(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 859 424**

(51) Int. CI.:

G01N 33/50 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2017 PCT/ES2017/070365**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2017 WO17207845**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2017 E 17805927 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020 EP 3467118**

(54) Título: **Método para evaluar la citotoxicidad de sustancias químicas**

(30) Prioridad:

30.05.2016 ES 201630708

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2021

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)
Plaza de Santa Cruz 5 bajo
47002 Valladolid, ES

(72) Inventor/es:

SRIVASTAVA, GIRISH KUMAR;
ALONSO ALONSO, Mª LUZ;
FERNÁNDEZ BUENO, IVÁN;
GARCÍA GUTIÉRREZ, Mª TERESA;
COCO MARTÍN, ROSA Mª y
PASTOR JIMENO, JOSÉ CARLOS

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para evaluar la citotoxicidad de sustancias químicas

La presente invención se encuadra dentro del campo de la sanidad y la citotoxicología, más específicamente dentro de los métodos de evaluación de la bioseguridad y biocompatibilidad de productos químicos, especialmente, de aquellos que contienen compuestos altamente volátiles, que son empleados preferiblemente en la práctica clínica por encontrarse incluidos en productos biosanitarios.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los productos sanitarios químicos se utilizan ampliamente en la práctica clínica. Estos productos están contacto directo, o indirecto, con el cuerpo humano y reaccionan con el ambiente y con las zonas del cuerpo donde se aplican. Aunque puedan tener propiedades mecánicas, físicas y químicas adecuadas para determinadas aplicaciones médicas, deben mostrar que también tienen una buena biocompatibilidad, y por tanto demostrar que son seguros para su uso en la práctica clínica (Directiva 93/42/CEE del Consejo, de 14 de junio de 1993, relativa a los productos sanitarios), ya que durante su uso pueden entrar en contacto directo, o indirecto, con células y tejidos del cuerpo humano.

Así, el diseño de una estrategia para evaluar la biocompatibilidad y la seguridad de la aplicación de un producto sanitario es siempre un tema de interés que preocupa a las autoridades certificadoras de cualquier país. Las normas internacionales para los productos sanitarios (ISO 10993) proporcionan una serie de directrices al respecto. Siguiendo estas normas, los productos sanitarios se someten a una serie de rigurosas pruebas de biocompatibilidad, que incluyen, entre otras, análisis de citotoxicidad, sensibilización, irradiación intradérmica y toxicidad sistémica aguda.

Los estudios de citotoxicidad son un primer indicador de biocompatibilidad, y por tanto, del nivel de seguridad del producto sanitario (Li, W., Zhou, J. & Xu, Y. 2015, Biomedical Reports, vol. 3, no. 5, pp. 617-620). Los resultados de este primer estudio marcan el destino del producto sanitario: si es necesario seguir investigándolo más a fondo, si es necesario hacer modificaciones, o si se descarta en la fase inicial de fabricación, antes de iniciar estudios con animales de experimentación (Fricker, S. 1994, Toxicology *in Vitro*, vol. 8, no. 4, pp. 879-881). Una buena prueba de citotoxicidad es aquella que sigue protocolos estándar, tiene alta sensibilidad y produce datos cuantitativos y comparables de forma rápida para ser evaluados. Los avances actuales en ciencia y tecnología proporcionan varios tipos de pruebas para realizar los estudios de citotoxicidad, muchos de los cuales se describen en las normas ISO ya mencionadas. Siguiendo las recomendaciones de las normas ISO se puede probar la biocompatibilidad a nivel mundial, y por tanto, el nivel de seguridad de los productos sanitarios.

La norma ISO 10993-5 recomienda tres tipos de ensayos de citotoxicidad: la utilización de un extracto de la muestra, el contacto directo o el contacto indirecto. Hasta ahora el método de dilución de extractos y el de contacto indirecto han sido los más comúnmente aceptados, ya que se pueden aplicar a una amplia variedad de productos químicos de uso sanitario y detectar toxinas extraíbles y lixiviables. Las condiciones de extracción (tiempo y temperatura) dependen de las características fisicoquímicas del producto sanitario y del vehículo de extracción. Por el contrario, el método de contacto directo permite detectar niveles de citotoxicidad más débiles y de compuestos no extraíbles o lixiviables, debido a su alta sensibilidad.

Los cultivos celulares de células de mamífero son habituales en los estudios de citotoxicidad *in vitro*; más concretamente, se han utilizado líneas celulares establecidas obtenidas a partir de repositorios reconocidos. En las normas ISO se recomiendan las líneas celulares CCL 1 (clon 929 de la NCTC; fibroblastos de ratón), CCL 163 (clon A31 de la Balb/3T3; fibroblastos de ratón), CCL 171 (MRC-5; fibroblastos humanos), CCL 75 (WI-38; fibroblastos humanos), CCL 81 (Vero; células epiteliales de primate no humano) y CCL 10 [BHK-21 (C-13); fibroblastos de hámster] y V-79 379A (fibroblastos de hámster) de la American Type Culture Collection (ISO 10993-5:2009). Sin embargo, los cultivos primarios celulares y tisulares obtenidos directamente a partir de tejidos vivos, también son recomendables para realizar análisis en los que se requiera una sensibilidad específica, siempre que se pueda demostrar la reproducibilidad y la exactitud de la respuesta celular y tisular frente a las muestras estudiadas. La elección de los cultivos celulares y tisulares, la metodología seguida para la preparación de las muestras de estudio, el tipo de ensayo de citotoxicidad y los métodos de análisis, pueden variar en función de las normas de las autoridades certificadoras de los diferentes países.

Algunos polímeros manufacturados, como por ejemplo el perfluoro-n-octano, la perfluorodecalina o el hialuronato sódico (solución viscoelástica) entre otros, son utilizados como productos sanitarios. El perfluoro-n-octano, también conocido como octadecafluorooctano, es un fluorocarbono líquido, un derivado perfluorado del hidrocarburo octano. Su fórmula molecular es C_8F_{18}. Tiene una masa molar de 438,06 g/mol, un punto de fusión de -13°F (-25°C) y una densidad de 1,77 g/cm³. Este producto sanitario es muy popular y ampliamente aceptado como una herramienta mecánica intraoperatoria en la cirugía vítreorretiniana en pacientes con desprendimiento de retina, trauma ocular penetrante, desgarro(s) gigante de retina, vitreorretinopatía proliferante (VRP) o complicaciones de la cirugía de

catarata. El perfluoro-n-carbono actúa como manipulador de la retina en la cirugía vitreorretiniana o se usa por ejemplo, para reflotar lentes luxadas a la cavidad vítrea. Varias empresas del mercado sanitario comercializan este producto con diferentes nombres como Perfluoron®, Okta-line™, Arcotane (ARCADOPHTA®), Ala®Octa, F-Octane (FLUORON®) y Bio Octane™ entre otros.

La adecuada síntesis y purificación de los perfluoro-n-octanos líquidos son siempre cuestiones ineludibles para las empresas que los fabrican y comercializan. Se han usado diferentes técnicas, como la fluoración electroquímica para la síntesis de las materias primas y la destilación y la filtración para su purificación. Se evalúa la biocompatibilidad de las materias primas y su seguridad antes de envasarlas en jeringas y viales de 5 o 7 mililitros y comercializarlos para uso oftálmico. Los estudios de citotoxicidad se llevan a cabo de acuerdo con las directrices de la norma ISO (UNE-EN ISO 10993-5:2009 Evaluación biológica de productos sanitarios, Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro* y UNE-EN ISO 10993-12:2007 Evaluación biológica de productos sanitarios, Parte 12: Preparación de muestras y materiales de referencia). Los ensayos con el método de dilución de extractos por contacto indirecto pueden ser aplicados en la mayoría de los casos.

La utilización de la línea celular clon NCTC 929 [L cell, L-929, tejido conectivo subcutáneo de ratón, derivado de la Cepa L] (ATCC® CCL-1™) es habitual en la realización de dichas pruebas. Los protocolos estándar para la evaluación de la proliferación celular se utilizan para la determinación de la citotoxicidad de las muestras de estudio de los perfluoro-n-octanos líquidos. Las muestras de estudio se extraen mediante agitación con medio de cultivo bajo determinadas condiciones de tiempo y temperatura, se observan para detectar anomalías (claridad, color, ausencia de materiales extraños) y finalmente se exponen a un cultivo celular de la línea L929. Por otra parte, en el caso del método de difusión por agarosa, las muestras de estudio o los extractos de las mismas se colocan encima de una mezcla de agarosa para difundir, a continuación, hacia el cultivo celular. En estas pruebas se considera que los componentes citotóxicos del perfluoro-n-octano, el producto sanitario, se separarían en el extracto o se filtrarían a través de la agarosa.

Sin embargo, los recientes casos de ceguera tras la cirugía vitreorretiniana alertaron a las autoridades certificadoras/sanitarias de Europa, Asia y América del Sur, las cuales hicieron una notificación a las autoridades sanitarias de las Comunidades Autónomas y al público general al respecto de los productos sanitarios que contenían perfluoro-n-octano (Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios. Web. Nota informativa Ref. PS, 19/2015. Información sobre incidentes relacionados con el producto ALA OCTA (perfluoroctano), utilizado en cirugía de retina; Swiss Agency for Therapeutic Products. Recalls and other field safety corrective actions (FSCA)-Archive, 21/12/2915; Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) 27/08/2013. Retiro del mercado del dispositivo médico Perfluoroctano líquido fabricado por Meran Tip, Turquía y distribuido por Falc Chile Ltda.; Department of Health, The Government of Hong Kong Special Administrative Region 17/12/2015. Medical Device Safety Alert: Arcadophta SARL Arcotane 5ml). Estas alertas proceden de una investigación sobre productos sanitarios que contenían perfluoro-n-octano, especialmente enfocada en la búsqueda de los fallos ocurridos en los actuales métodos utilizados para la detección de citotoxicidad en los lotes comercializados de perfluoro-n-octano.

Como se ha indicado previamente, el perfluoro-n-octano es un ejemplo de una sustancia de alto peso molecular, volátil e insoluble en agua. El hecho de ser insoluble en agua, hace necesario emplear otro vehículo de extracción más adecuado, que no se conoce, en el que los componentes tóxicos liberados sean solubles. La preparación de las muestras del compuesto en estudio, mediante su agitación con medio de cultivo bajo determinadas condiciones, no puede confirmar la presencia de componentes tóxicos insolubles en agua en los productos. El método en el que se utilice el extracto de esta muestra fallaría para determinar citotoxicidad por este motivo. Por otro lado, la naturaleza volátil dificulta la regulación del tiempo de exposición de las muestras de compuesto bajo estudio sobre los cultivos celulares y tisulares, y más en un producto altamente volátil como es el perfluoro-n-octano. El ensayo por contacto indirecto también fallaría por esta razón. Además, la respuesta celular sería diferente frente a diferentes estímulos. Por ejemplo, en un estudio publicado en 2015 (Zhongguo Yi Liao Qi Xie Za Zhi., 2015 Mar;39(3):212-5, In Vitro Cytotoxicity Study of Nickel Ion) las líneas celulares L929, h9c2(2-1), 293[HEK-293], hFOB1.19, THLE-3, H9 y IM-9 se testaron frente a productos sanitarios que contenían níquel, y los resultados confirmaron que las células de la línea L929 eran las células que mejor toleraban la exposición a níquel (menos sensibles). Por tanto, la respuesta celular obtenida en este tipo de experimentos para determinar citotoxicidad también es dependiente del tipo celular empleado.

Finalmente, se han descrito métodos para evaluar la citotoxicidad de compuestos químicos volátiles en células o tejidos que implican depositar el compuesto sobre las células, cubrirlo con una capa de aceite mineral, incubarlo y evaluar el efecto del compuesto sobre el cultivo (Yang A., et al., 2002, Toxicology In Vitro, vol. 16:1, 33-39).

Por lo tanto, teniendo en cuenta los problemas clínicos ocasionados por la toxicidad de sustancias como la descrita anteriormente y las dificultades para el análisis toxicológico de los compuestos volátiles insolubles en agua, debido a la imposibilidad de realizar un test de citotoxicidad adecuado, se hace necesario diseñar una nueva estrategia para evaluar de forma sensible y fiable la biocompatibilidad, y por tanto la seguridad, de los productos sanitarios químicos que pueden contener sustancias volátiles o insolubles en agua o compuestos no extraíbles o lixiviables antes de realizar estudios *in vivo* y de su uso en la práctica clínica.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un método que permite evaluar la citotoxicidad de las sustancias químicas que se emplean en la elaboración de productos sanitarios, en concreto de los compuestos volátiles inmiscibles en agua, que son más complicados de analizar. El método permite evaluar sus citotoxicidades de una manera fiable, reproducible, controlada y con una alta sensibilidad.

Cuando se evalúan *in vitro* los efectos tóxicos de sustancias altamente volátiles mediante un estudio de contacto directo con los cultivos celulares es difícil controlar cuál es el tiempo de exposición real, lo que imposibilita la realización de un estudio toxicológico adecuado, fiable y reproducible. Además, cuando dichas sustancias son inmiscibles en agua la difusión de los compuestos tóxicos presentes en las mismas hacia el medio de cultivo celular o tisular se ve dificultada. El método propuesto por la presente invención representa una solución a estos problemas, ya que incorpora el uso de una sustancia no volátil, preferiblemente un medio acuoso, situado sobre el compuesto volátil objeto de estudio, evitando así que este último se evapore y, por tanto, permitiendo controlar el tiempo de exposición de las células o tejido a los productos químicos volátiles estudiados. Esto permite determinar de forma fiable y reproducible la biocompatibilidad, así como la bioseguridad, de estos productos químicos volátiles antes de realizar estudios *in vivo* y de su uso en la práctica clínica, es decir antes de su contacto con el paciente. Además, este método proporciona un contacto directo durante un tiempo de exposición controlado entre el cultivo celular y/o tisular y el compuesto volátil, lo que permite detectar niveles de citotoxicidad con una alta sensibilidad, incluyendo la detección de citotoxicidad asociada a compuestos que presentan toxicidad leve. La invención permite, mediante el método descrito, evaluar la biocompatibilidad y seguridad, y por tanto la toxicidad, de un amplio número de productos sanitarios que entran en contacto con los pacientes durante la práctica clínica, proporcionando resultados útiles, concretos y tangibles.

Las ventajas asociadas al método propuesto por la presente invención son, por tanto, las siguientes:

- Permite el contacto directo entre el compuesto volátil y las células y/o tejidos, lo que implica que no existe interferencia con ningún otro factor, como sí ocurre en los ensayos por contacto indirecto o en los métodos de dilución de extractos, donde están implicados otros factores tales como los vehículos de extracción, la capa de agar sobre la capa de células, etc., que pueden estar afectando a la proliferación celular o a la estructura tisular en cultivo y, por consiguiente, a los resultados del ensayo.

- Evita que la sustancia volátil objeto de estudio se evapore durante el ensayo, permitiendo así regular y controlar el tiempo de exposición de la misma a los cultivos celulares o tisulares.

- Permite confirmar claramente qué compuesto es el que está en contacto directo con las células y los tejidos ya que, debido a la naturaleza insoluble del compuesto volátil y a su diferencia de peso molecular con el medio acuoso con el que está en contacto, se pueden visualizar fácilmente las distintas capas del sistema.

- Permite recoger las sustancias que han entrado en contacto con las células y los tejidos tras el tiempo de exposición deseado para estudios posteriores.

Así, este método facilita la realización de pruebas a los productos químicos volátiles, preferiblemente sanitarios, generando suficientes garantías para evaluar la biocompatibilidad y la seguridad de los mismos.

Por todo ello, un aspecto de la invención se refiere a un método para evaluar la citotoxicidad de compuestos químicos volátiles, que comprende:

a. depositar un compuesto químico volátil a estudiar sobre un cultivo celular o tisular *in vitro,*
b. depositar un medio acuoso no volátil sobre el compuesto químico volátil depositado en el paso (a),
c. incubar el cultivo celular o tisular obtenido tras el paso (b), y
d. evaluar el efecto producido por la presencia del compuesto químico volátil depositado sobre el cultivo;

donde el compuesto químico volátil depositado es insoluble en agua y tiene un peso molecular mayor que el del medio acuoso no volátil del paso (b), y
donde la cantidad de compuesto depositado en el paso (a) cubre la capa de células o tejido en cultivo y la cantidad de medio acuoso no volátil depositada en el paso (b) cubre la capa de compuesto depositada en el paso (a).

De ahora en adelante, se hará referencia a este método como “método de la invención”.

El término “compuestos volátiles”, “VOCs” o “COVs” hace referencia a cualquier compuesto orgánico (que contiene carbono) que se evapora con facilidad hacia la atmosfera a temperatura ambiente. Son sustancias químicas que contienen carbono y uno o más de los siguientes elementos, aunque sin limitarnos: hidrogeno, halógenos, oxígeno, azufre, fósforo, silicio o nitrógeno, salvo los óxidos de carbono y los carbonatos y bicarbonatos inorgánicos. Por otra

parte, los compuestos volátiles se convierten fácilmente en vapores o gases y además pueden suponer un problema para la salud ya que pueden producir, por ejemplo, un efecto irritante en los ojos y en el tracto respiratorio, pudiendo desencadenar reacciones asmáticas. Sus principales características son la volatilidad, liposolubilidad, inflamabilidad y, en ocasiones toxicidad. Algunos ejemplos de estos compuestos son, aunque sin limitarnos, perfluoro-n-octano, perfluorodecalina, hialuronato sódico, tolueno, formaldehido, butano, propano, xileno, alcohol butílico, metiletilcetona, acetona, etilenglicol, isopreno, pineno, limoneno, benceno, nitrobenceno, clorobenceno, percloroetileno (o tetracloroetileno), tricloroetileno, hidroxipropilmetilcelulosa, aceite de silicona, etc, que pueden ser testados utilizando el método de la invención.

El compuesto químico volátil al que se refiere la presente invención es un compuesto insoluble en agua y de alto peso molecular. El término “alto peso molecular” se refiere a que el compuesto volátil presenta un peso molecular mayor que el del medio acuoso no volátil del paso (b). Es decir, el compuesto volátil al que se refiere la presente invención no es capaz de flotar en un medio acuoso, preferiblemente en el medio acuoso no volátil empleado en el método de la presente invención que se deposita por encima de él. Así, el compuesto volátil a estudiar permanece durante el método de la invención por debajo del medio acuoso no volátil depositado en el paso (b), es decir, no flota sobre el mismo. Y a su vez, dicho medio acuoso no volátil impedirá la evaporación del compuesto volátil situado por debajo. Esto posibilita el contacto directo y permanente (durante el tiempo de exposición deseado) del compuesto volátil con el cultivo celular o tisular. El método de la presente invención permite, por tanto, que las células o tejidos en cultivo estén en contacto directo con las muestras de compuesto volátil durante un tiempo determinado de exposición. Si la muestra de compuesto volátil es tóxica o contiene componentes tóxicos lixiviables, afectará de forma directa a dichos cultivos y su efecto podrá ser evaluado posteriormente.

El término “cultivo celular” se refiere a un cultivo de células eucariotas o procariotas, preferiblemente eucariotas, más preferiblemente de mamífero (por ejemplo humano, felino, cánido, bovino, roedor o cerdo), aún más preferiblemente de humano. Los tres tipos de células: células derivadas de ectodermo, mesodermo y endodermo, pueden ser empleados en el método de la invención. Las líneas celulares preferidas para el cultivo celular del paso (a) son las recomendadas por las normas ISO (ISO 10993-5:2009), por ejemplo, aunque sin limitarnos, las líneas celulares CCL 1 (clon L929 de la NCTC; fibroblastos de ratón), CCL 163 (clon A31 de la Balb/3T3; fibroblastos de ratón), CCL 171 (MRC-5; fibroblastos humanos), CCL 75 (WI-38; fibroblastos humanos), CCL 81 (Vero; células epiteliales de primate no humano) o CCL 10 [BHK-21 (C-13); fibroblastos de hámster] y V-79 379A (fibroblastos de hámster) de la American Type Culture Collection. Sin embargo, los cultivos primarios celulares y tisulares obtenidos directamente a partir de tejidos vivos, también son recomendables para realizar el método de la invención.

El término “cultivo tisular” incluye desde el cultivo de órganos hasta el cultivo de tejidos aislados. Todo tipo de tejidos: tejidos derivados de ectodermo, mesodermo y endodermo, pueden ser empleados en el método de invención, por ejemplo, sin limitarnos, tejido epitelial, tejido ocular, tejido muscular, tejido nervioso, tejido óseo, tejido conjuntivo, tejido conectivo, etc.

Preferiblemente las células y tejidos empleados en el cultivo celular o tisular del paso (a) son células y tejidos procedentes de la zona del cuerpo en la que se pretende aplicar el producto sanitario o con la que dicho producto sanitario va a estar en contacto. La evaluación de los productos sanitarios sobre los tipos de células y tejidos donde se aplican de forma habitual en la práctica clínica proporciona más garantías sobre su biocompatibilidad, y por tanto, sobre su seguridad.

En una realización preferida del método de la invención, el cultivo celular o tisular comprende explantes de neurorretina y/o células de epitelio pigmentario de la retina (EPR). En una realización más preferida, los explantes de neurorretina y las células de epitelio pigmentario de la retina son de origen humano. En una realización aún más preferida, las células de EPR son células de la línea celular ARPE-19 (ATCC CRL-2302), la cual es una línea celular generada de forma espontánea a partir de EPR humano. Estas células forman una monocapa estable que muestra polaridad morfológica y funcional. Las células ARPE-19 expresan marcadores específicos de EPR, tales como CRALBP y RPE-65 y presentan polarización morfológica cuando se siembran en filtros Transwell-COL recubiertos con laminina y en un medio de cultivo con una baja concentración de suero. Estas células forman uniones estrechas en monocapas con resistencia transepitelial. Asimismo, otras fuentes de células del EPR y otras células retinianas en cultivo, como por ejemplo pero sin limitarnos, fotorreceptores, ganglionares, Müller, etc., y de origen no solo humano modificado, sino fresco y de otros animales, pueden ser también empleadas en la realización del método de la invención.

Preferiblemente, los explantes de neurorretina a los que se refiere la presente invención son explantes obtenidos en condiciones de laboratorio procedentes de tejido vivo.

El término “explantes de neurorretina” hace referencia a un tejido de neurorretina, es decir, a un tejido obtenido de la capa más interna, en relación a la posición del epitelio pigmentario, de las dos partes de la retina. La neurorretina es la capa de la retina de donde parte el impulso nervioso provocado por los fotones. Consta a su vez de nueve capas, que de fuera hacia dentro son: capa de conos y bastones, limitante externa, nuclear externa, plexiforme externa, nuclear interna, plexiforme interna, de células ganglionares, de fibras nerviosas y limitante interna. Los explantes de

neurorretina se pueden cultivar en presencia de los medios y condiciones de cultivo conocidas en el campo técnico para el cultivo de explantes de tejidos oculares. Así, el medio de cultivo puede comprender, por ejemplo, aunque sin limitarnos, suero fetal bovino (FBS) o humano, antibióticos, antimicóticos, factores de crecimiento, etc. El medio base que puede ser utilizado en el medio de cultivo podría ser cualquiera de los conocidos en el estado de la técnica para el cultivo tisular *in vitro*, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, medio Neurobasal A.

El "epitelio pigmentario de la retina" o "EPR" es la capa de células pigmentadas ubicada en la parte exterior de la retina que interactúa estrechamente con las células fotorreceptoras (conos y bastones) en el mantenimiento de la función visual. Está firmemente anclado a la coroides subyacente por la membrana de Bruch. El epitelio pigmentario retiniano está compuesto por una capa de células hexagonales que están densamente empaquetadas con gránulos de pigmentos. Vistas en sección, cada célula consta de una parte externa no pigmentada en la que se sitúa un núcleo de forma grande y oval y una porción interior pigmentada que extiende una serie de procesos filiformes rectos entre los bastones. Sirve como factor limitante del transporte que mantiene el ambiente de la retina, suministrando pequeñas moléculas como aminoácidos, ácido ascórbico y D-glucosa, al tiempo que representa una barrera estrecha para las sustancias transportadas por la sangre de la coroides. El epitelio pigmentario de la retina también tiene como función la fagocitosis de los segmentos externos de las células fotorreceptoras y regeneración del fotopigmento.

Se entiende por "células de epitelio pigmentario de la retina" o "células de EPR" cualquier tipo celular presente en dicho epitelio, preferiblemente células epiteliales. Las células de EPR se pueden cultivar en presencia de los medios y condiciones de cultivo conocidas en el campo técnico para el cultivo de células epiteliales. Así, el medio de cultivo puede comprender, por ejemplo, aunque sin limitarnos, suero fetal bovino (FBS) o humano, antibióticos, antimicóticos, factores de crecimiento, etc. El medio base que puede ser utilizado en el medio de cultivo podría ser cualquiera de los conocidos en el estado de la técnica para el cultivo celular *in vitro*, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, medio basal "Eagle", CRCM-30, CMRL-1066, "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" (DMEM), "Eagle´s Minimum Essential Medium" (EMEM), "Fischer's Medium", "Glasgow Minimum Essential Medium", Ham's F-10, Ham's F-12 (F12), "High Cell Density Medium", "Iscove's Modified Dulbecco's Medium", Leibovitz's L-15, McCoy's 5A, medio 199, "Minimum Essential Medium Eagle", "Alpha Minimum Essential Medium", CnT20, NCTC 109, NCTC 135, RPMI-1640, "William's Medium E", Waymouth's MB 75211, Waymouth's MB 70511, "Keratinocyte serum-free medium" (KSFM), o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende un medio base DMEM/F12, suplementado o no con FBS y en presencia de antibióticos y antimicóticos. Además, las condiciones de cultivo pueden ser, por ejemplo, aunque sin limitarnos, condiciones estándar de cultivo, es decir, en presencia de entre el 5 y el 10% de CO_2, entre 36 y 38ºC y renovando el medio cada 48 a 72h. Preferiblemente, dicho cultivo se lleva a cabo como se describe a continuación en los ejemplos de la presente invención.

El cultivo celular o tisular *in vitro* en el método de la presente invención se lleva a cabo, preferiblemente, como indican las directrices de las normas ISO (UNE-EN ISO 10993), más preferiblemente siguiendo el protocolo de preparación de las placas de cultivo.

En el método de la invención se deposita un producto, un medio acuoso no volátil, sobre el compuesto volátil a estudiar para impedir que este último se evapore y desaparezca antes de finalizar el tiempo de exposición.

El término "medio acuoso no volátil" hace referencia a un medio líquido sin capacidad de evaporarse con facilidad hacia la atmosfera a temperatura ambiente, que impida a su vez la evaporación del compuesto volátil a estudiar una vez depositado sobre el mismo. El compuesto volátil a estudiar es insoluble en dicho medio. Este medio será preferiblemente agua o cualquier medio acuoso en el cual el compuesto volátil a estudiar no se disuelva. El medio acuoso no volátil usado en la presente invención no contiene elementos o componentes que puedan comprometer la viabilidad o crecimiento celular o tisular o que puedan afectar a las propiedades físico-químicas del compuesto volátil objeto de estudio. Es decir, los componentes comprendidos en el medio acuoso no volátil usado en la presente invención serán inocuos tanto para el cultivo celular o tisular como para el compuesto volátil a estudiar. Dicho medio acuoso presenta, preferiblemente, carácter alcalino. En otra realización preferida del método de la invención, el medio acuoso no volátil del paso (b) es un medio de cultivo con igual o similar composición que el empleado en el cultivo celular o tisular del paso (a) del método.

La cantidad de compuesto volátil a estudiar y de medio acuoso no volátil dependen de la superficie del soporte o del volumen del recipiente en el que se estén cultivando las células o tejidos, y además debe tenerse en cuenta que la cantidad de los mismos no debe generar un peso/presión que llegue a aplastar las células o tejidos en cultivo. Para evitar este problema, en el método de la invención se emplearán, preferiblemente, controles negativos como los descritos más adelante.

En otra realización preferida del método de la invención, el cultivo del paso (a) es un cultivo celular, la cantidad de compuesto volátil depositada en el paso (a) es de 80µl o cualquier otra cantidad que pueda cubrir la capa de células en cultivo y la cantidad de medio acuoso no volátil depositada en el paso (b) es de 100µl o cualquier otra cantidad que pueda cubrir la capa de compuesto depositada en el paso (a).

En otra realización preferida del método de la invención, el cultivo del paso (a) es un cultivo tisular, la cantidad de compuesto volátil depositada en el paso (a) es de 500µl o cualquier otra cantidad que pueda cubrir la capa de tejido en cultivo y la cantidad de medio acuoso no volátil depositada en el paso (b) es de 500µl o cualquier otra cantidad que pueda cubrir la capa de compuesto depositada en el paso (a).

La incubación del cultivo celular o tisular del paso (b) en presencia del compuesto volátil, y del medio acuoso no volátil, como se describe en el paso (c) del método de la presente invención, se realiza durante un tiempo de exposición determinado (deseado y preferiblemente basado en el tiempo durante el cual el compuesto estará en contacto con las células y tejidos en el organismo, preferiblemente humano, durante la práctica clínica real) y preferiblemente en presencia de las condiciones apropiadas para permitir el crecimiento o proliferación celular o tisular. Dichas condiciones y tiempo de cultivo dependerán del tipo celular o tisular elegido para el cultivo. Los expertos en la materia reconocerán dichas condiciones y tiempo de incubación aplicables en cada caso, aunque preferiblemente la incubación del paso (c) se lleva a cabo durante al menos 30 minutos.

En una realización particular del método de la invención, para el cultivo celular del paso (a) se siembran las células en una placa multipocillo y se destinan las células de la segunda columna por la derecha y la segunda columna por la izquierda como controles para evaluar la calidad del análisis. De acuerdo con las directrices de la norma ISO (UNE-EN ISO 10993-5:2009 Evaluación biológica de productos sanitarios, Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro*; Anexo C: Ensayo de toxicidad MTT) el valor medio de la densidad óptica (OD_{570}) de los grupos control de la segunda columna por la derecha y la izquierda debe ser ≥ 0,2 y la diferencia entre el valor medio OD_{570} de los controles de la segunda columna por la derecha y la izquierda no debe ser mayor del 15% de la media total de ambas columnas control.

Así, en otra realización preferida, el método de la invención se realiza en una placa multipocillo en la que al menos dos columnas de la placa comprenden cultivos celulares o tisulares control. En una realización más preferida, el valor medio de la densidad óptica (OD_{570}) de los cultivos celulares control de las dos columnas es de al menos 0,2. En una realización aún más preferida, la diferencia entre el valor medio OD_{570} de los cultivos celulares control de las dos columnas es igual o inferior al 15% de la media total de ambas columnas. En el caso de los cultivos tisulares control, se aplica, preferiblemente, tejido fresco del día de aislamiento y preparación de los experimentos para evaluar la calidad del análisis.

Dichos cultivos control comprenden células del mismo tipo celular y misma procedencia que las células cultivadas en el paso (a) del método de la presente invención, o tejido del mismo tipo y misma procedencia que el tejido cultivado en el paso (a) del método de la presente invención. Dichas células y tejido de los cultivos control se incuban bajo las mismas condiciones de tiempo, Tª, pH, ciclos de luz/oscuridad, humedad, concentración de CO_2, composición de medio de cultivo, etc., que el cultivo bajo estudio del paso (a), pero dichos cultivos control no están expuestos al compuesto volátil añadido en el paso (a). Los cultivos control serán también procesados de la misma manera que los cultivos del paso (a) tras la incubación del paso (c).

En una realización más preferida, los cultivos control comprenden células o tejidos no expuestos a ningún compuesto (blanco), células o tejidos expuestos a un compuesto no tóxico de peso molecular igual al del compuesto volátil depositado a estudiar (control negativo) o células o tejidos expuestos a un compuesto tóxico control (control positivo). El control negativo comprende un compuesto no tóxico de peso molecular igual al del compuesto volátil a estudiar para ayudar a determinar que los efectos sobre las células o tejidos son debidos al compuesto volátil objeto de estudio y no a un daño provocado por aplastamiento debido al peso/presión ejercido por las sustancias depositadas.

En la norma ISO (UNE-EN ISO 10993-12:2007 Evaluación biológica de productos sanitarios, Parte 12: Preparación de muestras y materiales de referencia) se menciona que los materiales cuyos efectos se ha demostrado que son reproducibles pueden ser considerados controles positivos (efecto citotóxico reproducible) y controles negativos (efecto no citotóxico reproducible). De esta manera se puede determinar el estado del cultivo celular o tisular, es decir, la respuesta de las células o tejidos al estímulo, para realizar la evaluación por contacto directo. En una realización aún más preferida, el compuesto tóxico control se selecciona de la lista, mencionada en la norma ISO, que consiste en: PVC-org. Sn, SPU-ZDEC, SPU-ZBEC, látex natural y poliuretano o fenol. No obstante, se puede aplicar cualquier otra sustancia química que genere resultados reproducibles. En una realización particular, el compuesto tóxico control es fenol.

Previamente al paso (a) del método, las células y tejidos objeto de estudio así como los controles se pueden cultivar en una placa multipocillo, preferiblemente durante al menos 7 días o hasta que se obtenga el valor medio de la densidad óptica (OD_{570}) de los cultivos de al menos 0,2 en el caso de las células, y posteriormente se retira el medio de cultivo y se incuban de nuevo con medio incompleto (sin suero pero con antibióticos y antimicóticos) en condiciones estándar de cultivo durante preferiblemente 24 horas para sincronizar el ciclo celular. En el caso de tejidos, se hace el aislamiento y se prepara tejido fresco preferiblemente el mismo día de inicio de los experimentos. Posteriormente a esta fase de cultivo, se deposita el compuesto volátil sobre el cultivo de cada pocillo (a excepción de los controles) para que esté en contacto directo con las células o tejidos, tal y como se describe en el paso (a) del

método de la invención. A continuación, se deposita el medio acuoso no volátil (preferiblemente medio de cultivo) sobre las muestras de compuesto volátil depositado y se incuban las muestras durante, preferiblemente, al menos 30 minutos. Este tiempo de 30 minutos de exposición puede variar ajustándose al tiempo durante el cual el compuesto objeto de estudio estaría en contacto con células y tejidos en el organismo, preferiblemente humano, durante la práctica clínica real.

Los datos de toxicidad de las muestras estudiadas siempre son comparables con los datos de los cultivos no expuestos a ningún compuesto (blanco) siguiendo, preferiblemente, la siguiente fórmula (para el caso de células) o la tabla 1 (para el caso de tejidos).

En el caso de cultivo celular;

$$Viab.\% = \frac{100 \times \mathrm{OD570e}}{OD570b}$$

Según la norma UNE-EN ISO 10993-5 “C.2.5 Análisis de los datos”; OD570e es el valor medio de la densidad óptica medida en las muestras ensayo y OD570b es el valor medio de la densidad óptica medida en los blancos.
Así, en una realización aún más preferida, la citotoxicidad del cultivo celular estudiado se compara con la citotoxicidad de los cultivos control que comprenden células no expuestas a ningún compuesto siguiendo la fórmula:

Viab.% = $\frac{100*\mathrm{OD570e}}{\mathrm{OD570b}}$

siendo OD570e el valor medio de densidad óptica en el cultivo celular estudiado y OD570b el valor medio de densidad óptica en el cultivo control que comprende células no expuestas a ningún compuesto.

Y en el caso de cultivo tisular;

Graduación cualitativa subjetiva de las modificaciones tisulares/celulares en los explantes de neurorretina. Tabla configurada a partir de la Norma Española UNE-EN ISO 10993-5:2009 “Tabla 1 – Evaluación morfológica cualitativa de la citotoxicidad de los extractos”.

Grado	Degeneración	Condiciones del cultivo
0	Ninguna	Ausencia de cambios degenerativos en los explantes de neurorretina
1	Ligera	Presencia de cambios degenerativos ligeros, tales como: ausencia parcial de los segmentos externos de los fotorreceptores e inicio de vacuolización tisular
2	Leve	Presencia de cambios degenerativos leves, tales como: fragmentación y pérdida de los segmentos externos de los fotorreceptores; edema de los segmentos internos de los fotorreceptores; formación de rosetas de degeneración; reducción del número de núcleos en las capas nucleares; alteración de las capas plexiformes; presencia de núcleos picnóticos; y vacuolización tisular
3	Moderada	Presencia de cambios degenerativos moderados, tales como: ausencia de los segmentos internos de los fotorreceptores; alteración y reducción de las capas plexiformes; pérdida de parénquima retiniano; desorganización de la estructura retiniana; reducido número de núcleos celulares y picnosis en los presentes; y vacuolización tisular marcada en todo el parénquima retiniano
4	Severa	Presencia de cambios degenerativos severos, tales como: pérdida total de la estructura retiniana; pérdida marcada de núcleos celulares; y pérdida marcada de parénquima retiniano

Para “la evaluación del efecto producido por la presencia del compuesto volátil depositado sobre el cultivo” se pueden detectar o cuantificar en dicho cultivo uno o varios parámetros asociados a la determinación de la viabilidad, crecimiento, proliferación y/ supervivencia celular o asociados a la determinación del daño en la morfología de las células o en la estructura anatómica o morfología del tejido en cultivo. La medición de estos parámetros se realiza, preferiblemente, siguiendo los protocolos estándar de citotoxicidad descritos en las normas ISO (UNE-EN ISO 10993-5:2009 Evaluación biológica de productos sanitarios, Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro*; UNE-EN ISO

10993-5:2009 “Tabla 1- Evaluación morfológica cualitativa de la citotoxicidad de los extractos”). En el caso de los cultivos celulares, se puede realizar, por ejemplo aunque sin limitarnos, un ensayo de citotoxicidad MTT siguiendo las directrices de las normas ISO donde se evaluará el crecimiento celular (UNE-EN ISO 10993-5:2009 Evaluación biológica de productos sanitarios, Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro*; Anexo C: Ensayo de toxicidad MTT). Además, se puede evaluar el daño producido comprobando la morfología de las células en cultivos mediante microscopía durante el tiempo de crecimiento celular. Se puede detectar un cambio significativo en la apariencia del cultivo en comparación con el cultivo control. En el caso de los cultivos tisulares, se puede realizar, por ejemplo aunque sin limitarnos, un fijado de las muestras, procesado y tinción con azul de toluidina y posterior evaluación visual de la morfología tisular al microscopio.

En una realización más preferida del método de la invención, en el paso (d) se evalúa la proliferación y/o supervivencia celular o la morfología del tejido.

Cuando en el paso (d) se detectan cambios significativos en la proliferación y/o supervivencia celular o en la morfología del tejido con respecto al cultivo “control” no expuesto al compuesto volátil añadido en el paso (a) del método de la invención, se clasifica a dicho compuesto volátil como citotóxico. Cuando en el paso (d) no se detectan cambios significativos en la proliferación y/o supervivencia celular o en la morfología del tejido con respecto al cultivo “control” no expuesto al compuesto volátil añadido en el paso (a) del método de la invención, se clasifica a dicho compuesto volátil como no citotóxico.

En otra realización preferida del método de la invención, éste comprende un paso adicional opcional (c`) tras el paso (c) de incubación en el que los cultivos se someten a un lavado, preferiblemente con PBS o medio de cultivo, para eliminar los restos de compuesto volátil, se añade medio de cultivo fresco y se incuban de nuevo durante un tiempo determinado, preferiblemente durante al menos 24h en el caso de células en cultivo o durante al menos 72h en el caso de tejidos en cultivo, en condiciones estándar de cultivo. Posteriormente a este paso adicional (c`), se procede a la evaluación del efecto producido por el compuesto volátil como se describe en el paso (d).

En otra realización preferida del método de la invención, éste además comprende un paso (e) en el que se recupera el compuesto volátil depositado en el paso (a). La insolubilidad del compuesto volátil en medios acuosos facilita un claro marcaje de las muestras evaluadas de dicho compuesto en contacto con las células. La muestra de compuesto volátil es insoluble en el medio de cultivo, lo que ayuda a marcar de forma clara y visible la capa con la muestra del producto bajo estudio. Una vez recuperado y recogido el compuesto volátil en el paso (e), éste puede ser reutilizado en nuevos estudios y análisis.

Los compuestos volátiles se encuentran habitualmente en sectores industriales, tales como, pero sin limitarnos, la industria siderúrgica, de plásticos y de caucho, del calzado, de las artes gráficas, de las pinturas, barnices, lacas, disolventes, repelentes, pegamentos, dispersantes, desengrasantes, productos de limpieza, aromatizantes, perfumería y aerosoles, la alimentaria, la maderera, la cosmética, el fracking, y la farmacéutica, siendo ésta la más relevante respecto a la invención aquí presentada. Por otra parte, también se incluyen, pero sin limitarnos, los productos usados como aislantes eléctricos, térmicos o acústicos y las materias plásticas semielaboradas, en forma de hojas, placas o barras, así como caucho, gutapercha, goma, amianto, mica y productos de estas materias no comprendidos en otras clases, productos de materias plásticas semielaboradas, materias empleadas para calafatear, cerrar con estopa y aislar, tubos flexibles no metálicos, etc. Sin descartar los productos volátiles que se liberan como consecuencia de la quema de combustibles fósiles, tales como la gasolina, carbón o gas natural, o de la quema de madera. Así, los compuestos volátiles evaluados en el método de la presente invención pueden ser cualquiera de los presentes en dichos sectores de la industria, o en cualquier otro sector en el que también se empleen o liberen compuestos volátiles.

En otra realización preferida del método de la invención, el compuesto volátil depositado en el paso (a) es un compuesto empleado en la elaboración de dispositivos médicos o productos sanitarios.

El término “dispositivo médico” se refiere a cualquier instrumento empleado en el ámbito biosanitario o en clínica, tanto en medicina como en veterinaria, que está en contacto directo o indirecto con el paciente. Aquí se incluye cualquier instrumento, aparato, artefacto, equipo biomédico, reactivo para el diagnóstico o supervisión u otro artículo similar o relacionado, utilizado sólo o en combinación, incluyendo sus componentes, partes y accesorios que intervengan en su correcta aplicación, destinado por el fabricante para uso en seres humanos o animales no humanos, preferiblemente en seres humanos. Dentro de este término se incluyen los dispositivos empleados para el tratamiento, alivio, diagnóstico, pronóstico, prevención, supervisión, seguimiento o monitorización, investigación y/o cirugía del paciente, incluyendo los dispositivos destinados a la sustitución, modificación o soporte de la estructura anatómica de un tejido o de un proceso fisiológico o los dispositivos empleados en la regulación de la concepción. Así, se incluyen dentro de este término las prótesis o dispositivos implantables en el cuerpo humano o animal destinados al tratamiento de alguna condición patológica o a la regeneración tisular.

Algunos ejemplos en el contexto de la presente invención son, aunque sin limitarnos:

- Productos sanitarios químicos de uso médico: sustancias dietéticas para uso médico, alimentos para bebés; emplastos, material para apósitos; material para empastar los dientes y para moldes dentales; desinfectantes; productos para la destrucción de animales dañinos; fungicidas, herbicidas.

- Aparatos e instrumentos de uso diagnóstico o terapéutico (quirúrgico o médico, incluidos los de uso en odontología y veterinaria), recubiertos con productos químicos que puedan entrar en contacto con piel o mucosas, ojos y dientes artificiales; artículos ortopédicos; así como material de sutura, jeringas, agujas, gasas, sondas, vendajes, guantes, especialmente los empleados en cirugía, marcapasos, implantes de matriz ósea, prótesis, lentes de contacto, etc.

- Así como cualquier dispositivo médico o producto sanitario que contenga productos químicos que puedan llegar a estar en contacto con células y tejido animal, preferiblemente humano.

En una realización más preferida, los dispositivos médicos a los que se refiere la presente invención son empleados en cirugía, aún más preferiblemente en cirugía oftalmológica.

El término “cirugía oftalmológica” hace referencia a cualquier técnica quirúrgica llevada a cabo en cualquier estructura ocular, tales como pero sin limitarnos, cirugía refractiva, cirugía vitreorretiniana, cirugía de glaucoma, cirugía para tratamiento de cataratas, entre otros. La cirugía vítreorretiniana es una intervención ocular para tratar las enfermedades que afectan al vítreo y a la retina. Este tipo de enfermedades o traumatismos causan un desprendimiento de la retina, es decir, un desgarro de la retina y acumulación del fluido que hay en la cavidad vítrea bajo la retina. Así, la cirugía vitreorretiniana se aplica, aunque sin limitarnos, a pacientes con desprendimiento de retina, trauma ocular penetrante, desgarro/s gigante de retina, vitreorretinopatía proliferantes (VRP) o complicaciones de la cirugía de catarata.

En otra realización preferida del método de la invención, el compuesto volátil es un polímero manufacturado.

El término “polímero manufacturado” hace referencia a polímeros formados a partir de polímeros naturales o sintéticos. Por otra parte, los polímeros son macromoléculas formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros. Algunos de los polímeros naturales a partir de los cuales se generan los polímeros manufacturados son el almidón, la celulosa o la seda y algunos de los polímeros sintéticos a partir de los cuales se generan los polímeros manufacturados son el nailon, el polietileno o la baquelita. Ejemplos de polímeros manufacturados son, aunque sin limitarnos, el perfluoro-n-octano, la perfluorodecalina o el hialuronato sódico (solución viscoelástica) entre otros, los cuales se emplean como productos sanitarios.

En una realización más preferida, el compuesto volátil es perfluoro-n-octano.

El término “perfluoro-n-octano” u “octadecafluorooctano” hace referencia al fluorocarbono líquido, un derivado perfluorado del hidrocarburo octano, cuya fórmula molecular es C_8F_{18}, con una masa molar de 438,06 g/mol, un punto de fusión de -13ºF (-25ºC) y una densidad de 1,77 g/cm^3. Este polímero se aplica en oftalmología, particularmente en cirugía vitreorretiniana, actuando como manipulador de la retina debido tanto a sus buenas propiedades físicas como a su buena adhesión a la retina. Por tanto, este polímero entra en contacto con las células y tejidos oculares del paciente durante la cirugía vitreorretiniana, siendo por tanto necesario evaluar su toxicidad. El epitelio pigmentario de la retina es una de las capas de la retina que está expuesta al perfluoro-n-octano durante dicha cirugía, en el caso de que se produzcan roturas en la neurorretina. Por ello, en el método de la invención se emplean preferiblemente células de EPR de origen humano, por considerarse las células más apropiadas para la evaluación de la citotoxicidad de este producto químico volátil. En la cirugía vitreorretiniana, la neurorretina se expone también al perfluoro-n-octano, por lo tanto, los explantes de neurorretina también son apropiados para la evaluación de la citotoxicidad de este tipo de productos sanitarios mediante el método descrito en la presente invención. Varias empresas del mercado comercializan este producto perfluoro-n-octano con diferentes nombres como Perfluoron®, Okta-line™, Arcotane (ARCADOPHTA®), Ala®Octa, F-Octane (FLUORON®) y Bio Octane™ entre otros.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Diagrama de diseño del método de la invención. 1) Placa de cultivo, 2) células o tejidos 3) medio de cultivo, 4) muestra a testar.

Fig. 2. Placas de cultivo que muestran el método de la invención diseñado para realizar la evaluación por contacto directo. A) muestra de estudio de perfluoro-n-octano en un pocillo de una placa de 96 pocillos. B) medio

de cultivo sobre una muestra de estudio de perfluoro-n-octano en un pocillo de una placa de 96 pocillos. C) medio de cultivo sobre una muestra de estudio de perfluoro-n-octano en un pocillo de una placa de 12 pocillos. D) medio de cultivo en un pocillo de una placa de 12 pocillos.

Fig. 3. La muestra de perfluoro-n-octano volátil (capa inferior) fue recogida trascurrido el tiempo de exposición sobre el cultivo celular o sobre la sección de tejido.

Fig. 4. Proliferación del cultivo celular de células de ARPE-19 (A) y L929 (B). Los cultivos celulares estuvieron en contacto con muestras de perfluoro-n-octano (PFO) tóxico y no tóxico durante 30 minutos. Se incubaron con medio de cultivo durante 24 horas en condiciones estándar de cultivo de 37 °C y 5% de CO_2. A continuación, se realizó un ensayo MTT siguiendo directrices de la norma ISO, los resultados que se obtuvieron se presentan en esta gráfica. En el eje Y se representa el porcentaje de viabilidad celular, y en el eje X se representan los distintos tratamientos.

Fig. 5. Morfología de los explantes de neurorretina. Los explantes de neurorretina estuvieron en contacto con muestras de perfluoro-n-octano tóxico y no tóxico durante 30 minutos. Se incubaron con medio de cultivo durante 72 horas en condiciones estándar de cultivo de 37 °C y 5% de CO_2. A continuación, la morfología de cada explante de neurorretina se analizó mediante una tinción de azul de toluidina y los resultados se presentan siguiendo las directrices de la norma ISO. Se muestra: la morfología de explantes de neurorretina a tiempo 0 sin incubación con medio de cultivo, la morfología de explantes de neurorretina no expuestos a perfluoro-n-octano e incubados durante 72 horas, la morfología de explantes de neurorretina expuestos a muestras no tóxicas de perfluoro-n-octano e incubados durante 72 horas y la morfología de explantes de neurorretina expuestos a muestras tóxicas de perfluoro-n-octano e incubados durante 72 horas.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que ponen de manifiesto la efectividad del método descrito para evaluar la citotoxicidad de compuestos químicos volátiles, particularmente de aquellos comprendidos en productos sanitarios, sobre cultivos celulares de ARPE-19, L929 y explantes de neurorretina.

Ejemplo 1. Evaluación de la proliferación de un cultivo celular de epitelio pigmentario de la retina (línea celular ARPE19) tratado con muestras tóxicas y no tóxicas de perfluoro-n-octano.

La línea celular se obtuvo de la American Tissue Culture Collection (ATCC). Después de descongelarlas, se cultivaron las células en medio de cultivo [(Dulbecco's Modified Eagle Medium y F12 Nutrient Mixture (Ham)] suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico y antimicótico (100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomicina y 0,25 µg/ml de Anfotericina B). El cultivo celular se mantuvo en frascos de 75 cm^2 en condiciones estándar de cultivo de 37 °C y 5% CO_2, renovando el medio de cultivo cada 2 días y subcultivando las células cuando alcanzaban una confluencia del 80-90%. Cuando las células llegaban a dicha confluencia, se tripsinizaron y se realizó un recuento utilizando la tinción de azul tripán. A continuación, se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad óptima de $1x10^4$ células/pocillo y se incubaron durante 7 días con medio completo en condiciones estándar de 37 °C y 5% CO_2, renovando cada dos días el medio de cultivo. A continuación, se retiró el medio de cultivo completo y se incubaron las células con medio de cultivo incompleto (sin suero pero con un 1% de antibiótico y antimicótico) durante 24 horas en condiciones estándar de cultivo, con el objetivo de sincronizar el ciclo celular. Posteriormente, se depositaron 80 µl de las muestras de perfluoro-n-octano tóxico y no tóxico sobre el cultivo celular en los correspondientes pocillos, para exponer las células directamente a los perfluoro-n-octanos. A continuación se depositaron 100 µl de medio de cultivo sobre las muestras de perfluoro-n-octano en los pocillos con las muestras, y 180 µl de medio de cultivo en los pocillos no expuestos (Fig. 1). Las células se incubaron durante 30 minutos y, transcurrido este tiempo, se retiraron las muestras de perfluoro-n-octano y el medio de cultivo de cada pocillo. Las células se lavaron dos veces con PBS (también es posible hacerlo con medio de cultivo) y se incubaron nuevamente con medio de cultivo fresco durante 24 horas en condiciones estándar. Posteriormente, se determinó el crecimiento celular en cada pocillo siguiendo el protocolo del ensayo de citotoxicidad MTT, de acuerdo con las recomendaciones de la norma ISO [UNE-EN ISO 10993-5:2009 Evaluación biológica de productos sanitarios, Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro; Anexo C: Ensayo de toxicidad MTT].

1.1. Resultados

Los resultados mostraron que las muestras de perfluoro-n-octano son incapaces de evaporarse cuando se deposita medio de cultivo sobre ellas (figura 2B y C). Transcurrido el tiempo de exposición, las muestras pudieron ser recogidas para su posterior análisis (figura 3). El cultivo celular expuesto a la muestra no tóxica presenta una viabilidad superior al 70 % cuando se compara con la viabilidad del cultivo celular no expuesto (100%) [(figura 4 A; primera columna (células no expuestas a la muestra), segunda y tercera columnas (células expuestas a muestras no tóxicas)]. Así, se confirma que la muestra de perfluoro-n-octano no aplasta el cultivo celular (figura 4 A; segunda y tercera columnas) cuando se deposita una cantidad de 80 µl del producto. El cultivo celular expuesto a las muestras

tóxicas presenta una viabilidad inferior al 70% cuando se compara con el cultivo celular no expuesto y con las muestras no tóxicas (figura 4 A; cuarta y quinta columnas). El análisis de los datos también confirma que la media de la OD_{570} del grupo blanco no expuesto es ≥ 0,2 tras ≥ 7 días de cultivo, y que la diferencia de la media de la OD_{570} de los grupos blanco de la derecha e izquierda no difiere en más de un 15% del valor medio de todos los blancos. Esto confirma que los experimentos cumplen con las normas ISO.

Ejemplo 2. Evaluación de la proliferación de un cultivo celular de fibroblastos (línea celular L929) tratado con muestras tóxicas y no tóxicas de perfluoro-n-octano.

La línea celular de L929 se obtuvo de la American Tissue Culture Collection (ATCC). Después de descongelarlas, se cultivaron las células en medio de cultivo [(Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (ATCC® 30-2003™)] suplementado con 15% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico y antimicótico (100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomicina y 0,25 µg/ml de Anfotericina B). El cultivo celular se mantuvo en frascos de 75 cm^2 en condiciones estándar de cultivo de 37 °C y 5% CO_2, renovando el medio de cultivo cada 2 días y subcultivando las células cuando alcanzaban una confluencia del 80-90%. Cuando las células llegaban a dicha confluencia, se tripsinizaron y se realizó un recuento utilizando la tinción de azul tripán. A continuación, se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad óptima de $1x10^4$ células/pocillo y se incubaron durante 1 día con medio completo en condiciones estándar de 37 °C y 5% CO_2. A continuación, se retiró el medio de cultivo completo y se incubaron las células con medio de cultivo incompleto (sin suero pero con un 1% de antibiótico y antimicótico) durante 24 horas en condiciones estándar de cultivo, con el objetivo de sincronizar el ciclo celular. Posteriormente, se depositaron 80 µl de las muestras de perfluoro-n-octano tóxico y no tóxico sobre el cultivo celular en los correspondientes pocillos, para exponer las células directamente a los perfluoro-n-octanos. A continuación se depositaron 100 µl de medio de cultivo sobre las muestras de perfluoro-n-octano en los pocillos con las muestras, y 180 µl de medio de cultivo en los pocillos no expuestos. Las células se incubaron durante 30 minutos y, transcurrido este tiempo, se retiraron las muestras de perfluoro-n-octano y el medio de cultivo de cada pocillo. Las células se lavaron dos veces con PBS (también es posible hacerlo con medio de cultivo) y se incubaron nuevamente con medio de cultivo fresco durante 24 horas en condiciones estándar. Posteriormente, se determinó el crecimiento celular en cada pocillo siguiendo el protocolo del ensayo de citotoxicidad MTT, de acuerdo con las recomendaciones de la norma ISO [UNE-EN ISO 10993-5:2009 Evaluación biológica de productos sanitarios, Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro; Anexo C: Ensayo de toxicidad MTT].

2.1. Resultados

Los resultados mostraron que las muestras de perfluoro-n-octano son incapaces de evaporarse cuando se deposita medio de cultivo sobre ellas (figura 2B y C). Transcurrido el tiempo de exposición, las muestras pudieron ser recogidas para su posterior análisis (figura 3). El cultivo celular expuesto a la muestra no tóxica presenta una viabilidad superior al 70 % cuando se compara con la viabilidad del cultivo celular no expuesto (100%) [(figura 4 B; primera columna, células no expuestas a la muestra), segunda y tercera columnas (células expuestas a muestras no tóxicas)]. Así, se confirma que la muestra de perfluoro-n-octano no aplasta el cultivo celular (figura 4 B; segunda y tercera columnas) cuando se deposita una cantidad de 80 µl del producto. El cultivo celular expuesto a las muestras tóxicas presenta una viabilidad inferior al 70 % cuando se compara con el cultivo celular no expuesto y con las muestras no tóxicas (figura 4 B; cuarta y quinta columnas). El análisis de los datos también confirma que la media de la OD_{570} del grupo blanco no expuesto es ≥ 0,2 tras ≥1 día de cultivo, y que la diferencia de la media de la OD_{570} de los grupos blanco de la derecha e izquierda no difiere en más de un 15% del valor medio de todos los blancos. Esto confirma que los experimentos cumplen con las normas ISO.

Ejemplo 3. Evaluación de las alteraciones en la estructura de los explantes de neurorretina tratados con muestras tóxicas y no tóxicas de perfluoro-n-octano.

Los globos oculares porcinos se diseccionaron en las dos horas posteriores a la enucleación para obtener los explantes de neurorretina. Se colocaron los explantes en una placa de 12 pocillos, y a continuación se depositaron sobre ellos 500 µl de las muestras tóxicas y no tóxicas de perfluoro-n-octano, exponiendo así las neurorretinas directamente al producto sanitario. Se depositaron 500 µl de medio de cultivo (Neurobasal A medio suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico y antimicótico, 1% de L-Glutamina y 2% B-27) sobre las muestras de perfluoro-n-octano para evitar su evaporación. Se depositó 1 ml de medio de cultivo sobre los explantes de neurorretina para el grupo de explantes no expuestos a perfluoro-n-octano. Transcurridos 30 minutos, se retiraron las muestras de perfluoro-n-octano y de medio de cultivo de cada pocillo. Los explantes de neurorretina se lavaron con medio de cultivo fresco y se transfirieron a una placa de 12 pocillos con membranas Transwell®. Los explantes de neurorretina se depositaron en dichas membranas Transwell® de modo que la capa de fotorreceptores quedara en contacto con la membrana. Se llenó cada pocillo con medio de cultivo de tal manera que alcanzase los explantes pero que estos no fuesen capaces de flotar. Las placas con los explantes se incubaron durante 72 horas en condiciones estándar de 37 °C y 5% CO_2 renovando diariamente el medio de cultivo. Al mismo tiempo (0 horas), uno de los explantes obtenidos se fijó y se almacenó para ser procesado y observar los cambios morfológicos en los explantes de neurorretina sin ser cultivados. Tras 72 horas de cultivo, los explantes de neurorretina se fijaron y se

almacenaron para su procesado. Los explanes de neurorretina se procesan y tiñen con azul de toluidina. Finalmente, se observaron en el microscopio para evaluar su morfología. Los resultados se muestran en la figura 5.

3.1. Resultados

Los resultados mostraron que las muestras de perfluoro-n-octano no son capaces de evaporase cuando se deposita medio de cultivo sobre el producto (figura 2B y C). Transcurrido el tiempo de exposición, las muestras pudieron ser recogidas para su posterior análisis (figura 3). Los explantes de neurorretina muestran una buena morfología a tiempo cero (figura 5). Los explantes de neurorretina que se expusieron a las muestras de perfluoro-n-octano no tóxicas muestran una morfología similar a la que se ha observado en el caso de los explantes no expuestos a las 72 horas de cultivo (figura 5). Sin embargo, lo explantes de neurorretina expuestos a las muestras tóxicas de perfluoro-n-octano muestran una morfología deteriorada a las 72 horas de cultivo (figura 5). De este modo, se confirma que las muestras de perfluoro-n-octano no aplastan los explantes de neurorretina y se puede regular el tiempo de exposición de los explantes a las muestras de perfluoro-n-octano. Los experimentos cumplen con las normas ISO.

Así, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ejemplos previamente expuestos, se puede concluir que:

- El método diseñado no permite que el perfluoro-n-octano, que es una sustancia altamente volátil, se evapore.

- El método diseñado permite de regular el tiempo de exposición del perfluoro-n-octano a los cultivos celulares y de tejido.

- El método diseñado es capaz de detectar el efecto tóxico de las muestras de perfluoro-n-octano sobre cultivos celulares de EPR y sobre cultivos de explantes de neurorretina.

- El método diseñado facilita la recogida de las muestras de perfluoro-n-octano después del tiempo de exposición para su posterior análisis.

REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar la citotoxicidad de compuestos químicos volátiles, que comprende:

a. Depositar un compuesto químico volátil sobre un cultivo celular o tisular *in vitro*,
b. Depositar un medio acuoso no volátil sobre el compuesto depositado en el paso (a),
c. Incubar el cultivo celular o tisular obtenido tras el paso (b), y
d. Evaluar el efecto producido por la presencia del compuesto depositado sobre el cultivo;

donde el compuesto depositado es insoluble en agua y tiene un peso molecular mayor que el del medio acuoso no volátil del paso (b), y
donde la cantidad de compuesto depositado en el paso (a) cubre la capa de células o tejido en cultivo y la cantidad de medio acuoso no volátil depositada en el paso (b) cubre la capa de compuesto depositada en el paso (a).

2. El método según la reivindicación 1, donde el compuesto depositado es un compuesto empleado en la elaboración de dispositivos médicos o productos sanitarios.

3. El método según la reivindicación 2, donde los dispositivos médicos son empleados en cirugía oftalmológica.

4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el compuesto volátil es un polímero manufacturado.

5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el compuesto volátil es perfluoro-n-octano.

6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el cultivo celular o tisular comprende explantes de neurorretina y/o células de epitelio pigmentario de la retina.

7. El método según la reivindicación 6, donde los explantes de neurorretina y las células de epitelio pigmentario de la retina son de origen humano.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el medio acuoso no volátil del paso (b) es un medio de cultivo con igual composición que el empleado en el cultivo celular o tisular del paso (a).

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la incubación del paso (c) se lleva a cabo durante al menos 30 minutos.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde en el paso (d) se evalúa la proliferación y/o supervivencia celular o la morfología del tejido.

11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que además comprende un paso (e) en el que se recupera el compuesto depositado en el paso (a).

12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicho método se realiza en una placa multipocillo en la que al menos dos columnas de la placa comprenden cultivos celulares o tisulares control.

13. El método según la reivindicación 12, donde el valor medio de la densidad óptica (OD_{570}) de los cultivos celulares control de las dos columnas es de al menos 0,2.

14. El método según la reivindicación 13, donde la diferencia entre el valor medio OD_{570} de los cultivos celulares control de las dos columnas es igual o inferior al 15% de la media total de ambas columnas.

15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde los cultivos control comprenden células o tejido no expuestos a ningún compuesto, células o tejido expuestos a un compuesto no tóxico de igual peso molecular al del compuesto depositado a estudiar o células o tejido expuestos a un compuesto tóxico control.

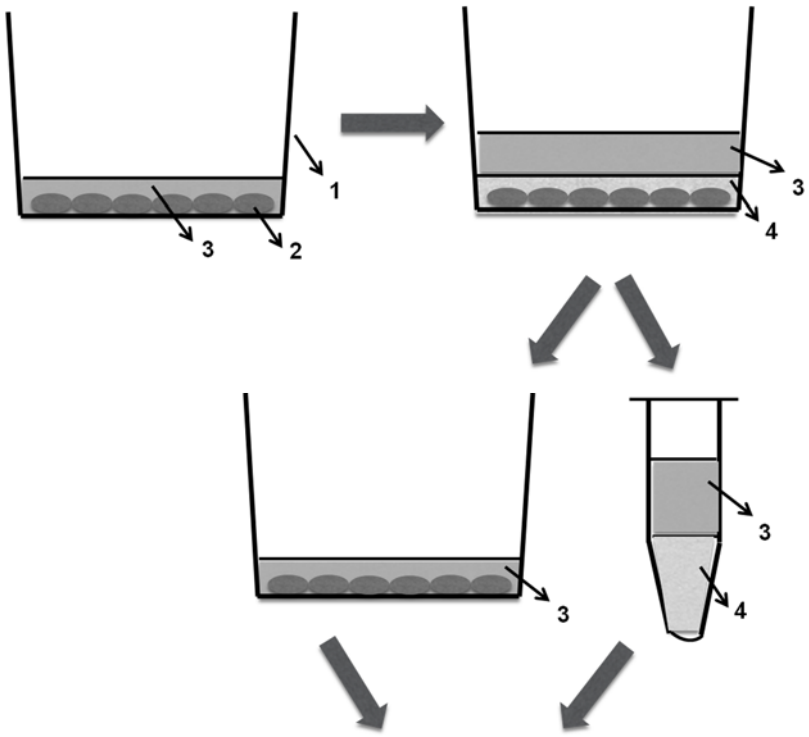
16. El método según la reivindicación 15, donde el compuesto tóxico control se selecciona de la lista que consiste en: PVC-org. Sn, SPU-ZDEC, SPU-ZBEC, látex natural y poliuretano o fenol.

17. El método según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, donde la citotoxicidad del cultivo celular estudiado se compara con la citotoxicidad de los cultivos control que comprenden células no expuestas a ningún compuesto siguiendo la fórmula:

$$\text{Viab.\%} = \frac{100 * \text{OD570e}}{\text{OD570b}}$$

siendo OD570e el valor medio de densidad óptica en el cultivo celular estudiado y OD570b el valor medio de densidad óptica en el cultivo control que comprende células no expuestas a ningún compuesto.

Fig. 1



Análisis biológico, físico y químico

Fig. 2

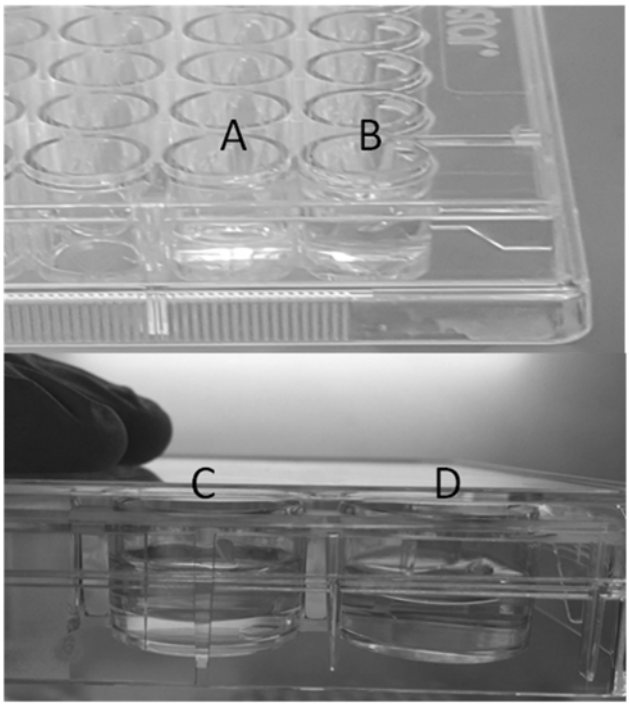


Fig. 3

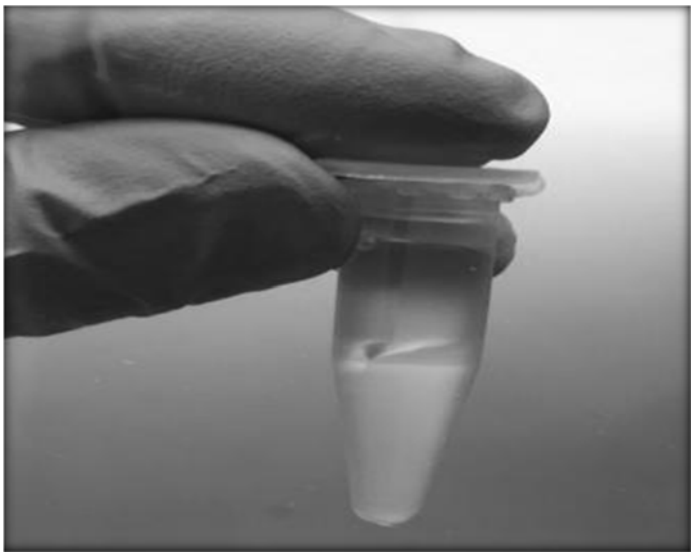


Fig. 4 (A)

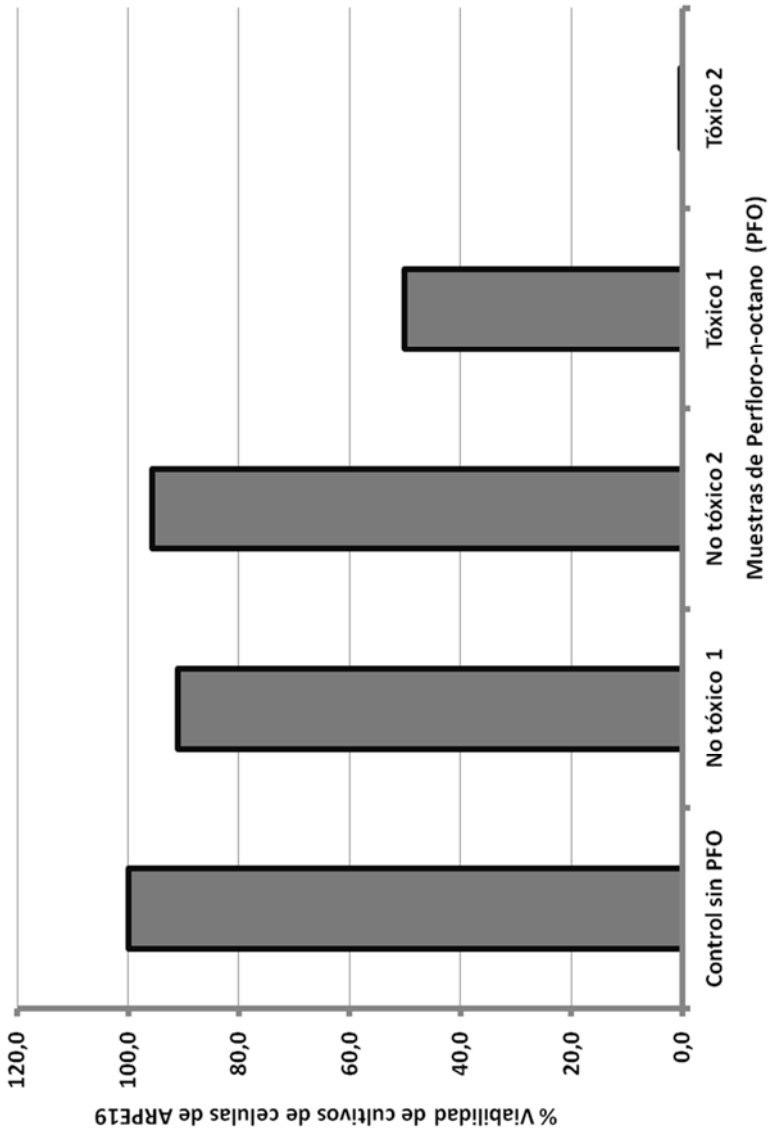

% Viabilidad de cultivos de células de ARPE19
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
Control sin PFO
No tóxico 1
No tóxico 2
Tóxico 1
Tóxico 2
Muestras de Perfloro-n-octano (PFO)

Fig. 4 (B)

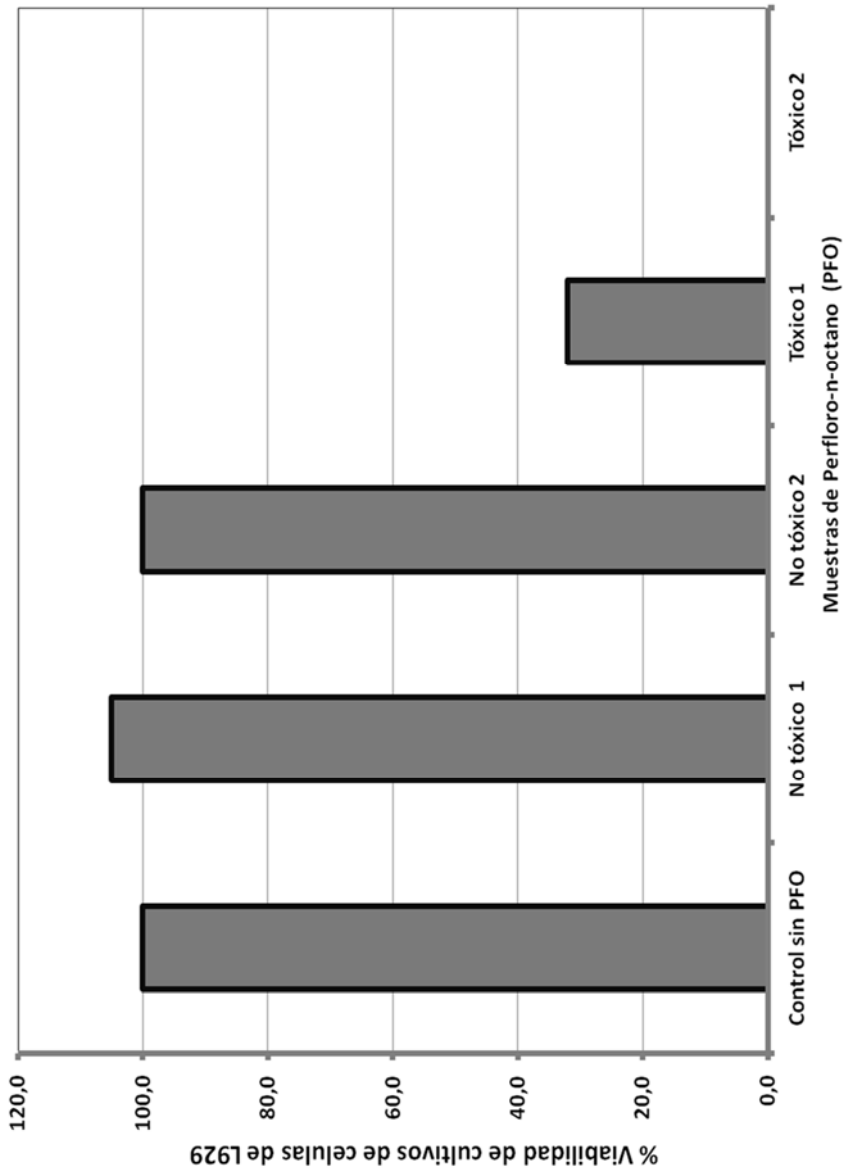
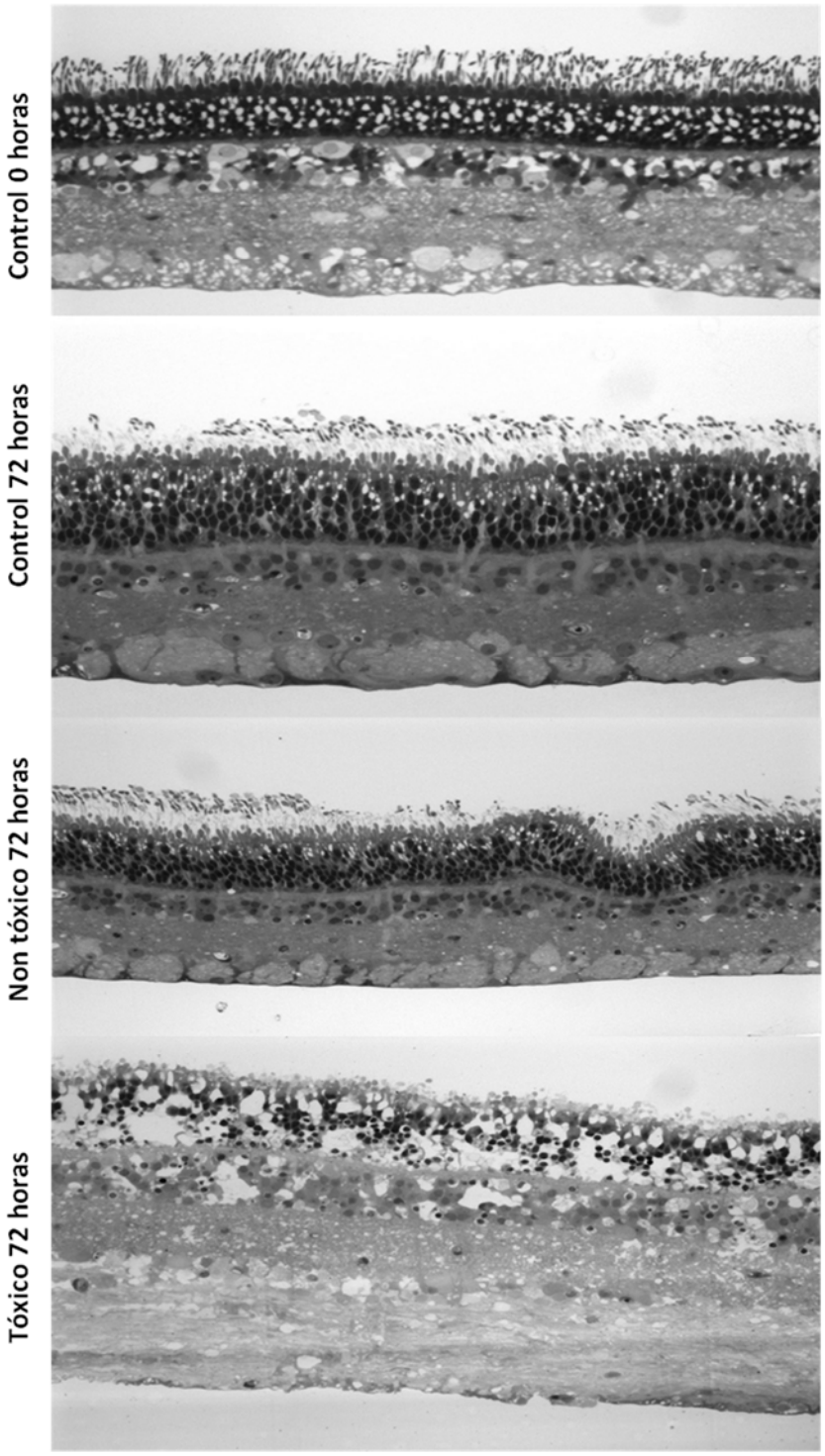

% Viabilidad de cultivos de celulas de L929
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
Control sin PFO
No tóxico 1
No tóxico 2
Tóxico 1
Tóxico 2
Muestras de Perfloro-n-octano (PFO)

Fig. 5


Control 0 horas
Control 72 horas
Non tóxico 72 horas
Tóxico 72 horas
Perfluoro-n-octane (PFO)