



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a  
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

### OSASUN ZIENTZIAK

**Proteinetan oinarritutako  
biomaterialen  
biobateragarritasunaren eta  
egokitasunaren azterketa  
kornearako ordezkoen edo  
matrizeen hautagai potentzial gisa**

*Cristina Romo-Valera, Jon Arluzea  
eta Noelia Andollo*

185-192 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.04.23>



# Proteinetan oinarritutako biomaterialen biobateragarritasunaren eta egokitasunaren azterketa kornearako ordezkoen edo matrizeen hautagai potentzial gisa

Romo-Valera, C.<sup>1</sup>, Arluzea, J.<sup>1</sup>, Andollo, N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zelulen biologia eta Histologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU)

<sup>2</sup>Begiker, Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketa Institutua

cristinaromol@gmail.com

## Laburpena

Azterketa honetan kornearako matrizeak garatzeko baliagarriak izan daitezkeen proteinetan oinarritutako lau biomaterialen egokitasun optikoa, biodegradagarritasuna eta biobateragarritasun zelularra ebaluatu ditugu. Kolagenoa, soja proteina isolatua (SPI) eta laktosa edo azido zitrikoarekin erretikulatutako gelatinak izan dira aztertutako filmen lehengaiak. Propietate optikoen eta degradagarritasunaren ebaluazioek kornea ehunaren eskakizunak bete daitezkeela eta biomaterialek degradazio profil progresiboa dutela erakutsi dute. Gainera, 3T3 fibroblastoeekin eta HCE korneako zelula epitelialekin egindako bideragarritasun, atxikipen eta migrazio azterketek zelulen portaera egokia baieztatu dute. Hala, material hauek korneako inplanteak zein korneako zelulentzako euskarriak garatzeko etorkizun handiko materialak izan daitezkeela frogatu dugu.

**Hitz gakoak:** Kornearako matrizeak, Kolagenoa, Gelatina, Soja proteina isolatua (SPI)

## Abstract

*The current study has focused on the in vitro assessment of protein-based biomaterials that could be a potential source for corneal scaffolds. Collagen, soy protein isolate (SPI) and gelatin films cross-linked with lactose or citric acid were prepared and transmittance and degradation measurements were carried out. In vitro cytotoxicity, cell adhesion and migration studies were performed with human corneal epithelial cells (HCE) and 3T3 fibroblasts to assess the biocompatibility of the films. Transmittance values met the needs of the cornea and the degradation profile revealed a progressive decomposition of the biomaterials. Cell viability at 72 h was above 70% when exposed to SPI and gelatin films. Adhesion analysis demonstrated the adhesion of both cell types to the films, with a similar arrangement to that observed in controls. Besides, both cell lines were able to proliferate and migrate over the films. These results demonstrated that the studied biomaterials could be potential alternatives applicable in corneal bioengineering.*

**Keywords:** Corneal scaffolds; Collagen; Gelatin; Soy protein isolate (SPI)

## 1. Sarrera eta uneko egoera

Lesio edo traumatismo handi bat jasaten dugunean, ehunei eragiten zaien kalteak hauek duten sendatze-gaitasuna gaintzen du zenbait kasutan. Ondorioz, transplanteak egitea beharrezkoa bilakatzen da ehunek beren funtzioa berrezartzeko. Hala ere, eskatzaileen eta emaitzen arteko desoreka handiek eta ehun-mentuen errefusatzearekin erlazionatutako arazo posibleek irtenbide alternatiboak bilatzea ekarri dute. Ehunen ordezkoei berrien bilaketa honetan biomaterialen merkatua eta potentziala sartzeko jokoan, 2021erako 150 mila milioi dolarretik hurbil daudela estimatzen delarik (Chawla, 2018).

Ehun-ingeniaritzaren alorra biomaterialen aplikagarritasunak emaitza kliniko baliotsuak ekar ditzakeen eremu bat da, non osagai natiboak eta zelulaz kanpoko matrizearen egitura antzeratzea helburu duten, zelulen hazkuntza eta ondorengo ehunen birsorkuntza sustatzeko. Hala, proteinetan oinarritutako materialak dira esku-garri dauden aukeretako batzuk. Kolagenoa ehun iturri batetik eratorritako proteina interesgarrietako bat da,

zelulaz kanpoko matrizeko proteina ugariena baita (Cen *et al.*, 2008). Ikerketa honetan txerri-larruzaletik ateratako kolagenoa erabili dugu. Biodegradagarriak, biobateragarriak, oso moldagarriak edo erraz eskuratzeko modukoak izateagatik, kolagenoa eta kolagenotik eratorritako materialen erabilera asko handitu da ehun-ingeniaritzako aplikazioetan (Matthyssen *et al.*, 2018).

Gelatina kolagenoaren desnaturalizazio partzialetik eratorritako proteina bat da, animali espezie guztien larrazal, hezur edo ehun konektibotik lortu daitekeena (Kariduraganavar *et al.*, 2014). Bere biobateragarritasunak, filmen formakuntza-gaitasunak eta biodegradagarritasunak medikuntza birsortzailean biomaterial gisa erabiltzeko aukera egokia bihurtzen dute. Era berean, polimero honen arginina-glizina-aspartiko sekuentziek zelulen atzema-tea errazten dute eta aminoazidoen talde funtzionalek material honen eraldaketa estrukturala ahalbidetzen dute, baita hidrogelen eraketa erraztu eta ur-bolumen handiak xurgatzeko gaitasuna ere. Gainera, erabilitako erretikulazio-agenteen arabera, propietate mekaniko bereziak dituen material bat lortu daiteke. Lan honetan, gelatina bi osagairekin erretikulatu dugu: laktosarekin, Maillard erreakzioaren bitartez (Etxabide *et al.*, 2018), edo azido zitrikoarekin, zeinek amino loturak sortzen dituen gelatinaren talde aminoen eta azidoaren talde karboxilikoaren artean (Najafpour, 2007).

Landareetatik eratorritako materialak ere badaude. Soja-proteinak adibidez ezaugarri onberak ditu arlo biomedikoan aplikatzeko. Zehazki, soja-proteina isolatua (SPI), soja-irinetik lortutakoa, fisikoki eta kimikoki eralda daiteke edo beste polimero batzuekin konbinatu amino eta hidroxilo taldeen bidez (Tansaz eta Boccaccini, 2016). Gainera, soja-proteinak dituen isoflabonen kopuru altuak efektu antiinflamatorio eta antioxidatzaileak ditu zauriak sendatzeko (Santin *et al.*, 2007).

Ehun-ingeniaritzaren alor honetan, korneako inplanteen garapena gaur egungo ikerketa askoren helburu bihurtu da (Hancox *et al.*, 2020) (Isaacson *et al.*, 2018) (Jumelle *et al.*, 2021) (Rico-Sánchez *et al.*, 2019) (Wang *et al.*, 2017) (McTiernan *et al.*, 2020). Jatorrizko kornea-ehuna ordeztuko luketen biomaterialen diseinuek arreta handia jaso dute azken urteotan, kornea emailen eskasia, itxarote-zerrenda luzeak zein mentuen errefusa gainditzeko iturri izan baitaitezke.

## 2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa honen helburu nagusia ehun eta landare-jatorriko material ezberdinen (kolagenoa, soja proteina isolatua (SPI), gelatina-laktosa (GEL-LAC) eta gelatina-azido zitrikoa (GEL-CA)) egokitasun optikoa, biodegradagarritasuna eta biobateragarritasun zelularra ebaluatzea izan da, korneako zelulen euskarri gisa erabili daitezkeen.

Horretarako, zelulen ugaltze, atxikidura eta migrazio prozesuak *in vitro* aztertu dira HCE korneako zelula epitelial zein 3T3 fibroblastoekin.

## 3. Ikerketaren muina

### 3.1. Materialak eta metodoak

#### 3.1.1. Filmene ebaluazio fisiko-kimikoa

Propietate optikoen ebaluazioa filmek argia transmititzeko duten gaitasunaren eta hauen gardentasunaren bitartez gauzatu dugu. Alde batetik filmene argi xurgapena neurtu dugu espektro ikusgarrian (400-800 nm) eta bestetik, filmeetatik 12 cm-ko distantziara kokaturiko eredu fotografiko zehatzak analizatu ditugu gardentasuna kualitatiboki neurtzeko.

Biomaterialen degradazio maila degradazio hidrolitiko eta entzimatiakoaren ondorioz film bakoitzak jasandako pisu galera erregistratuz neurtu dugu. Filmak kolagenasa entzima, PBS edo ur destilatuko soluzioetan mantendu ditugu denbora tarte desberdinetan (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h eta 24 h). Ondoren, laginak soluzioetatik atera, liofilizatu eta pisatu ditugu.

#### 3.1.2. Filmene ebaluazio biologikoa

Materialen zitotoxikotasuna frogatzeko MTT entsegu kolorimetroan oinarritu gara. 3T3 fibroblastoak eta HCE korneako zelula epitelialak film ezberdinekin kultibatu ditugu 0, 24, 48 eta 72 orduz.

Zelulen atxikidura eta filmene egokitasuna 3T3 eta HCE zelulak filmene gainean 24, 48 eta 72 orduz kultibatuz aztertu dugu. Hala, 3 metodo ezberdinetan oinarritu gara: alde batetik fase kontrasteko mikroskopioaren bitartez; bestetik Kaltzeina- Etidio 1 homodimero testaren bitartez, zeinak zelula bizi (berdez) eta hilak (gorriz) bereizteko

aukera ematen duen fluoreszentiako mikroskopia erabiliz; eta azkenik ekorkuntz mikroskopia erabiliz, zelula eta filmen gainazalaren arteko atxikidura zehaztasunez ikusteko.

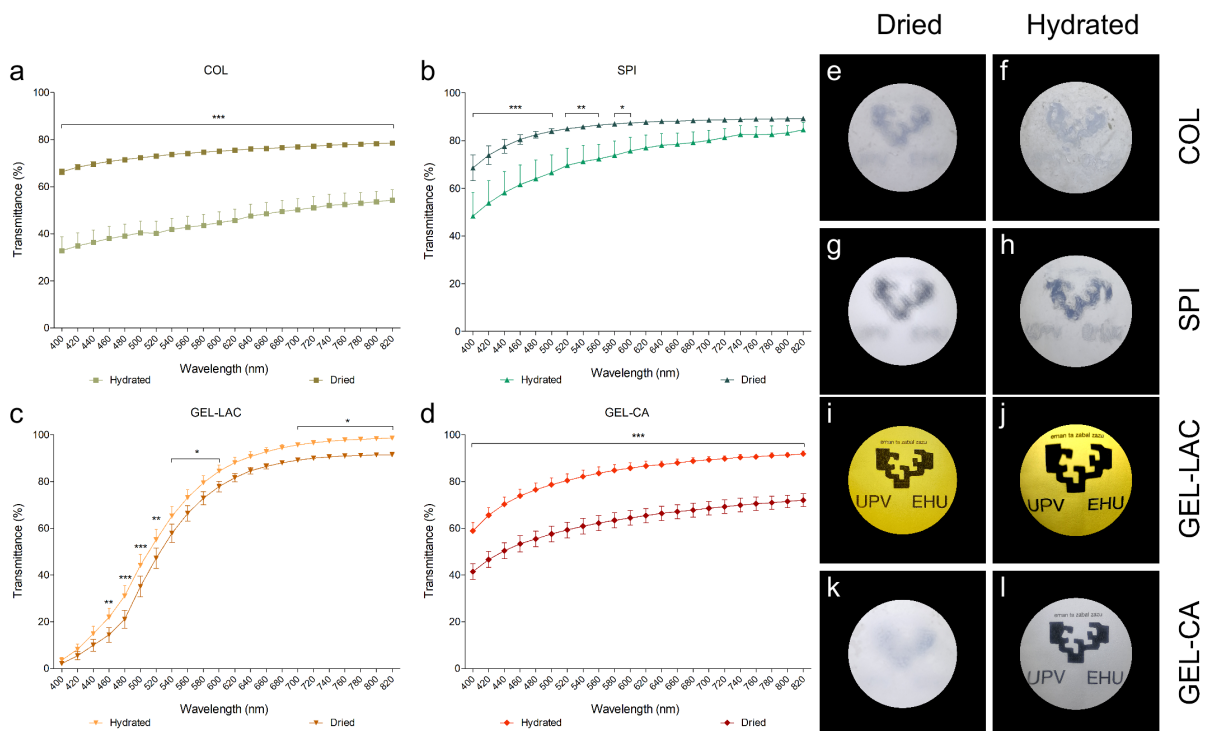
Azkenik, bi zelula motek filmen gainean migratzeko eta mugitzeko gaitasuna 24, 48 eta 72 orduz ere aztertu dugu. Proba hau filmetan zelulaz estali gabeko hutsune bat utziz eta zelulek hutsune hori betetzeko behar duten denbora erregistratuz gauzatu dugu.

### 3.2. Emaizak

#### 3.2.1. Filmek ebaluazio fisiko-kimikoa

Espectro ikusgarri osoa kontuan hartuz, kolageno eta SPI-z egindako filmek transmisio-balio baxuenak erakutsi zituzten, hidratatutako filmak zeharrargiagoak zirelarik. Nahiz eta kolageno eta SPI-z egindako lagin hidratatuak argiaren %60-80 a transmititu espektro ikusgarrian, ez zuten gardentasun egokirik aurkeztu ez forma hidratatua ezta forma lehorrean, distantzia batera kokatutako objektuak ezin baitziren ondo bereiztu. Gelatinaz egindako filmek, buztiek zein lehorrek, transmisio balio altuagoak eta gardentasun egokiagoa aurkeztu zuten. GEL-LAC materialak gainera, UVA izpien aurkako efektu babeslea erakutsi zuen, eskualde honetako argi erradiazioa xurgatzeko gai baitzen (400-500 nm). Material berdinean, forma lehor eta hidratatuaren arteko argi-transmisio eta gardentasunaren hobekuntzarik handiena GEL-CA filmak aurkeztu zuen (1 irudia).

**1. irudia:** Film ezberdinen argi transmisioa (a, b,c eta d grafikoak) eta gardentasun ezberdintasunak (e-l irudiak). Datuek argi transmisio portzentaia adierazten dute. Estatistikoki esanguratsuak diren desberdintasunak film bakoitzaren forma hidratatu eta lehorrean arteko desberdintasunei dagokie (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ;  $n \geq 3$ ). Gardentasuna aztertzeko erabilitako irudiak eredu berera egokituta eta baldintza berdinekin ateratakoak dira.

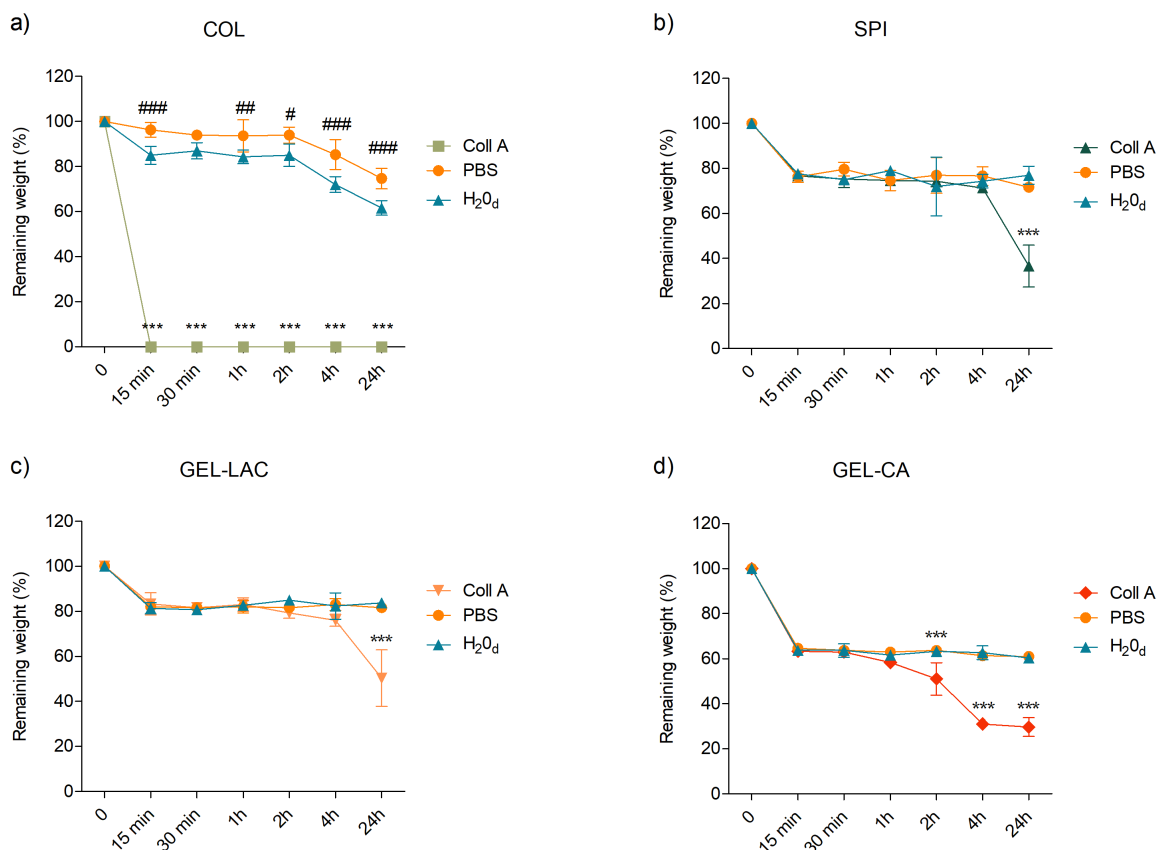


Beraz, gardentasuna izango balitz kezkarik handiena, gelatina filmak izango lirakeke hautagai egokienak, laktosarekin erretikulatutakoak bereziki eguzki izpien aurkako babes gehiagarri bat eskeiniko ligukeelako.

Degradagarritasunaren haritik, erretikulazio motaren efektua argi ikusi genuen: fisikoki erretikulatutako filmak, kolagenoz eta SPI-z egindakoak kasu, azkarrago degradatu ziren kimikoko erretikulatutako gelatinak baino. Erreakzio kimikoen bidez erretikulatutako gelatinetan arreta jarritz, erreakzio kimiko motak gelatina filmeetan ere

eragina izan zuen. 24 orduren ostean, GEL-LAC filmaren %50 a degradatu gabe mantendu zen, GEL-CA filmean ordean hasierako pisuaren %40 baino gutxiagok egin zion aurre degradazioari (2 irudia). Emaitza hauek agerian jarri zuten erretikulazio agenteen garrantzia, filmen degradazio tasak neurtzeko modua eta denbora.

**2. irudia: Film ezberdinen degradazio entzimatikoa (kolagenasa A entzima) eta hidrolitikoaren (PBS eta ur destilatua) profilak 37°C-tan. Ur destilatua utzitako filmak kontrol gisa erabili genituen. Estatistikoki esanguratsuak diren desberdintasunak soluzio entzimatikoa edo PBS eta ur destilatua arteko desberdintasunei dagokie (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001; n ≥ 3).**

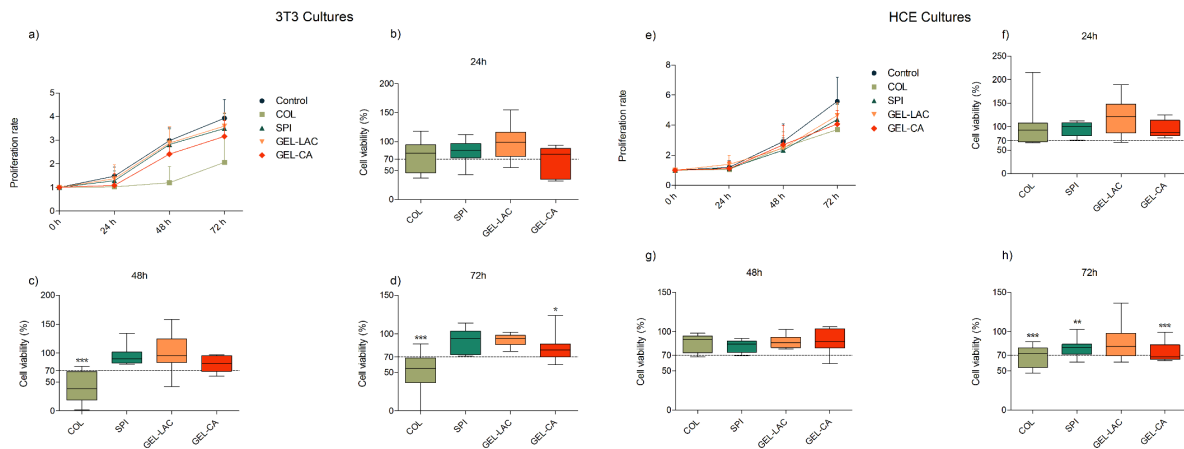


Kasu honetan, kornea-ehuna ordeztzeko material egoki batek begiko entzimen degradazio mekanismo progresiboari aurre egin beharko lieke ehuna birsortu eta ehun osasuntsuarekin integratzeko behar duen denboran.

### 3.2.2. Filmek ebaluazio biologikoa

MTT analisien bidez SPI eta gelatina filmen biobateragarritasuna frogatu genuen bi zelula motekin. Kolagenozko filmak ordea zelulentzat kaltegarritzat jo ziren, %70 baino baxuagoko bideragarritasun balioak lortu baitziren. Kontrolekin alderatuta, 72 ordutara egindako erregistroek estatistikoki alde esanguratsuak erakutsi arren, kontuan eduki behar dugu kultibo-inguruneak ez genituela denbora-tarte horretan aldatu. Baldintza hau ez litzateke egoera erreal batean gertatuko, non malkoak eta begien kliskak ingurunea etengabe berrituko luketen (3 irudia).

**3. irudia: Material ezberdinek 3T3 (a-d) eta HCE (e-h) zelulen biobideragarritasunean eta proliferazioan izandako eragina 24, 48 eta 72 ordutan. Materialik gabeko kultibo zelularrak kontrol gisa jarri genituen. Estatistikoki esanguratsuak diren desberdintasunak material bakoitzarekin kultibatutako zelulen eta kontrolen arteko desberdintasunei dagokie (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; n ≥ 3).**



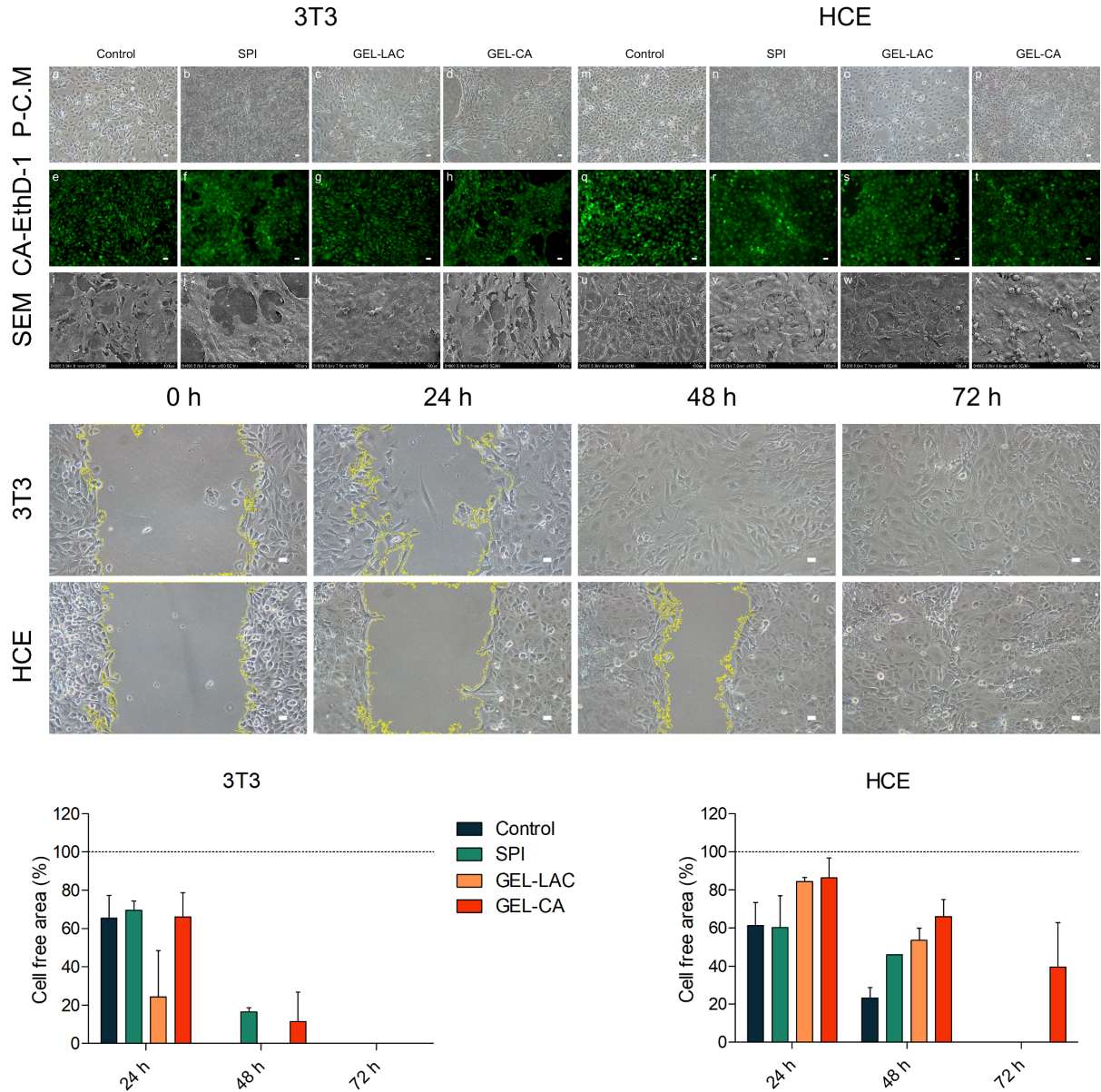
SPI eta gelatinazko filmetan ereindako 3T3 zelulek kontrolaren antzeko morfologia adarkatu eta bi/multipolarra erakutsi zuten. Halaber, HCE-en ohiko morfologia GEL-LAC filmetan erregistratu zen. SPI eta GEL-CA filmeetan hazitako HCE zelulek ordea, forma biribilagoa eta estuagoa aurkeztu zuten ( a-d eta m-p 4 irudia).

Kaltzeina-Etidio 1 homodimero probari dagokionez, hildako zelula gutxi ikusi genituen 24, 48 eta 72 orduz filmen gainean ereindako bi zelula moten kultiboetan (e-h eta q-t 4 irudia). Ekorkuntz mikroskopio elektronikoko irudietan 3T3 zelulen antolaketa oso laua ikusi genuen, HCE zelulak antolaketa estratifikatu bat aurkezten zutelarik. Lagin ezberdinen artean ez zen alde morfologiko esanguratsurik hauteman (i-l eta u-x 4 irudia).

Migrazioari erreparatuz, bi zelula motek film ezberdinetan migratzeko gaitasuna erakutsi zuten. Bi kasuetan, GEL-CA filmen gaineko zelulek denbora gehiago behar izan zuten filmetako hutsuneak ixteko, dena den, kultibo zelular guztiak zelula libreko eremuak bete zituzten 72 ordutan (4 irudia).

Bi zelula-motetako bat bera ere ez zen kolageno filmetan itsatsi eta ondorioz, ezin izan genuen bideragarritasun testik eta migrazio testik egin ezta mikroskopiotik irudiak atera.

4. irudia: 3T3 eta HCE zelulen atxikidura eta migrazio proben emaitzak. a-x irudiek frogatutako filmen gaineko kultibo zelularrak erakusten dituzte (a-d eta m-p fase-contrasteko mikroskopiotik ateratako irudiak; e-h eta q-t Kaltzeina- Etidio 1 homodimero testaren emaitzen irudiak; i-l eta u-x ekorkuntz mikroskopia erabiliz ateratako irudiak). Bestetik, 3T3 eta HCE zelulek GEL-LAC filmaren gaineko migrazioaren eboluzioa ikus daiteke. Azkenik, grafikek zelula mota bakoitzak film mota bakoitzean egindako hutsuneak ixteko izandako eboluzioa adierazten dute.



## 4. Ondorioak

Azterketa honetan egindako *in vitro* ebaluazio biologikoak baitezatu duenez, azterketapean egondako 4 film ezberdinetatik 3-k korneako zelulaz kanpoko matrizeak zein korneako zelulen euskarri diren egiturak garatzeko material gisa balio dute.

Kolagenozko filmekin lorturako emaitza desegokiek kolageno zuntzen aurre tratamenduarekin dute zerikusia, emaitza hauek ez zaizkio lehengaiari berari egotzi.

Nahiz eta propietate biologiko egokiak erakutsi, soja proteina isolatuz egindako filmak ez lirateke kornea zentralen txertatzeko aukerarik egokiena izango, ez baitute argitasun eta definizio optiko egokia aurkeztu. Hala ere, kornea periferikorako edo beste ehun baten euskarriak garatzeko balio lezakete.

Laburbilduz, gelatinazko filmek aurkeztu dituzte propietate egokienak kornea ehuna ordeztuko lituzketen euskarriak garatzeko, laktosarekin erretikulatutako filmek bereziki, propietate optiko eta biologiko onak erakutsi baituzte.

## 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Azterketa honek lehen ebaluazio biologiko gisa balio izan badu ere, biomaterial hauek kornea-ehuna ordeztuko erakutsi duten potentzialak hauen inguruko azterketa sakonago bat egitera bultzatzen dute. Hala, azken helburua biomaterial hauek korneako inplante zein matrizeetan erabili ahal izatea da.

## 6. Erreferentziak

- Cen, Lian, Wei Liu, Lei Cui, Wenjie Zhang, eta Yilin Cao. 2008. Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. *Pediatric Research* 63.492–496.
- Chawla, Kanika. 2018. *Biomaterials for Tissue Engineering*, volume 1758 of *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York.
- Etxabide, A, R D C Ribeiro, P Guerrero, A M Ferreira, G P Stafford, K Dalgarno, K de la Caba, eta P Gentile. 2018. Lactose-crosslinked fish gelatin-based porous scaffolds embedded with tetrahydrocurcumin for cartilage regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules* 117.199–208.
- Hancox, Zoe, Saeed Heidari Keshel, Safiyya Yousaf, Morvarid Saeinasab, Mohammad-Ali Shahbazi, eta Farshid Sefat. 2020. The progress in corneal translational medicine. *Biomaterials Science* 8.6469–6504.
- Isaacson, Abigail, Stephen Swioklo, eta Che J Connon. 2018. 3D bioprinting of a corneal stroma equivalent. *Experimental eye research* 173.188–193.
- Jumelle, Clotilde, Ehsan Shirzaei Sani, Yukako Taketani, Ann Yung, Fanny Gantin, Sunil K Chauhan, Nasim Annabi, eta Reza Dana. 2021. Growth factor-eluting hydrogels for management of corneal defects. *Materials Science and Engineering: C* 120.111790.
- Kariduranavar, Mahadevappa Y, Arjumand A Kittur, eta Ravindra R Kamble. 2014. Chapter 1 - Polymer Synthesis and Processing. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, ed. by Sangamesh G Kumbar, Cato T Laurencin, eta Meng Deng, 1–31. Oxford: Elsevier.
- Matthyssen, Steffi, Bert Van den Bogerd, Sorcha Ní Dhubbghaill, Carina Koppen, eta Nadia Zakaria. 2018. Corneal regeneration: A review of stromal replacements. *Acta Biomaterialia* 69.31–41.
- McTiernan, Christopher D, Fiona C Simpson, Michel Haagdorens, Chameen Samarawickrama, Damien Hunter, Oleksiy Buznyk, Per Fagerholm, Monika K Ljunggren, Philip Lewis, Isabel Pintelon, David Olsen, Elle Edin, Marc Groleau, Bruce D Allan, eta May Griffith. 2020. LiQD Cornea: Pro-regeneration collagen mimetics as patches and alternatives to corneal transplantation. *Science Advances* 6.
- Najafpour, Ghasem D. 2007. CHAPTER 12 - Production of Citric Acid. In *Biochemical Engineering and Biotechnology*, ed. by Ghasem D Najafpour, 280–286. Amsterdam: Elsevier.
- Rico-Sánchez, Laura, Ingrid Garzón, Miguel González-Andrades, Antonio Ruíz-García, Miriam Punzano, Antonio Lizana-Moreno, Jose Ignacio Muñoz-Ávila, María Del Carmen Sánchez-Quevedo, Juliana Martínez-Atienza, Luis Lopez-Navas, Rosario Sanchez-Pernaute, Roke Iñaki Oruezabal, Santiago Medialdea, María Del Carmen Gonzalez-Gallardo, Gloria Carmona, Sara Sanbonmatsu-Gámez, Matías Perez, Pilar Jimenez, Natividad Cuende, Antonio Campos, eta Miguel Alaminos. 2019. Successful development and clinical translation of a novel anterior lamellar artificial cornea. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 13.2142–2154.
- Santin, Matteo, Christopher Morris, Guy Standen, Luigi Nicolais, eta Luigi Ambrosio. 2007. A New Class of Bioactive and Biodegradable Soybean-Based Bone Fillers. *Biomacromolecules* 8.2706–2711.



Tansaz, Samira, eta Aldo R Boccaccini. 2016. Biomedical applications of soy protein: A brief overview. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 104.553–569.

Wang, Siran, Chiara E Ghezzi, Rachel Gomes, Rachel E Pollard, James L Funderburgh, eta David L Kaplan. 2017. In vitro 3D corneal tissue model with epithelium, stroma, and innervation. *Biomaterials* 112.1–9.

## **7. Eskerrak eta oharrak**

- BIOMAT (Biopolymeric Materials) taldeari (Gipuzkoako Ingeniaritza eskola EHU) filmen produkzio eta karakterizazioagatik.
- Egileek, SGIkerren (UPV/EHU/ FEDER, EU) mikroskopia analitikoan eta elektronikoan emandako laguntza tekniko eta giza babesa eskertzen dituzte.