrophages cell culture, selecting a cell density of 15.000 cells/ml for 96-hour cell cultures and a cell density of 30.000 and 40.000 cells/ml for 72-hour cell cultures. Growth curves of J774A.1 macrophages were performed to find the most suitable conditions for a 96 hours cell culture selecting a total cell density of 10.000 cells/cm² of growth surface. This result allows to establish, for this culture time, data comparison between assays performed on different growth areas, moving from a format plate to another as the total number of cells per growing area unit is constant. The macrophage response to metallic CoCr-based materials and their surface modifications with ErGO and HA, has been analyzed to be used as implants in situations in which a bone repair is required. These modifications are supposed to enhance the behaviour of the material against wear and corrosion that is produced in the cellular environment where the implant will be placed. Considering the results published by Escudero *et al*, it is expected that the LDH/WST-1 ratio will show a lower value as time exposure to CoCrErGO increases up to 96 hours of exposure, a result that would indicate a better biocompatibility with the exposure time upon ErGO surface modification of CoCr. The effect of the additional modification of CoCrErGO with HA on macrophage biocompatibility is a study underway, but it is expected that at similar concentrations of HA to the physiological ones (3-4 mg/ml), will improve the biocompatibility of CoCr due to its lubricants properties ameliorating its behavior to wear to corrosion.

CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

1.1.1 El empleo de materiales metálicos como implantes osteoarticulares: logros y retos a resolver

Cerca del 10% de la población mundial son personas mayores de 65 años, y está previsto que este número se duplique para el año 2050. En la tercera edad es más probable que se presenten complicaciones de salud relacionadas con fracturas de hueso y pérdida de tejido óseo, situaciones que requieren fijación, reconstrucción o reemplazo del hueso o de la articulación dañada. Debido a las necesidades mecánicas que tiene el tejido óseo, normalmente los materiales de tipo metálico son utilizados para proporcionar soporte, permitir movilización inmediata y prevenir el desarrollo de complicaciones. Entre el 70-80% de los implantes usados clínicamente son de acero inoxidable, aleaciones de cobalto-cromo (CoCr), aleaciones de titanio, nitinol, tantalio y niobio. Además, recientemente ha habido un gran interés por el empleo de implantes fabricados con metales biodegradables incluyendo magnesio, hierro, zinc y calcio (Ni *et al.*, 2019).

A principios del siglo XX se usaba cobalto puro en la industria; sin embargo, el cobalto en esta forma no es suficientemente dúctil y resistente a la corrosión. Entre 1907 y 1913 Haynes desarrolló una serie de aleaciones de CoCr y cobalto-cromo-tungsteno (CoCrW) con buena resistencia a la corrosión. Durante los años 30, se usó una aleación llamada “Vitalio”, compuesta por cobalto-cromo-molibdeno (CoCrMo), para la preparación de prótesis dentales. Más recientemente, el CoCrMo se empezó a usar además en articulaciones artificiales, en los ejes de articulaciones que soportan un elevado peso, como es la que soporta la articulación fémur-cadera (Eliaz N, 2019).

Para fabricar implantes osteoarticulares se emplean fundamentalmente aleaciones basadas en cobalto y titanio debido a que poseen propiedades mecánicas idóneas: excelente resistencia a la corrosión, elevada fuerza y solidez, resistencia al desgaste, alta resistencia térmica y una adecuada biocompatibilidad (Ni *et al.*, 2019) (Pérez-Maceda *et al.*, 2017). Haynes *et al.*, llevó a cabo un experimento en ratas para comparar la diferencia de toxicidad y liberación del metal en implantes metálicos usando titanio de grado 5 y CoCr. Los resultados concluyeron que las partículas liberadas del implante formado por aleación de titanio-aluminio-vanadio inducían una mayor liberación de prostaglandina E2 en comparación con la que inducían las partículas de CoCr. Además, se vio que la presencia de partículas en las aleaciones de titanio aumentaba la liberación de

interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Por otro lado, las partículas de las aleaciones de CoCr provocaban una liberación más reducida de prostaglandina E2 e IL-6, mientras que tenían poco efecto sobre la liberación de IL-1 y TNF- α . Esto señala que el CoCr es mejor opción en comparación con el titanio y sus aleaciones para aplicaciones en remplazo de grandes articulaciones (Oliver *et al.*, 2019). Las aleaciones basadas en cobalto además son altamente resistentes al agrietamiento inducido por el ambiente, tienen una tenacidad razonable y una elongación superior al 8% antes de fractura (Eliaz N, 2019). Las características mencionadas convierten a estos biomateriales metálicos en implantes de soporte ideales y en herramientas muy útiles para reemplazar o reparar los tejidos osteoarticulares, tanto de forma temporal como permanente (Pérez-Maceda *et al.*, 2017). Sin embargo, una vez que son introducidos en el cuerpo humano experimentan procesos de desgaste y corrosión. La activación de la superficie como consecuencia del proceso de corrosión da lugar a ciclos de continua activación y repasivación, liberando restos del material al organismo y provocando la acumulación de iones metálicos junto con la formación de una película pasiva. Esto puede desencadenar problemas clínicos como hipersensibilidad metálica, reacciones adversas locales (complicaciones inflamatorias, activación de macrófagos, resorción ósea y neoplasia) y finalmente fallo del implante. Esto supone un problema mayor en el caso de implantes de duración permanente donde es necesario que exista una alta resistencia al desgaste. Los factores que influyen en este fenómeno son la lubricación entre las superficies del implante, el pH, temperatura, etc... (Pérez-Maceda *et al.*, 2017) (Radice *et al.*, 2019). Debido a los procesos de desgaste, todos los biomateriales pueden inducir una respuesta biológica del huésped a los productos de la corrosión generados, respuesta que va a depender de la naturaleza de los desechos. En este contexto, los macrófagos juegan un papel decisivo, en las reacciones inflamatorias adversas que pueden llevar al aflojamiento y al fallo de los implantes (Escudero *et al.*, 2020). El estudio de la biocompatibilidad de los materiales metálicos resulta necesario para tratar de evitar el aflojamiento de la prótesis y los procesos de osteolisis (Pérez-Maceda *et al.*, 2017). Los implantes pueden ser modificados con factores de crecimiento y células para proporcionar señales biológicas necesarias que mejoren la integración ósea y la reparación de los defectos del hueso (Arwal y García, 2015). Para que el biomaterial se considere adecuado a la hora de fabricar un implante también hay que tener en cuenta la bioactividad. Los implantes ortopédicos deben ser capaces de facilitar la inducción ósea y la proliferación celular (Oliver *et al.*, 2019).

1.1.2 Recubrimientos de materiales metálicos: recubrimiento con óxido de grafeno reducido y ácido hialurónico

El revestimiento de la superficie de un material es uno de los métodos más convencionales y ampliamente adoptados para mejorar la biocompatibilidad y la bioactividad de los biomateriales (Oliver *et al.*, 2019). El carbono presenta unas propiedades extremas que le proporcionan un gran abanico de usos en metalurgia y fabricación y por ello, se ha valorado integrarlos en la superficie de implantes biomédicos previo a la implantación. También presenta muchas formas cristalinas denominadas alótropos, siendo el diamante y el grafito los más conocidos. El grafito es un mineral procedente de rocas metamórficas e ígneas. Tiene una gran suavidad, corta con una presión ligera y tiene una gravedad específica muy baja. Por otro lado, es extremadamente resistente al calor y casi inerte en contacto con otros materiales. Está formado por un gran número de láminas de carbono, mientras que el grafeno es una estructura de carbono 2D constituida por una sola capa de átomos de carbono sp^2 en una red hexagonal. A pesar de que el carbono es uno de los elementos químicos más comunes y conocidos, en esta disposición confiere propiedades sorprendentes. El óxido de grafeno (GO) se sintetiza a partir de la oxidación y exfoliación del grafito. A diferencia del grafeno, el GO es hidrofílico y buen aislante eléctrico, pero también posee una gran área superficial. Se puede mezclar fácilmente con polímeros y otros materiales y puede ser depositado en casi cualquier sustrato. En general, el GO es sintetizado por los métodos de Brodie, Staudenmaier y Hummers o alguna variante de estos (Zhu *et al.*, 2010). Los citados métodos incluyen la oxidación del grafito a varios niveles. Brodie y Staudenmaier usan la combinación de clorato de potasio ($KClO_3$) con ácido nítrico (HNO_3) para oxidar el grafito y el método de Hummers incluye el tratamiento del grafito con permanganato de potasio ($KMnO_4$) y ácido sulfúrico (H_2SO_4). Las sales de grafito obtenidas mediante la intercalación del grafito con ácidos fuertes como H_2SO_4 , HNO_3 o $HClO_4$ también han sido utilizadas como precursores de la subsiguiente oxidación a GO. Estos procesos dan lugar a un entramado de grafeno que incorpora grupos funcionales oxigenados, como grupos hidroxilos y epoxi en su plano basal y grupos carboxilo en los extremos (Zhu *et al.*, 2010) (Escudero *et al.*, 2020). (Figura 1)

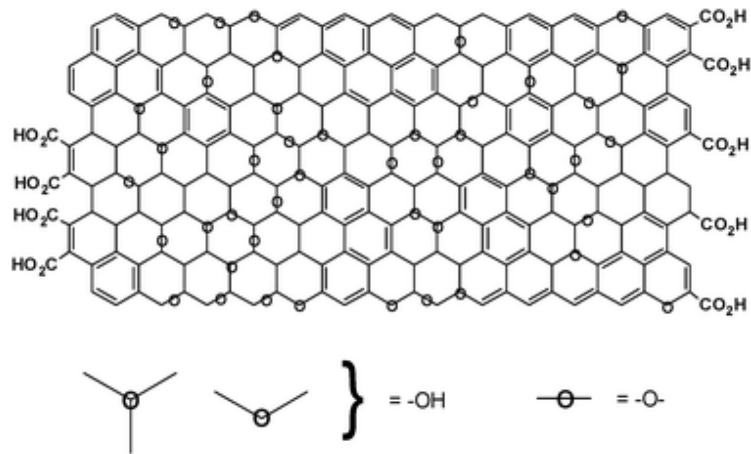


Figura 1. Estructura del óxido de grafeno (GO). Variación del modelo de Lerf-Klinowski. Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W., & Ruoff, R. S. (2010). *The chemistry of graphene oxide. Chemical Society Reviews*, 39(1), 228-240. doi:10.1039/B917103G. El GO está constituido por una red hexagonal de carbono 2D constituyendo una sola capa de átomos sp^2 , con grupos funcionales oxigenados (hidroxilos y epoxi) en su plano basal y grupos carboxilo en los extremos.

El grafeno y el GO, debido a sus propiedades fisicoquímicas y biocompatibilidad, se han usado como material biomédico en biodetección, distribución de fármacos, tratamiento de neoplasias, medicina regenerativa y en cirugía de implantes (Dudek *et al.*, 2016). Pueden ser depositados como lubricante sólido en superficies metálicas y, además, el GO puede ser reducido para obtener superficies enriquecidas con grafeno, a un menor coste y fácil deposición. El proceso completo de obtención del óxido de grafeno reducido (rGO) a partir de grafito se muestra en la Figura 2.

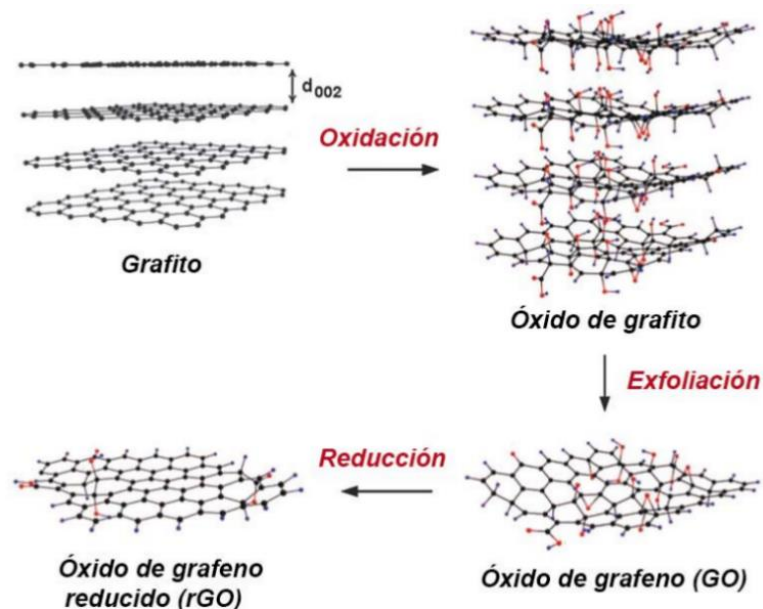


Figura 2. Ruta del óxido de grafito para la síntesis de grafeno. Rozada-Rodríguez, R. Grafenos procesables en fase líquida con características optimizadas mediante el control microscópico de su estructura. (Universidad de Oviedo, 2014). Las láminas que componen el grafito son oxidadas inicialmente para dar lugar al óxido de grafito. A continuación, el óxido de grafito se exfolia obteniendo una única lámina oxidada, el óxido de grafeno (GO). Finalmente, el GO se reduce, consiguiendo óxido de grafeno reducido (rGO).

La reducción de GO para obtener óxido de rGO puede ser realizada mediante procesos químicos, térmicos o electroquímicos. Los tratamientos térmicos producen un menor contenido residual de oxígeno en comparación con la reducción química. Sin embargo, pueden causar cambios microestructurales no deseados en el metal. Los métodos electroquímicos son una buena alternativa a la reducción del contenido de oxígeno incorporado en la red de carbono sin alterar las propiedades del material, aunque la retirada completa del contenido de oxígeno es difícil de obtener. El grafeno producido por todos estos métodos provoca defectos estructurales comunes y el oxígeno residual permanece en el grafeno parcialmente reducido. El oxígeno presente en la red de carbono puede actuar como unión entre el grafeno y las sustancias específicas que se deseen unir. Los resultados experimentales en aplicaciones *in vivo* no son concluyentes (Escudero *et al.*, 2020).

La importancia de estudiar la modificación de la superficie con estructuras basadas en grafeno sobre la aleación de CoCr, una de las más utilizadas en reemplazos de articulaciones, es la capacidad de disminuir la corrosión y mejorar el desgaste de los implantes. Se realizó un estudio para mejorar la resistencia a la corrosión del aluminio en una solución salina mediante el recubrimiento con GO y óxido de grafeno reducido electroquímicamente (ErGO) (Badr *et al.*, 2019). La capa de GO aplicada en un sustrato de aluminio se redujo electroquímicamente mediante voltaje cíclico en 0,01 M de una solución fosfato dipotásico (K_2HPO_4) para formar una capa de ErGO. Los resultados mostraron que tanto las películas de GO como de ErGO cubrían uniformemente la superficie del aluminio formando una estructura a base de capas. Este método produce una notable eliminación de los grupos funcionales que contienen oxígeno dejando una capa de ErGO altamente reducida en el sustrato. Además, el proceso de reducción electroquímica aumentó significativamente el grosor del recubrimiento GO. Las capas de GO y ErGO mejoraron la resistencia a la corrosión del sustrato de aluminio desnudo (Badr *et al.*, 2019). También se han realizado estudios sobre capas de CoCr con películas de ErGO en el que la electrodeposición fue llevada a cabo mediante cronoamperometría y experimentos de voltamperometría cíclica, ambos teniendo en cuenta la influencia del oxígeno en solución. Los grupos C=O y C-O residuales en las películas de ErGO apiladas en las superficies de CoCr dieron lugar a un grosor deforme debido al desorden estructural de las películas de ErGO. Esto fue más evidente en la película procedente de los experimentos cronoamperométricos, debido a la mayor tasa de reducción electroquímica proporcionada por la aplicación de un potencial de reducción alto (2.1V). Esto podría inducir el desarrollo de defectos en la película resultante (García-Argumániz *et al.*, 2019).

En estudios recientes se redujo el GO mediante voltamperometría cíclica de -2.1 a -0.5 V (vs. Ag/AgCl) a una velocidad de 10 mVs^{-1} . Se concluyó que la presencia de películas ErGO en las superficies de CoCr no provocaba cambios significativos en el buen comportamiento a la corrosión de las aleaciones de CoCr (Escudero *et al.*, 2020).

La toxicidad es un factor muy importante a tener presente en el uso de GO debido a su interacción con la materia viva, por lo que deben ser considerados los efectos citotóxicos y genotóxicos que pueda producir. Ambos efectos parecen estar muy relacionados con la habilidad potencial de atravesar la membrana plasmática. Algunos estudios prueban que el GO puede entrar fácilmente en las células y que este mecanismo depende en gran medida del tamaño de las láminas de GO. El principal daño es debido a la interacción de los grupos funcionales en el interior de la célula lo que provoca un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y consecuentemente, efectos citotóxicos. Estos efectos han sido observados en líneas celulares de fibroblastos dérmicos humanos (HDF) y en ratones tras inyección intravenosa de GO a concentraciones mayores de $50 \mu\text{g/mL}$ (Wang *et al.*, 2011). La genotoxicidad de GO en células madre mesenquimales humanas (hMSCs) fue identificada correlacionando el nivel de ROS de hMSCs con resultados de citotoxicidad y genotoxicidad. También se encontró que la toxicidad depende en gran medida del tamaño de las partículas (Escudero *et al.*, 2020).

A pesar de que durante el envejecimiento es más común presentar problemas osteoarticulares, los pacientes que requieren un reemplazo total de cadera (THR) son cada vez más jóvenes y atléticos, por la práctica de deportes más activos y los accidentes de tráfico. Para mejorar el reemplazo total de cadera es fundamental reducir la fricción entre la cabeza y el acetábulo (la copa). La lubricación límite, que reduce la fricción y el desgaste de las articulaciones naturales y artificiales, depende de la adsorción de los componentes del líquido sinovial a las superficies articulares. Los componentes principales del líquido sinovial humano son la albúmina sérica, la globulina c, los fosfolípidos y el ácido hialurónico (HA), que puede tener un efecto significativo en las propiedades de fricción y desgaste de las articulaciones. El HA es un componente importante del líquido sinovial en las articulaciones humanas normales con una concentración de 3 a 4 mg/ml. Aunque el HA es el principal responsable de la viscosidad del líquido sinovial, su papel como lubricante eficaz en la capacidad de lubricación límite de las articulaciones no se ha identificado claramente. Algunos estudios de fricción a macroescala demostraron una mejora en la capacidad de lubricación del HA en soportes: “cartílago sobre cartílago”, “cartílago sobre acero” y “cartílago sobre vidrio”. También

se utilizó un implante de cabeza femoral de CoCr para comprender el mecanismo de avance del desgaste de un implante de cabeza femoral, bajo estrés por fricción durante un largo período de tiempo. Así se podía observar el efecto dependiente de la concentración de HA y el fosfolípido Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) en la superficie de desgaste recuperada. La respuesta de fricción a microescala de la cabeza femoral CoCr recuperada presentó una dependencia significativa de las concentraciones de HA y DPPC. La concentración de HA óptima estaba cerca de la concentración fisiológica en el líquido sinovial humano (es decir, 3-4 mg/ml). Por lo tanto, a concentraciones inferiores o superiores al rango fisiológico se observó una disminución en la efectividad de la lubricación límite. Este resultado puede ser debido a la baja adsorción de HA en la superficie de la cabeza femoral de CoCr a bajas concentraciones y a la alta viscosidad de HA cuando se encuentra en altas concentraciones (Park *et al.*, 2014).

Por otra parte, se han estudiado recubrimientos con HA y con silano en la aleación de magnesio biodegradable, AZ31, para aplicaciones ortopédicas. La influencia de la capa de HA y silano mostró una mejora en la resistencia a la corrosión del sustrato AZ31 en comparación con la aleación equivalente sin recubrimiento. Además, se evaluó la citocompatibilidad del HA en osteoblastos y se observó una mejora en la respuesta celular de osteoblastos dependiente de la concentración, que a su vez producía una mejora en la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Por lo tanto, el HA es una molécula prometedora como recubrimiento para mejorar la resistencia a la corrosión y citocompatibilidad de aleaciones de materiales con base de magnesio biodegradable para aplicaciones ortopédicas (Argawal *et al.*, 2018).

Cuando se produce la inflamación de una articulación se libera ROS en el tejido adyacente y en el líquido sinovial. Para simular estas condiciones en el laboratorio, se usa normalmente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en un medio que contiene proteínas y HA para simular el fluido del líquido sinovial. En presencia de una superficie de CoCrMo se esperaba que existieran interacciones electroquímicas entre el H_2O_2 y el HA, ya que las moléculas de HA contienen restos redox activos. Aunque se planteó la hipótesis de que cualquier reacción redox de estos restos activos del HA con ROS mitigaría el efecto oxidante del peróxido en la superficie CoCrMo (limitando la tasa de corrosión del metal) el HA no disminuyó la corrosión en presencia de 3mM de peróxido e incluso, causó un aumento de la corrosión, al elevar la concentración a 30 mM de peróxido. Por tanto, la disminución en la resistencia a la corrosión de la aleación puede ser atribuida a la formación de un complejo entre las cadenas moleculares de HA degeneradas con iones de cromo liberados de la superficie metálica, que son necesarias para construir la película

de óxido protectora. Este hallazgo tiene implicaciones clínicas, sugiriendo que en condiciones en las que se produzca una fuerte inflamación, el HA acelera la corrosión de implantes de CoCrMo (Radice *et al.*, 2019).

1.1.3 El macrófago en la respuesta inmediata al material implantado

Los macrófagos son células especializadas del sistema inmune innato ampliamente distribuidas por el organismo. Estas células juegan diversos papeles en procesos fisiológicos y patológicos y su función principal es la fagocitosis y la eliminación de cuerpos extraños. Las respuestas inflamatorias de los macrófagos desencadenadas por el proceso de infección comprenden cuatro fases interrelacionadas:

- a) El reconocimiento de patrones moleculares asociados al patógeno o partículas extrañas por parte de receptores específicos expresados en los macrófagos.
- b) El incremento de la concentración de los macrófagos en el tejido local infectado mediante el reclutamiento de monocitos en circulación por el torrente sanguíneo y/o proliferación *in situ*.
- c) La mediación de la actividad microbiana y la conversión de los macrófagos al fenotipo antiinflamatorio.
- d) La finalización de la respuesta frente a la infección y la reparación del tejido.

Los macrófagos activados clásicamente (M1) son inducidos por interferón gamma (IFN- γ) y/o TNF- α . Muestran un fenotipo tipo Th1, son efectores proinflamatorios y tienen funciones bactericidas. En cambio, los macrófagos activados alternativamente (M2), que incluyen por lo menos tres fenotipos diferentes solapados (M2a, b, c), exhiben un fenotipo tipo Th2 y están involucrados en la resolución de la inflamación y la curación del tejido (Correa y López, 2007). Todo ello, está regulado por moléculas de señalización intracelular, moléculas de membrana, microRNAs y moléculas implicadas en la modificación epigenética (Zhang *et al.*, 2014).

Los materiales implantados de forma subcutánea desencadenan la respuesta inmune innata al detectarse componentes ajenos al cuerpo. Esta reacción consiste en la adsorción de proteínas a la superficie del implante, la infiltración de las células responsables de la inflamación (entre ellas los macrófagos), la fusión de los macrófagos en cuerpos celulares gigantes, la activación de los fibroblastos y, por último, la encapsulación fibrosa. Esta serie de sucesos puede afectar a la función de los implantes, así como inhibir la difusión

de fármacos de dispositivos de liberación de larga duración y en consecuencia, el fallo médico del dispositivo. La reacción del cuerpo es un fenómeno complejo y todavía no es entendido completamente. Hay estudios recientes que han demostrado el papel específico de los macrófagos en la activación diferencial hacia estados pro y antiinflamatorios, así como diferencias de especies en el tiempo de la deposición del colágeno y la fibrosis. La liberación de modificadores, como corticoesteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), agentes antifibróticos y ARN pequeño de interferencia (siRNA), se han utilizado para prevenir o minimizar la fibrosis. De estos, la liberación de dexametasona durante el período de implantación es el método más común para prevenirla. Aproximaciones más recientes emplean modificaciones de las superficies para minimizar la adsorción proteica a niveles mínimos. La naturaleza diversa de los procesos involucrados en la reacción al implante favorece el uso de los corticoesteroides debido al amplio espectro de acción comparado con otras aproximaciones. Sin embargo, otros estudios basados en los recubrimientos hidrofílicos que reducen la adsorción proteica, combinado con la liberación de dexametasona resultan ser los más eficaces (Kastellorizios *et al.*, 2015).

En condiciones *in vitro*, el grafeno y el GO provocan un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, principalmente IL-1, IL-6, IL-10 y TNF- α , como resultado de la activación de receptores “toll-like” en macrófagos (Dudek *et al.*, 2012). Las células fagocíticas y las células dendríticas presentan una mayor sensibilidad al grafeno y al GO en comparación con otras células como osteocitos, condrocitos y células madre. El grafeno activa la apoptosis en macrófagos a través de la ruta TGF- β /Smad/Bcl-2 y además a través de kinasas JNK, que son estimuladas debido a un incremento de ROS en la célula o a través de una señal recibida por proteínas Smad. (Figura 3)

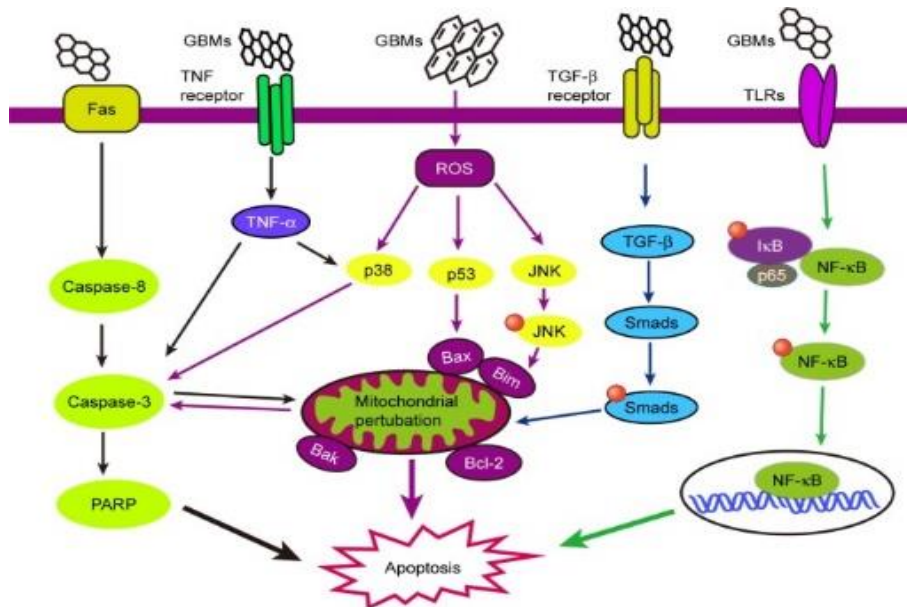


Figura 3. Rutas de señalización involucradas en la apoptosis inducida por materiales basados en grafeno (GBM). Ou, L., Lin, S., Song, B., Liu, J., Lai, R., & Shao, L. (2017). The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *International journal of nanomedicine*, 12, 6633–6646. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140526>. Estos materiales pueden inducir apoptosis a través de rutas mitocondriales y rutas mediadas por kinasas y el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β). La mitocondria actúa como punto de control en la regulación de la apoptosis. Las caspasas (caspasa-3, caspasa-8), PARP (poli-ADP ribosa polimerasa) y proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Bim y Bax) son activadas y se produce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial.

En condiciones *in vivo*, nanomateriales de grafeno inducen el desarrollo de una reacción inflamatoria local y el desarrollo de granulomas en órganos parenquimales. Existe una gran diversidad de resultados en cuanto a la biocompatibilidad y bioseguridad del GO, lo que se debe en parte a variaciones en las propiedades fisicoquímicas (Dudek et al., 2016). El papel de estas propiedades, como el tamaño lateral, en los efectos biológicos o toxicológicos del GO no se conoce totalmente. Para conocer en profundidad la influencia de estas propiedades, se realizó un estudio *in vitro* que se centró en el análisis del tamaño lateral mediante la preparación de un panel de muestras de GO con tamaños laterales diferentes usando el mismo material de partida. Se encontraron que en comparación con su equivalente más pequeño, el GO más grande mostraba una fuerte adsorción sobre la membrana plasmática produciendo menos fagocitosis, se producía una interacción fuerte con receptores “toll-like” y una activación más potente de las rutas NF-κB (Ma *et al.*, 2015). En contraste, las láminas de GO más pequeñas fueron mejor toleradas por las células. Como resultado, el GO más grande provocó una polarización M1 mayor asociada con una producción elevada de citoquinas y el reclutamiento de células inmunes. Los resultados *in vitro* correlacionaron bien con respuestas inflamatorias sistémicas tras administración de GO en la cavidad abdominal, pulmón o flujo sanguíneo (Ma *et al.*, 2015). Análisis posteriores a estos demostraron explícitamente que la forma de

interacción entre el grafeno y las células inmunes depende estrictamente de factores como el tipo de derivado de grafeno, el estado físico, las dimensiones de la lámina, la concentración de la solución, el tiempo de incubación y, lo más importante, la fisiología y anatomía de las células diana (Dudek *et al.*, 2016). Las diferentes respuestas celulares en función de la estructura del grafeno se muestran en la Figura 4.

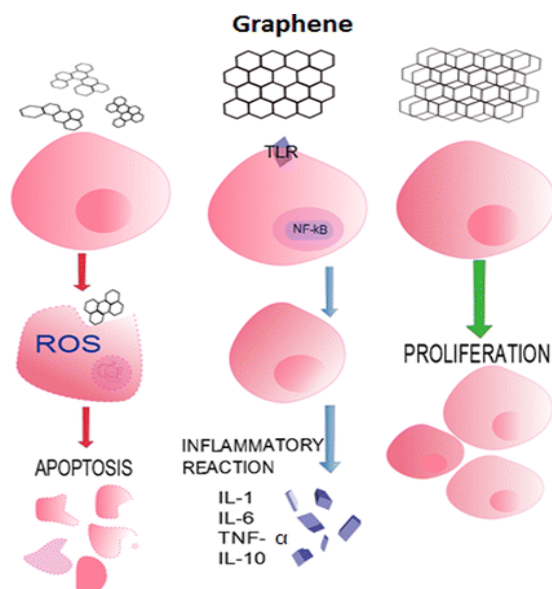


Figura 4. Efecto de diferentes estructuras de grafeno en macrófagos. Dudek, I., Skoda, M., Jarosz, A., & Szukiewicz, D. (2016). *The Molecular Influence of Graphene and Graphene Oxide on the Immune System Under In Vitro and In Vivo Conditions. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 64(3), 195–215. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0369-3> El efecto de la interacción del grafeno con los macrófagos depende del tamaño, estructura y calidad de la partícula de grafeno. Las partículas pequeñas e irregulares desencadenaron apoptosis en las células; las partículas regulares desencadenaron la producción y secreción de citoquinas; el grafeno en estructura 3D promovió la proliferación celular.

Se evaluó la influencia de nanoláminas de GO funcionalizadas con polietilenglicol-amina y marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PEG-GO) en la polarización de los macrófagos peritoneales murinos hacia los fenotipos M1 y M2, en condiciones basales y estimuladas mediante un estudio por citometría de flujo y microscopía confocal, a través de la expresión de diferentes marcadores celulares: CD80 y óxido nítrico sintasa (iNOS) como marcadores M1, y CD206 y CD163 como marcadores M2. Los resultados sugirieron que la absorción de FITC-PEG-GO no indujo la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo proinflamatorio M1, promoviendo el control del equilibrio M1/M2 con un ligero cambio hacia el fenotipo reparador M2 involucrado en la reparación del tejido, asegurando una adecuada respuesta inmune a estas nanocapas (Feito *et al.*, 2018).

Estudios recientes han comprobado que la biocompatibilidad de superficies de CoCr frente a macrófagos mejora con la deposición de películas de ErGO, que incrementa con el tiempo de exposición al material. Las películas de ErGO en discos de CoCr forman una superficie biocompatible que permite la distribución homogénea de los macrófagos sobre la superficie del material (Escudero *et al.*, 2020).

1.2 Objetivos

Los objetivos de este trabajo consisten en:

- Estudiar la metodología de cultivo celular como técnica experimental, que permite evaluar el comportamiento del biomaterial a ensayar. En concreto, se describirá el cultivo de una línea celular de macrófagos J774A.1, describiendo el trabajo en campana de flujo laminar, la descongelación y la congelación de la línea celular de trabajo, la preparación del medio de cultivo, el mantenimiento de la línea celular, las curvas de crecimiento y un ensayo tipo para evaluar la biocompatibilidad de los materiales.
- Analizar la respuesta de los macrófagos a los materiales, en concreto se estudiarán materiales metálicos de base CoCr y sus modificaciones superficiales por ErGO y HA, para ser utilizados como implantes en situaciones en las que se requiere una reparación ósea. Se pretende con estas modificaciones superficiales mejorar el comportamiento del material frente al desgaste y a la corrosión que experimenta en el entorno celular en el que se implanta en el organismo.

CAPÍTULO 2- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Técnica de Cultivos celulares

2.1.1 Procedimientos de trabajo en condiciones de esterilidad

Para trabajar en condiciones de esterilidad, se realizan cada una de las actividades en el interior de una campana de flujo laminar. Se trata de un recinto que emplea un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro HEPA o ULPA y proporcionar un ambiente limpio en la zona de trabajo, libre de partículas de hasta 0.1 micras. La cara frontal permite el acceso a la parte interna, donde se encuentra la superficie de trabajo estéril. Es un medio idóneo para trabajar con cultivos celulares que deben mantenerse limpios y evitar cualquier tipo de contaminación.

La velocidad de paso de aire oscila entre los 0,3 y los 0,5 m/s para así barrer la superficie de la zona de trabajo y evitar la suspensión de partículas, así como una posible contaminación de las muestras. El aire es insuflado en forma de un flujo laminar o flujo unidireccional, suavemente, hacia el usuario. La superficie de trabajo de la cabina se construye generalmente de acero inoxidable grado 304 o superior (para facilitar su limpieza y aumentar su durabilidad por el uso) con acabados sanitarios, sin espacios o juntas donde las esporas pueden llegar a acumularse. Las cabinas de este tipo existen tanto en configuración vertical como en horizontal, según esté la posición del filtro, en la parte superior o en la parte trasera de la zona de trabajo. Sin embargo, el flujo de aire siempre va hacia el operador por lo cual estos equipos ofrecen protección únicamente a la muestra que se maneja en su interior, pero nunca al operador. Las cabinas de flujo laminar pueden tener una lámpara de rayos ultravioleta-C con acción germicida para esterilizar el recinto y su contenido cuando no se utiliza. Es importante apagar la lámpara durante la utilización de la cabina, ya que rápidamente se producirían quemaduras de sol en la piel expuesta, y también puede causar cataratas oculares. Se enciende la luz ultravioleta junto con el flujo de aire 15 minutos antes del uso de la campana. Una vez pasado este tiempo, se sustituye por luz blanca manteniendo el flujo al nivel deseado para permitir la renovación de aire durante el trabajo en la campana.

Además de disponer de un entorno estéril, es necesario limpiar todos los materiales que se van a utilizar. El “Hibiscrub” sirve para desinfectar la superficie metálica de la campana y los diferentes instrumentos. El resto de materiales: bolsas de pipetas, pipetas automáticas, bolsas de tubos Falcon, “cell scrapers”, pipetas automáticas, puntas, pipetas etc... se limpian con etanol al 70 %. El “Virkon” se emplea para eliminar los restos

biológicos de frascos de cultivo, tubos, etc. y se prepara una solución al 1% para disminuir su toxicidad y que sea menos contaminante e irritable.

2.1.2 Preparación del medio de cultivo y condiciones de crecimiento

El medio de cultivo para el crecimiento de la línea celular de macrófagos de ratón J774A.1 contiene el medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de la casa comercial Gibco, (45 ml de medio DMEM), 10 % de suero fetal bovino (SFB) de la casa comercial Sigma, un suero en el que el complemento ha sido previamente inactivado por tratamiento térmico (en un baño de agua a 56 °C durante 30 minutos y cribado por un filtro estéril Stericup de Millipore de 0.1 micras) (5 ml de SFB) y 0,5 ml de una solución 100 X de una mezcla de antibióticos que contiene penicilina (10.000 Units/mL) y estreptomicina (10.000 ug/mL). Este medio de cultivo recibe el nombre de “medio completo” que indica que contiene todo los constituyentes y suplementos necesarios (aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, proteínas, elementos traza, glucosa, etc.) para el crecimiento de la línea celular de trabajo. El medio DMEM contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el medio esencial mínimo de Eagle, constituido por ocho vitaminas B, los diez aminoácidos esenciales y cisteína, tirosina y glutamina. DMEM se formuló originalmente con bajas cantidades de glucosa (1 g/l) y piruvato sódico, pero a menudo se utiliza con niveles de glucosa más altos, y con o sin piruvato sódico. No contiene proteínas, lípidos ni factores de crecimiento. Por lo tanto, requiere suplementación, normalmente de un 10 % de suero. Además, utiliza un sistema de tampones de bicarbonato de sodio (3,7 g/l) y, por tanto, requiere un ambiente con un 5-10 % de CO₂ para mantener el pH fisiológico.

El suero contiene factores de crecimiento (que promueven la proliferación de células), factores de adhesión y actividad antitripsina (que promueven la adhesión celular al recipiente de cultivo). Es una fuente de minerales, lípidos y hormonas. El SFB es el más utilizado en el cultivo de muchas líneas celulares y para clonación. Las proteínas son el principal constituyente del suero. Entre ellas están la albúmina (que transporta minerales, ácidos grasos y hormonas), la fibronectina (que promueve la adhesión celular), la α 2-macroglobulina (que inhibe a la tripsina) y la transferrina (que transporta hierro, haciéndolo biodisponible y menos tóxico). Dichas proteínas incrementan la viscosidad del medio, reduciendo el “shear stress” durante el pipeteo y la agitación y pueden agregar capacidad buffer al medio. Otros constituyentes importantes del suero son los factores de crecimiento, como el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), el FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), el EGF (factor de crecimiento epidérmico), el VEGF

(factor de crecimiento del endotelio vascular) y el IGF-1 (factor de crecimiento parecido a la insulina). Durante la coagulación (necesaria para obtener el suero a partir de sangre total), se libera PDGF, razón por la cual el suero en cultivo celular tiene mayor poder mitogénico que el suero en el contexto fisiológico del organismo de origen. En el suero están presentes diferentes hormonas (por ejemplo, en el SFB hay hidrocortisona e insulina), metabolitos (glucosa, aminoácidos, nucleósidos), lípidos (ácido oleico, ácido linolénico, etanolamina, fosfatidiletanolamina), minerales (hierro, cobre, zinc, selenio, usualmente unidos a la albúmina) e inhibidores de proliferación celular (que pueden ser artefactos de preparación, como toxinas bacterianas o anticuerpos que tengan reacción cruzada con epítomos de superficie celular, o bien fisiológicos, como el TGF- β). La inactivación con calor del suero, descrita más arriba, retira al complemento del suero y reduce la acción citotóxica de los anticuerpos sin dañar factores de crecimiento.

Los antibióticos añadidos al medio tienen la función de prevenir el crecimiento microbiano en los cultivos celulares. Entre los antibióticos clásicos se encuentra la penicilina-estreptomina descrita anteriormente.

De forma rutinaria, el medio de cultivo se preparaba en tubos Falcon de 50 ml que se mantenían en la nevera hasta su utilización. Antes de utilizar el medio completo con el cultivo celular, se termostataba el medio de cultivo en un baño de agua a 37°C.

2.1.3 Recuento de la densidad celular: cámara Neubauer

La cámara de Neubauer o hemocitómetro es un instrumento utilizado para realizar el recuento de células o esporas en un medio líquido que puede ser: un cultivo celular, sangre, orina, líquido sinovial, etc. En este caso, ha sido utilizada para el recuento de células: macrófagos. Consiste en una placa de vidrio especial grueso cuyo tamaño es el de un portaobjetos normal para que pueda ser colocada en la platina del microscopio. Sus dimensiones son 30x70 mm y 4 mm de grosor. Está dividida en tres zonas: una central para el recuento y dos para soporte. La zona de recuento está dividida en dos áreas: superior e inferior. Cada una de esas áreas está formada por un cuadro que posee una superficie de 9 mm² y está dividido internamente en 9 cuadrados con 1 mm² de superficie cada uno. Los cuatro cuadros de las esquinas están divididos en 16 cuadrículas más pequeñas (0.0625 mm² de superficie) y es donde se realiza el conteo de la mayoría de las células mientras que las plaquetas se cuentan en la zona central. La zona central tiene más divisiones, consta de un cuadrado de 1 mm² dividido en 25 cuadros que tienen una superficie de 0,04 mm² cada uno. Estos a su vez se dividen en 16 cuadrículas con una superficie de 0,0025 mm². Estas cuadrículas se forman por una serie de líneas

milimetradas que se entrecruzan entre sí, constituyendo cuadrículas perfectamente dibujadas y delimitadas a las medidas que se han especificado. Estas líneas han sido grabadas con punta de diamante. (Figura 5)

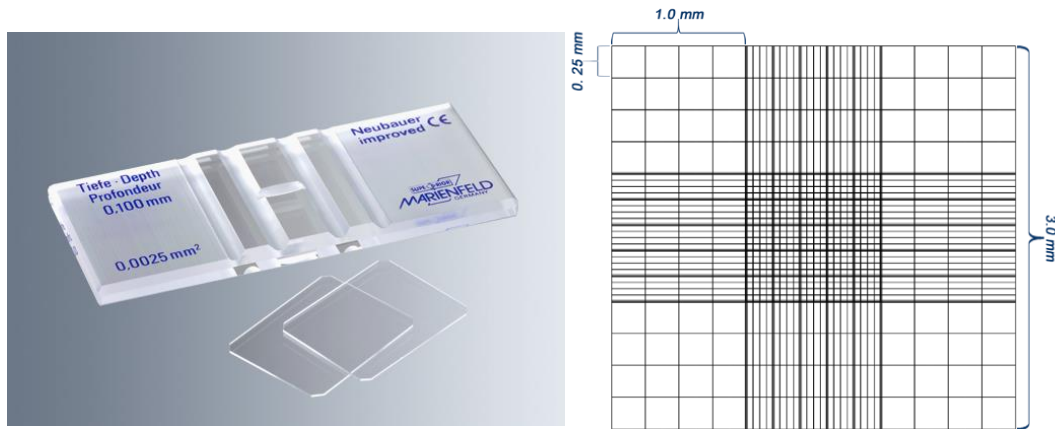


Figura 5. Cámara Neubauer y figura ampliada del retículo de las zonas de recuento. *Fundamental Techniques in Cell Culture. Laboratory Handbook 4th Edition. Publicado por Sigma-Aldrich Lab and production materials (SigmaAldrich.com/ecacc).* En el panel izquierdo, se observa la cámara Neubauer con las dos áreas de recuento centrales, superior e inferior, y las dos zonas de soporte a ambos lados. Los cubreobjetos se colocan sobre la zona de recuento previamente a la carga de la muestra. En el panel derecho, se muestra el área de recuento que, mediante el microscopio, permite observar la zona reticular dividida en cuadrantes. El recuento se realiza en los cuadrados pequeños de los cuatro cuadros de las esquinas.

La cámara de Neubauer se monta colocando en la zona central un cubreobjetos. Se toma por los bordes y se deja caer suavemente sobre la cámara. Tanto la cámara como el cubreobjetos deben estar muy limpios y secos. Esta se llena colocando la punta de una pipeta automática en un ángulo de 35° en el borde de la zona de carga. Se va descargando el líquido, la suspensión de células, suavemente y la zona de carga se llena por capilaridad. Esta operación se realiza por ambos lados para cargar los dos retículos: superior e inferior, que constituyen la zona central. No se deben sobrecargar los retículos y tampoco rellenarlos con líquido insuficiente. Es importante que el llenado se realice homogéneamente, es decir, no deben quedar burbujas. Primero se enfoca con el objetivo de 10X y si es necesario, se cambia después al de 32X. Para mejorar su visualización se disminuye el paso de la luz del microscopio (se baja el condensador y se cierra un poco el diafragma). El contaje se inicia en el cuadrado de la esquina izquierda superior. Se comienza desde el primer cuadrado de la primera fila, es decir, de izquierda a derecha hasta llegar al extremo contrario. En este punto se baja y se devuelve la mirada de derecha a izquierda hasta llegar al otro extremo y así, sucesivamente, se van contando las células que hay dentro de cada cuadrícula en forma de “zigzag”. Se cuentan las células en las 16 cuadrículas de cada cuadrado mediano. Para ello es útil disponer de un contador de células

manual para pulsar la tecla del aparato tantas veces como células se observen. De esta forma, se puede contar sin necesidad de levantar la mirada del campo microscópico. Al terminar el contaje se calcula la media del número de células de los 4 cuadros. Cada cuadro grande presenta $0,1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} = 0,01 \text{ cm}^2$ de superficie y al multiplicar por $0,01 \text{ cm}$ de profundidad se obtiene el volumen que es de $0,0001 \text{ cm}^3$ o ml. El valor de la concentración en células/ml se obtiene multiplicando la media del número de células de los 4 cuadros por 10.000.

2.2 Muestras metálicas: materiales en estudio y método de esterilización

Los materiales empleados en el estudio de biocompatibilidad en macrófagos son discos de CoCr, CoCrErGO y CoCrErGOHA. Los discos de CoCr ensayados, de 12 mm de diámetro y 2 mm de espesor, se obtuvieron cortando discos de estas dimensiones a partir de barras cilíndricas de este material suministrado por la casa comercial International Edge alloys. La composición química de la aleación CoCr empleada es la publicada por Escudero *et al* 2020, trabajo en el que también se describe el método empleado para el recubrimiento de los discos con ErGO. Los discos CoCrErGOHA se obtuvieron a partir de discos CoCrErGO mediante la inmersión durante 24 horas en una solución de HA a una concentración de 3 mg/ml, concentración semejante a la que aparece en el líquido sinovial.

Los materiales metálicos antes de ponerlos en contacto con el cultivo de macrófagos, se esterilizaron en una placa de cultivos de 12 pocillos mediante la irradiación con luz ultravioleta en una campana de flujo laminar. Cada cara del disco se irradió durante 5 minutos con luz ultravioleta, utilizando pinzas estériles desechables para dar la vuelta en la placa a los discos.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Cultivo de la línea celular de macrófagos de ratón J774A.1: descongelación de la línea celular. Siembra, mantenimiento y congelación

En este TFG se ha trabajado con la línea celular de macrófagos (J774A.1) de ratón murino *Mus musculus* obtenida del banco de células del laboratorio de Reconocimiento Célula-Biomaterial del Centro de Investigaciones Biológicas, que a su vez derivan de un vial que se obtuvo del banco de células Humanas y Animal DSMZ (ACC 170).

La línea J774A.1 se estableció a partir de un tumor en un ratón BALB/c hembra en 1968. Estas células sintetizan lisozima e interleuquina 1 y receptores para inmunoglobulina y complemento. Son células relativamente pequeñas que crecen de forma semi-adherente, observándose macrófagos en la superficie del frasco tras unos pocos días de cultivo. Antes de que el cultivo alcance la confluencia, hay que dividir el cultivo ya que una cierta cantidad de células se despegan espontáneamente.

Para establecer el cultivo celular lo primero que se hizo fue seleccionar un vial de la línea de macrófagos de ratón J774A.1 del banco de células del laboratorio. El criotubo estaba en un tanque de nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para descongelar el vial, se introdujo el criotubo en un corcho en un baño a 37°C el tiempo suficiente para que se descongelara su contenido. Una vez descongelado el 1 ml del vial se pasó a un tubo Falcon de 15 ml que contenía 5 ml de medio DMEM completo para diluir la solución en la que se congeló la línea celular y se centrifugó durante 5 minutos a 1.200 rpm a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras retirar el sobrenadante cuidadosamente, se añadieron 5 ml de medio completo resuspendiendo el pellet de células cuidadosamente mediante el pipeteo sucesivo del medio de cultivo. A partir de esta suspensión celular se prepararon 2 frascos de cultivo en Falcon de 25 cm^2 de área de cultivo: uno que tenía una dilución 2:5 (2 ml de la suspensión de células+3 ml de medio) y otro, con una dilución 3:5 (3 ml de la suspensión de células+ 2 ml de medio). Un tercer frasco con 5 ml de medio se utilizó como control para comprobar que el medio completo que se había utilizado estaba en condiciones estériles y no era fuente de contaminación del cultivo celular. Los frascos, una vez aflojado su tapón suficientemente (1 vuelta y media, sin que se suelte del frasco) para que pueda existir intercambio de gases con la estufa y se mantenga el pH del medio de cultivo, se metieron en la estufa de cultivos a 37°C con un 5% de CO_2 .

A las 24 horas de iniciar el cultivo, el medio de cultivo se retiró para eliminar las células muertas que no han resistido el proceso de congelación-descongelación. Estas células que no han resistido el proceso de descongelación aparecen en suspensión en el medio de

cultivo, flotando. Una vez retirado este medio, se añadieron 5 ml de DMEM completo fresco. Los frascos de cultivo se volvieron a meter en la estufa de cultivo para mantener en crecimiento el cultivo celular. Después de unos días en cultivo se visualizaron los frascos en el invertoscopio (Figura 6) y se observó una densidad celular suficiente como para realizar el pase de las células.

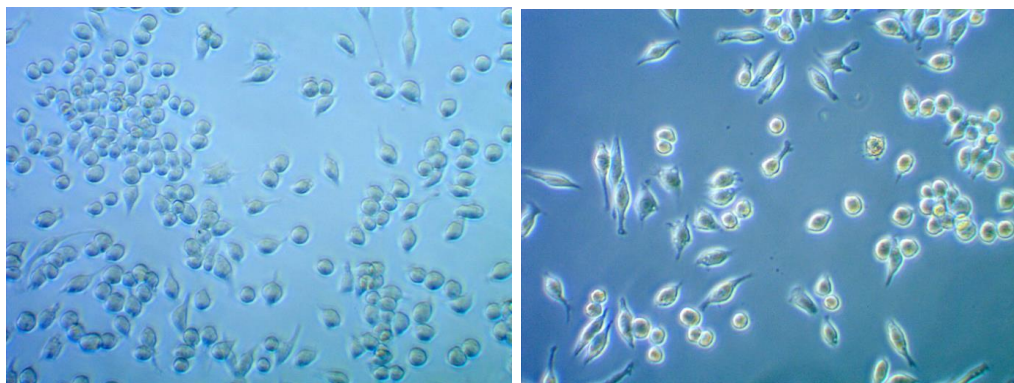


Figura 6. Imágenes de microscopio invertido de la línea celular de macrófagos J774A.1 creciendo en frascos de cultivo. El panel izquierdo de la figura 1, a menor aumento 10X, muestra el aspecto del cultivo celular, en el que se observan los macrófagos en cultivo con huecos en la superficie del frasco que permiten a las células seguir proliferando. El panel derecho de la Figura 1, a mayor aumento 32X, permite observar la morfología celular de los macrófagos. Se puede apreciar la forma alargada característica de este tipo celular y las prolongaciones, llamadas filopodios, que se desarrollan en los extremos de algunas células.

Para realizar el pase de las células, el medio de cultivo se retiró para eliminar así las células muertas, y se añadieron 5 ml de DMEM completo a 37 °C. En este medio fresco, las células que crecen semiadheridas a la superficie del plástico del frasco de cultivo se rasparon con un “cell scraper” o raspador. Una vez raspadas, la suspensión de células se pasó a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 1.200 rpm a 25 ° C. Una vez retirado el sobrenadante, el pellet de células se resuspendió en 5 ml de DMEM completo. Para realizar el recuento celular se cargó con un volumen de 10 μ l la cámara Neubauer. A partir del número de células/ml contabilizadas en el frasco 2:5 del descongelado se prepararon frascos con un volumen final de 5 ml y con la siguiente densidad celular: de 25.000 cels/ml y 30.000 cels/ml. A partir del frasco descongelado 3:5 se pusieron también frascos con un volumen final de 5 ml y con la siguiente densidad celular: 25.000 cels/ml y 40.000 cels/ml. Los frascos se guardaron en la estufa de cultivos durante el fin de semana (72 horas en cultivo). Transcurridas las 72 horas, se cambió el medio de cultivo del frasco 2:5 de 30.000 cels/ml y del 3:5 con 40.000 cels/ml (los de mayor densidad celular) y se realizó en 5 ml de medio completo fresco el raspado de la

superficie. Una vez raspadas las células, se pasó la suspensión celular a un tubo Falcon. Se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet. Con los resultados del recuento de células en la cámara Neubauer, se realizaron los cálculos oportunos para preparar las tres densidades iniciales que permitieran realizar una curva de crecimiento de la línea celular de trabajo.

Para el mantenimiento de la línea celular, se pusieron dos frascos a una densidad celular de 15.000 cels/ml para que estuvieran en cultivo de lunes a viernes, es decir durante 96 horas. Para el mantenimiento del cultivo de viernes a lunes (72 horas en cultivo) se prepararon dos frascos con la siguiente densidad celular: 30.000 y 40.000 cels/ml. En este caso de viernes a lunes se puso mayor densidad celular ya que las células estaban en cultivo menos tiempo. Esta rutina de mantenimiento del cultivo celular de la línea J774A.1 se estableció para disponer siempre de un cultivo de macrófagos en condiciones óptimas. Durante todo el tiempo de experimentación no se produjo ningún episodio de contaminación de los cultivos, lo que indica la adecuada manipulación y la adquisición de buenas prácticas en el laboratorio de cultivos celulares.

Uno de los frascos en cultivo, que correspondía a un frasco con una densidad inicial de 20.000 cels/ml, se congeló una vez que tenía un crecimiento suficiente próximo a confluencia, para reponer el stock del banco de líneas celulares del laboratorio. Para ello se eliminó primero el medio de cultivo y se sustituyó por 5 ml de medio completo en el que se realizó el raspado del cultivo con un “cell scraper”. La suspensión de células se pasó a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 1.200 rpm a 25 °C. El sobrenadante se retiró y el pellet de células se resuspendió en 1 ml de la solución de congelar que contiene Suero de sigma descomplementarizado suplementado con 10 % de DMSO. Una vez resuspendido el pellet en la solución de congelar, se pasó el ml a un criotubo y se puso en un polispán a -80 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, el criotubo se pasó al tanque de nitrógeno líquido en donde se mantiene hasta la próxima vez que sea necesaria la descongelación del vial.

3.2. Curva de crecimiento de la línea de macrófagos de ratón J774A.1

Para elaborar la curva de crecimiento y así analizar la evolución de la línea de macrófagos J774A.1 a lo largo de 96 horas en cultivo (cultivo de lunes a viernes), se realizó una siembra a tres densidades diferentes de menor a mayor concentración. El lunes, se añadió en tres tubos Falcon de 15 ml el volumen necesario de suspensión de células para

conseguir las densidades iniciales correspondientes, y la diferencia de medio completo hasta conseguir 10 ml de volumen final. Se sembró por duplicado cada una de las soluciones a la densidad seleccionada añadiendo un volumen de 1 ml por pocillo en una placa de cultivo de 24 pocillos (p24) que se mantuvo en la estufa a 37 °C en una atmósfera con 5% CO₂ y 99% de humedad hasta el momento de la medida de la densidad celular del cultivo. Los tiempos que se seleccionaron para la medida de la densidad celular fueron 24, 48, 72 y 96 horas. La densidad resultante en cada tiempo seleccionado se obtuvo calculando la media del duplicado. A cada tiempo de ensayo, se sacaba la placa de la estufa y en la campana de flujo laminar se llevaba a cabo el mismo proceso: el raspado del pocillo con el émbolo de goma de una jeringa de 1 ml, el pase del 1 ml del raspado a una placa limpia (con el fin de devolver lo antes posible la placa a la estufa y mantener las condiciones del cultivo) y el recuento de la densidad celular con la cámara Neubauer. El objetivo de estos ensayos era determinar una concentración inicial adecuada para realizar los ensayos con la línea celular de macrófagos, de tal forma que hubiera una densidad suficiente para el tiempo de ensayo seleccionado sin llegar a alcanzar la confluencia del cultivo. Al principio, el experimento se hizo con densidades celulares más bajas: 5.000, 10.000 y 15.000 cels/ml, pero el número de células que se observaron durante el tiempo del ensayo era demasiado bajo. Por ello, se realizó otra curva de crecimiento en la que se aumentaron las concentraciones iniciales de partida a 20.000, 25.000 y 30.000 cels/ml. Los resultados de esta curva de crecimiento se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Densidad celular de la línea celular de macrófagos J774A.1 las 24, 48, 72 y 96 horas en cultivo siendo la siembra inicial 20.000, 25.000 y 30.000 células/ml.

Tiempo en cultivo (horas)	Densidad celular (células/ml)		
0	20.000	25.000	30.000
24	11.250	16.250	23.750
48	47.500	55.000	95.000
72	281.250	337.500	388.750
96	888.750	968.750	1.016.250

Con estos valores se representó la curva de crecimiento utilizando el programa Excel que se observa en la Figura 7:

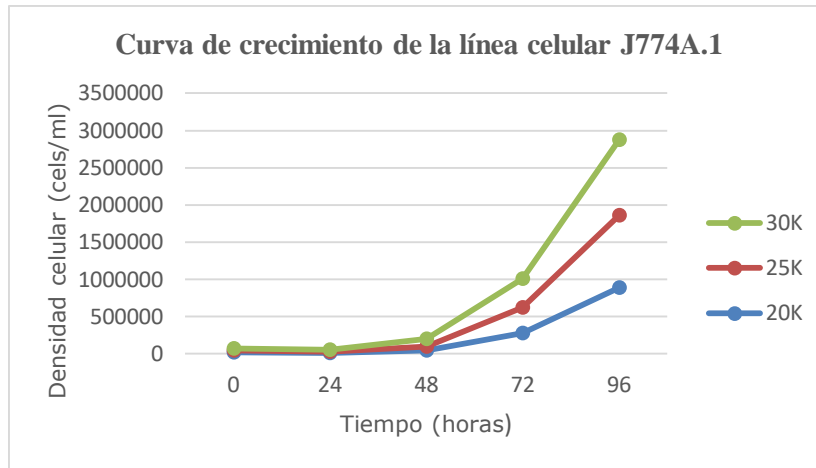


Figura 7. Curva de crecimiento de la línea celular de macrófagos J774A.1 a lo largo de 96 horas en cultivo (de lunes a viernes) tras la siembra inicial de 20.000, 25.000 y 30.000 cels/ml. Se llevó a cabo el recuento de las células a las 24, 48, 72 y 96 horas de iniciar el cultivo.

Como se puede observar en la gráfica de la Figura 7 se produce un aumento de la densidad celular de los macrófagos con el tiempo en cultivo en cada una de las tres curvas, siendo mayor en la que la concentración inicial es 30.000 cels/ml de, después en la de 25.000 cels/ml y por último en la de 20.000 cels/ml. Sin embargo, en las primeras 24 horas se observa que se reduce la densidad celular aproximadamente a la mitad (Tabla 1) Este resultado puede deberse a que parte de los macrófagos que se siembran mueren durante el proceso de adhesión a la superficie del frasco de cultivo debido a la manipulación a la que son sometidos (daño mecánico producido por el pipeteo repetitivo que se realiza para conseguir una suspensión celular homogénea). A las 48 horas, puede verse un aumento considerable del crecimiento, reflejado en una mayor pendiente en las tres curvas. Este aumento se debe a que el tiempo de duplicación de la línea celular J774A.1 es de 35 horas. A partir de este tiempo en cultivo se observa una mayor diferencia entre las curvas de crecimiento.

A la semana siguiente, se repitió la curva de crecimiento modificando en este caso las concentraciones iniciales a 15.000, 20.000 y 25.000 cels/ml ya que en el ensayo anterior se observaban a las 96 horas en cultivo, antes de raspar los pocillos, muchas células flotando que podrían indicar el sobrecrecimiento del cultivo en esas condiciones. Los resultados aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2. Densidad celular a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo de la línea celular de macrófagos J774A.1 tras la siembra inicial de 15.000, 20.000 y 25.000 cels/ml.

Tiempo en cultivo (horas)	Densidad celular (células/ml)		
0	15.000	20.000	25.000
24	7.500	10.000	12.500
48	37.500	53.750	66.250
72	152.500	160.000	202.500
96	736.250	862.500	1.130.000

Con estos datos se representó la curva de crecimiento que se observa a continuación en la Figura 8.

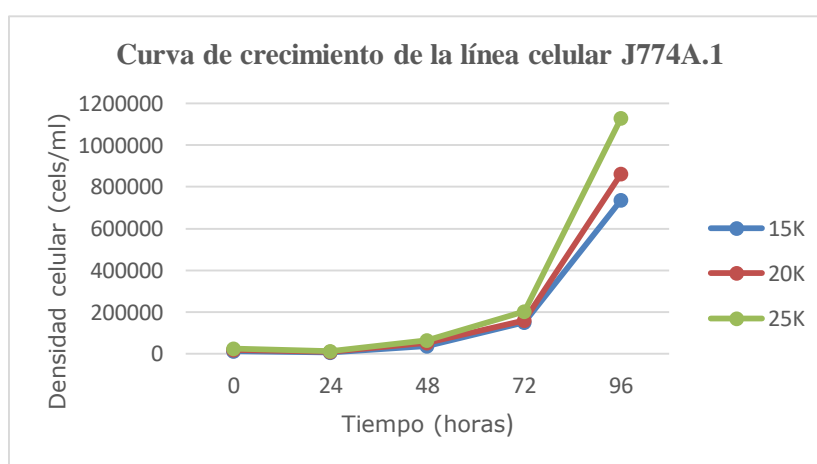


Figura 8. Curva de crecimiento de la línea celular de macrófagos J774A.1 a lo largo de 96 horas en cultivo (de lunes a viernes) tras la siembra inicial de 15.000, 20.000 y 25.000 cels/ml. Se llevó a cabo el recuento celular a las 24, 48, 72 y 96 horas de iniciar el cultivo.

En este ensayo se observa, para todas las densidades ensayadas, una disminución en el número de células a las 24 horas, reduciéndose en todas ellas prácticamente a la mitad de la densidad inicial. Esta disminución, como se señalaba en la curva de crecimiento anterior, se debe a la muerte de cierto número de células durante la siembra debido a la manipulación del cultivo. En cambio, a las 48 horas, coincidiendo con el tiempo que necesita el cultivo para multiplicarse (35 horas), la densidad de todos los cultivos aumenta 5 veces sobre la densidad observada a las 24 horas. A las 72 horas, las curvas de crecimiento son semejantes independientemente de la densidad celular. Sin embargo, a partir de este tiempo en cultivo, las curvas de crecimiento se separan mostrando una mayor proliferación la curva cuya densidad inicial era de 25.000 cels/ml, muestra en la que se observa células flotando antes de realizar el raspado. El análisis de estos resultados

ha permitido establecer las condiciones más idóneas para realizar un cultivo a 96 horas, siendo la densidad celular de macrófagos más adecuada, para estas placas de cultivo que tienen una superficie de crecimiento de 2 cm², de 20.000 céls/ml siendo el volumen de siembra 1 ml. De esta forma se establece que la siembra óptima de macrófagos J774A.1 es de 10.000 céls/cm² para un cultivo que se mantiene durante 96 horas. Este resultado es importante ya que permite comparar datos obtenidos en distintas áreas de crecimiento al mantener siempre constante la relación del número de células por cm², ya que muchas veces es necesario ensayar discos metálicos con diferentes diámetros.

3.3 Ensayo de biocompatibilidad de los materiales metálicos

Para evaluar la biocompatibilidad de materiales de CoCr y sus modificaciones superficiales con ErGO y con ErGOHA, se seleccionó el cultivo de macrófagos analizando la respuesta del cultivo después de 96 horas de exposición a los materiales. Para ello, se seleccionaron tres discos de cada tipo de material, para obtener los resultados a partir de un triplicado. Los discos, una vez esterilizados, como se ha descrito previamente en materiales y métodos, se pasaron a una placa p24 estéril. Los discos de CoCr, CoCrErGO y CoCrErGOHA se colocaron en los tres primeros pocillos de la segunda, tercera y cuarta columna de la placa, respectivamente. La primera columna solo contenía la suspensión de células, al igual que la quinta columna, que se utilizaron como control del ensayo (en ausencia de material). En la última columna se puso medio DMEM completo, sin células ni material a modo de blanco del ensayo. El esquema de la placa p24 se muestra en la Figura 9.

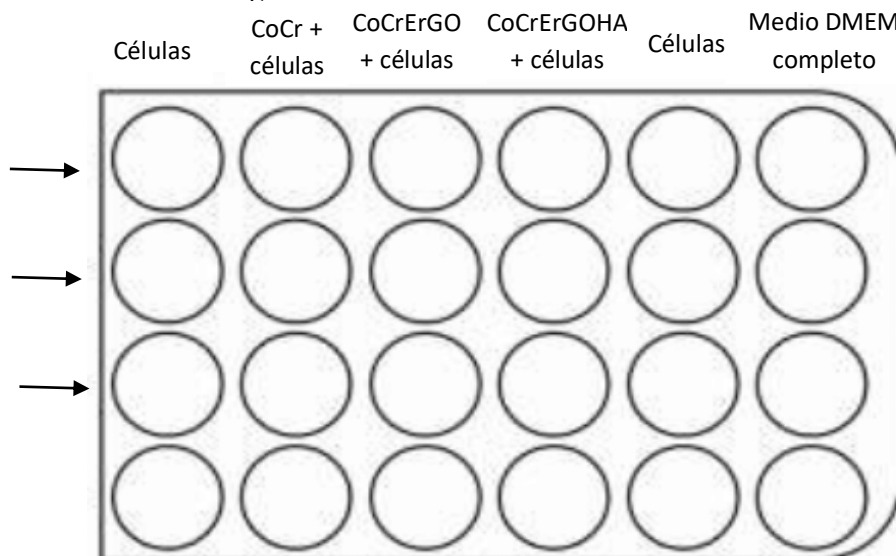


Figura 9. Esquema de la placa de 24 pocillos utilizada en el ensayo de biocompatibilidad de 96 horas de los materiales metálicos en la línea celular de macrófagos J774A.1. Se sembraron las células en contacto con discos de CoCr, CoCrErGO y CoCrErGOHA (columna 2, 3 y 4

respectivamente), las células sin material como control (columnas 1 y 5) y el medio DMEM completo sin células ni material como blanco (columna 6)

Los macrófagos que se sembraron en la placa para el ensayo, se obtuvieron a partir de un cultivo con una densidad inicial de 25.000 cels/ml que estuvo en cultivo durante 72 horas. Para ello, en el frasco en cultivo durante 72 horas se retiró el medio y se añadieron 5 ml de medio DMEM completo fresco, en el que se hizo el raspado de las células adheridas a la pared del frasco de cultivo con el “cell scraper”. Se pasaron a un tubo Falcon de 15 ml, se centrifugó 5 minutos a 1.200 rpm a 25 ° C y se retiró el sobrenadante cuidadosamente. A continuación, se añadieron 5 ml de medio DMEM completo y se resuspendió el pellet de células en este volumen. Por último, se cargaron en la cámara Neubauer 10 µl de la suspensión y se realizó el recuento celular. La densidad de este cultivo era de 360.000 cels/ml y se tomaron 1,11 ml para obtener un número total de 400.000 células. Ese volumen de la suspensión de células se pasó a un tubo Falcon de 50 ml y se añadió medio DMEM completo hasta alcanzar un volumen final de 20 ml, de esta forma se obtuvo una densidad celular de 20.000 céls/ml, que es la concentración que se ha visto en las curvas de crecimiento que resulta la más adecuada para realizar un cultivo durante 96 horas sin que se produzca un sobrecrecimiento del cultivo. A continuación, se realizó la siembra de 1 ml de la suspensión de macrófagos a 20.000 células/ml en los tres primeros pocillos de cada columna de la placa de cultivo p24, excepto en la última columna que se dejó vacía. Aunque no dio tiempo a evaluar los resultados por las circunstancias sanitarias derivadas del COVID-19 que impidieron seguir la experimentación programada, se podría asumir que los resultados estarían en la misma línea que los publicados por Escudero *et al.*, 2020. El ensayo publicado por Escudero *et al.*, 2020 muestra resultados a las a 72 horas de exposición a los materiales siendo en este trabajo sólo evaluado la respuesta de los macrófagos a materiales CoCr y CoCrErGO. Los autores de esta publicación valoraron la biocompatibilidad de las muestras metálicas de CoCr y CoCrErGO a partir del cociente de las actividades LDH/WST-1. Este cociente constituye un indicador de biocompatibilidad relacionando la muerte celular con la respiración celular. Los valores pequeños de dicho cociente indican la buena biocompatibilidad del material ensayado, reflejado en la viabilidad del cultivo. La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima importante de la ruta anaeróbica, que pertenece a la clase de las oxidorreductasas. Cataliza la reacción reversible de lactato a piruvato con la reducción de NAD^+ a NADH^+/H^+ . Se encuentra en todos los tejidos y sirve como punto de control de la gluconeogénesis y el metabolismo del ADN (Farhana y Lappin, 2020). Se localiza en el citoplasma y es rápidamente liberada al sobrenadante del cultivo celular cuando se produce un daño en la membrana plasmática, indicando la muerte celular (Pérez-Maceda *et al.*, 2017). El WST-

1 es una sal de tetrazolio disulfatada que puede ser utilizada para examinar la viabilidad celular, sin matar a las células. El WST-1 tras la reducción en la mitocondria produce un formazán altamente soluble en agua, que presenta un color rojo intenso, dando lugar a un aumento en la absorbancia a 490 nm. La solubilidad en agua lo convierte en una mejor opción que el ensayo MTT, que produce cristales de formazán altamente insolubles que se acumulan en el interior de las células, desembocando en una gran toxicidad. El WST-1 se ha empleado también en combinación con BrdU, nucleósido sintético que marca ADN naciente en células y tejidos, para detectar proliferación en células de músculo liso. (Holthaus *et al.*, 2013) (Yin *et al.*, 2014). La respiración celular medida mediante la reducción del reactivo WST-1, es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas (Pérez-Maceda *et al.*, 2017). Como se observa en la Figura 10, el cociente LDH/WST-1 aumenta con el tiempo de exposición al CoCr. Sin embargo, cuando los macrófagos eran expuestos a CoCrErGO, el valor de la relación LDH/WST-1 disminuye a partir de las 48 horas de exposición, observándose una disminución más acentuada cuando el tiempo de exposición aumenta hasta las 72, siendo su valor aproximadamente la mitad del valor observado con el CoCr sin recubrimiento (control). Estos resultados sugieren que el daño sobre la membrana plasmática del macrófago disminuye en presencia del recubrimiento con ErGO del CoCr, mejorando la biocompatibilidad del material en macrófagos.

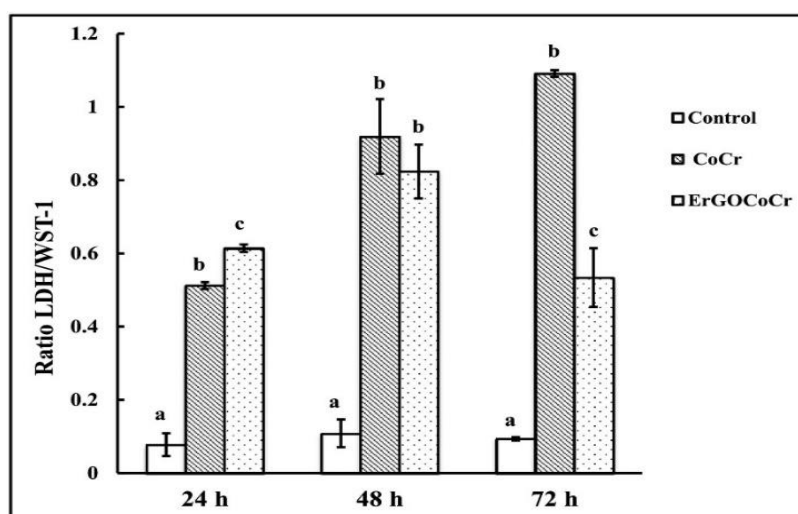


Figura 10. Efecto del CoCr y el CoCrErGO en la biocompatibilidad de los macrófagos J774A.1. Escudero, M. L., Llorente, I., Pérez-Maceda, B. T., San José-Pinilla, S., Sánchez-López, L., Lozano, R. M., ... & García-Alonso, M. C. (2020). Electrochemically reduced graphene oxide on CoCr biomedical alloy: Characterization, macrophage biocompatibility and hemocompatibility in rats with graphene and graphene oxide. *Materials Science and Engineering: C*, 109, 110522. Los macrófagos fueron cultivados en presencia de CoCr y de CoCrErGO y sin ningún material (control). Las barras etiquetadas con diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas y las barras etiquetadas con las mismas letras muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas.

Escudero et al observaron, en imágenes obtenidas en el microscopio óptico, diferencias en el patrón de distribución de los macrófagos sobre CoCr y CoCrErGO a las 48 horas en cultivo. Los macrófagos se agrupaban sobre el CoCr en determinadas áreas apareciendo las células agrupadas a modo de colonia, mientras que sobre el CoCrErGO la distribución de los macrófagos era homogénea y con una distribución regular en toda la extensión de la superficie del material. Además, al observarlas mediante el microscopio electrónico de barrido, las células sobre CoCr aparecían bastante redondeadas y con aspecto algodonoso, como si las células se estuviesen desintegrando mientras que sobre el CoCrErGO los macrófagos mantenían su volumen celular, su forma elongada y fusiforme observándose extensiones celulares que muy probablemente facilitan la adhesión de la célula a la superficie metálica. Todo esto indica que el recubrimiento con ErGO mejora la biocompatibilidad del CoCr favoreciendo el crecimiento de los macrófagos. También se realizó un análisis de la distribución de la vimentina, que es una de las proteínas que forman los filamentos intermedios en el interior de las células de muchos tejidos. La vimentina tiene las funciones de mantener la integridad celular, la resistencia al estrés mecánico y la posición de los orgánulos (*Ivaska et al.*, 2007). Se vio que en presencia de CoCr, los macrófagos no poseían apenas vimentina mientras que, en contacto con CoCrErGO, el patrón fluorescente de la proteína era el mismo que en ausencia de material. Los macrófagos al entrar en contacto con partículas de CoCr pueden producir y secretar la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), IL-8, IL-1 β y TNF- α (*Kaufman et al.*, 2008). Además de la secreción de citoquinas, pueden provocar apoptosis y citotoxicidad en los macrófagos. Los restos de CoCr pueden liberar cromo hexavalente que entra en el núcleo celular y se une al ADN. Se han detectado mayores niveles de TNF- α en presencia de iones Co²⁺ que de iones Cr³⁺, demostrando el mayor efecto estimulador del primer ión. Sin embargo, mediante la tinción “Trypan blue” y citometría de flujo se mostró que ambos iones pueden inducir la mortalidad de los macrófagos dependiendo de la dosis y el tiempo, observándose una disminución en el número de células al incrementar las concentraciones de los iones, especialmente a las 48 horas (*Catelas et al.*, 2003). El CoCr afecta a la expresión normal de vimentina, la cual es liberada por los macrófagos en entornos proinflamatorios (*Mor-Vaknin et al.*, 2003). A la vista de estos resultados, era esperable observar a mayor tiempo de exposición, como era el ensayo diseñado a 96 horas, un valor para la relación LDH/WST-1 menor a mayor tiempo de exposición al CoCrErGO y, por el contrario, un aumento en el valor de este cociente para el CoCr. Estos datos de haber sido medidos confirmarían los datos

publicados por Escudero *et al.*, 2020 y demostrarían la mejora en la biocompatibilidad del CoCr tras la modificación superficial con ErGO. Es esperable que la modificación adicional de la superficie del CoCrErGO con HA a concentraciones similares a las fisiológicas (3-4 mg/ml) mejore la resistencia a la corrosión del CoCr y afecte positivamente a la biocompatibilidad de los macrófagos a estos materiales, esperando que esta modificación suponga una mejora de los implantes metálicos de CoCr.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSIONES

- Los cultivos celulares de macrófagos J774A.1 han permitido establecer las condiciones necesarias para el mantenimiento de la línea celular de macrófagos, siendo seleccionada una densidad celular de 15.000 células/ml para cultivos de 96 horas y una densidad celular de 30.000 y 40.000 cels/ml para cultivos de 72 horas.
- Las curvas de crecimiento obtenidas de cultivos de macrófagos J774A.1 han permitido establecer las condiciones de cultivo más idóneas para realizar un cultivo a 96 horas, siendo la densidad celular de macrófagos más adecuada para estas placas de cultivo, con una superficie de crecimiento de 2 cm², de 20.000 cels/ml siendo el volumen de siembra 1 ml. Esta densidad resulta por tanto ser 10.000 células totales por cm² de superficie de crecimiento. Este resultado permite comparar resultados sobre distintas áreas de crecimiento de las distintas placas de cultivo celular, al mantener constante el número de células totales por unidad de superficie de crecimiento.
- Los resultados publicados por Escudero *et al* 2020 hacen que sea esperable que a mayor tiempo de exposición al CoCrErGO, como es las 96 horas de exposición, el valor de la relación LDH/WST-1 sea menor que lo observado a las 72 horas, lo que indicaría la mejora en la biocompatibilidad del CoCr tras la modificación superficial con ErGO. Este resultado señala la modificación superficial por ErGO del CoCr como estrategia para su uso como implantes.
- El efecto ErGOHA sobre los macrófagos ha quedado pendiente de estudio, pero se espera que a concentraciones similares a las fisiológicas (3-4 mg/ml) mejore la resistencia a la corrosión del CoCr y que esto afecte positivamente a la biocompatibilidad de los implantes.

CAPÍTULO 5 – BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, R., & García, A. J. (2015). Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Advanced drug delivery reviews*, 94, 53-62.

Agarwal, S., Labour, M. N., Hoey, D., Duffy, B., Curtin, J., & Jaiswal, S. (2018). Enhanced corrosion resistance and cytocompatibility of biomimetic hyaluronic acid functionalised silane coating on AZ31 Mg alloy for orthopaedic applications. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 29(9), 144. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6150-5>

Arpaçay, P., & Türkan, U. (2016). Development of antibiotic-loaded silk fibroin/hyaluronic acid polyelectrolyte film coated CoCrMo alloy. *Biomedizinische Technik. Biomedical engineering*, 61(5), 463-474. <https://doi.org/10.1515/bmt-2015-0061>

Badr, A., Sadighi, M., Asgharzadeh, H., & Rabizadeh, T. (2019). Enhancing the corrosion resistance of aluminum by graphene oxide and reduced graphene oxide films. *Materials Research Express*, 6(7), 075606.

Catelas, I., Petit, A., Zukor, D. J., Antoniou, J., & Huk, O. L. (2003). TNF-alpha secretion and macrophage mortality induced by cobalt and chromium ions in vitro-qualitative analysis of apoptosis. *Biomaterials*, 24(3), 383-391. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00351-4](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00351-4)

Chen, G. Y., Yang, H. J., Lu, C. H., Chao, Y. C., Hwang, S. M., Chen, C. L., ... & Hu, Y. C. (2012). Simultaneous induction of autophagy and toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide. *Biomaterials*, 33(27), 6559-6569.

Correa, M. D., & López, M. R. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*, 26(2), 73-86.

Dudek, I., Skoda, M., Jarosz, A., & Szukiewicz, D. (2016). The Molecular Influence of Graphene and Graphene Oxide on the Immune System Under In Vitro and In Vivo Conditions. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 64(3), 195-215. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0369-3>

Eliaz N. (2019). Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(3), 407. <https://doi.org/10.3390/ma12030407>

Escudero, M. L., Llorente, I., Pérez-Maceda, B. T., San José-Pinilla, S., Sánchez-López, L., Lozano, R. M., ... & García-Alonso, M. C. (2020). Electrochemically reduced graphene oxide on CoCr biomedical alloy: Characterization, macrophage biocompatibility and hemocompatibility in rats with graphene and graphene oxide. *Materials Science and Engineering: C*, 109, 110522.

Farhana, A., & Lappin, S. L. (2020). Biochemistry, Lactate Dehydrogenase (LDH). In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Feito, M. J., Diez-Orejas, R., Cicuéndez, M., Casarrubios, L., Rojo, J. M., & Portolés, M. T. (2019). Characterization of M1 and M2 polarization phenotypes in peritoneal macrophages after treatment with graphene oxide nanosheets. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 176, 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.063>

García-Argumán, A., Llorente, I., Caballero-Calero, O., González, Z., Menéndez, R., Escudero, M. L., & García-Alonso, M. C. (2019). Electrochemical reduction of graphene oxide on biomedical grade CoCr alloy. *Applied Surface Science*, 465, 1028-1036.

Glenske, K., Donkiewicz, P., Köwitsch, A., Milosevic-Oljaca, N., Rider, P., Rofall, S., Franke, J., Jung, O., Smeets, R., Schnettler, R., Wenisch, S., & Barbeck, M. (2018). Applications of Metals for Bone Regeneration. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 826. <https://doi.org/10.3390/ijms19030826>

Guarise, C., Barbera, C., Pavan, M., Pluda, S., Celestre, M., & Galesso, D. (2018). Dopamine-functionalized sulphated hyaluronic acid as a titanium implant coating enhances biofilm prevention and promotes osseointegration. *Biofouling*, 34(7), 719-730. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1491555>

He, H., Klinowski, J., Forster, M., & Lerf, A. (1998). A new structural model for graphite oxide. *Chemical physics letters*, 287(1-2), 53-56.

Holthaus MG, Treccani L, Rezwan K. Osteoblast viability on hydroxyapatite with well-adjusted submicron and micron surface roughness as monitored by the proliferation reagent WST-1. *J Biomater Appl.* 2013;27:791–800. doi: 10.1177/0885328211426354.

Ivaska, Johanna, et al. "Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling." *Experimental cell research* 313.10 (2007): 2050-2062.

Kastellorizios, M., Tipnis, N., & Burgess, D. J. (2015). Foreign body reaction to subcutaneous implants. In *Immune Responses to Biosurfaces* (pp. 93-108). Springer, Cham.

Kaufman, A. M., Alabre, C. I., Rubash, H. E., & Shanbhag, A. S. (2008). Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr, and alumina particles: analysis of multiple cytokines using protein arrays. *Journal of biomedical materials research Part A*, 84(2), 464-474.

Luo, Y., Peng, J., Huang, C., & Cao, Y. (2020). Graphene oxide size-dependently altered lipid profiles in THP-1 macrophages. *Ecotoxicology and environmental safety*, 199, 110714. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110714>

Ma, J., Liu, R., Wang, X., Liu, Q., Chen, Y., Valle, R. P., ... & Liu, S. (2015). Crucial role of lateral size for graphene oxide in activating macrophages and stimulating pro-inflammatory responses in cells and animals. *Acs Nano*, 9(10), 10498-10515.

Mor-Vaknin, N., Punturieri, A., Sitwala, K., & Markovitz, D. M. (2003). Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nature cell biology*, 5(1), 59-63.

Ni, J., Ling, H., Zhang, S., Wang, Z., Peng, Z., Benyshek, C., Zan, R., Miri, A. K., Li, Z., Zhang, X., Lee, J., Lee, K. J., Kim, H. J., Tebon, P., Hoffman, T., Dokmeci, M. R., Ashammakhi, N., Li, X., & Khademhosseini, A. (2019). Three-dimensional printing of metals for biomedical applications. *Materials today. Bio*, 3, 100024. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2019.100024>

Oliver, J. N., Su, Y., Lu, X., Kuo, P. H., Du, J., & Zhu, D. (2019). Bioactive glass coatings on metallic implants for biomedical applications. *Bioactive materials*, 4, 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.09.002>

Ou, L., Lin, S., Song, B., Liu, J., Lai, R., & Shao, L. (2017). The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *International journal of nanomedicine*, 12, 6633–6646. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140526>

Park, J. B., Duong, C. T., Chang, H. G., Sharma, A. R., Thompson, M. S., Park, S., Kwak, B. C., Kim, T. Y., Lee, S. S., & Park, S. (2014). Role of hyaluronic acid and phospholipid in the lubrication of a cobalt-chromium head for total hip arthroplasty. *Biointerphases*, 9(3), 031007. <https://doi.org/10.1116/1.4886255>

Pérez-Maceda, B. T., López-Fernández, M. E., Díaz, I., Kavanaugh, A., Billi, F., Escudero Rincón, M. L., ... & Lozano, R. M. (2017). Osteoblasts MC3T3-E1 response in 2D and 3D cell cultures models to high carbon content CoCr alloy particles. Effect of metallic particles on vimentin expression.

Radice, S., Yao, J., Babauta, J., La urent, M. P., & Wimmer, M. A. (2019). The effect of hyaluronic acid on the corrosion of an orthopedic CoCrMo-alloy in simulated inflammatory conditions. *Materialia*, 6, 100348. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2019.100348>

Wang, K., Ruan, J., Song, H., Zhang, J., Wo, Y., Guo, S., & Cui, D. (2011). Biocompatibility of Graphene Oxide. *Nanoscale research letters*, 6(1), 8. <https://doi.org/10.1007/s11671-010-9751-6>

Yin, L. M., Wei, Y., Wang, W. Q., Wang, Y., Xu, Y. D., & Yang, Y. Q. (2014). Simultaneous application of BrdU and WST-1 measurements for detection of the proliferation and viability of airway smooth muscle cells. *Biological research*, 47(1), 75. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-75>

Zhang, L., & Wang, C. C. (2014). Inflammatory response of macrophages in infection. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 13(2), 138-152.

Zhu, Y., Murali, S., Cai, W., Li, X., Suk, J. W., Potts, J. R., & Ruoff, R. S. (2010). Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. *Advanced materials*, 22(35), 3906-3924.