



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

Diseño de hidrogeles de ácido hialurónico injertados con
moléculas condroprotectoras

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Biomédica

AUTOR/A: Seguí Esquembre, Carmen

Tutor/a: Vilariño Feltrer, Guillermo

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

“Gracias a Guillermo por darme la oportunidad de colaborar en este proyecto y dejarme aprender de él.

Gracias a mi familia por ser mi recreo.

Y gracias Javi por todo tú.”

RESUMEN:

La artrosis es una enfermedad degenerativa de las articulaciones que afecta a un gran número de personas. Según las estadísticas más recientes, se estima que la incidencia de la artrosis en España es del 10% de la población. Las terapias inyectables actuales solo tratan los síntomas y no regeneran el tejido afectado, por lo que son poco efectivas a largo plazo.

Con el objetivo de crear una solución más efectiva, se plantea desarrollar un hidrogel de ácido hialurónico (HA) inyectable y autorreticulable *in situ* con condroitín sulfato (CS) injertado para su posterior liberación controlada. Este hidrogel actuará como viscosuplemento, mimetizando las principales propiedades del cartílago, y estimulando la producción de nueva matriz. Para ello, se han desarrollado estructuras basadas en glicosaminglicanos con el fin de obtener constructos supramoleculares más estables y evitar la respuesta inmunológica del organismo. Se ha empleado ácido hialurónico de alto peso molecular (1.5-1.8 MDa) modificándolo mediante la química EDC/NHS para introducir grupos sulfhidrilo (SH) terminales y conferirle al HA la posibilidad de gelificar *in situ* a través de los puentes de disulfuro trabajando dentro de un grado de tiolación óptimo. Por otro lado, para el injerto de CS también se ha utilizado la química EDC/NHS y posteriormente se ha evaluado su concentración mediante la técnica de la fluorescamina. Una vez puesto a punto el método de preparación de los hidrogeles controlando la temperatura y pH de estos, se ha llevado a cabo la caracterización química mediante la técnica de cromatografía por permeación de gel (GPC) y mecánica mediante ensayos de reometría, así como la determinación de la liberación controlada de condroitín sulfato mediante el ensayo de biodegradación, trabajando en condiciones fisiológicas similares a lo que será el tejido real.

La investigación establece la concentración óptima de ácido hialurónico (HA) para el hidrogel SH-HA-g-CS en 0.5%. La elección entre SH-HA-g-CS 24/24 y 24/48 se basa en la mayor eficacia de gelificación del primero. Con este trabajo se obtiene una solución que produce una liberación controlada de condroitín sulfato, que actúa como condroprotector y que mejora las propiedades viscoelásticas del tejido en el que se inyecta.

Palabras clave: Ácido hialurónico; condroitín sulfato; artrosis; condroprotección; química EDC/NHS; biodegradación; gelificación *in situ*; viscosuplemento.

ABSTRACT:

Osteoarthritis is a degenerative joint disease that affects a large number of people. According to the latest statistics, the incidence of osteoarthritis in Spain is estimated to be 10% of the population. Current injectable therapies only treat symptoms and do not regenerate the affected tissue, making them ineffective in the long term.

In order to create a more effective solution, we plan to develop an injectable, self-crosslinking in situ hyaluronic acid (HA) hydrogel with grafted chondroitin sulphate (CS) for subsequent controlled release. This hydrogel will act as a viscosupplement, mimicking the main properties of cartilage, and stimulating the production of new matrix. To this end, structures based on glycosaminoglycans are developed in order to obtain more stable supramolecular constructs and to avoid the body's immune response.

For this purpose, high molecular weight hyaluronic acid (1.5-1.8 MDa) will be modified by EDC/NHS chemistry to introduce terminal sulphhydryl (SH) groups and give the HA the ability to gel in situ through disulphide bridges working within an optimal degree of thiolation. On the other hand, EDC/NHS chemistry is also used for CS grafting and its concentration is subsequently evaluated by the fluorescamine technique. Once the hydrogel preparation method has been fine-tuned by controlling the temperature and pH of the hydrogels, chemical characterisation is carried out using gel permeation chromatography (GPC) and mechanical characterisation using rheometry tests, as well as the determination of the controlled release of chondroitin sulphate using the biodegradation test, working under physiological conditions similar to what will be the real tissue.

The research sets the optimal hyaluronic acid (HA) concentration for the SH-HA-g-CS hydrogel at 0.5%. The choice between SH-HA-g-CS 24/24 and 24/48 is based on the higher gelling efficiency of the former. This work results in a solution that produces a controlled release of chondroitin sulphate, which acts as a chondroprotectant and improves the viscoelastic properties of the tissue into which it is injected.

Keywords: Hyaluronic acid; chondroitin sulphate; osteoarthritis; chondroprotection; EDC/NHS chemistry; biodegradation; in situ gelation; viscosupplementation.

RESUM:

L'artrosi és una malaltia degenerativa de les articulacions que afecta a un gran nombre de persones. Segons les estadístiques més recents, s'estima que la incidència de l'artrosi a Espanya és del 10% de la població. Les teràpies injectables actuals només tracten els símptomes i no regeneren el teixit afectat, per la qual cosa són poc efectives a llarg termini.

Amb l'objectiu de crear una solució més efectiva, es planteja desenvolupar un hidrogel d'acid hialurònic (HA) injectable i autorreticulable *in situ* amb sulfat de condroitina (CS) empeltat per al seu posterior alliberament controlat. Aquest hidrogel actuarà com viscosuplement, mimetitzant les principals propietats del cartílag i estimulant la producció de nova matriu. Per fer això, es desenvolupen estructures basades en glicosaminoglicans amb la fi d'obtenir constructes supramoleculares més estables i evitar la resposta immunològica de l'organisme.

Per a això, s'emprarà àcid hialurònic d'alt pes molecular (1.5-1.8 MDa), modificant-lo mitjançant la química EDC/NHS per introduir grups sulfhidril (SH) terminals i conferir-li al HA la possibilitat de gelificar *in situ* a través de ponts de disulfur, treballant dins d'un grau de tiolació òptim. D'altra banda, per a l'empeltament de CS també es pot emprar la química EDC/NHS i, posteriorment, s'avalua la seua concentració mitjançant la tècnica de la fluorescamina. Una vegada a punt el mètode de preparació dels hidrogeles, controlant la temperatura i pH d'aquests, es du a terme la caracterització química mitjançant la tècnica de cromatografia per permeància en gel (GPC) i mecànica a través d'assajos de reometria, així com la determinació de l'alliberament controlat de sulfat de condroitina mitjançant el assaig de biodegradació, treballant en condicions fisiològiques similars a les que es trobarà en el teixit real.

Amb aquest treball se estableix la concentració òptima d'acid hialurònic (HA) per al hidrogel SH-HA-g-CS en un 0,5%. La elecció entre SH-HA-g-CS 24/24 i 24/48 es basa en l'eficiència de gelificació més alta del primer. Aquest treball dona com a resultat una solució que produeix una alliberació controlada de sulfat de condroitina, que actua com a condroprotector i millora les propietats viscoelàstiques del teixit en què es injecta.

Paraules clau: Àcid hialurònic; sulfat de condroitina; artrosi; condroprotecció; química EDC/NHS; biodegradació; gelificació *in situ*; viscosuplement.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la composición estructural de una rodilla sana y artrósica (Salgado et al., 2021).	11
Figura 2. Esquema resumen del tratamiento de la OA.....	13
Figura 3. Representación de la estructura del cartílago donde: a) representa la zona superficial; b) representa la zona media; y c) representa la zona profunda (Sacitharan, 2019).	14
Figura 4. Representación esquemática de las moléculas más abundantes en la matriz del cartílago que muestra la interacción entre las fibrillas de colágeno de tipo II y los proteoglicanos unidos al ácido hialurónico (Sánchez Téllez, 2019).....	16
Figura 5. Unidad de repetición formada por un disacárido, a) Estructura HA y b) Estructura CS (Schuurmans et al., 2021).....	20
Figura 6. Ruta química EDC/NHS para crear modificaciones químicas de polisacáridos carboxilados y formar hidrogeles SH-HA (Bart et al., 2009).....	22
Figura 7. Proceso de síntesis SH-HA.	25
Figura 8. En la figura se observa cómo la molécula de HA al reaccionar con la cisteamina, forma el grupo químico amida dejando expuestos los sulfhidrilos.	25
Figura 9. Proceso diálisis SH-HA	26
Figura 10. a) Estructura química del reactivo de Ellman; b) Reacción del DTNB en presencia de -SH (sulfhidrilos) (Thermo Scientific, s. f.).	26
Figura 11. Estructura molecular de la cisteamina.	27
Figura 12. Protocolo de Thermo Scientific para Ellman's Reagent: a) Primer paso donde se prepara el proceso seriado de la dilución de CSA para la recta patrón; b) Segundo paso donde se preparan las muestras definitivas para sacar resultados en el espectrofotómetro.....	28
Figura 13. Proceso de síntesis HA-g-CS (1:15, 1:50, 1:100).	29
Figura 14. Diálisis completa de HA-g-CS 1:50.	29
Figura 15. Reacción de la fluorescamina con una amina primaria.....	30
Figura 16. Liofilizadora (Freeze-Dryer).....	32
Figura 17. Proceso de síntesis de los geles. La diferencia entre a) y b) radica en el periodo de agitación entre la adición de CS y la de CSA.....	33
Figura 18. Reómetro que se utiliza para la determinación de las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles.	34
Figura 19. Diseño de las placas utilizadas durante el ensayo de biodegradación en los diferentes timepoints. Donde: Fila A: SH-HA + CS; Fila B: SH-HA-g-CS 24/24; Fila C: SH-HA-g-CS 24/48; Fila D: Synvisc One + CS.	36
Figura 20. Logaritmo del peso molecular frente al tiempo de elución de las muestras de los patrones de referencia de polietilenglicol. La recta representa el ajuste lineal utilizado posteriormente para la obtención de los pesos moleculares de las diferentes muestras.	40
Figura 21. A) Representación de la señal obtenida en el ensayo GPC-SEC de la muestra HA-g-CS 1:50 pasada por el Float-A-Lyzeer (curva negra) y su procesado (curva verde). B) Distribución de los pesos moleculares en función de la fracción de área bajo la curva para cada instante temporal con respecto al área total.....	41
Figura 22. Gráfico comparativo de la distribución de los pesos moleculares de las muestras HA y de HA-g-CS 1:50 pasada por el Float-A-Lyzer en función de la fracción de área bajo la curva para cada instante temporal con respecto al área. El detalle se amplía en la figura siguiente.....	42
Figura 23. Gráfico comparativo con detalle e la Figura 22 que representa la distribución de los pesos moleculares de las muestras HA y de HA-g-CS 1:50 pasada por el Float-A-Lyzer en función de la fracción de área bajo la curva para cada instante temporal con respecto al área...	42

Figura 24. Gráfico comparativo de la distribución de los pesos moleculares de las muestras HA-g-CS 1:50 y de HA-g-CS 1:50 pasada por el Float-A-Lyzer en función de la fracción de área bajo la curva para cada instante temporal con respecto al área.	43
Figura 25. Gráfico comparativo de la distribución de los pesos moleculares de las muestras HA-g-CS 1:15, 1:50 y 1:100 en función de la fracción de área bajo la curva para cada instante temporal con respecto al área.	44
Figura 26. La curva naranja representa el espectro de absorbancia del DTNB, mientras que la azul, representa el del DTNB en contacto con grupos SH.	44
Figura 27. Ajuste estequiométrico para formar puentes disulfuro.	46
Figura 28. Gelificación de las muestras SH-HA a pH = 4.5, 7.5 y 9.....	47
Figura 29. Comportamiento de las muestras SH-HA pH = 4.5, SH-HA pH = 7.5 y SH-HA pH = 8.5 en el ensayo de reometría.	47
Figura 30. Gráfico que representa la comparación de los geles SH-HA y SH-HA-g-CS (24/24) a pH=7.5.....	49
Figura 31. Recta patrón obtenido. La recta representa el ajuste lineal utilizado posteriormente para la obtención de la concentración de CS presente en cada muestra.....	50
Figura 32. Evolución temporal de la liberación de CS de las muestras SH-HA + CS, SH-HA-g-CS (24/24), SH-HA-g-CS (24/48), Monovisc + CS y Synvisc One + CS en medio tampón.....	51
Figura 33. Evolución temporal de la liberación de CS de las muestras SH-HA + CS, SH-HA-g-CS (24/24), SH-HA-g-CS (24/48), Monovisc + CS y Synvisc One + CS en medio alcalino.	51
Figura 34. Evolución temporal de la liberación de CS de las muestras SH-HA + CS, SH-HA-g-CS (24/24), SH-HA-g-CS (24/48), Monovisc + CS y Synvisc One + CS en medio enzimático.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la Matriz Extracelular del cartílago articular y función de cada uno de los componentes (Vaca-González et al., 2017).....	15
Tabla 2. Tabla resumen de las propiedades del HA (Alonso Carro & Villanueva Blaya, 2002).	18
Tabla 3. Preparados comerciales disponibles	19
Tabla 4. Material necesario para seguir el protocolo de de Thermo Scientific para Ellman's Reagent (Thermo Scientific, s. f.)	27
Tabla 5. Resumen ensayo de biodegradación.	35
Tabla 6. Concentración de aminas primarias de las muestras HA-g-CS.....	38
Tabla 7. Grado y rendimiento de injerto de la muestra HA-g-CS a diferentes concentraciones.	38
Tabla 8. Resultados obtenidos en el ensayo siendo; Muestra 1: CS en H ₂ O destilada; Muestra 2: CS en H ₂ O destilada + membrana de diálisis de 3500 durante 24 horas; Muestra 3: CS en H ₂ O destilada + membrana de diálisis de 3500 durante 48 horas; y Muestra 4: CS en H ₂ O destilada + membrana de diálisis de 3500 48 durante horas + Float-A-Lyzer 100 kDa durante 24 horas. ...	39
Tabla 9. Resultados del grado de tiolación de las muestras: SH-HA, SH-HA-g-CS 24/24 y SH-HA-g-CS 24/48.	45
Tabla 10. Grado y rendimiento de injerto de la muestra SH-HA-g-CS 24/24 SH-HA-g-CS 24/48.	45
Tabla 11. Resultados del reómetro del gel SH-HA a diferentes pH.	48
Tabla 12. Resultados del reómetro del gel SH-HA-g-CS (24/24) a diferentes pH.....	48
Tabla 13. Comparación del valor de la tan δ de los geles estudiados con respecto al valor gel comercial Synvisc-One.	49

ÍNDICE

DOCUMENTO I:.....	10
MEMORIA	10
1. Introducción	11
1.1. Contexto de la artrosis y limitaciones de las terapias actuales	11
1.2. Composición del cartílago articular y su papel en la artrosis	13
1.2.1. Condrocitos	14
1.2.2. Matriz extracelular.....	15
1.2.3. Proteoglicanos	16
1.3. Viscosuplementación de HA.....	17
1.4. Uso de hidrogeles para la regeneración del cartílago	19
1.4.1. La química EDC/NHS	21
2. Objetivos y justificación.....	23
2.1. Contexto de la invención	23
2.2. Objetivos particulares	23
3. Materiales y métodos	24
3.1. Obtención del hidrogel SH-HA	24
3.1.1. Síntesis SH-HA	24
3.1.2. Diálisis.....	25
3.1.3. Determinación del grado de tiolación.....	26
3.2. Incorporación de moléculas condroprotectoras	28
3.2.1. Injerto de CS a cadenas de HA.....	28
3.2.2. Diálisis.....	29
3.2.3. Determinación del grado de injerto de CS.....	30
3.2.4. Liofilización	31
3.2.5. Caracterización de HA-g-CS mediante cromatografía.....	32
3.3. Síntesis de geles con injerto de CS	33
3.4. Reología de los hidrogeles	34
3.5. Ensayo de biodegradación de los hidrogeles	35
4. Resultados y discusión	38
4.1. Determinación del grado de injerto del CS en diferentes concentraciones.....	38
4.2. Determinación de las propiedades del CS	39
4.3. Análisis de las muestras SH-HA y SH-HA-g-CS.	44
4.3.1. Determinación del grado de tiolación y de injerto de CS en las muestras SH-HA y SH-HA-g-CS.	44
4.3.2. Optimización en el proceso de gelificación.....	45
4.3.3. Caracterización de las propiedades viscoelásticas.....	47
4.3.4. Determinación de la liberación de CS de los geles	49

5. Conclusiones	53
6. Trabajo en proceso y futuro.....	55
7. Bibliografía	56
DOCUMENTO II:.....	60
1. Presupuesto	61
1.1. Presupuesto parcial	61
1.1.1. Costes de la mano de obra.....	61
1.1.2. Costes de material fungible	61
1.1.3. Costes de material inventariable.....	62
2. Presupuesto total	63

DOCUMENTO I: MEMORIA

1. Introducción

1.1. Contexto de la artrosis y limitaciones de las terapias actuales

Las enfermedades reumáticas afectan al aparato locomotor, y con ello, son aquellas que causan dolor en los tendones, articulaciones, músculos y ligamentos. Este grupo representa un problema importante en la salud pública ya que, en España 1 de cada 5 personas padece una enfermedad de este tipo, aumentando significativamente la cifra en pacientes mayores de 65 años (Rojas, 2018). Además de dolor, este tipo de enfermedades provocan un daño estructural irreversible en el tejido diana, lo que supone una disminución o pérdida de la capacidad funcional, de la actividad física o laboral y, con ello, un elevado coste socioeconómico.

Las enfermedades reumáticas se pueden clasificar en diferentes grupos en función del órgano afectado. La artrosis afecta principalmente al cartílago articular y al hueso subcondral mientras que la artritis, provoca la inflamación del tejido sinovial de la articulación. Por otro lado, están los reumatismos que afectan a las partes blandas o las enfermedades óseas que afectan directamente a los huesos (Rojas, 2018).

La artrosis, osteoartritis en inglés (OA), es una enfermedad muy heterogénea que afecta a todas las articulaciones sinoviales, incluidas la mano, la rodilla, la cadera y la columna vertebral. La enfermedad se caracteriza principalmente por la degradación progresiva del cartílago articular y la remodelación del hueso subcondral junto con sinovitis episódica secundaria, como se ve representado en la Figura 1.

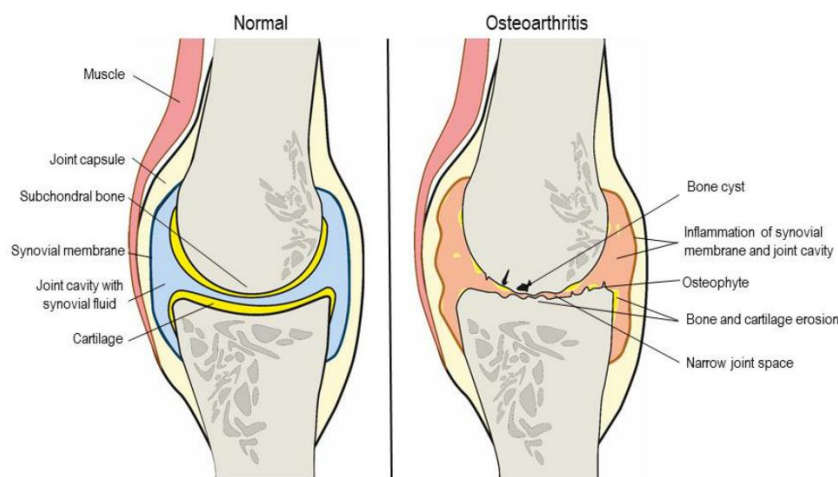


Figura 1. Representación esquemática de la composición estructural de una rodilla sana y artrósica (Salgado et al., 2021).

Estudios recientes publicados en 2020 desvelan que la prevalencia de artrosis en España asciende al 29,35% (IC 95%: 27,77-30,97) y aumenta con la edad, alcanzando sus cifras más altas en personas mayores de 60 años (52,6%; IC 95%: 46,97-58,29) (Blanco et al., 2021).

Durante muchos años se han desarrollado numerosas investigaciones para dar con la etiología de la enfermedad. El problema principal es que hay muchos factores heterogéneos que inducen al inicio y la progresión de la artrosis. Además, aunque se ha demostrado que la incidencia es mayor en personas mayores, muchos jóvenes deportistas también padecen esta enfermedad debido a la sobrecarga excesiva de las extremidades. Otros factores de riesgo están relacionados con la edad,

el sexo, la sobrecarga y la mala alineación, los trastornos genéticos y los síndromes metabólicos de las personas, así como la obesidad, respuestas inflamatorias o la diabetes (Vina & Kwoh, 2018). Por tanto, dado el envejecimiento progresivo de la población y el aumento de las patologías relacionadas con su etiopatogenia (obesidad y sedentarismo) la OMS considera que, en un plazo corto de tiempo, más de 579 millones de personas en el mundo la padecerán, convirtiéndose así en la cuarta causa de discapacidad en el mundo (Apostu et al., 2019).

Se han desarrollado diferentes terapias para mejorar la calidad de vida y el alivio del dolor de los pacientes que padecen artrosis. Sin embargo, ninguna de ellas ha sido capaz de detener o retrasar satisfactoriamente la progresión de la OA o proporcionar un alivio sintomático eficaz y duradero que disminuya significativamente el gasto económico en los sistemas de salud (Vina & Kwoh, 2018).

Su carácter "incurable" en la actualidad, es decir, la no disponibilidad de un tratamiento etiológico eficaz, hace que se convierta en un reto desde el punto de vista terapéutico. El proceso deberá incidir en la prevención y en tratar de los síntomas que incluyen: dolor e impotencia funcional o hipomovilidad (secundaria al dolor y a la disminución del arco de movilidad por los cambios estructurales que comporta esta patología). Actualmente se utilizan múltiples métodos de tratamiento basados en fisioterapia, administración de fármacos (sistémicos o intrarticulares) y técnicas quirúrgicas (Apostu et al., 2019). Se van a ir explicando por orden de menor a mayor afectación como así dicta la ESCEO (European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases) (Bruyère et al., 2019):

En primer lugar, en el tratamiento no farmacológico se recurre a planificar cambios en el estilo de vida del paciente, implementando ejercicios o cambios en su dieta.

Por otro lado, si se trata de pacientes que tienen una mala alineación, el primer paso es derivarlos al fisioterapeuta para comenzar un tratamiento con dispositivos de apoyo, así como plantillas o bastones, entre otros.

Cuando el paciente es sintomático, el tratamiento más utilizado durante años ha sido a base de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, AINEs por sus siglas, como el paracetamol hasta 4 gr por día. En caso de que el dolor persista se puede añadir la capsaicina tópica en crema para aplicarla directamente sobre la articulación unas 4 veces al día. Se ha demostrado que este método consigue aliviar el dolor y la inflamación, aunque no evite el daño producido en el cartílago (Calvo, 2012).

Los AINES son medicamentos encargados de inhibir la enzima ciclooxigenasa (COX), tanto la COX-1, como la COX-2 aunque es la inhibición de esta última la responsable de la acción antiinflamatoria y analgésica. La ciclooxigenasa es una enzima que sintetiza prostaglandinas, responsables de la realización de funciones relacionadas con el dolor y la inflamación. Sin embargo, a pesar de que el paracetamol es un fármaco analgésico y antipirético, y pertenece al grupo de los AINE, no presenta actividad antiinflamatoria ya que no inhibe la ciclooxigenasa (COX) en lugares con altas concentraciones de peróxido como los sitios de inflamación. Por lo que, si el paciente continúa con síntomas o son más severos, se recurre a prescribir ibuprofeno durante periodos más largos. Hay que considerar el riesgo gastrointestinal, renal y cardiovascular que conlleva el uso de AINE, por ello se evitan o se prescriben AINE selectivos a COX-2 o no selectivos en función del riesgo asociado del paciente. Además, en caso de la artrosis de rodilla,

también se puede recurrir a prescribir fármacos de glucosamina y/o condroitín sulfato administrados por vía oral para reducir el dolor y el deterioro funcional en la artrosis, aunque si no hay respuesta en 6 meses se retirarán (Calvo, 2012).

Entrando en una fase más aguda, si el paciente no responde a los analgésicos se recurre a la “infiltración”. Esto corresponde a la inyección intraarticular de corticoides o de productos de ácido hialurónico con el fin de restaurar la viscoelasticidad del líquido sinovial.

Finalmente, si la respuesta es mínima después de estos tratamientos mencionados y los pacientes padecen una discapacidad o gran dolor, se recurre al tratamiento quirúrgico donde se producirá el reemplazo total de la articulación por una prótesis (Sánchez Martín, 2013).

En la Figura 2 se puede ver un resumen de los tratamientos actuales de la artrosis.

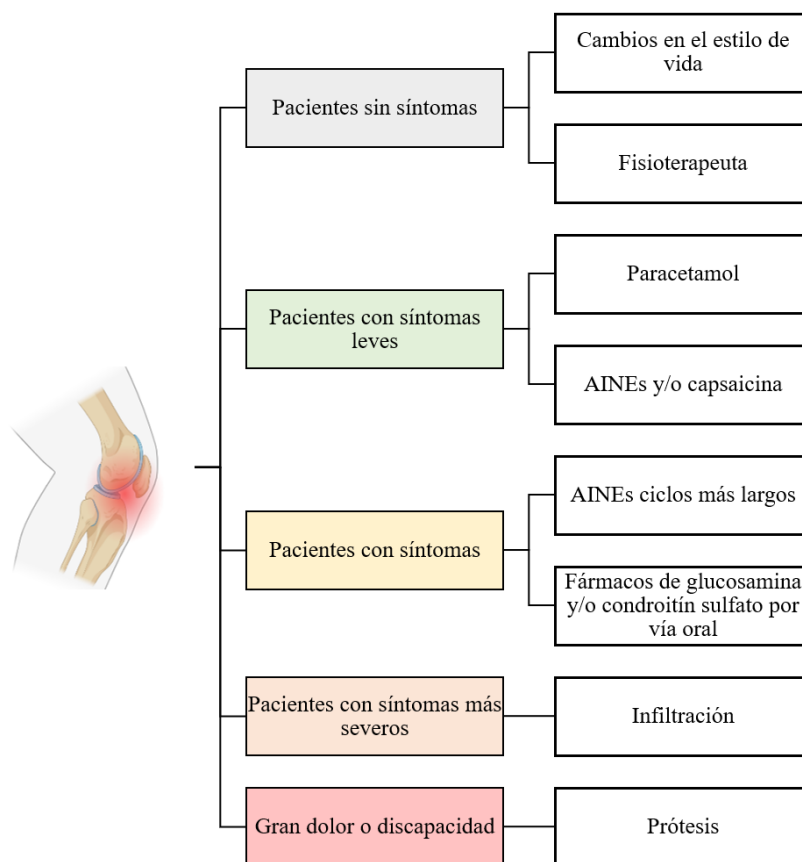


Figura 2. Esquema resumen del tratamiento de la OA.

1.2. Composición del cartílago articular y su papel en la artrosis

El cartílago articular se localiza en las superficies de las articulaciones que permiten el movimiento y se trata de un tejido carente de vasos sanguíneos y nervios, por lo que no tiene capacidad regenerativa. Su principal función es proveer una superficie suave que facilite el movimiento sin fricción de los huesos subcondrales y distribuir las cargas adecuadamente entre estos.

El cartílago articular, también conocido como cartílago hialino, está compuesto en su mayoría por agua (70%), condrocitos y matriz extracelular (MEC). Este es un tejido con una alta relación MEC-células. La MEC del cartílago articular está compuesta de colágeno tipo II (70%), proteoglicanos (30%) y lípidos en menor medida. Asimismo, contiene otros tipos menores de colágeno como el VI, IX y XI, y varias proteínas y glicoproteínas. Estos componentes forman una extensa matriz extracelular hidratada. Tanto la cantidad de células como la producción de la matriz cartilaginosa son objetos cruciales en las propiedades y la función correcta del cartílago. Estos componentes, así como su organización, se ven dañados a medida que va incrementando la edad en los pacientes, lo que conlleva a la pérdida de su función.

El cartílago se puede segmentar en cuatro regiones como se observa en la Figura 3. La primera de ellas es la zona superficial, que se encuentra en la proximidad inmediata a la superficie articular. Esta zona está compuesta por fibras de colágeno densamente empacadas alrededor de condrocitos aplanados. Esta morfología otorga una elevada resistencia a la tracción del cartílago, lo que le permite adaptarse a las fuerzas generadas durante la carga y la movilidad de la articulación. Las fibras de colágeno de la zona media del cartílago articular se encuentran dispuestas al azar, y se ubican junto a condrocitos de forma esférica. Finalmente, la zona profunda del cartílago articular está conformada por columnas de condrocitos en forma de elipsoide, las cuales se distribuyen entre fibras de colágeno orientadas radialmente que se extienden en dirección a la zona calcificada. En la zona calcificada del cartílago articular, se encuentran condrocitos que expresan un fenotipo hipertrófico, los cuales sintetizan matriz calcificada que proporciona una interfaz entre el cartílago no calcificado y el hueso subcondral subyacente (Sacitharan, 2019).

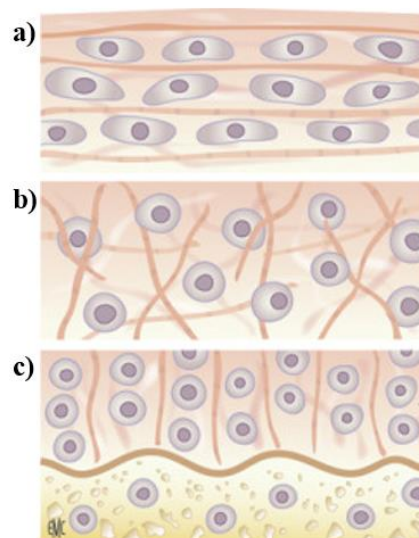


Figura 3. Representación de la estructura del cartílago donde: a) representa la zona superficial; b) representa la zona media; y c) representa la zona profunda (Sacitharan, 2019).

1.2.1. Condrocitos

Los condrocitos son las células que se encuentran en el cartílago articular. Son responsables de mantener una renovación equilibrada del cartílago y responden a los cambios inducidos por la

carga articular, las citocinas, los factores de crecimiento y la presencia de moléculas fragmentadas en la MEC del cartílago.

Como el cartílago es de naturaleza avascular, los condrocitos viven en condiciones hipóxicas y dependen de los nutrientes obtenidos de la superficie articular por difusión, así como de las señales obtenidas por el entorno iónico extracelular y las interacciones de la MEC (Stockwell, 1991).

Se observa una pérdida sustancial de condrocitos por necrosis o apoptosis en las zonas superficiales y medias del cartílago a lo largo de la progresión de la artrosis. La apoptosis de los condrocitos puede ser el resultado de varios mediadores inflamatorios, disminución del metabolismo celular y disminución de la protección contra la fuerza mecánica (Lotz & Caramés, 2011). La pérdida de condrocitos reduce el volumen del cartílago y la renovación efectiva de la ECM, lo que a su vez aumenta la pérdida de cartílago y conduce a la OA (Vaca-González et al., 2017).

1.2.2. Matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) del cartílago hialino está formada en su mayor parte por agua (60-80% de la masa total) y por macromoléculas (20-40% de la masa total). Estas moléculas son colágeno, proteoglicanos y proteínas no colágenas. Su composición se puede ver de manera más detallada en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de la Matriz Extracelular del cartílago articular y función de cada uno de los componentes (Vaca-González et al., 2017).

Elemento	Tipo de elemento	Porcentaje en masa y función
Agua		80% del total de la MEC
Colágeno	Tipo II (70%), VI, IX y XI	El principal componente de la MEC es el colágeno de tipo II. Estas fibras de colágeno se alinean de acuerdo con la dirección de la carga soportada por el cartílago y le proporcionan mayor rigidez.
Proteoglicanos	Agrecanos: Queratán sulfato, Hialuronato, Condroitín sulfato	Estas macromoléculas principalmente retienen agua y mantienen la distancia entre las células. Además, le brindan al tejido una capacidad de resistencia osmótica y le proporcionan propiedades de compresibilidad.
Moléculas de adhesión	Laminina, integrinas y fibronectina	Participan en la unión de las células y la MEC
Lípidos		Participan en el desarrollo de la membrana celular
Proteasas	Metaloproteasas	Enzimas encargadas de la degradación y renovación de los componentes de la MEC.

En general, la función principal de esta matriz es servir como soporte de las células para que puedan realizar sus funciones y permitir la transducción de las señales durante las cargas soportadas por la articulación (Vaca-González et al., 2017).

1.2.3. Proteoglicanos

La sustancia fundamental del cartílago hialino contiene dos clases de glicosaminoglicanos: el sulfato de condroitina (CS) y el sulfato de queratina. Ambos sulfatos se unen a una proteína central para formar un monómero de proteoglicano. El monómero de proteoglicano más importante en el cartílago hialino es el agregano (250 kDa). Cada molécula contiene unas 100 cadenas de sulfato de condroitina y hasta 60 moléculas de sulfato de queratina. Debido a los grupos sulfato, las moléculas de agregano poseen una gran carga negativa con afinidad por las moléculas de agua. Cada molécula lineal de ácido hialurónico está asociada a un gran número de moléculas de agregano (más de 300). Las proteínas de enlace unen de forma no covalente el núcleo proteico de los proteoglicanos a las moléculas lineales de ácido hialurónico. Las cadenas laterales de condroitín sulfato del proteoglicano se unen electrostáticamente a las fibrillas de colágeno, formando una matriz reticulada, como se muestra en la Figura 4. Las propiedades físicas de estos componentes de la matriz producen un material altamente hidratado, flexible y de gran resistencia. Aproximadamente el 75% del peso húmedo del cartílago hialino es agua.

En resumen, los proteoglicanos son altamente hidrófilos. Esta propiedad permite la entrada de agua a través del proceso de ósmosis en la matriz extracelular; pero la hidratación y la capacidad de hinchamiento están limitadas por las fibrillas de colágeno (Sánchez Téllez, 2019).

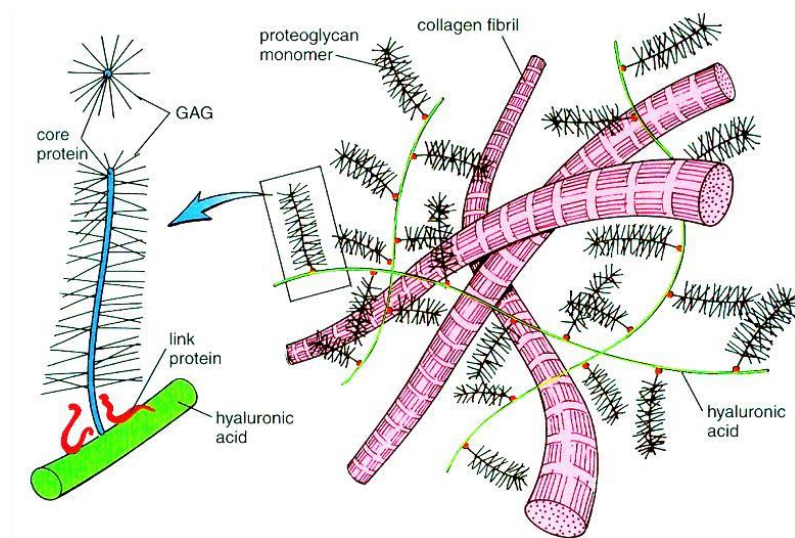


Figura 4. Representación esquemática de las moléculas más abundantes en la matriz del cartílago que muestra la interacción entre las fibrillas de colágeno de tipo II y los proteoglicanos unidos al ácido hialurónico (Sánchez Téllez, 2019).

1.3. Viscosuplementación de HA

- **Ácido hialurónico:**

El ácido hialurónico (HA) es un carbohidrato que está presente de manera natural en muchos de los tejidos vivos. Este polisacárido es un componente de la matriz extracelular y está compuesto por repeticiones de disacáridos de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico que están unidos por los enlaces glucosídicos beta-1,4 y beta-1,3 que van alternando. El número de disacáridos repetidos puede superar los 10000, con una masa molar de hasta cuatro millones de Dalton. Esto da como resultado cadenas muy largas de HA, con estructuras muy rígidas y estables (Necas et al., 2008).

El HA desempeña varias funciones organizativas importantes en la matriz extracelular uniéndose a las células y otros componentes a través de interacciones específicas y no específicas. Además, existe un receptor específico de HA (CD44), que incita que las células (los condrocitos) se unan al ácido hialurónico.

Los grupos característicos del HA le ofrecen unas propiedades determinadas que se ven a modo resumen en la Tabla 2:

- ✓ **Propiedades físicas:** El ácido hialurónico tiene propiedades viscosas y elásticas, y la prevalencia de cualquiera de ellas depende de la fuerza aplicada. Debido a esto, el ácido hialurónico imparte viscosidad al líquido sinovial, absorbiendo los golpes durante los movimientos rápidos y actuando como lubricante durante los movimientos lentos.
- ✓ **Efecto antiinflamatorio:** La administración intraarticular de ácido hialurónico reduce los niveles de mediadores inflamatorios en el líquido sinovial de pacientes con artritis. Existe evidencia in vitro de que el ácido hialurónico afecta en la liberación de ácido araquidónico de los fibroblastos sinoviales, aunque esta propiedad depende de la dosis y del peso molecular. Por lo que, el ácido araquidónico extracelular es absorbido por los glóbulos blancos sinoviales y convertido en mediadores inflamatorios como las prostaglandinas y los leucotrienos (Tobetto et al., 1992).
- ✓ **Efecto anabólico:** La inyección intraarticular de ácido hialurónico puede afectar a la síntesis de ácido hialurónico estimulando a los fibroblastos sinoviales. Varios estudios han evaluado el efecto de varios preparados comerciales de ácido hialurónico en las articulaciones de pacientes con artrosis y se concluye que, tanto la concentración como el peso molecular de los mismos son importantes a la hora de estimular producción de ácido hialurónico, siendo más efectivo un peso molecular superior a 5×10^5 dalton (Smith & Ghosh, 1987).
- ✓ **Efecto analgésico:** El ácido hialurónico intraarticular modula el dolor por dos mecanismos: un mecanismo directo, mediante la inhibición de los receptores del dolor, y otro indirecto, mediante la sustancia P (péptido implicado en la señalización del dolor) (Ghosh, 1994).
- ✓ **Efecto condroprotector:** Se ha demostrado que el ácido hialurónico tiene un efecto condroprotector en modelos animales. Ya que, al incluir HA se observó un aumento en la producción de la matriz del cartílago en artrosis inducidas en perros (Adams & Brandt, 1991).

Tabla 2. Tabla resumen de las propiedades del HA (Alonso Carro & Villanueva Blaya, 2002).

Propiedades del HA
Viscoelasticidad
Efecto antiinflamatorio
Efecto anabólico
Efecto analgésico
Condroprotector

Una rodilla sana contiene 2 ml de líquido sinovial con una concentración de ácido hialurónico de 2,5 a 4,0 mg/ml. Sin embargo, en la artrosis, esta concentración disminuye de la mitad a un tercio del valor normal. Al igual que la interacción entre las moléculas de ácido hialurónico, el tamaño de las moléculas también disminuye. Esto se expresa en una pérdida de propiedades reológicas, una disminución de la densidad dinámica, un cambio en las propiedades elásticas, una disminución de la acción de filtrado y barrera del líquido sinovial, lo que afecta a la nutrición del cartílago. La pérdida de lubricación aumenta las fuerzas de tracción y destruye la red de tejido de colágeno necesaria para la integridad de las superficies articulares (Alonso Carro & Villanueva Blaya, 2002).

Por tanto, la naturaleza viscoelástica única del HA, junto con su biocompatibilidad y no inmunogenicidad, ha llevado a su uso en una serie de aplicaciones clínicas, incluida la suplementación del líquido articular en la artrosis (Necas et al., 2008).

- **Viscosuplementación:**

La viscosuplementación se trata de la administración intraarticular de ácido hialurónico con el objetivo de recuperar las propiedades elásticas y viscosas del líquido sinovial, restableciendo así la homeostasis alterada en la articulación artrósica. Esta terapia está recomendada para pacientes que presentan síntomas después de haber recibido tratamiento médico farmacológico y rehabilitador (Alonso Carro & Villanueva Blaya, 2002).

A partir de 1980 se inició se inició la investigación sobre la seguridad y eficacia de esta técnica, pero no fue hasta 1990 cuando se demostró su seguridad, lo que desencadenó una amplia variedad de estudios para analizar su efecto (Puhl et al., 1993). Un estudio adicional, demostró la eficacia de la viscosuplementación con ácido hialurónico en la rodilla de pacientes con osteoartritis (Clegg et al., 2013). Pero no fue hasta el año 1995 cuando la viscosuplementación de HA comenzó a utilizarse clínicamente en Europa (Necas et al., 2008).

A pesar de que se han llevado a cabo diversos estudios que evidencian los efectos beneficiosos del ácido hialurónico en pacientes con artrosis, aún no se cuenta con información suficiente para establecer de manera concluyente su efectividad a largo plazo en seres humanos. Por lo tanto, resulta imprescindible la realización de investigaciones adicionales que permitan determinar los beneficios a largo plazo, la cantidad de inyecciones necesarias y el momento óptimo para su administración (Clegg et al., 2013).

A día de hoy, los productos más utilizados clínicamente son el HA natural (Hyalgan) y Synvisc, un hilano sintético G-F 20. El Synvisc es un HA reticulado que tiene mayor peso molecular y viscoelasticidad, por tanto, tiene mejores propiedades mecánicas, lo que lo hace más eficaz en el

tratamiento de la OA, ya que perdura más tiempo en la articulación. Otros productos comerciales análogos se basan en estrategias equivalentes al Hyalgan (Orthovisc) o al Synvisc (Monovisc), con sutiles diferencias en la concentración del soluto que afectan muy sutilmente al efecto clínico o la persistencia en el tejido como se ve representado en la Tabla 3 (Alonso Carro & Villanueva Blaya, 2002).

Tabla 3. Preparados comerciales disponibles

Productos comerciales	Peso molecular x10 ⁵ (MDa)	Concentración de HA (mg/ml)	Régimen de tratamiento
Synvisc Hylan G-F 20	60	8	Semanal x 3
Hyalgan	5-7.3	10	Semanal x 6
Orthovisc	>10	15	Semanal x 3
Monovisc	1-2.9	22	Semanal x 3

Actualmente, se emplean pesos moleculares de HA muy altos (3-6 MDa), medios-altos (0.5-2 MDa) y bajos (0.1-0.5 MDa). Los resultados de algunos estudios (Baron et al., 2019) han demostrado que las inyecciones intraarticulares de ácido hialurónico de alto peso molecular dan mejores resultados que las inyecciones de bajo peso molecular. Esto se debe a que mejora la calidad de vida de los pacientes al reducir el número de inyecciones, es un procedimiento menos invasivo y tiene menores riesgos asociados. Sin embargo, la eficacia del HA de alto peso molecular es limitada, ya que si es demasiado alto ($\geq 3-6$ MDa) puede perder su capacidad de unión al receptor CD44 a pesar de la ventaja de proporcionar un tiempo de residencia más prolongado (Necas et al., 2008).

1.4. Uso de hidrogeles para la regeneración del cartílago

Como se ha estado discutiendo repetitivamente en los apartados anteriores, el cartílago articular tiene poca capacidad para regenerar y reparar tejidos después de lesiones o enfermedades degenerativas debido a su naturaleza avascular, lo que hace que la reparación del cartílago articular sea un gran desafío. Debido a su alto contenido de agua y su parecido estructural con los tejidos biológicos blandos naturales, los hidrogeles son candidatos prometedores para la reparación del cartílago. Los hidrogeles tienen una resistencia mecánica y una cinética de hinchamiento que facilitan la difusión de nutrientes y metabolitos, para proporcionar un entorno de matriz extracelular (MEC) biomimético similar al cartílago natural.

Se ha desarrollado una variedad de hidrogeles compuestos por polímeros reticulados física o químicamente de origen natural o sintético para aplicaciones biomédicas. Los hidrogeles basados en polímeros sintéticos como el polietilenglicol, el alcohol polivinílico, el ácido poliglicólico y la poliacrilamida tienen altas propiedades mecánicas, pero estos materiales son relativamente bioinertes y no muestran bioactividad. Por lo tanto, no puede proporcionar un entorno ideal para la unión celular, inducir la condrogénesis y apoyar la remodelación de la matriz del cartílago (Han et al., 2018).

Por otro lado, los glicosaminoglicanos (GAG) son un grupo importante de polímeros naturales que pueden funcionalizarse para producir hidrogeles para su uso en ingeniería de tejidos (Schuurmans et al., 2021). Estos grupos incluyen colágeno, agarosa, fibroína de seda, quitosano,

alginate, gelatina, elastina, ácido hialurónico y sulfato de condroitina (CS), que presentan excelentes actividades biológicas, incluidas las propiedades de señalización e interacción celular (Han et al., 2018).

La mayoría de los GAG que se encuentran en el cuerpo humano consisten principalmente en ácido hialurónico y sulfato de condroitina. Todos los GAG, excepto el ácido hialurónico, están unidos covalentemente a proteínas en agregados llamados proteoglicanos que, a su vez, interactúan con otros componentes de la MEC para formar una estructura similar a un gel hidratado que permite que los tejidos resistan las fuerzas de compresión (Schuurmans et al., 2021).

El CS es un glicosaminoglicano sulfatado compuesto por unidades alternas de ácido glucurónico unidas a β -1,4 y β -1,3-N-acetil-D-glucosamina (Nam & Mooney, 2021). Estos glicosaminoglicanos son componentes importantes de la matriz extracelular del cartílago y otros tejidos corporales y desempeñan un papel clave en la regulación de funciones celulares como la migración celular y la unión a receptores. Sin embargo, los hidrogeles naturales basados en CS están limitados en algunos estudios clínicos (p. ej., la regeneración del cartílago) debido a las malas propiedades mecánicas y la corta persistencia in vivo. Además, debido a su carga negativa, CS no tiene una fuerte afinidad citoplasmática por condrocitos, fibroblastos y neuronas del hipocampo (E et al., 2022). Por lo tanto, es muy importante desarrollar hidrogeles basados en CS para la regeneración del cartílago que tengan una buena afinidad entre las células y los tejidos, así como propiedades mecánicas.

Estructuralmente, el HA y el CS son muy similares (Figura 5). Por una parte, como se ha visto en el apartado 1.3, el HA consiste en unidades repetidas de disacárido de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, que están unidas a través de enlaces glucosídicos β -(1 \rightarrow 4) y β -(1 \rightarrow 3) alternados. Mientras que, en el CS, la N-acetil-D-galactosamina combinada con el ácido D-glucurónico constituye una unidad monomérica. La diferencia entre una galactosamina (presente en CS) y una glucosamina (presente en HA) es la posición del OH en la posición -4, en HA este OH es ecuatorial, para CS es axial. Además, CS se puede sulfatar en muchos patrones diferentes, como la condroitina no sulfatada, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, condroitina-2-6-sulfato y condroitina-4-6-sulfato (Schuurmans et al., 2021).

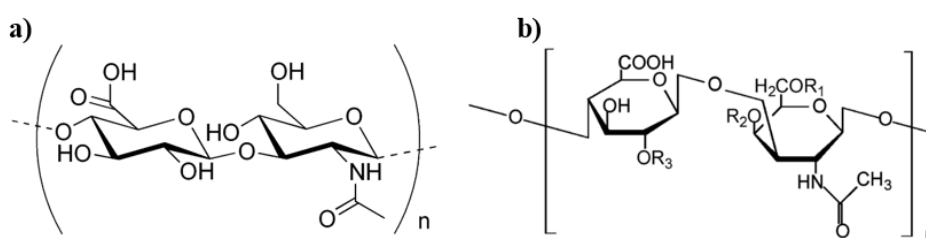


Figura 5. Unidad de repetición formada por un disacárido, a) Estructura HA y b) Estructura CS (Schuurmans et al., 2021).

Tanto el HA como el CS se utilizan actualmente en el contexto clínico. El HA se usa a menudo como relleno cosmético (en forma de partículas reticuladas) (Beasley et al., 2009), y el HA y el CS (formulados en glucosamina) se usan para reducir el dolor en pacientes con osteoartritis de rodilla (DiNubile, 2018). Sin embargo, cabe señalar que la eficacia de tales configuraciones requiere más estudios científicos (DiNubile, 2018; Roman-Blas et al., 2017). No obstante, debido

a la presencia generalizada de sulfato de condroitina y ácido hialurónico en el cuerpo humano y su uso clínico generalizado, los derivados de estos polisacáridos capaces de formar hidrogeles tienen un alto potencial como biomateriales deformables para su uso como andamios diseñados para tejidos.

1.4.1. La química EDC/NHS

Debido a sus características únicas, el HA ha sido ampliamente investigado y aplicado como biomaterial para la administración de fármacos y proteínas, andamios tridimensionales (3D) para el cultivo de células, regeneración de cartílago y hueso, curación de heridas, bioimpresión, etc. Sin embargo, como polímero natural, su rápida degradación *in vivo* y sus pobres propiedades biomecánicas limitan en cierta medida sus aplicaciones biomédicas (Bian et al., 2016).

Para obtener unas propiedades mecánicas adecuadas y unas caracterizaciones metabólicas estables, se han desarrollado diversos métodos de reticulación química y agentes de reticulación para producir materiales de HA en forma de gel mediante la formación de redes covalentes. Algunos ejemplos de estos métodos son la reacción de adición tipo Michael y la reacción de base de Schiff. Aunque estos métodos podrían preparar eficazmente hidrogeles de HA para su aplicación en el campo de la biomedicina, los investigadores siguen teniendo algunos problemas para disolverlos, como la citotoxicidad derivada del aditivo exógeno o de los agentes reticulantes o el control nulo en el proceso de gelificación del hidrogel (Bian et al., 2016).

En los últimos años, el hidrogel reticulado con enlaces disulfuro ha atraído el interés de muchos investigadores debido a su protocolo simple de síntesis, su método de gelificación adecuado y sus propiedades de gelificación *in situ*, entre otras.

Por lo que se preparó un nuevo hidrogel inteligente autorreticulante con propiedad de gelificación *in situ* a partir de derivados de ácido hialurónico tiolado (SH-HA) de un solo componente, que se obtuvo mediante una modificación química EDC/NHS. Esta ruta química es interesante porque se produce en fase acuosa, lo que es muy infrecuente en síntesis química ya que el agua suele ser un inhibidor y, porque además, se puede producir a temperatura ambiente en periodos de tiempo razonables, ya que el resultado puede estar listo en unas horas o en unos pocos días. Los hidrogeles SH-HA tienen una excelente biocompatibilidad porque el HA es un tipo de polímero natural y los compuestos de sulfhidrilo se distribuyen ampliamente en los tejidos animales (Bian et al., 2016).

EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]-carbodiimida) es un agente de reticulación que se utiliza para acoplar grupos carboxilo a aminas primarias, normalmente a través de la formación de ésteres de NHS reactivos con amina (Bart et al., 2009). Esta reacción se produce en dos pasos que se ven representados en la Figura 6:

1. EDC reacciona con un carboxilo y en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) convierte los grupos de ácido carboxílico en ésteres de NHS reactivos con amina (Bart et al., 2009).
2. En este punto, las aminas primarias pueden hacer contacto donando pares de electrones para formar amidas. Si la molécula a la que pertenece la amina primaria contiene un grupo sulfhidrilo terminal, puede verse afectado y formar puentes disulfuro por oxidación.

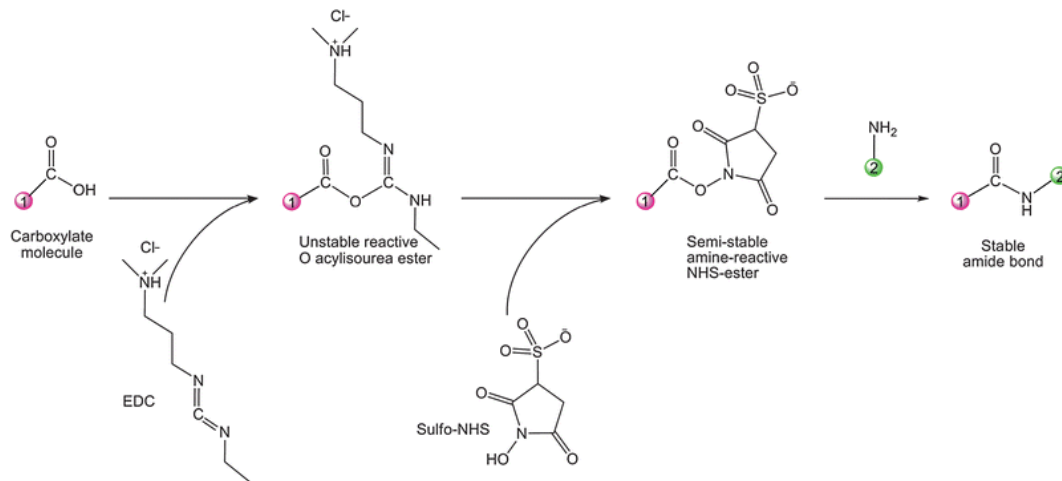


Figura 6. Ruta química EDC/NHS para crear modificaciones químicas de polisacáridos carboxilados y formar hidrogeles SH-HA (Bart et al., 2009).

Este método de entrecruzamiento de hidrogeles permite la incorporación de varios fármacos en sus estructuras, lo que da como resultado estructuras HA funcionalizadas capaces de retener propiedades viscoelásticas específicas para el tratamiento de diversas enfermedades.

2. Objetivos y justificación

2.1. Contexto de la invención

Este Trabajo Fin de Máster (TFM) pertenece a una de las fases de un proyecto de investigación más amplio que se está llevando a cabo en un grupo de investigación del CBIT (Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular). El nombre del proyecto es "Hidrogeles inyectables *in situ* de ácido hialurónico como viscosuplemento en osteoartritis y dispositivo de liberación de biomoléculas condroprotectoras", la referencia es CIGE/2021/174 y su entidad financiadora es la Generalitat Valenciana. Además, este TFM surge de otros Trabajos Fin de Grado defendidos anteriormente en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Valencia en los que se consiguieron alcanzar unas condiciones de síntesis del HA-SH que permitieran su gelificación.

El objetivo principal de este proyecto en cuestión es el desarrollo de un producto sanitario que sea un gel auto-reticulable *in situ* de HA modificado mediante tioles (HA-SH) que sirva como dispositivo viscosuplementador y que, además, produzca una liberación controlada de CS para el tratamiento de OA.

2.2. Objetivos particulares

Para poder llevar a cabo el objetivo principal del proyecto, se han abordado objetivos más específicos durante este trabajo:

- Fabricación del gel a partir de la modificación del HA con cisteamina (CSA) recurriendo a la química EDC/NHS, para obtener así el HA-SH mencionado anteriormente. Se parte de la concentración óptima de HA ya que en el anterior TFG se demostró que la concentración de HA que mayor grado de sustitución presentaba era 0.5% m/v (Torregrosa Aragoneses, 2022), y se produce su caracterización usando alguna técnica de cuantificación colorimétrica para determinar el grado de sustitución de los tioles.
- Determinación de la concentración óptima (mayor grado de injerto) del CS en el HA empleando técnicas de cuantificación del residuo N-terminal de la macromolécula. Para ello se realizará la síntesis siguiendo la misma química que para la modificación del HA, probando 3 concentraciones distintas de CS (1:15, 1:50, 1:100).
- Determinación de la técnica de entrecruzamiento óptima (mayor grado de tiolación y de injerto de CS). Para ello se realizarán dos síntesis con la concentración óptima de CS y de HA, empleando dos procesos diferentes (reacción competitiva o secuencial).
- Obtención de un método de síntesis válido que permita la gelificación *in situ* de los hidrogeles controlando la temperatura y pH de estos.
- Caracterización química y mecánica de los hidrogeles, mediante la técnica de cromatografía por permeación de gel (GPC) y ensayos de reometría.
- Determinación de la liberación controlada de condroitín sulfato en un ensayo de biodegradación, trabajando en condiciones fisiológicas similares a lo que será el tejido real.

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención del hidrogel SH-HA

3.1.1. Síntesis SH-HA

Tal y como representa la Figura 7, el primer paso para la obtención del gel SH-HA fue preparar la solución de ácido hialurónico con agua Mili-Q y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante un período flexible de 24 a 72 horas. Se eligió este intervalo temporal con la consideración de que, posiblemente, se haya logrado una interacción inicial significativa después de 24 horas, pero se permite un máximo de 72 horas para garantizar interacción completa y optimizar sus propiedades. El agua Milli-Q que se utiliza en los laboratorios es agua de conductividad controlada, ya que ha sido filtrada y purificada por ósmosis inversa. El ácido hialurónico empleado tenía un peso molecular 1.5-1.8 MDa (Sigma Aldrich, 99% pureza, 401 g/mol) y la solución contenía una concentración de HA de 0.5% (% m/v), es decir, 5 mg/ml, valor óptimo según estudios preliminares del grupo de investigación.

Una vez preparada la solución se comenzó la reacción EDC/NHS utilizando la proporción 1/4/2/4 equivalente a las proporciones molares HA/EDC/NHS/CSA como sugieren estudios previos (Bian et al., 2016). Para ello, se pesó la masa de NHS (Sigma Aldrich, pureza 98%, 15.09 g/mol) y se puso su cantidad en el frasco de vidrio donde anteriormente se había preparado la solución de HA. Se agitó durante 10 minutos y, mientras tanto, se realizó el mismo procedimiento para el EDC·HCl (Sigma Aldrich, pureza 99%, 191.70 g/mol) y se vertió la cantidad correspondiente en la solución anterior. Pero esta vez, la muestra se dejó agitando durante 2 horas para conseguir que la reacción tenga lugar, pues durante estas dos horas, el EDC activa los COOH y el NHS se acopla a estos. Realmente el NHS tarda más en disolverse que el EDC·HCl en fase acuosa, pero la reacción no comienza hasta que se le añade el EDC·HCl a la muestra ya que este es el responsable de que el NHS se fije al HA.

Pasadas las 2 horas, se añadió a la disolución la cisteamina hidrocloreto (CSA·HCl (Sigma Aldrich, pureza 97% 113.61 g/mol)). Como el NHS es una molécula inestable, en presencia de una amina (en este caso el CSA) es capaz de sacrificarse y dejar su lugar (Figura 8). Debido a esta sustancia es altamente higroscópica, la cisteamina hidrocloreto se preparó en una cámara sellada, inundada con nitrógeno. Para ello, se cogió una cantidad en exceso de CSA·HCl y se puso en un Eppendorf como se observa en color rojo en la Figura 7 dentro del ambiente de nitrógeno. Este Eppendorf se pesó antes y después de poner la cisteamina dentro, para saber en todo momento las cantidades con las que se estaba trabajando. Por último, se diluyó en 1 ml de agua Mili-Q (para controlar el agua que interacciona con el reactivo) y se vertió la cantidad necesaria en la disolución preparada anteriormente.

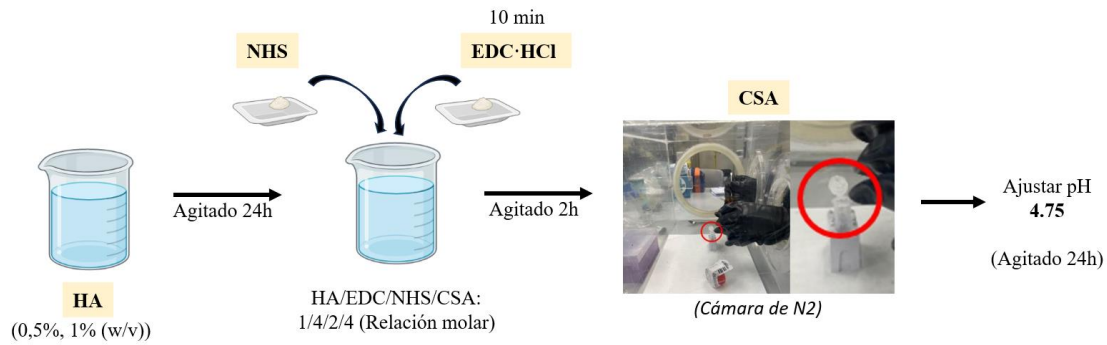


Figura 7. Proceso de síntesis SH-HA.

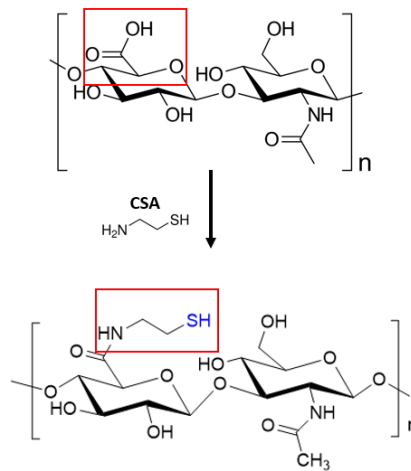


Figura 8. En la figura se observa cómo la molécula de HA al reaccionar con la cisteamina, forma el grupo químico amida dejando expuestos los sulfhidrilos.

Una vez preparada la mezcla de reacción, se reguló su pH (añadiendo 1.0 M NaOH o 1.0 M HCl) y se midió mediante pH-metro hasta alcanzar un pH 4.75. Es muy importante dejar la muestra a un pH ácido para poder controlar su gelificación, evitando así la desprotonación de los grupos sulfhidrilo para que se formen prematuramente los puentes disulfuro. Por último, se dejó la reacción agitando durante 24 horas para que se produjese la tiolación.

3.1.2. Diálisis

La diálisis es una técnica que consiste en el intercambio de sustancias o moléculas según su tamaño a través de una membrana. El intercambio ocurre de altas a bajas concentraciones y depende de la permeabilidad y el área superficial de la membrana. Como resultado, las moléculas pequeñas y los solventes pasan, pero las moléculas grandes no.

Por tanto, tras agitar la mezcla durante 24 horas, se transfirió a la membrana de diálisis y se dializó contra una solución de HCl diluido (pH 3,5) que contenía 100 mM de NaCl durante 24 horas. Tras 24 horas, se cambió el medio de diálisis a H₂O destilada, para evitar mantener la disolución

de HA mucho tiempo en condiciones ácidas, que pueden catalizar su biodegradación. El volumen del medio en el que se puso la membrana era de al menos 100 veces superior al volumen de la muestra, como así recomienda el fabricante de esta (Bian et al., 2016).

En este caso, como se utilizó una membrana de 3500 Da y el ácido hialurónico utilizado es de alto peso molecular (1,5 MDa), este y sus derivados permanecieron dentro de la membrana, mientras que las sales reactivas, así como la CSA libre, se transfirieron al medio de diálisis por difusión (Figura 9).



Figura 9. Proceso diálisis SH-HA

3.1.3. Determinación del grado de tiolación

Para determinar el grado de tiolación (sustitución de grupos carboxilo terminal (-COOH) por -SH, también llamados tioles o sulfhidrilos) que se ha producido en las cadenas SH-HA se emplea el método de Ellman (Ellman, 1959).

Este método utiliza el reactivo DTNB (5,5'-ditio-bis-[ácido 2-nitrobenzoico]) (Sigma Aldrich, 99% Pureza), el cual reacciona con un grupo sulfhidrilo libre para dar una mezcla de disulfuro y ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) como representa la Figura 10.

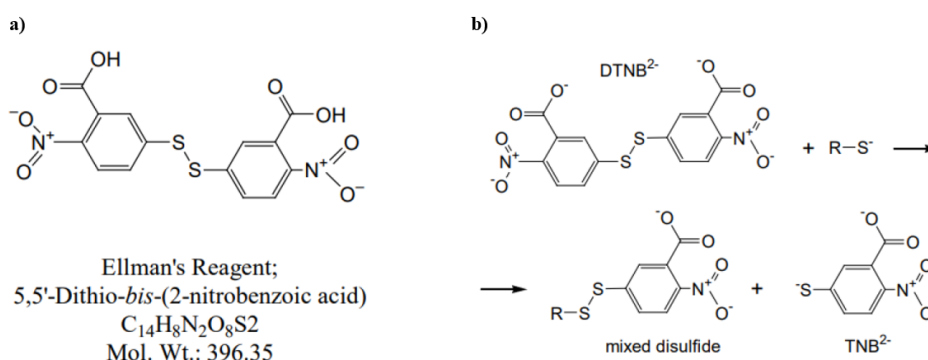


Figura 10. a) Estructura química del reactivo de Ellman; b) Reacción del DTNB en presencia de -SH (sulfhidrilos) (Thermo Scientific, s. f.).

El DTNB permite cuantificar los grupos sulfhidrilo (-SH) expuestos en una solución ya que cuando reacciona con estos se produce un producto de color amarillo. Esta reacción es muy rápida

y se analiza utilizando el coeficiente de extinción molar del TNB en valores de $14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 412 nm (Thermo Scientific, s. f.).

Para poder cuantificar los grupos (-SH) es necesario crear una curva patrón a partir de concentraciones conocidas de un compuesto que contenga sulfhidriilo. En este caso se empleará también la CSA, ya que se trata de una molécula sencilla que contiene un grupo sulfhidriilo como se ve representado en la siguiente figura.

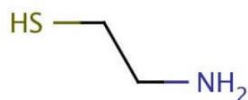


Figura 11. Estructura molecular de la cisteamina.

Siguiendo el protocolo de Thermo Scientific para Ellman's Reagent (Thermo Scientific, s. f.), en primer lugar, se preparó el tampón de reacción o *reaction buffer* (RB), la cisteamina hidrocioruro, una solución del reactivo de Ellman, y la muestra SH-HA en las condiciones óptimas para llevar a cabo el protocolo (Tabla 1/Tabla 4).

Tabla 4. Material necesario para seguir el protocolo de de Thermo Scientific para Ellman's Reagent (Thermo Scientific, s. f.).

Preparación del material	
<i>Reaction Buffer</i>	0.1M fosfato de sodio a pH=8 y conteniendo 1 mM EDTA
Cisteamina hidrocioruro	1.5mM diluido en RB
Reactivo de Ellman	4mg DTNB en 1ml de RB
Muestra SH-HA	1.5mM diluido en RB

Una vez todo preparado, se pusieron en 7 tubos diferentes concentraciones de CSA. Estos estaban nombrados de la A (CSA 1.5 mM) a la G (CSA 0.1 mM). Este proceso se trataba de una dilución seriada en la que se partió de la muestra A, para la que se hizo un cálculo del volumen inicial necesario de la disolución tampón a partir de CSA (expresada en mmol/l), de la concentración del protocolo (1.5mM) y del volumen seleccionado: $V_1C_1 = V_2C_2$.

Se preparó otro tubo para la muestra SH-HA. Para ello, esta se diluyó en tras la diálisis en *reaction Buffer* para asegurar que la concentración de sulfhidrilos se encontrara dentro del rango de trabajo de la curva estándar (1.0 mM) incluso si el grado de tiolación fuera el 100%.

A continuación, se prepararon de nuevo 7 tubos nombrados de la A a la G y el *blank* (o blanco de referencia, cuya concentración equivalente es de 0 mM). En estos, se disolvió 50 μl del reactivo de Ellman, 2.5 ml del RB y 250 μl de cada una de las muestras anteriores. Todo este proceso se ve representado en la (Figura 12).

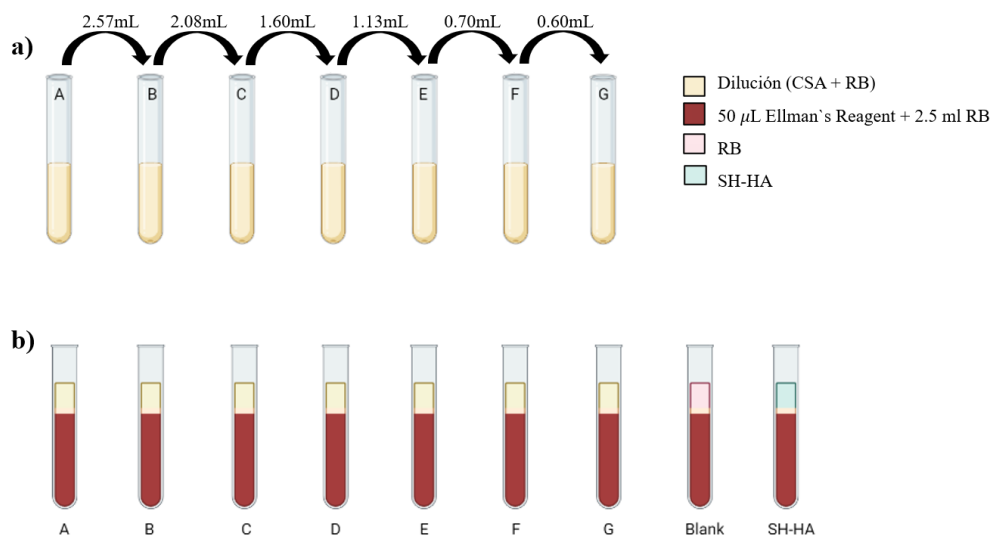


Figura 12. Protocolo de Thermo Scientific para Ellman's Reagent: a) Primer paso donde se prepara el proceso seriado de la dilución de CSA para la recta patrón; b) Segundo paso donde se preparan las muestras definitivas para sacar resultados en el espectrofotómetro.

Después de hacer esta mezcla, se esperó 15 min para cada muestra antes de medir la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm con el espectrofotómetro Cary 60 de Agilent (Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer). Las mediciones se tomaron durante 1 segundo y con un intervalo de 1 minuto entre cada muestra, tiempo suficiente para limpiar y volver a llenar la cubeta del instrumento.

3.2. Incorporación de moléculas condroprotectoras

3.2.1. Injerto de CS a cadenas de HA

Se realizó la síntesis de ácido hialurónico con condroitín sulfato injertado (HA-g-CS) en tres proporciones molares HA:CS diferentes (1:15, 1:50 y 1:100, denominadas HA-g-CS 1:15, HA-g-CS 1:50 y HA-g-CS 1:100, respectivamente), con el objetivo de conseguir que el CS se injertara a las cadenas laterales de las cadenas de HA y poder verificar que concentraciones de condroitín sulfato serían las más interesantes. Para ello, se siguió la misma técnica utilizada para la síntesis de SH-HA explicada en el apartado 3.1.1, es decir, la ruta química EDC/NHS pero esta vez se utilizaría CS (Sigma Aldrich) en vez de CSA, como se puede observar en la Figura 13.

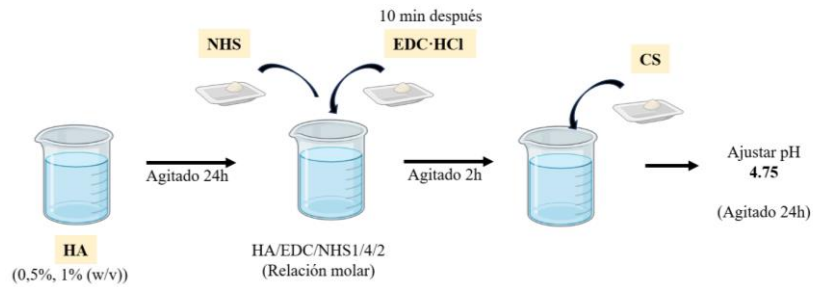


Figura 13. Proceso de síntesis HA-g-CS (1:15, 1:50, 1:100).

Teniendo en cuenta que por cada mol de carboxilos terminales del HA (1 por cada unidad de repetición, de masa molar 401 g/mol) se requiere un mol de macromoléculas enteras de CS (ya que solo hay una amina terminal por cada macromolécula), se estudiaron diferentes proporciones de CS 1:15, 1:50, 1:100. No se ha podido trabajar con proporciones más altas ya que resultaban muestras muy viscosas por la gran cantidad de CS que hubiera supuesto añadir a la mezcla (Prudnikova et al., 2018).

3.2.2. Diálisis

Una vez las muestras (HA-g-CS 1:15, HA-g-CS 1:50 y HA-g-CS 1:100) estaban preparadas, los materiales se purificaron mediante diálisis siguiendo el mismo procedimiento explicado en el apartado 3.1.2.

Solo en el caso de la muestra HA-g-CS 1:50, se pasaron 10 ml de esta además de la membrana, a una columna Float-A-Lyzer (Spectra-Por® Float-A-Lyzer® G2) con capacidad de 10 ml y un tamaño de poro de 100 kDa durante 24 horas frente H₂O destilada (Figura 14), con el objetivo de obtener también la mezcla purificada sin CS no injertado (o libre) para evaluar cuánto CS libre quedaba con las técnicas que se explican en apartados posteriores (apartado 3.5).

La otra parte de las muestras se reservó sin dializar con el último paso, de cara a evaluar cuánto CS libre quedaba sin injertar (ver punto siguiente, 3.2.3).

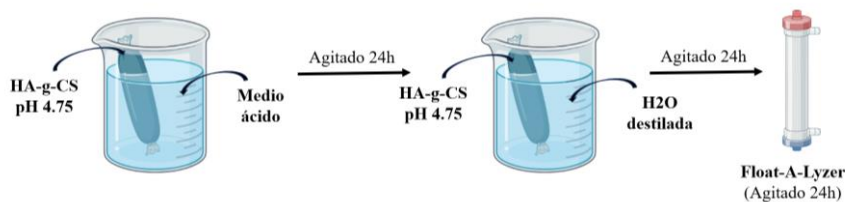


Figura 14. Diálisis completa de HA-g-CS 1:50.

3.2.3. Determinación del grado de injerto de CS

El injerto de CS en las cadenas de HA se confirmó con la técnica de la fluorescamina (Thermo Scientific, s. f.). La fluorescamina (FCA) (Sigma Aldrich, $\geq 98\%$ pureza, 278.26 g/mol de peso molecular) es un reactivo fluorométrico que reacciona con las aminas primarias (PA) de forma que la fluorescencia resultante de esta reacción es directamente proporcional a la concentración de PA que hay en la solución. En este caso, como a cada cadena de CS le pertenece una amina primaria, la fluorescamina permite medir esta cantidad de PA y con ello, la cantidad de cadenas de CS que no se han injertado al HA, como se ve representado en la Figura 15.

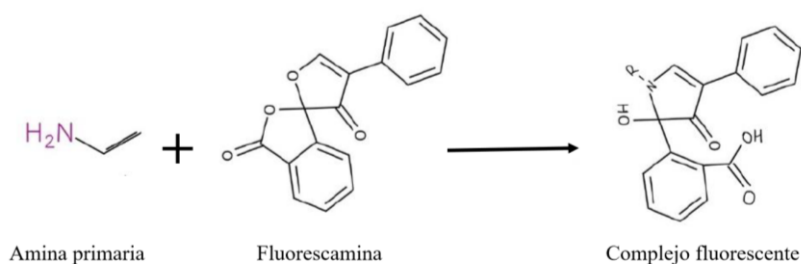


Figura 15. Reacción de la fluorescamina con una amina primaria.

La intensidad de la fluorescencia se midió con el espectrofotómetro de placas (Victor3 Perkin Elmer 8000), utilizando una placa negra de 96 pocillos para evitar que la luz interviniera tanto en el reactivo como en las muestras. La reacción fluorescamina-PA se produce a 390 nm, con una longitud de onda de emisión a 475 nm (Sarkar et al., 2012) por eso se utilizó los filtros de 355 nm (excitación) y 460 nm (emisión) disponible en el laboratorio ya que era el más cercano a estos valores.

Como blanco de las lecturas se utilizó agua destilada, como control positivo se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma Aldrich, $\geq 98\%$ pureza, 66.430 g/mol) ya que tiene una alta proporción de PA por molécula ($19,74 \pm 4,45$ PA/molécula) (Sarkar et al., 2012). Esta concentración es tan alta porque muchos de los aminoácidos en el esqueleto de la proteína BSA contienen PA. Por último, como control negativo se usó la L-prolina (Sigma Aldrich, 115,13 g/mol) y la N-acetil-galactosamina (GalNAc) (Sigma Aldrich, 98% pureza) porque tienen una amina secundaria pero no primaria y, además, la segunda molécula es el constituyente aminado de la unidad de repetición del CS, a fin de demostrar que estas macromoléculas no interferían en la medida. Se empleó agua destilada para preparar las soluciones de cada muestra.

Para hacer el calibrado se utilizó la glicina (Gly·HCl) (Sigma Aldrich, $\geq 99\%$ pureza, 75.07 g/mol). La glicina tiene una amina primaria por molécula y se trata de un aminoácido muy similar al que el CS utiliza para anclarse a la proteína del núcleo del proteoglicano. Se realizó una dilución seriada de la glicina en tubos de la A a la F y el blanco para obtener la recta patrón.

Posteriormente se añadió la fluorescamina a cada una de las muestras preparadas y se analizaron empleando el espectrofotómetro lector de placas Victor³ (Perkin-Elmer), siguiendo el procedimiento establecido por (Sarkar et al., 2012).

Finalmente, se midieron las muestras de los patrones, Gly-HCl, CS, BSA, GalNAc, L-prolina y las muestras a determinar (HA-g-CS a diferentes concentraciones) por triplicado en la placa negra de 96 pocillos (Sarkar et al., 2012).

Cabe destacar que, además, el ensayo también se realizó para las muestras adicionales SH-HA-g-CS 24/24 y 24/48. Estas muestras son los geles que se describen más adelante en el apartado 3.3.

A partir de la región lineal obtenida de la curva estándar o recta patrón de la glicina se calculó la concentración de aminas primarias que contenía cada una de las muestras (cada una con una concentración de CS diferente) para poder determinar así el grado de injerto de CS y la concentración que permitía un grado satisfactorio de injerto.

3.2.4. Liofilización

Los resultados de la fluorescamina llamaron la atención ya que daba la sensación de que se estaba perdiendo CS en el proceso de diálisis. Para salir de dudas, se decidió realizar un análisis gravimétrico dedicado al CS.

El objetivo de este ensayo era conocer la cantidad de CS que había en la muestra después de la diálisis en la membrana de 3500 Da en medio ácido durante 24h, después de la diálisis en la membrana de 3500 Da en agua y después de la diálisis en columna Float-A-Lyzer 100 kDa. Para ello, se siguió el siguiente procedimiento: En primer lugar, se pesaba un Eppendorf® vacío, después se rellenaba con la solución correspondiente, se congelaba cada muestra a -80°C y finalmente, se ponían las muestras a liofilizar para eliminar por completo el agua de la muestra.

El primer paso fue preparar 5 ml de la solución principal de CS en H₂O destilada siguiendo con la concentración utilizada anteriormente en HA-g-CS 1:50.

Para preparar la muestra número 1 se pesó el primer Eppendorf® vacío, inmediatamente se llenó de 1 ml de la solución CS en H₂O destilada y por último se puso a congelar a -80°C. Los 4 ml restantes de la solución se transfirieron a la membrana de diálisis de 3500 Da y se dializó contra una solución de HCl diluido (pH 3,5) que contenía 100 mM de NaCl durante 24 horas. Tras 24 horas, se pesó el segundo Eppendorf® vacío, se llenó de 1 ml de la solución sometida a la diálisis y se congeló a -80°C. De la misma forma, los 3 ml restantes de la solución se transfirieron a la membrana de diálisis de 3500 Da contra H₂O destilada durante 24 horas. Tras esas 24 horas, se pesó el tercer Eppendorf® vacío, se llenó de 1 ml de la solución sometida a la diálisis en agua y se congeló a -80°C. De la misma forma, los 2 ml restantes de la solución se transfirieron a la columna de diálisis Float-A-Lyzer 100 kDa contra H₂O destilada durante 24 horas. Por último, finalizadas las últimas 24h de la diálisis, se pesó el cuarto Eppendorf® vacío, se llenó de 1 ml de la solución sometida a la diálisis en Float-A-Lyzer y se congeló a -80°C.

Una vez las cuatro muestras estaban congeladas se liofilizaron durante 48 horas. La liofilización se trata de un proceso en el que inicialmente se congela el material a -80°C como se ha comentado antes, de manera que produce una transición de fases entre sólido-líquido. Después, se elimina el hielo mediante sublimación a muy bajas presiones (conversión directa a vapor) quedando una fase de soluto concentrado, que es el material liofilizado. De esta forma se pesaría el Eppendorf® liofilizado y se podría saber la cantidad de CS que persiste después de cada una de las diálisis.

En la Figura 16 se muestra el equipo que se empleó para liofilizar. En la zona superior de cristal es donde se colocaron las muestras (cámara estanca sobre la que se ejerce vacío), en recipientes con una superficie amplia para que se liofilizaran todas las partes de las muestras por igual.



Figura 16. Liofilizadora (Freeze-Dryer).

3.2.5. Caracterización de HA-g-CS mediante cromatografía

Como se tenía la sospecha de que el peso molecular del CS era bastante disperso, (ya que proviene de un agregado natural de tiburón), se decidió recurrir a la técnica de cromatografía de permeación en gel (GPC) para determinar la distribución del peso molecular de las muestras. Este ensayo consiste en hacer pasar las muestras a través de una columna rellena con un lecho de partículas de dextrano con poros de diferente tamaño, permitiendo obtener una medición del tiempo de llegada de las cadenas, lo cual está estrechamente relacionado con la longitud (y, con ello, el peso molecular) de estas. Para ello, previamente al ensayo, es necesario realizar una calibración haciendo uso de las muestras patrón, fracciones con mezclas monodispersas de polietilenglicol de peso molecular conocido. Las señales obtenidas con estas permiten calcular la recta patrón que relaciona el tiempo de llegada con el peso molecular de las cadenas. Este tiempo será menor para las cadenas de mayor peso, que se lixivian más rápidamente por no poder entrar en los poros de las partículas del lecho de la columna.

Para ello, se utilizó el Waters Breeze GPC 1525 Binary HPLC (Waters Corporation, Milford, MA, EEUU) equipado con un detector de índice de refracción 2414 y columnas Waters Styragel HR THF.

Se utilizó agua Mili-Q como eluyente con un caudal de 0,5 mL/min. El volumen de inyección de cada muestra fue de 50 μ L, y se realizaron dos inyecciones. Los pesos moleculares precisos de las muestras de CS y HA se calcularon a partir de los parámetros de Mark-Houwink-Sakurada, donde $k_{CS} = 0.04$ [dL/g], $\alpha_{CS} = 1.14$ y $k_{HA} = 0.01019$ [dL/g], $\alpha_{HA} = 0.524$, respectivamente (Simulescu et al., 2016; Wu et al., 2010).

En este ensayo se analizaron ocho muestras diferentes: HA, CS, CS dializado con Float-A-Lyzer, HA-g-CS 1:15, HA-g-CS 1:50 y HA-g-CS 1:100 y HA-g-CS 1:50 + Float-A-Lyzer.

Para poder llevar a cabo el ensayo, se prepararon todas las muestras en una concentración 2 mg/ml en un volumen total de 5 ml de agua Mili-Q. En el caso de las muestras de ácido hialurónico con

CS injertado, se utilizó la fórmula $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$ para conseguir estas concentraciones. Finalmente, antes de la inyección al equipo se pasaron por filtros con un tamaño de poro 0.22 micras de la marca Chrom Tech® para eliminar las impurezas y poder comenzar con el ensayo.

3.3. Síntesis de geles con injerto de CS

Se realizaron procedimientos de síntesis diferentes de los geles SH-HA-g-CS competitivo (SH-HA-g-CS (24/24)) y secuencial (SH-HA-g-CS (24/48)) para compararlos y poder determinar cuál de los dos representa mayor grado de tiolación y de injerto de CS, y, por tanto, resulta el gel más interesante.

Dado que la funcionalización y el injerto se basan en el mismo mecanismo de reacción química, las dos síntesis de SH-HA-g-CS (24/24) y SH-HA-g-CS (24/48) se pueden realizar utilizando solo la técnica EDC/NHS y añadiendo CS a concentración 1:50. La justificación de por qué se ha trabajado con esta concentración se explicará posteriormente en el apartado de resultados.

Ambas síntesis se realizan en paralelo como representa la Figura 17. La única diferencia entre SH-HA-g-CS (24/24) y SH-HA-g-CS (24/48) radica en el momento de agregar CSA durante la síntesis. En el caso de 24/24, la CSA se añade al inicio de la síntesis, mientras que en 24/48, la CSA se incorpora por primera vez después de 24 horas de reacción.

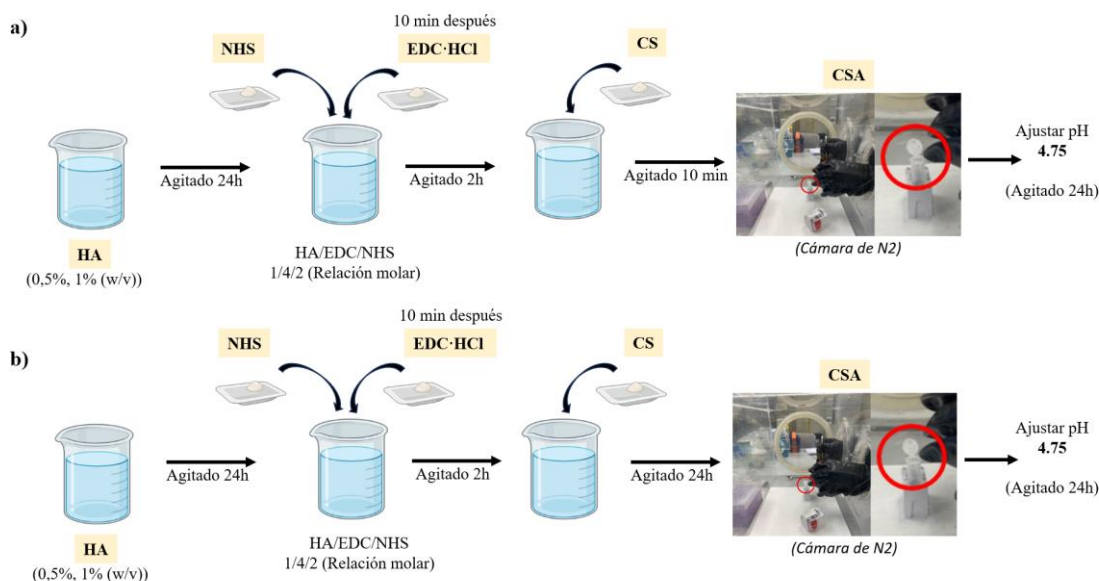


Figura 17. Proceso de síntesis de los geles. La diferencia entre a) y b) radica en el periodo de agitación entre la adición de CS y la de CSA.

Una vez las muestras estaban preparadas se sometieron a la misma diálisis con membrana de 3500 Da realizada en el apartado 3.1.2. De esta forma se pueden comparar a futuro las propiedades viscoelásticas y el punto de gelificación de los hidrogeles.

Además, se determinó el grado de tiolación y el grado de injerto de CS en los hidrogeles siguiendo los mismos procedimientos explicados anteriormente en el apartado 3.1.3 y 3.2.3 respectivamente.

3.4. Reología de los hidrogeles

Las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles SH-HA y SH-HA-g-CS (24/24) se analizaron mediante el reómetro Discovery HR 20 (TA Instruments) y se compararon los resultados con los obtenidos respecto al viscosuplemento comercial Synvisc One.

Dada la importancia que tiene el pH en la gelificación de los hidrogeles, puesto que la presencia de iones en el medio condiciona la desprotonación de los grupos sulfhidrilo para poder formar enlaces disulfuro, resultó interesante analizar las características viscoelásticas de ambos en diferentes condiciones. Para ello, antes de realizar el ensayo se reguló el pH de las muestras con el pH-metro añadiendo 1.0 M NaOH o 1.0 M HCl hasta obtener diferentes muestras de SH-HA y de SH-HA-g-CS (24/24) a distintos pH (6, 7, 7.5, 8 y 8.5).

Para la caracterización, se disponían 330 μl de cada muestra (a su pH correspondiente) en el plato inferior utilizando la geometría de platos paralelos de 20 mm de diámetro de acero inoxidable del reómetro. Además, al mismo tiempo que se ponía la muestra en el plato, se añadían 10 μl de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) diluido ya que este reactivo ayudaba al proceso de la gelificación, por incorporar oxígeno libre a la reacción de formación de puentes de disulfuro (Torregrosa Aragoneses, 2022). Este procedimiento se ve representado en la Figura 18.

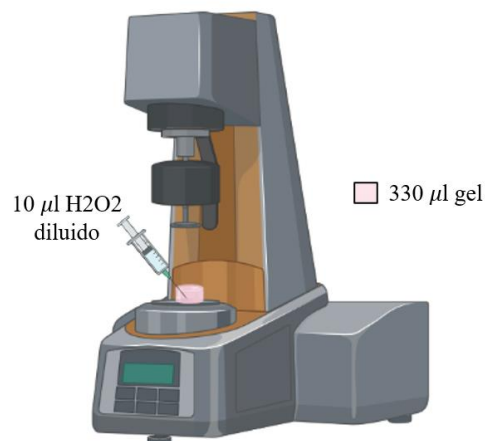


Figura 18. Representación de la muestra y el peróxido de hidrógeno en el reómetro, antes del ensayo.

Finalmente, se programó un barrido oscilatorio dentro de un intervalo de tiempo de 1800 segundos fijando el *strain* (deformación) al 1% y la frecuencia a 1 Hz (Torregrosa Aragoneses, 2022) a 37°C para emular condiciones fisiológicas. En estos ensayos se registró la evolución temporal de G' (módulo de almacenamiento o elástico) y G'' (módulo de pérdidas o viscoso) del barrido oscilatorio y del de frecuencia.

Además, también se realizó el ensayo reométrico en las mismas condiciones al producto comercial Synvisc One, ya que se trata de uno de los productos más utilizados clínicamente en pacientes con artrosis (Alonso Carro & Villanueva Blaya, 2002). Por tanto, pareció muy interesante poder tener una comparación directa de las propiedades de los productos que se están desarrollando en este proyecto frente a lo que hay actualmente en el mercado.

3.5. Ensayo de biodegradación de los hidrogeles

Por último, se realizó el ensayo de biodegradación para analizar y comparar la cantidad de CS que liberaban los hidrogeles conforme pasaban los días. Pues, en este caso y a diferencia de un dispositivo de liberación pasiva convencional, al tener el CS injertado, primero se tiene que dar la degradación del extremo de la cadena para poder liberarse, lo que permite un control más detallado y lento de la misma, e incluso abre la puerta a que las células nativas del tejido condral puedan proveerse del CS modulando su metabolismo en función de las necesidades.

Tabla 5. Resumen ensayo de biodegradación.

Ensayo Biodegradación	
Medios	Buffer
	Medio alcalino
	Medio enzimático
Geles	SH-HA + CS
	SH-HA-g-CS (24/24)
	SH-HA-g-CS (24/48)
	Synvisc One + CS
Puntos de medida	1 día
	3 días
	7 días
	10 días
	15 días

Como representa la Tabla 5, el ensayo se analizó en tres medios diferentes para poder comparar como trabajan los hidrogeles en diferentes ambientes. Para ello se trabajó con: tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS), que contiene la composición salina básica de un medio fisiológico simulado y está tamponado a pH = 7.4; en medio alcalino (pH = 8.5, ajustado con NaOH 1M) y en medio enzimático. El medio enzimático estaba formado por Tripsina (Sigma Aldrich, ≥ 8.500 unidades BAEE/mg de proteína), Papaína (Sigma Aldrich, ≥ 10 unidades/mg de proteína) y H₂O Mili-Q a concentraciones 0.0083 mg/ml y 0.029 mg/ml, respectivamente. Teniendo en cuenta que la tripsina se encuentra activa en un rango de pH 7.5-8.5 e inactiva a pH 4.75-6 (Merck, s. f.) y que la papaína se encuentra activa a pH 4-7 e inactiva a pH > 8 (Bromme, 2004), se decidió que la solución del medio enzimático estuviera a un pH = 7, ajustado con NaOH 1M.

Además, en el ensayo se llevó a cabo una comparación del comportamiento de los hidrogeles objeto de estudio en el marco de este proyecto, en relación con el viscosuplemento comercial Synvisc One. Para preparar las muestras SH-HA + CS, y Synvisc One + CS se añadió la misma concentración de CS que se utiliza en la formación de los hidrogeles SH-HA-g-CS (24/24) y SH-HA-g-CS (24/48) (12,45 mg CS/ml), pero en estos casos el CS no estaba covalentemente vinculado al HA, sino que podía difundir libremente en virtud a los fenómenos de transporte de materia.

Se emplearon *timepoints* de 1-3-7-10 y 15 días con el propósito de evaluar la evolución en la liberación de las muestras.

Una vez todo preparado, las muestras fueron gelificadas a un pH de 7,5, poniendo 50 μl de cada gel en los respectivos pocillos correspondientes. Para controlar la variabilidad experimental, cada muestra se ensayó por cuadruplicado (N=4). Posteriormente, se añadieron los medios a sus respectivos pocillos y placas con el fin de dar inicio al ensayo como representa la Figura 19.

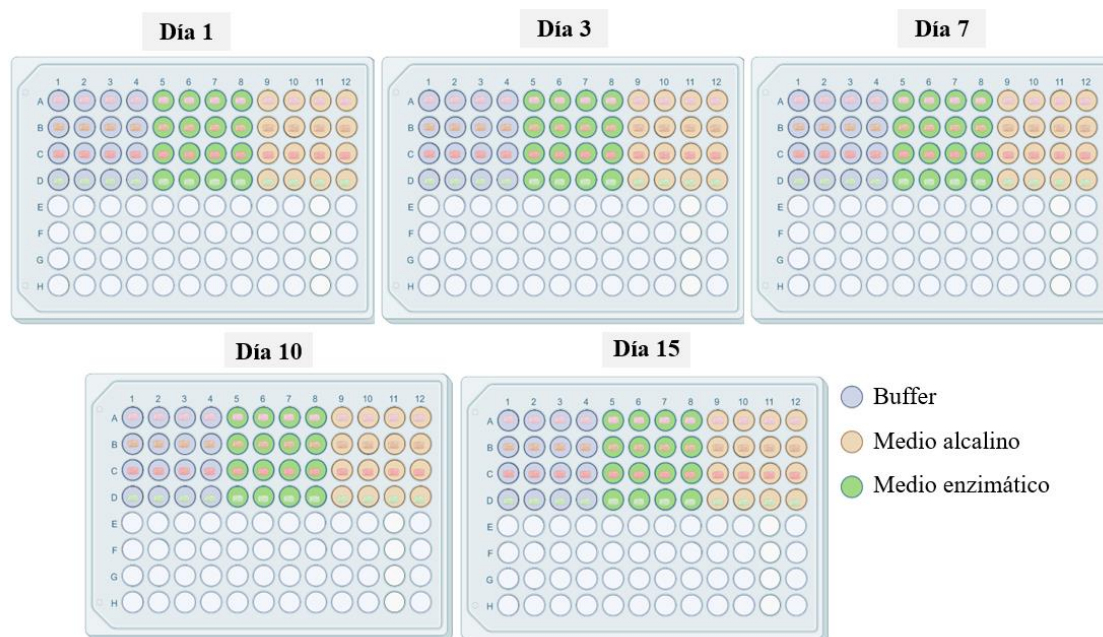


Figura 19. Diseño de las placas utilizadas durante el ensayo de biodegradación en los diferentes timepoints. Donde: Fila A: SH-HA + CS; Fila B: SH-HA-g-CS 24/24; Fila C: SH-HA-g-CS 24/48; Fila D: Synvisc One + CS.

En cuanto al análisis del CS liberado, para cada *timepoint* y cada muestra se recogió el sobrenadante soluble (es decir, que no formaba parte del hidrogel), ya que cuando se produce la biodegradación del enlace entre el HA y el CS, este último pasa a formar parte del medio circundante. El reactivo empleado para medir la cantidad de CS presente, conocido como Blyscan, presenta una limitación en su capacidad de cuantificación que no permite medir concentraciones superiores a 5 mg por cada 200 microlitros de muestra. Con el fin de evitar que los resultados obtenidos se encuentren fuera de la línea estándar de referencia, se requiere un paso inicial de dilución para todas las muestras. Para llevar a cabo esta dilución, se realiza el siguiente cálculo basado en la concentración máxima de condroitín sulfato presente en las muestras.

Suponiendo que en cada pocillo se encuentra una cantidad de 50 microlitros del gel y que dicho gel tiene una concentración de 12,5 mg de CS por mililitro, se estima la cantidad máxima de CS que podría estar presente en las muestras. Además, se considera una degradación completa del hidrogel y, por lo tanto, una liberación del 100% de CS en estas condiciones. Este cálculo arroja un valor de 0,625 mg de CS por cada 50 microlitros de muestra.

En consecuencia, para que las muestras puedan ser analizadas de manera adecuada utilizando el reactivo Blyscan, se debe diluir cada muestra en una proporción de 1 parte de muestra por cada 125 partes de diluyente. Una vez las muestras están diluidas (Biocolor Life Science Assays, s. f.):

1. Se coloca cada muestra diluida (un total de 300 muestras) en un tubo tipo Eppendorf, al que se le añaden 100 microlitros de agua destilada (H₂O).

2. Posteriormente, se agrega 1,0 mililitro del reactivo colorante Blyscan a cada uno de los tubos.
3. Se tapan los tubos y se colocan los tubos en el agitador Vortex, manteniéndolos en esta condición durante un período de 30 minutos. Durante este tiempo, se forma un complejo entre el colorante y el glicosaminoglicano sulfatado que precipitará del reactivo, separándose de la fracción soluble no unida.
4. Seguidamente, se transfieren los tubos a una microcentrífuga y se centrifugan a una velocidad de 13,000 veces la fuerza de gravedad ($\times g$) durante 10 minutos.
5. Se retira el sobrenadante, es decir, la parte líquida en la parte superior, dejando el complejo insoluble de sulfato de glicosaminoglicano (sGAG) y tinte en el fondo de los tubos.
6. A cada uno de los tubos se le añade 0,5 mililitros del reactivo de disociación.
7. Se vuelven a tapar los tubos y se procede a agitar vigorosamente durante 10 minutos en el Vortex. Esto tiene como objetivo liberar el colorante que está unido a la solución.
8. Finalmente, se realiza una segunda centrifugación a una velocidad de 13,000 $\times g$ durante 5 minutos, con el propósito de eliminar cualquier espuma presente en la muestra.

Por último, para el proceso de medición de absorbancia:

1. Se transfieren con cuidado 200 microlitros de cada muestra (por lo que de cada muestra salen 2 pocillos, siendo un total de 600 pocillos utilizados y analizados) a pocillos individuales en una placa de 96 micropocillos, evitando el pipeteo rápido, ya que la formación de espuma podría generar lecturas de absorbancia erróneas.
2. Se ajusta el lector de microplacas a una longitud de onda de 656 nm.
3. Se mide la absorbancia de cada pocillo en comparación con un blanco de reactivo (agua), así como de los estándares (que son CS en agua a concentraciones de 0 a 50) y las muestras de ensayo.

4. Resultados y discusión

4.1. Determinación del grado de injerto del CS en diferentes concentraciones

Para poder determinar cuál es la concentración óptima de CS se ha llevado a cabo la prueba de la fluorescamina en las muestras HA-g-CS 1:15, HA-g-CS 1:50 y HA-g-CS 1:100 que anteriormente no habían pasado por el Float-A-Lyzer, ya que esta técnica mide la cantidad de CS que no se ha injertado como se ha explicado en el apartado anterior (3.2.3). Se ha realizado esta técnica con el objetivo de conocer cuál de ellas contenía una concentración menor de aminas primarias, y, por tanto, mayor grado de injerto de CS (si se puede medir la amina terminal del CS es que no se ha enlazado covalentemente al HA). La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 6. Concentración de aminas primarias de las muestras HA-g-CS

Muestra	C _{PA} (mM)
HA-g-CS 1:15	0.0842
HA-g-CS 1:50	0.1215
HA-g-CS 1:100	0.3899

Sabiendo la cantidad de aminas primarias presentes en cada muestra:

1. Para calcular la concentración de CS en la muestra se utiliza una regla de tres. Dado que la concentración de CS en la muestra es conocida (3,3 mg/ml) y la señal de aminas primarias que se ha contado, se puede determinar la concentración de CS correspondiente a esa señal, es decir, la concentración de CS que no se ha injertado en cada muestra.
2. Sabiendo esto, para calcular la concentración de CS que sí se ha injertado se resta a concentración inicial de CS en la muestra diluida (3,3 mg/ml) y la concentración de CS que no se ha injertado
3. Por último, se calcula el porcentaje de injerto dividiendo la concentración de CS que se ha injertado por la concentración inicial de CS en la muestra diluida y multiplica por 100 para obtener el porcentaje:

Estos resultados permiten hablar del grado de injerto de CS, calculado como la relación entre la concentración de CS que sí que se ha injertado y la concentración de CS que había previamente en todas las muestras (3.30 mg/ml). Y, como se puede observar la Tabla 7, cuanto mayor es la cantidad de CS utilizado, mayor es la cantidad de CS injertado

Tabla 7. Grado y rendimiento de injerto de la muestra HA-g-CS a diferentes concentraciones.

Muestra	Grado de injerto de CS	Rendimiento del injerto
HA-g-CS 1:15	95%	17%
HA-g-CS 1:50	93%	56%
HA-g-CS 1:100	76%	91%

Por otro lado, también se representa el rendimiento del injerto. Estos valores se han calculado teniendo en cuenta el porcentaje de injerto que se ha producido con respecto al rendimiento máximo que se podría haber injertado. Es decir, si en una muestra se habla de una proporción

1:15, significa que por cada 15 HOOC- del HA hay una cadena de CS, por tanto, el porcentaje del injerto no puede exceder de ese límite. En este caso, los resultados son justo contrarios ya que a mayor cantidad de CS (HA-g-CS 1:15), menor rendimiento ha tenido el injerto que se ha producido.

Debido a los resultados obtenidos y haciendo un balance de todos ellos, en futuros ensayos en este trabajo sólo se trabajará con una proporción 1:50 entre unidades de repetición de HA y macromoléculas de CS.

4.2. Determinación de las propiedades del CS

4.2.1. Análisis de la pérdida de CS en el proceso de diálisis

Con el propósito de evaluar si se producía una pérdida de CS durante el proceso de diálisis, se optó por llevar a cabo un análisis gravimétrico. Esta elección se fundamenta en la intuición previa que sugiere que las cadenas de CS podrían ser altamente dispersas en el transcurso de este procedimiento. La metodología utilizada se describe en detalle en la sección 3.2.4, y los resultados obtenidos se exponen a continuación.

Se planteaban las siguientes expectativas para los diferentes casos:

En la Muestra 1, se anticipa que la masa medida debería corresponder a la cantidad inicial de CS introducida, es decir, 12.4 mg, dado que esta muestra no ha sido sometida a ningún proceso de diálisis.

En las Muestras 2 y 3, también se espera que la masa obtenida refleje la cantidad inicial de CS, ya que la diálisis se llevó a cabo utilizando membranas de 3500 Da, lo que teóricamente debería impedir la pérdida de CS.

Por otro lado, en la Muestra 4, se espera que la masa sea igual a cero, ya que se supone que la columna de Float-A-Lyzer ha permitido que todo el CS pase a través de ella.

Tabla 8. Resultados obtenidos en el ensayo siendo; Muestra 1: CS en H₂O destilada; Muestra 2: CS en H₂O destilada + membrana de diálisis de 3500 durante 24 horas; Muestra 3: CS en H₂O destilada + membrana de diálisis de 3500 durante 48 horas; y Muestra 4: CS en H₂O destilada + membrana de diálisis de 3500 48 durante horas + Float-A-Lyzer 100 kDa durante 24 horas.

Muestra	V (mL)	m Eppendorf vacío (mg)	m Eppendorf liofilizado (mg)	masa CS (mg)	masa teórica CS presente (mg)
Muestra 1	1	1139,30	1137,59	-1,71	12,40
Muestra 2	1	1163,60	1064,50	-99,10	12,40
Muestra 3	1	1139,01	1029,15	-109,86	12,40
Muestra 4	1	1109,87	1027,25	-82,62	0,00

Sin embargo, como representan los resultados del ensayo en la Tabla 8 en todas las muestras muestran valores negativos que carecen de coherencia. La diferencia entre el peso de los tubos Eppendorf vacíos y los que contienen las muestras es inverosímil, incluso después de la liofilización.

Se plantea la hipótesis de que la presencia de humedad previa en los tubos Eppendorf podría explicar esta discrepancia, ya que los pesos de los tubos vacíos son mayores que los de los tubos con las muestras. Esto sugiere que los tubos Eppendorf no fueron adecuadamente desecados ni liofilizados previamente, o bien que la técnica no es suficientemente sensible.

En consecuencia, se concluye que la técnica utilizada no ha resultado apropiada para determinar la pérdida de CS mediante el análisis gravimétrico en este contexto.

4.2.2. Determinación del peso molecular del CS utilizado

Para la caracterización de las propiedades del CS, se hace uso del ensayo de GPC-SEC. Con este ensayo, es posible tener una primera idea de la distribución del peso del HA y del CS, permitiendo saber si efectivamente el condroitín sulfato está formado por cadenas muy dispersas o no.

En primer lugar, se obtuvo la recta patrón que relaciona el tiempo de llegada de las cadenas con el peso molecular utilizando las muestras patrón (polietilenglicol) descritas en el apartado 3.2.5. Como se puede observar en la Figura 20, conforme aumenta el tiempo que tarda la muestra en dar señal (en pasar los poros de la columna), el valor del peso molecular comienza a disminuir, por lo que se tratará de cadenas más pequeñas.

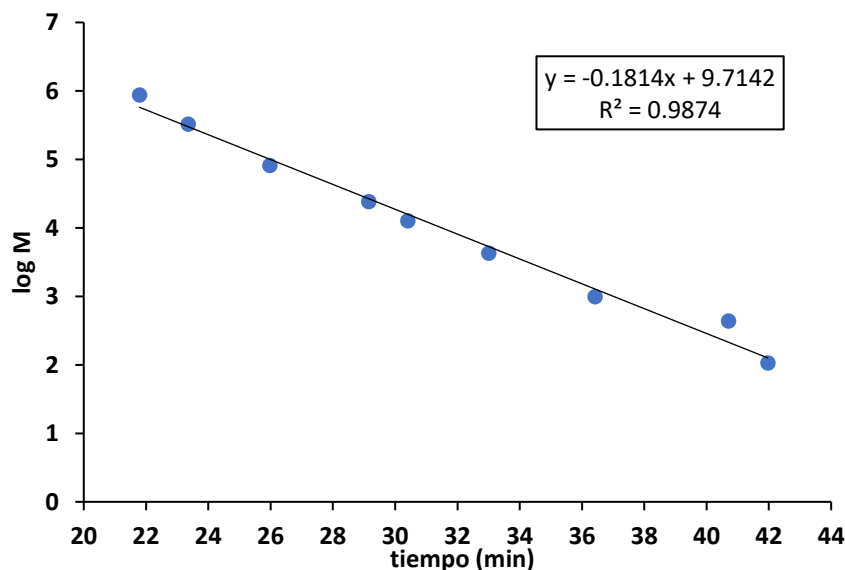


Figura 20. Logaritmo del peso molecular frente al tiempo de elución de las muestras de los patrones de referencia de polietilenglicol. La recta representa el ajuste lineal utilizado posteriormente para la obtención de los pesos moleculares de las diferentes muestras.

Para cada una de las muestras descritas, se obtiene una señal temporal como la que se muestra a continuación en la Figura 21, a). De la señal bruta obtenida en el ensayo (línea negra), se hace un primer preprocesado con el objetivo de eliminar las partes que no proporcionan información de la señal (línea verde).

Con estos valores de amplitud en función del tiempo, se calcula la fracción de área bajo la curva para cada incremento temporal (de menos de un segundo) con respecto al área total. A continuación, conociendo los parámetros de la recta de calibrado y los coeficientes de Mark-Houwink-Sakurada, se puede calcular el peso molecular para cada instante de tiempo de llegada. Este proceso permite representar la curva que muestra la distribución de los pesos moleculares de una muestra en función de la fracción de área bajo la curva instantánea, como se muestra en la Figura 21, b).

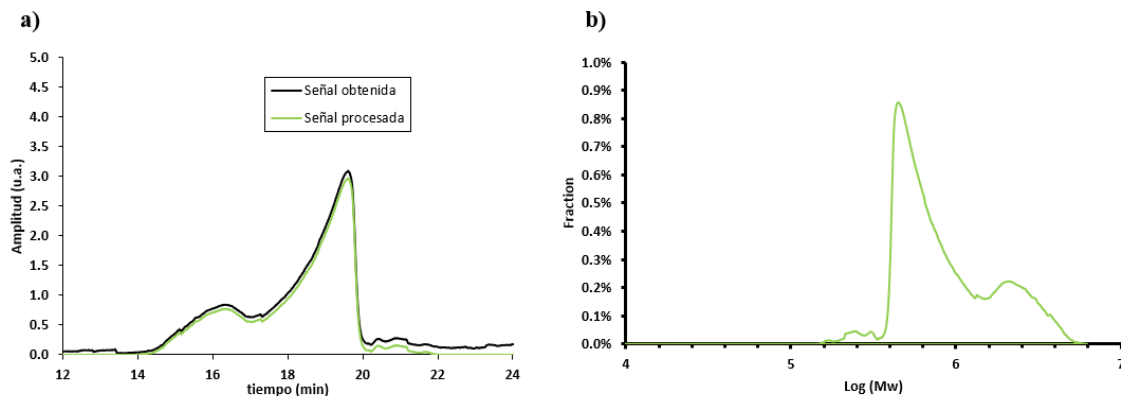


Figura 21. A) Representación de la señal obtenida en el ensayo GPC-SEC de la muestra HA-g-CS 1:50 pasada por el Float-A-Lyzer (curva negra) y su procesado (curva verde). B) Distribución de los pesos moleculares en función de la fracción de área bajo la curva para cada instante temporal con respecto al área total.

A partir de las señales obtenidas para cada muestra, se comparan algunas de ellas con el objetivo de poder conocer las características del CS.

En primer lugar, en la Figura 22 se ven representadas la muestra de HA y de HA-g-CS 1:50 pasada por el Float-A-Lyzer, es decir, muestra que representa solo la cantidad de CS que se ha injertado al ácido hialurónico, ya que las cadenas de CS deberían haber sido eliminadas (puesto que, de acuerdo al fabricante, la masa molar promedio era muy inferior a 100 kDa).

Como se puede observar, hay un pico marcado en ambas curvas entorno a un valor de peso molecular (en escala logarítmica) de 5.6, representando el peso molecular de la mayoría de cadenas de HA. Para la muestra con CS se observa que también hay un pico menos pronunciado a partir de 6.2, el cual representa las cadenas más pesadas de CS que se han injertado en el ácido hialurónico.

Cabe destacar que los pesos moleculares derivados mediante el ajuste de Mark-Houwink-Sakurada no son completamente precisos. Esta discrepancia se debe principalmente a que los coeficientes del ácido hialurónico (HA) y del sulfato de condroitina (CS) son diferentes y, como solución, se ha implementado un promedio para llevar a cabo los análisis de manera conjunta.

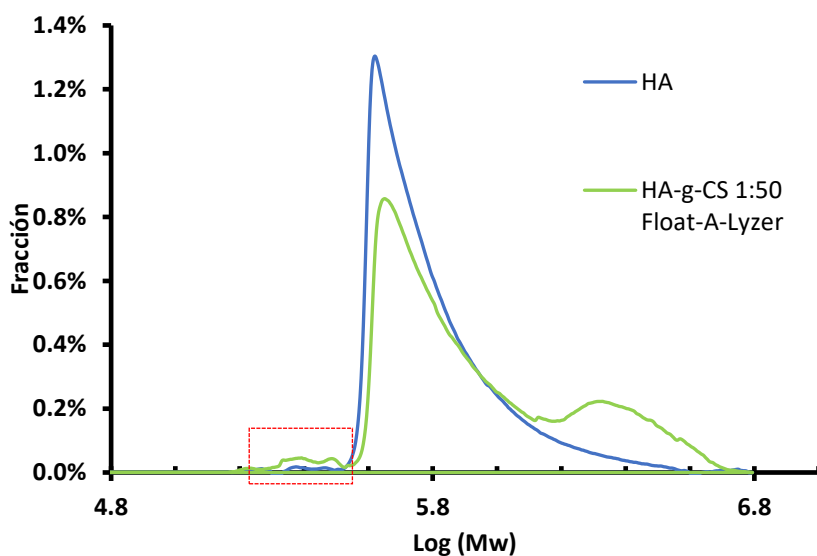


Figura 22. Gráfico comparativo de la distribución de los pesos moleculares de las muestras HA y de HA-g-CS 1:50 pasada por el Float-A-Lyzer, en función de la fracción de área bajo la curva para cada instante temporal con respecto al área. El detalle (cuadro rojo) se amplía en la figura siguiente.

Cabe destacar un ligero aumento en la Figura 23 que representa las cadenas de CS que tenían un peso molecular superior a 100 kDa y que, por tanto, no han atravesado la membrana del Float-a-Lyzer, pese a que su peso molecular promedio es bastante inferior. Esto confirma la hipótesis de que el CS utilizado es muy disperso (Sarkar et al., 2012).

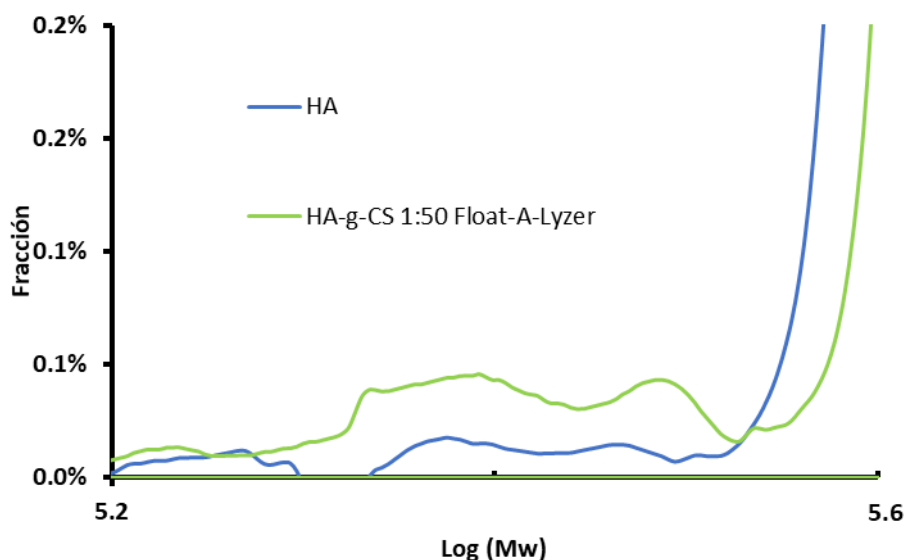


Figura 23. Gráfico comparativo con detalle e la Figura 22 que representa la distribución de los pesos moleculares de las muestras HA y de HA-g-CS 1:50 pasada por el Float-A-Lyzer en función de la fracción de área bajo la curva para cada instante temporal con respecto al área.

Por otro lado, en Figura 24 se observa la comparación de las señales obtenidas para las muestras HA-g-CS 1:50 y HA-g-CS 1:50 pasada por el Float-A-Lyzer. Se puede ver como la curva en verde

comienza a representarse a partir del valor 5. Este valor coincide con el límite que tiene la columna Float-A-Lyzer para dejar pasar las cadenas. Por tanto, se afirma que la columna funciona muy bien eliminando todo lo que esté por debajo de ese umbral, el cual sí que se aprecia en la muestra sin pasar por el filtro (curva en rojo).

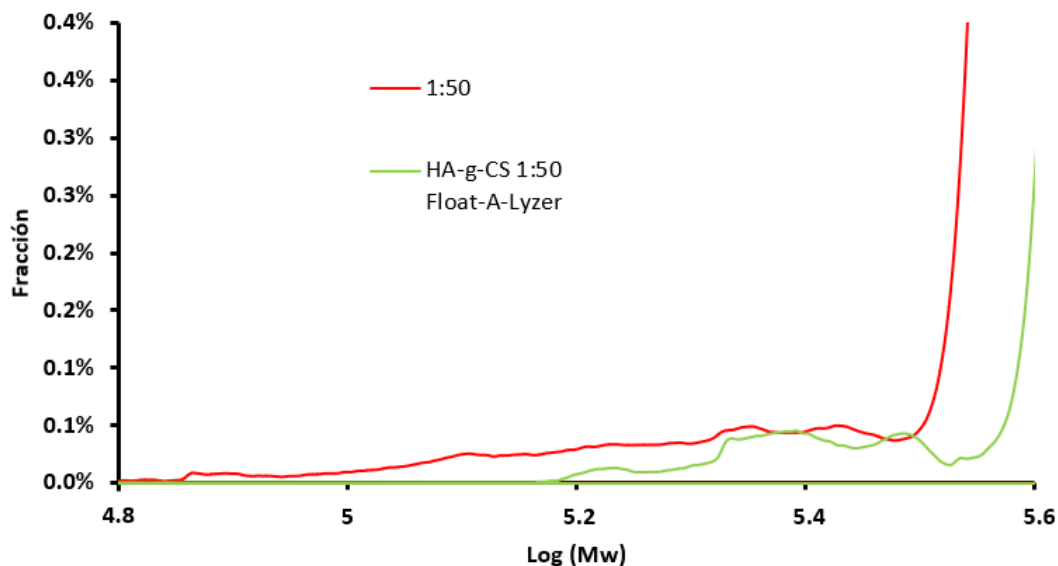


Figura 24. Gráfico comparativo de la distribución de los pesos moleculares de las muestras HA-g-CS 1:50 y de HA-g-CS 1:50 pasada por el Float-A-Lyzer en función de la fracción de área bajo la curva para cada instante temporal con respecto al área.

Por último, al comparar las muestras HA-g-CS 1:15, 1:50 y 1:100 entre sí como representa la Figura 25 con los resultados obtenidos anteriormente en el ensayo de fluorescamina, se observa como la cantidad de las cadenas injertadas en las muestras 1:15 y 1:50 son muy similares. Esto concuerda con la similitud en los valores de grado de injerto de ambas (95 y 93% respectivamente). Por otro lado, es curioso cómo en 1:100 da una proporción tan alta de CS injertado teniendo en cuenta que el grado de injerto es menor para 1:100 (es decir, que hay menos moles de CS injertados en total por cada cadena de HA). Lo único que puede justificar esto es que hay una afinidad especial en el caso del procedimiento hecho con 1:100 por el injerto de las cadenas más grandes de CS. Es decir, cuanto más CS pones inicialmente, más probable es que los fragmentos pequeños se unan al -COOH del HA. Por el contrario, si pones pocas cadenas de CS (1:100), las cadenas injertadas serán las más grandes, en detrimento de las pequeñas (de ahí que haya menos porcentaje en la franja 5.6-5.8 y luego, un repunte grande en 6.2).

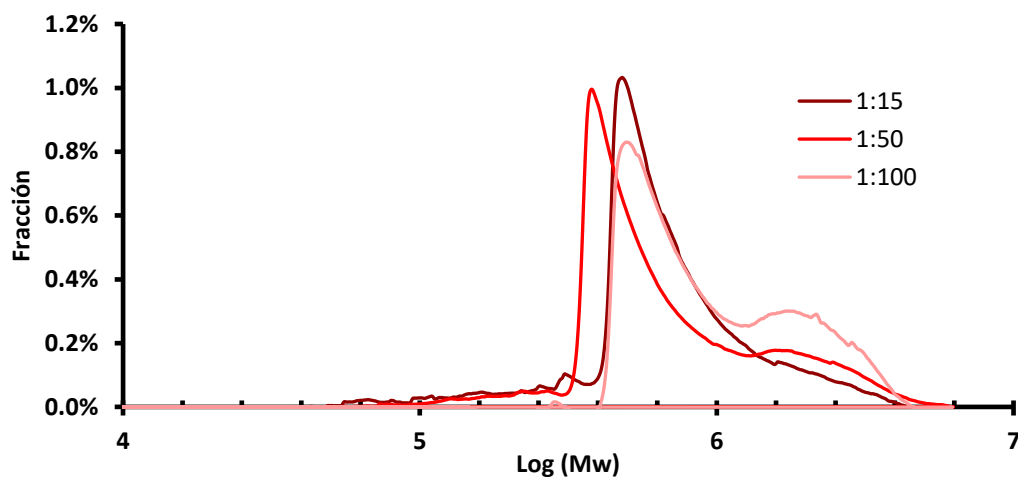


Figura 25. Gráfico comparativo de la distribución de los pesos moleculares de las muestras HA-g-CS 1:15, 1:50 y 1:100 en función de la fracción de área bajo la curva para cada instante temporal con respecto al área.

4.3. Análisis de las muestras SH-HA y SH-HA-g-CS.

4.3.1. Determinación del grado de tiolación y de injerto de CS en las muestras SH-HA y SH-HA-g-CS.

Para determinar la concentración de grupos SH (modificación por CSA) que presentaban las muestras se empleó el método de Ellman.

Para poder visualizar cómo funciona la técnica colorimétrica, se realizó una comparación de los espectros de absorbancia del DTNB entre 200 y 800 nm sin modificar y cuando ha estado en contacto con moléculas de SH (en presencia de CSA), para demostrar el cambio en el espectro que permite cuantificar los SH. Como se puede observar en la Figura 26, el DTNB en presencia de SH a 412 nm (longitud de onda que indica el protocolo de Ellman (Thermo Scientific, s. f.)) da más señal que únicamente el DTNB, por tanto, podemos concluir que es un buen método para cuantificar los -SH.

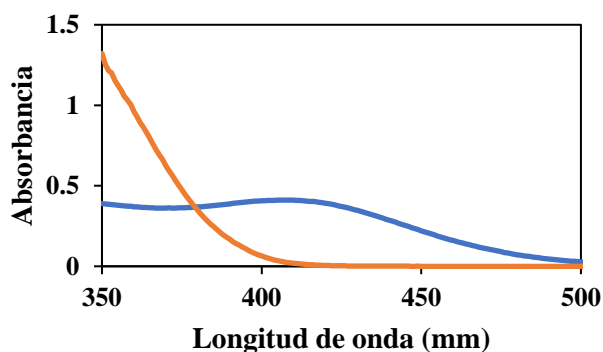


Figura 26. La curva naranja representa el espectro de absorbancia del DTNB, mientras que la azul, representa el del DTNB en contacto con grupos SH.

Para calcular el grado de tiolación, se obtuvo previamente una recta patrón empleando las medidas que se realizó mediante el espectrofotómetro. Esta, se obtuvo a partir del *blank*, y de los estándares de la A-G. A partir de la misma, se pudieron obtener las concentraciones de grupos SH. El grado de tiolación se calculó haciendo la división de la concentración (C) de SH entre la de grupos COOH provenientes de las unidades de repetición del HA introducido originalmente ($\frac{C_{SH}}{C_{COOH_{HA}}}$). Nótese que el resultado del cociente sería 1 si todos los grupos carboxilo del HA hubieran sido funcionalizados con la CSA.

Los resultados obtenidos en cuanto a la muestra SH-HA han sido muy buenos ya que representa un grado de tiolación de hasta un 40.52%. Este valor ha sido un poco más pequeño en las muestras con condroitín sulfato, no siendo significativamente mayor en SH-HA-g-CS 24/24 cómo se puede observar en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados del grado de tiolación de las muestras: SH-HA, SH-HA-g-CS 24/24 y SH-HA-g-CS 24/48.

Muestra	% de tiolación
SH-HA	40.52%
SH-HA-g-CS 24/24	27.31%
SH-HA-g-CS 24/48	26.79%

Por otro lado, para determinar el grado de injerto de CS que se ha producido en las muestras SH-HA-g-CS 24/24 y SH-HA-g-CS 24/48 se utiliza la prueba de la fuorescamina siguiendo el mismo procedimiento explicado en el apartado 4.1. En la Tabla 10 destaca el porcentaje de CS injertado en el caso de la muestra SH-HA-g-CS 24/48.

Tabla 10. Grado y rendimiento de injerto de la muestra SH-HA-g-CS 24/24 SH-HA-g-CS 24/48.

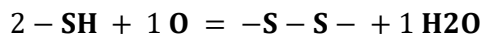
Muestra	% de CS injertado	Rendimiento del injerto
SH-HA-g-CS 24/24	64%	38%
SH-HA-g-CS 24/48	92%	56%

Por tanto, con respecto a elegir si es mejor el SH-HA-g-CS 24/24 o el SH-HA-g-CS 24/48, se observa que claramente, el segundo tiene más CS injertado y que, además, el porcentaje de tiolación no se ve apenas afectado a pesar de que el CS actúe primero que la CSA en la síntesis de la muestra (cosa que se podría esperar antes de conocer los resultados). Por lo que se puede concluir que es muy interesante analizar SH-HA-g-CS 24/48 también en futuros ensayos.

4.3.2. Optimización en el proceso de gelificación

En este apartado el objetivo es estudiar cuáles son las condiciones óptimas para conseguir la gelificación *in situ* de los hidrogeles SH-HA, SH-HA-g-CS 1:50 24/24 y SH-HA-g-CS 1:50 24/48.

Para que la muestra gelifique es necesario que se formen los puentes disulfuro. Para ello, en primer lugar, se hace un ajuste estequiométrico para conocer la cantidad de H_2O_2 que hay que añadir. Sabiendo el número de unidades de repetición presentes en el volumen de HA, como cada unidad de repetición tiene 1 único grupo $-\text{COOH}$ y suponiendo que se modifican todos los $-\text{COOH}$ para acabar siendo $-\text{SH}$ en el extremo. Como la reacción para formar un puente de disulfuro es:



Hacen falta 2 $-\text{SH}$ por cada O . Entonces, como el H_2O_2 se descompone en $\text{H}_2\text{O} + \text{O}\cdot$, resulta en 1 mol de O por cada mol de 1 H_2O_2 que se añade. Por tanto, la concentración que se necesita de H_2O_2 será la mitad de la de $-\text{SH}$ presentes, así como representa la

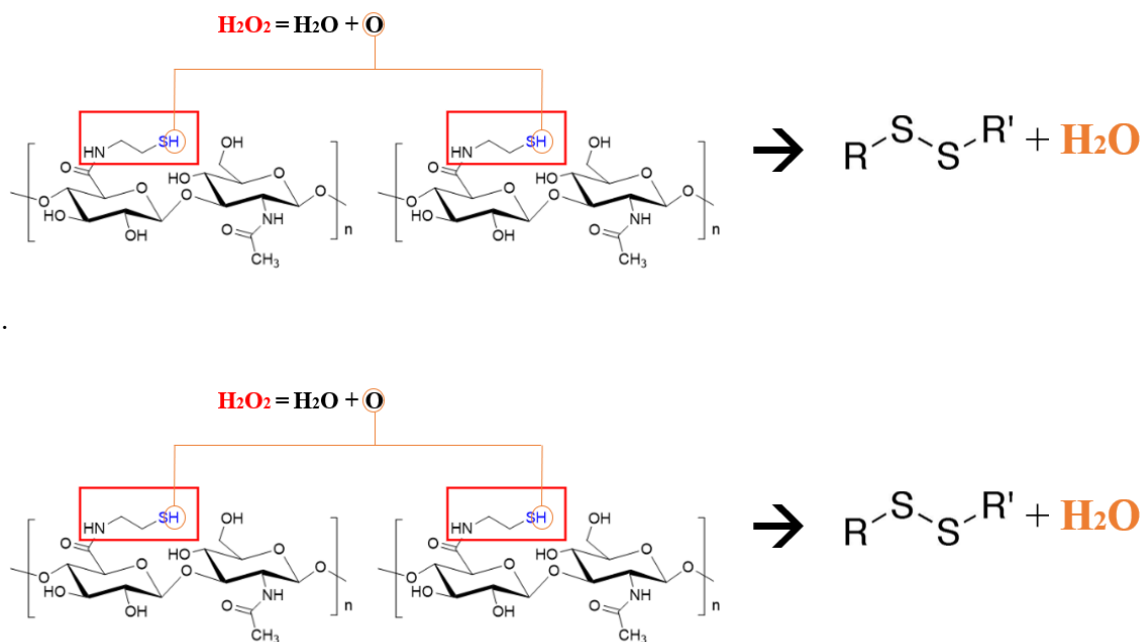


Figura 27. Ajuste estequiométrico para formar puentes disulfuro.

Uno de los resultados de mayor relevancia que se ha obtenido en el transcurso de la investigación es la significativa influencia que ejerce el pH en el proceso de gelificación del material gel. La Figura 28 corrobora este fenómeno: cuando el gel se encuentra en un entorno con un pH ácido, la gelificación es prácticamente inalcanzable, y una situación similar se presenta cuando el gel está sometido a condiciones de pH claramente alcalino, resultando imposible gelificar. Por lo contrario, cuando el pH del entorno se mantiene en torno a un valor de 7.5, se manifiesta de manera evidente la formación y consistencia del gel. Este descubrimiento pone de manifiesto la dependencia del pH en el proceso de gelificación y la necesidad de mantener condiciones apropiadas para lograr la estructura y las propiedades deseadas del gel en el contexto de nuestras investigaciones.

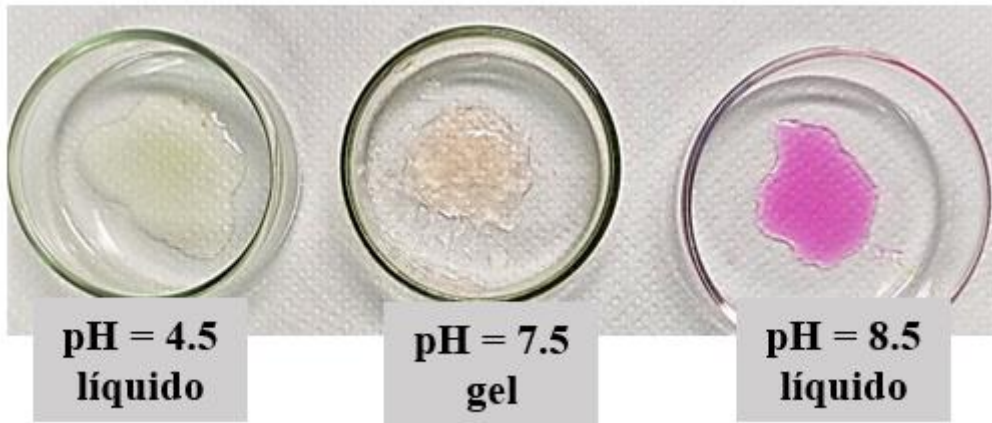


Figura 28. Gelificación de las muestras SH-HA a pH = 4.5, 7.5 y 9.

Además, para respaldar esta observación, se realizó un ensayo de reometría que proporciona una mayor evidencia. En este ensayo, se puede apreciar claramente, como muestra la Figura 29, que la muestra con un pH de 7.5 exhibe propiedades de gel, ya que se observa una considerable separación entre los valores de G' (módulo de almacenamiento o contribución elástica) y G'' (módulo de pérdidas o contribución viscosa). Sin embargo, este fenómeno no se manifiesta de la misma manera en las otras muestras, lo que sugiere una distinta respuesta reológica en función del pH y confirma la importancia crítica del pH en la formación y las propiedades del gel.

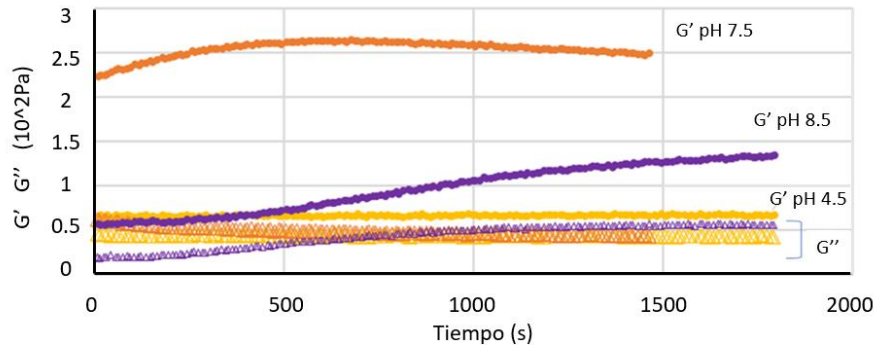


Figura 29. Comportamiento de las muestras SH-HA pH = 4.5, SH-HA pH = 7.5 y SH-HA pH = 8.5 en el ensayo de reometría donde las series con relleno corresponden a G' y las vacías a G'' .

4.3.3. Caracterización de las propiedades viscoelásticas

Se utilizó también el ensayo de reometría con el fin de conocer las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles estudiados, siguiendo la metodología explicada en el apartado anterior 3.4. Los resultados obtenidos consisten en la evolución temporal de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdidas (G'') mediante un barrido oscilatorio de frecuencia.

La tangente delta es una medida que indica la relación entre el módulo de almacenamiento de energía (G') y el módulo de disipación de energía (G'') en un material viscoelástico, como un gel.

$$\tan \delta = G'' / G'$$

En términos simples, un valor bajo de $\tan \delta$ significa que el material tiene una menor capacidad de disipar energía (viscosidad) en relación con su capacidad de almacenar energía (elasticidad) cuando se somete a una deformación o una tensión. Por lo que la relación $G' > G''$ en un gel indica que el componente elástico es dominante en comparación con el componente viscoso en el comportamiento del material. Esto significa que el gel tiene una estructura que le permite recuperar su forma original después de una deformación, lo que es una característica típica de los materiales gelificados. Dado que este parámetro es representativo para comprender las características de los hidrogeles, se determinó la tangente delta para cada una de las muestras para comparar comportamientos.

Los resultados obtenidos para la muestra SH-HA se presentan en la Tabla 11. Como se observa, la muestra con un pH de 7.5 tiene una tangente delta más cercana a 0 que el resto. Esto concuerda con las características que ya se podían observar en la textura de las muestras (Figura 28).

Tabla 11. Resultados del reómetro del gel SH-HA a diferentes pH.

Valor pH	$\tan \delta$
4.5	0.649
6	1.394
7.5	0.193
8	0.477
8.5	0.515

En el caso del hidrogel con condroitín sulfato SH-HA-g-CS (24/24), se observa un patrón similar en la Tabla 12, pues la muestra con un pH de 7.5 presenta una tangente delta más cercana a 0.

Tabla 12. Resultados del reómetro del gel SH-HA-g-CS (24/24) a diferentes pH.

Valor pH	$\tan \delta$
6	0.241
7.5	0.055
8	0.071
8.5	0.087

Es relevante explicar por qué en este ensayo no se ha empleado el compuesto SH-HA-g-CS 24/48, a pesar de sus prometedores indicios. A pesar de su inicial atractivo en términos de grado de injerto, se descartó debido a la incapacidad para gelificar de manera efectiva. Como resultado, los valores de reometría obtenidos no mostraban sensibilidad al pH, lo que lo descalifica para su aplicación, ya que se requiere que los hidrogeles sean capaces de gelificar *in situ*. Es importante señalar que, aunque parecía prometedor desde el punto de vista del grado de injerto, la falta de gelificación plantea interrogantes sobre su idoneidad para las aplicaciones específicas que demandan hidrogeles gelificables *in situ*. Una posible explicación teórica podría apuntar al exceso de injerto de sulfato de condroitina (CS), que podría haber actuado como una barrera estérica, dificultando la formación de entrecruzamientos mediante puentes de disulfuro u otro mecanismo.

Por tanto, dado que el pH de 7.5 se relaciona con las propiedades más favorables, se comparan los resultados de ambas muestras en la siguiente figura (Figura 30), que representa la evolución

temporal de los módulos G'' y G' . Aquí se aprecia que el hidrogel con CS exhibe propiedades claramente superiores en comparación con el hidrogel sin CS, aunque en ambos casos se obtienen resultados altamente satisfactorios que se pueden relacionar con la formación de un hidrogel, el objetivo perseguido en este estudio.

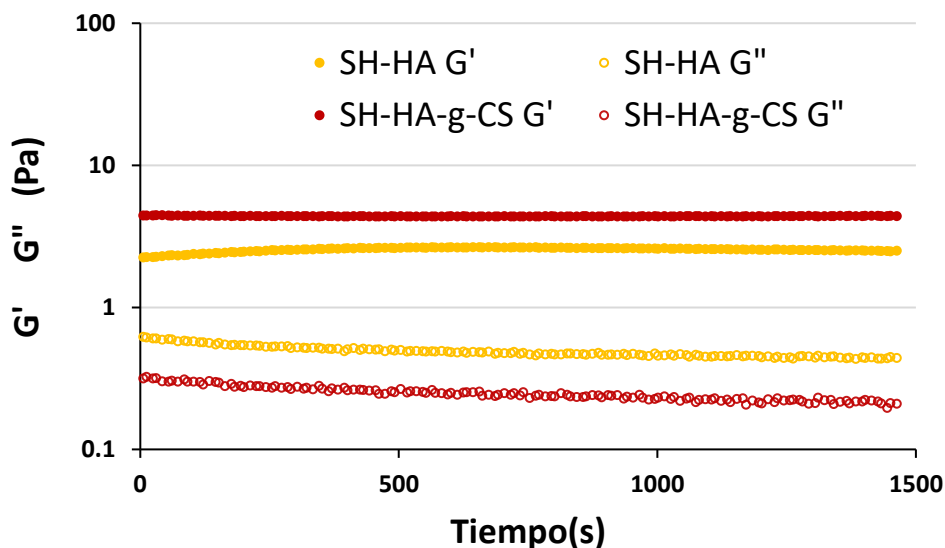


Figura 30. Gráfico que representa la comparación de los geles SH-HA y SH-HA-g-CS (24/24) a pH=7.5

Finalmente, se llevó a cabo el ensayo de reometría en el hidrogel comercial Synvisc One con el propósito de comparar los resultados con los hidrogeles de ensayo. Tal y como representa la Tabla 13, los tres hidrogeles se encuentran en un rango cercano en términos de sus propiedades reológicas. En consecuencia, se puede concluir que se han desarrollado dos hidrogeles de alta calidad.

Tabla 13. Comparación del valor de la $\tan \delta$ de los geles estudiados con respecto al valor gel comercial Synvisc-One.

Gel	$\tan \delta$
SH-HA	0.193
SH-HA-g-CS (24/24)	0.055
Synvisc-One	0.247

4.3.4. Determinación de la liberación de CS de los geles

Conforme se explica en el apartado anterior 3.5, este ensayo engloba diversas muestras: SH-HA + CS, SH-HA-g-CS (24/24), SH-HA-g-CS (24/48) y Synvisc One + CS, las cuales han sido evaluadas en tres distintos medios: buffer, alcalino y enzimático. El análisis se centra en determinar el porcentaje de liberación de condroitín sulfato que cada muestra experimenta en distintos intervalos de tiempo: 1, 3, 5, 7, 10 y 15 días.

El primer paso es obtener la recta patrón (Figura 31). Para ello ha puesto CS en agua a concentraciones de 0 a 50 como representa el eje x. Donde el valor de la absorbancia del 0 será el

blanco que posteriormente se le va a restar a todas las absorbancias de las muestras que obtenemos como resultados.

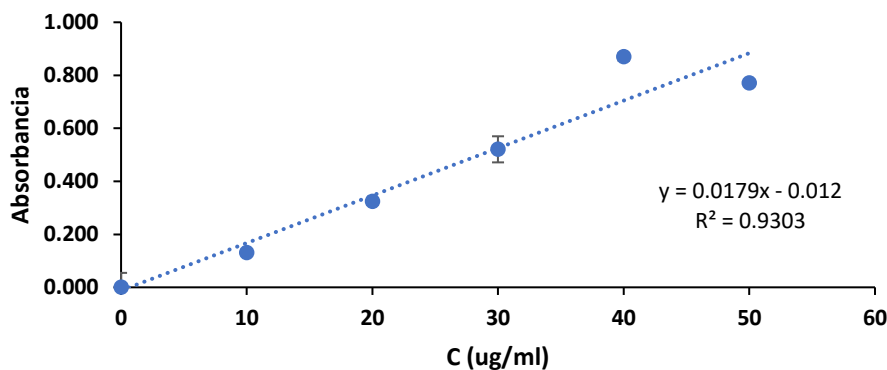


Figura 31. Recta patrón obtenido. La recta representa el ajuste lineal utilizado posteriormente para la obtención de la concentración de CS presente en cada muestra.

Para la obtención del porcentaje de liberación de CS en los diferentes hidrogeles, en distintos medios y momentos específicos, se implementa el siguiente procedimiento:

Inicialmente, se calcula el promedio de los valores de absorbancia. A dicho promedio se le resta el valor de absorbancia del blanco, previamente determinado. Utilizando estos valores promedio y el ajuste lineal de la recta, se calcula la concentración de CS presente en cada pocillo de muestra según la siguiente fórmula: $C (\mu\text{g/ml}) = (\text{Absorbancia} - 0.012) / 0.0179$. Por último, una vez que se conoce la concentración promedio de CS en los pocillos de muestra del mismo tipo, considerando el volumen estándar presente en cada pocillo (125 ml) y la concentración inicial de CS en las muestras evaluadas (0.0004 mg/ml), se procede a calcular el porcentaje de liberación de CS en cada uno de los hidrogeles estudiados, en relación con los distintos medios y momentos de exposición.

Además, dado que este ensayo es extenso y proporciona una variedad significativa de resultados, también se determina la desviación estándar de los resultados de absorbancia obtenidos en cada muestra, así como se evalúa la variabilidad en el proceso de pipeteo. Estas consideraciones son importantes exponerlas ya que se observa una dispersión apreciable en los resultados obtenidos dentro de las mismas muestras.

Analizando la Figura 32, la Figura 33 y la Figura 34, los resultados obtenidos indican que los hidrogeles SH-HA-g-CS (24/24) y SH-HA-g-CS (24/48) presentan una liberación de CS controlada en diversos medios, destacando especialmente el 24/24, esto puede estar relacionado con la dificultad encontrada en la gelificación del 24/48.

Por otro lado, se observan resultados inusuales en los geles sin CS injertado (SH-HA + CS y SynviscOne + CS), ya que, en ciertos puntos temporales, el porcentaje de liberación supera el 100%. Este fenómeno podría deberse a que no se llevó a cabo una verificación para determinar si el ácido hialurónico o las unidades estructurales del mismo en sí generan señales en el ensayo Blyscan (no se realizaron controles positivos del HA pero sí del CS). Por lo tanto, es posible que los hidrogeles proporcionen señales, contribuyendo a los excesos observados en los resultados. En las gráficas se observa que la serie amarilla (SH-HA + CS) muestra valores que exceden el 100% en las gráficas. Esto podría deberse a la falta de pruebas para determinar si el ácido hialurónico (HA) genera señales, lo cual podría estar contribuyendo a estos resultados atípicos.

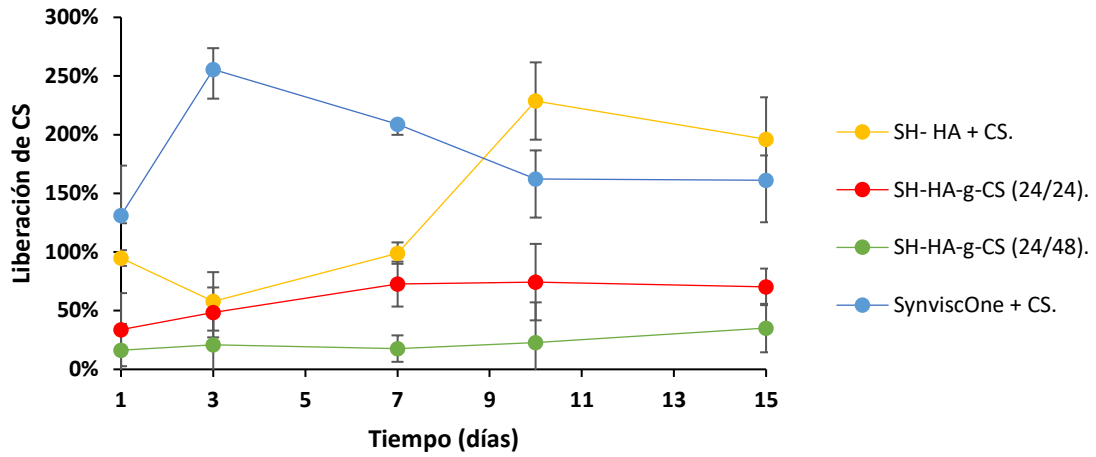


Figura 32. Evolución temporal de la liberación de CS de las muestras SH-HA + CS, SH-HA-g-CS (24/24), SH-HA-g-CS (24/48), Monovisc + CS y Synvisc One + CS en medio tampón.

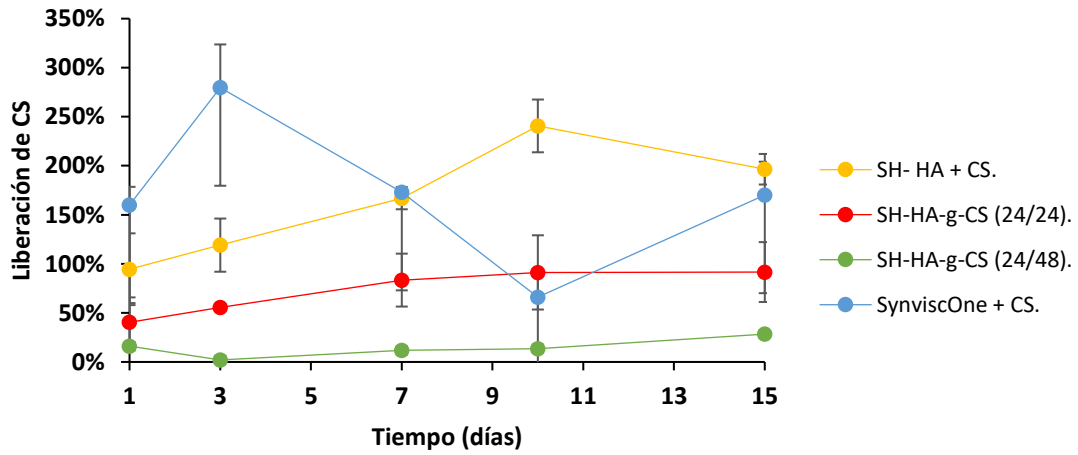


Figura 33. Evolución temporal de la liberación de CS de las muestras SH-HA + CS, SH-HA-g-CS (24/24), SH-HA-g-CS (24/48), Monovisc + CS y Synvisc One + CS en medio alcalino.

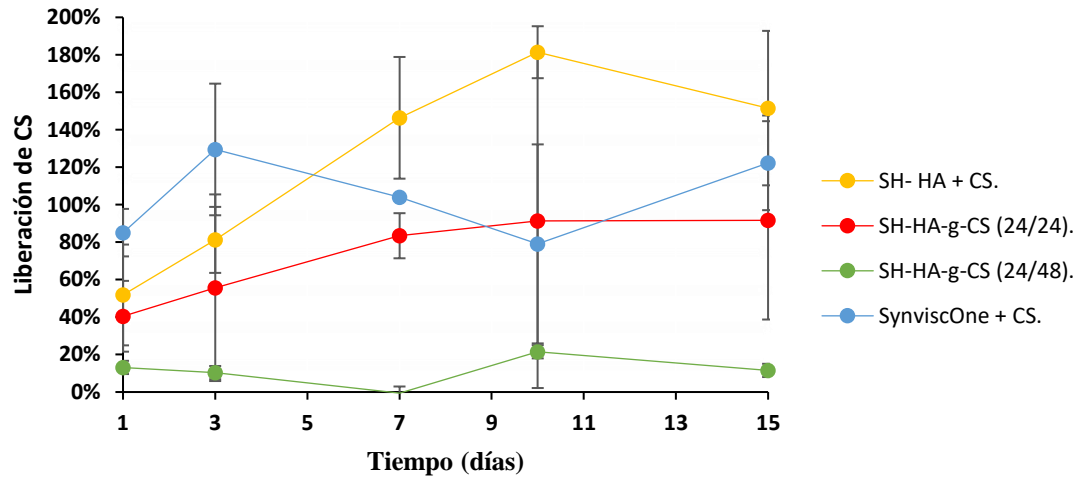


Figura 34. Evolución temporal de la liberación de CS de las muestras SH-HA + CS, SH-HA-g-CS (24/24), SH-HA-g-CS (24/48), Monovisc + CS y Synvisc One + CS en medio enzimático.

En conclusión, se puede afirmar que la interpretación de las gráficas desempeña un papel esencial y claramente, los geles injertados, en comparación con los mezclados, presentan una liberación más controlada, como se observa de manera concluyente.

5. Conclusiones

El aumento global de la incidencia de la artrosis y la limitada disponibilidad de productos efectivos para su tratamiento han despertado un interés significativo en la investigación y desarrollo de soluciones más innovadoras y eficaces tanto a nivel clínico como comercial.

En este Trabajo de Fin de Máster, se propone abordar esta problemática mediante el desarrollo de un tratamiento innovador basado en la inyección intraarticular. El objetivo es lograr un efecto condroprotector y viscosuplementador, permitiendo una dosificación más precisa del fármaco. Esta estrategia busca satisfacer las necesidades de los pacientes y alinearse con las tendencias comerciales mediante la aplicación de dos enfoques terapéuticos competentes.

Se ha empleado una ruta química sencilla que evita la presencia de proteínas, generando así un producto libre de complicaciones asociadas a respuestas a cuerpo extraño. La inspiración proviene de la imitación de estructuras basadas en los GAG presentes naturalmente en la MEC.

La investigación confirma que la concentración óptima de ácido hialurónico (HA) para la creación del hidrogel SH-HA-g-CS es del 0.5% w/v. La caracterización del mismo se llevó a cabo mediante espectrofotometría y el método de Ellman.

La técnica de fluorescencia ha revelado que a mayor cantidad de condroitín sulfato (CS) utilizado, mayor es la cantidad de CS injertado, aunque el rendimiento del injerto disminuye con una proporción más alta de CS (HA-g-CS 1:15). La síntesis con un ratio 1:50 (CS:Carboxilo) se selecciona tras un análisis exhaustivo de los resultados, siendo la primera vez que se logran estos objetivos de manera integral.

La elección de la técnica de entrecruzamiento óptima entre el proceso de reacción competitiva y secuencial se basa en la comparación entre SH-HA-g-CS 24/24 y SH-HA-g-CS 24/48. Se observa que el segundo presenta un mayor porcentaje de CS injertado (56% frente a 38%), y el porcentaje de tiolación apenas se ve afectado, sugiriendo la necesidad de explorar SH-HA-g-CS 24/48 en futuras investigaciones.

Se ha desarrollado un método de síntesis que permite la gelificación in situ de los hidrogeles, controlando temperatura y pH. La influencia del pH en la formación y consistencia del gel destaca la importancia de mantener condiciones adecuadas para alcanzar las propiedades deseadas.

La caracterización mecánica mediante ensayos de reometría demuestra que los hidrogeles desarrollados presentan propiedades similares al hidrogel comercial Synvisc One, estableciendo así su potencial como dispositivo médico.

El análisis detallado de las propiedades del CS mediante la técnica GPC-SEC confirma la dispersión de cadenas de diferentes pesos moleculares, respaldando la hipótesis de macromoléculas de CS con masas molares muy dispares y diferentes entre sí.

Finalmente, la evaluación de la liberación de condroitín sulfato en condiciones fisiológicas muestra que los hidrogeles SH-HA-g-CS (24/24) y SH-HA-g-CS (24/48) presentan una liberación controlada de CS, destacando el primero. Además, se confirma que los geles injertados ofrecen una liberación más controlada en comparación con los geles mezclados.

La elección entre SH-HA-g-CS 24/24 y SH-HA-g-CS 24/48 plantea una decisión clave: ¿cuál es el gel más adecuado? Inicialmente, la opción predeterminada sería el 24/48 debido a la mayor cantidad de injerto de CS sin pérdida aparente. Sin embargo, al analizar los resultados de reometría, solo se cuenta con datos del 24/24, ya que el 24/48 no logró gelificar completamente, a pesar de seguir el método de síntesis exitoso aplicado al 24/24.

En conclusión, resulta intrigante que, con una diferencia tan pequeña en el grado de tiolación, el 24/48 no logre la gelificación mientras que el 24/24 sí lo hace. Se puede especular que la mayor cantidad de CS en él 48 podría estar provocando un fenómeno estérico, es decir, posiblemente separando las cadenas y evitando que encajen adecuadamente.

Por lo tanto, la decisión final es apostar por el gel SH-HA-g-CS 24/24, ya que ha demostrado su capacidad para gelificar y excelentes propiedades. Como trabajo futuro, sería crucial verificar si, de hecho, el CS en exceso está impidiendo la formación de la gelificación. A pesar de que el 48 posee una mayor cantidad de CS y, teóricamente, tendría propiedades condroprotectoras superiores, enfrenta desafíos significativos, como la dificultad para gelificar.

6. Trabajo en proceso y futuro

El presente Trabajo de Fin de Máster (TFM) se enmarca en el contexto del proyecto "Hidrogeles inyectables in situ de ácido hialurónico como viscosuplemento en osteoartritis y dispositivo de liberación de biomoléculas condroprotectoras". En el marco de esta iniciativa, se han ejecutado las labores inherentes a la caracterización de los hidrogeles. Una vez obtenidos los hidrogeles con las propiedades específicas y previamente definidas en la descripción del proyecto, la fase final del mismo, la cual se está llevando a cabo actualmente, implica la evaluación de estos materiales en ensayos *in vitro* y *ex vivo* con el propósito de analizar la viabilidad de su utilización y su funcionalidad en un entorno más cercano a la investigación preclínica.

Las actividades a realizar de acuerdo a la memoria científico-técnica del proyecto, son descritas a continuación en dos subobjetivos distintos:

- Evaluación de la viabilidad del uso de sustratos tridimensionales basados en geles en cultivo celular *in vitro*. Para testear el SH-HA-g-CS como hidrogel inyectable en tejidos celularizados, se sembrarán líneas celulares de condrocitos suspendidos en una disolución que debería producir la transición sol-gel en condiciones de cultivo celular, cuya distribución y expresión génica será determinada.
- Evaluación del efecto antiinflamatorio y regenerativo de los hidrogeles en modelo *ex vivo* de explante recurriendo a explantes osteocondrales tipo tapón de rata, mediante la gelificación *in situ* de hidrogeles SH-HA-g-CS, se realizará un cultivo *ex vivo* en un modelo tisular relevante, tanto en estructuras sanas como dañadas, para cuantificar mediante histología el impacto inflamatorio y regenerativo a medio plazo.

7. Bibliografía

- Adams, M. E., & Brandt, K. D. (1991). Hypertrophic repair of canine articular cartilage in osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection. *The Journal of rheumatology*, *18*(3), 428-435.
- Alonso Carro, G., & Villanueva Blaya, P. (2002). Aplicaciones clínicas y efectos terapéuticos de la viscosuplementación en la artrosis de rodilla. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, *46*(5), 458-464.
- Apostu, D., Lucaciu, O., Mester, A., Oltean-Dan, D., Baciut, M., Baciut, G., Bran, S., Onisor, F., Piciu, A., Pasca, R. D., Maxim, A., & Benea, H. (2019). Systemic drugs with impact on osteoarthritis. *Drug Metabolism Reviews*, *51*(4), 498-523. <https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1687511>
- Baron, D., Flin, C., Porterie, J., Despaux, J., & Vincent, P. (2019). Inyección Intraarticular Única de Ácido Hialurónico en la Artrosis de Rodilla: Estudio Multicéntrico Prospectivo Abierto (ART-ONE 75) mediante Comparación Post-Hoc con Placebo. *Current Therapeutic Research*, *90*, 69-83. <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2019.04.002>
- Bart, J., Tiggelaar, R., Yang, M., Schlautmann, S., Zuilhof, H., & Gardeniers, H. (2009). Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. *Lab on a Chip*, *9*(24), 3481. <https://doi.org/10.1039/b914270c>
- Beasley, K., Weiss, M., & Weiss, R. (2009). Hyaluronic Acid Fillers: A Comprehensive Review. *Facial Plastic Surgery*, *25*(02), 086-094. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1220647>
- Bian, S., He, M., Sui, J., Cai, H., Sun, Y., Liang, J., Fan, Y., & Zhang, X. (2016). The self-crosslinking smart hyaluronic acid hydrogels as injectable three-dimensional scaffolds for cells culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *140*, 392-402. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.008>
- Biocolor Life Science Assays. (s. f.). Blyscan: sulfated glycosaminoglycan assay. https://assets-global.website-files.com/623c6aaf9b946bc877abcc61/64c2317b3dd3ad3ffee60a95_Blyscan-manual-webopt.pdf
- Blanco, F. J., Silva-Díaz, M., Quevedo Vila, V., Seoane-Mato, D., Pérez Ruiz, F., Juan-Mas, A., Pego-Reigosa, J. M., Narváez, J., Quilis, N., Cortés, R., Romero Pérez, A., Fábregas Canales, D., Font Gayá, T., Bordoy Ferrer, C., Sánchez-Piedra, C., Díaz-González, F., & Bustabad-Reyes, S. (2021). Prevalence of symptomatic osteoarthritis in Spain: EPISER2016 study*. *Reumatología Clínica (English Edition)*, *17*(8), 461-470. <https://doi.org/10.1016/j.reumae.2020.01.005>
- Bromme, D. (2004). Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods*, *32*(2), 199-206. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00212-3](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00212-3)
- Bruyère, O., Honvo, G., Veronese, N., Arden, N. K., Branco, J., Curtis, E. M., Al-Daghri, N. M., Herrero-Beaumont, G., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., Rannou, F., Rizzoli, R., Roth, R., Uebelhart, D., Cooper, C., & Reginster, J.-Y. (2019). An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO). *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, *49*(3), 337-350. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2019.04.008>

- Calvo, R. (2012). Sulfato de glucosamina y condroitín sulfato, fármacos para el tratamiento de la artrosis, acusados de no presentar eficacia clínica. ¿Culpables? *Gaceta Médica de Bilbao*, *109*(4), 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.gmb.2012.08.001>
- Clegg, T. E., Caborn, D., & Mauffrey, C. (2013). Viscosupplementation with hyaluronic acid in the treatment for cartilage lesions: a review of current evidence and future directions. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, *23*(2), 119-124. <https://doi.org/10.1007/s00590-012-0940-0>
- DiNubile, N. (2018). Glucosamine and Chondroitin Sulfate: What Has Been Learned Since the Glucosamine/chondroitin Arthritis Intervention Trial. *Orthopedics*, *41*(4), 200-207. <https://doi.org/10.3928/01477447-20180511-06>
- E, Y., Ju, Y., Wang, Z., Chang, Z., Jiang, J., Li, P., Lei, F., Yao, X., & Wang, K. (2022). Tunable and Self-Healing Properties of Polysaccharide-Based Hydrogels through Polymer Architecture Modulation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *10*(42), 14053-14063. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c05125>
- Ellman, G. L. (1959). Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *82*, 70-77.
- Ghosh, P. (1994). The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. *Clinical and experimental rheumatology*, *12*(1), 75-82.
- Han, L., Wang, M., Li, P., Gan, D., Yan, L., Xu, J., Wang, K., Fang, L., Chan, C. W., Zhang, H., Yuan, H., & Lu, X. (2018). Mussel-Inspired Tissue-Adhesive Hydrogel Based on the Polydopamine–Chondroitin Sulfate Complex for Growth-Factor-Free Cartilage Regeneration. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *10*(33), 28015-28026. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b05314>
- Lotz, M. K., & Caramés, B. (2011). Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA. *Nature Reviews Rheumatology*, *7*(10), 579-587. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.109>
- Merck. (s. f.). Sigma-Aldrich: certificate of Analysis. <https://www.sigmaaldrich.com/>
- Nam, S., & Mooney, D. (2021). Polymeric Tissue Adhesives. *Chemical Reviews*, *121*(18), 11336-11384. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00798>
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinárni medicína*, *53*(8), 397-411. <https://doi.org/10.17221/1930-VETMED>
- Prudnikova, K., Lightfoot Vidal, S. E., Sarkar, S., Yu, T., Yucha, R. W., Ganesh, N., Penn, L. S., Han, L., Schauer, C. L., Vresilovic, E. J., & Marcolongo, M. S. (2018). Aggrecan-like biomimetic proteoglycans (BPGs) composed of natural chondroitin sulfate bristles grafted onto a poly(acrylic acid) core for molecular engineering of the extracellular matrix. *Acta Biomaterialia*, *75*, 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.013>
- Puhl, W., Bernau, A., Greiling, H., Kopcke, W., Pforringer, W., Steck, K., Zacher, J., & Scharf, H. (1993). Intra-articular sodium hyaluronate in osteoarthritis of the knee: a multicenter, double-blind study. *Osteoarthritis and Cartilage*, *1*(4), 233-241. [https://doi.org/10.1016/S1063-4584\(05\)80329-2](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(05)80329-2)
- Rojas, J. (2018). Clasificación de las enfermedades reumáticas. La Escuelita Médica.

- Roman-Blas, J. A., Mediero, A., Tardío, L., Portal-Nuñez, S., Gratal, P., Herrero-Beaumont, G., & Largo, R. (2017). The combined therapy with chondroitin sulfate plus glucosamine sulfate or chondroitin sulfate plus glucosamine hydrochloride does not improve joint damage in an experimental model of knee osteoarthritis in rabbits. *European Journal of Pharmacology*, 794, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.11.015>
- Sacitharan, P. K. (2019). *Ageing and Osteoarthritis* (pp. 123-159). https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2_6
- Salgado, C., Jordan, O., & Allémann, E. (2021). Osteoarthritis In Vitro Models: Applications and Implications in Development of Intra-Articular Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 13(1), 60. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010060>
- Sánchez Martín, M. M. (2013). Artrosis. Etiopatogenia y tratamiento. *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid*, 50, 181-201.
- Sánchez Téllez, D. A. (2019). Biological hyaluronic acid-based and chondroitin sulfate-based hybrid hydrogels with great potential for cartilage substitution and regeneration. Instituto Politécnico Nacional.
- Sarkar, S., Lightfoot-Vidal, S. E., Schauer, C. L., Vresilovic, E., & Marcolongo, M. (2012). Terminal-end functionalization of chondroitin sulfate for the synthesis of biomimetic proteoglycans. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 431-440. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.062>
- Schuermans, Carl. C. L., Mihajlovic, M., Hiemstra, C., Ito, K., Hennink, W. E., & Vermonden, T. (2021). Hyaluronic acid and chondroitin sulfate (meth)acrylate-based hydrogels for tissue engineering: Synthesis, characteristics and pre-clinical evaluation. *Biomaterials*, 268, 120602. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120602>
- Simulescu, V., Kalina, M., Mondek, J., & Pekař, M. (2016). Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydrate Polymers*, 137, 664-668. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.101>
- Smith, M. M., & Ghosh, P. (1987). The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatology International*, 7(3), 113-122. <https://doi.org/10.1007/BF00270463>
- Stockwell, R. A. (1991). Cartilage failure in osteoarthritis: Relevance of normal structure and function. A review. *Clinical Anatomy*, 4(3), 161-191. <https://doi.org/10.1002/ca.980040303>
- Thermo Scientific. (s. f.). Ellman's Reagent Protocol. Instructions. https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011216_Ellmans_Reag_UG.pdf
- Tobetto, K., Yasui, T., Ando, T., Hayaishi, M., Motohashi, N., Shinogi, M., & Mori, I. (1992). Inhibitory Effects of Hyaluronan on (14C)Arachidonic Acid Release from Labeled Human Synovial Fibroblasts. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 60(2), 79-84. <https://doi.org/10.1254/jjp.60.79>
- Torregrosa Aragonese, I. (2022). Desarrollo de un viscosuplemento gelificable in situ basado en ácido hialurónico entrecruzado para liberación controlada de moléculas condroprotectoras. Universitat Politècnica de València.
- Vaca-González, J. J., Gutiérrez, M. L., & Garzón-Alvarado, D. A. (2017). Cartílago articular: estructura, patologías y campos eléctricos como alternativa terapéutica. Revisión de

conceptos actuales. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, 31(4), 202-210.
<https://doi.org/10.1016/j.rccot.2017.06.002>

Vina, E. R., & Kwok, C. K. (2018). Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Current Opinion in Rheumatology*, 30(2), 160-167.
<https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000479>

Wu, M., Xu, S., Zhao, J., Kang, H., & Ding, H. (2010). Physicochemical characteristics and anticoagulant activities of low molecular weight fractions by free-radical depolymerization of a fucosylated chondroitin sulphate from sea cucumber *Thelenata ananas*. *Food Chemistry*, 122(3), 716-723. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.042>

DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

1. Presupuesto

En este capítulo se realiza una estimación económica de este Trabajo Final de Máster: "Diseño de hidrogeles de ácido hialurónico injertados con moléculas condroprotectoras". Contiene los costes parciales de los materiales y equipos utilizados, así como los costes de mano de obra. Finalmente, se calcula el presupuesto total del proyecto.

1.1. Presupuesto parcial

1.1.1. Costes de la mano de obra

El desarrollo de este trabajo contó con la participación de un estudiante del Máster en Ingeniería Biomédica así como de dos supervisores, que guiaron y corrigieron el proyecto. Los precios mostrados a continuación en la Tabla 14 son orientativos, considerando que un estudiante recibe 20 e/h. y los profesionales ingenieros e investigadores reciben 40 e/h.

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Cantidad	Precio Unitario (€)	Precio total (€)
1	MO.1	Horas	Ingeniero/a Biomédico	600.00	20.00	12000.00
2	MO.2	Horas	Tutor/a responsable del proyecto	161.50	40.00	6460.00
Precio total de la mano de obra (€)						18460.00

1.1.2. Costes de material fungible

El desglose de los materiales utilizados en el desarrollo del proyecto se muestra en la Tabla 15.

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Cantidad	Precio Unitario (€)	Precio total (€)
1	MAT.01	ud	Blyscan GAG Assay	3.00	339.00	1017.00
2	MAT.02	ud	Accesorio plato reómetro	1.00	30.00	30.00
3	MAT.03	ml	Ácido clorhídrico (HCl)	4.50	0.42	1.89
4	MAT.04	g	Ácido hialurónico	0.80	31.00	24.80
5	MAT.05	L	Agua destilada	646.13	0.15	96.92
6	MAT.06	L	Agua mili-Q	683.57	0.06	43.75
7	MAT.07	L	Agua oxigenada 30% v/v	0.50	1.16	0.58
8	MAT.08	g	Albúmina de suero bovino (BSA)	0.32	0.23	0.07
9	MAT.09	Horas	Caja de guantes	1.50	0.01	0.02
10	MAT.10	g	Cisteamina	0.11	1.58	0.18
11	MAT.11	g	Cloruro de sodio (NaCl)	6.13	0.04	0.25
12	MAT.12	ml	NaH ₂ PO ₄	6.00	0.40	2.40
13	MAT.13	g	Condroitín sulfato	3.15	2.50	7.87
14	MAT.14	mg	DNTB	4.00	11.50	0.05

15	MAT.15	g	EDC·HCL	0.76	34.40	26.31
16	MAT.16	g	EDTA	0.07	0.01	0.00
17	MAT.17	ud	Eppendorf 1.5 mL	431.00	0.07	30.17
18	MAT.18	ud	Eppendorf 2 mL	7.00	0.08	0.56
19	MAT.19	ud	Espátula metálica laboratorio	6.00	3.99	23.94
20	MAT.20	ud	Espátula teflón laboratorio	3.00	1.99	5.97
21	MAT.21	g	Fluorescamina	0.36	0.96	0.35
22	MAT.22	ud	Frascos de vidrio Teqler 20 mL	12.00	2.24	26.88
23	MAT.23	g	Glicina	0.28	0.22	0.06
24	MAT.24	ml	Hidróxido de sodio (NaOH)	23.00	0.40	9.20
25	MAT.25	g	L-prolactina	2.50	0.04	0.10
26	MAT.26	m	Membrana de diálisis (35KDa)	9.00	22.40	201.60
27	MAT.27	ml	Na ₂ B ₄ O ₇	0.20	0.48	0.10
28	MAT.28	g	Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	0.40	0.32	0.13
29	MAT.29	mg	N-Acetil-Dgalactosamina	10.14	0.74	7.50
30	MAT.30	g	NHS	1.26	3.98	5.03
31	MAT.31	mg	Papaina	1.25	2.20	2.75
32	MAT.32	m	Papel de aluminio	22.00	0.05	1.10
33	MAT.33	ud	Parafilm	4.00	10.00	40.00
34	MAT.34	ud	Pinzas plástico	8.00	0.29	2.32
35	MAT.35	ud	Pipeta Pasteur	3.00	0.20	0.60
36	MAT.36	ud	Placa multipocillo p96	4.00	0.79	3.16
37	MAT.37	ud	Plataforma para pesar	10.00	0.05	0.50
38	MAT.38	ud	Placa multipocillo p96 negra	2.00	0.79	1.58
39	MAT.39	Horas	Placa petri	10.00	3.38	33.80
40	MAT.40	ud	Probeta 100 mL	3.00	4.36	13.08
41	MAT.41	ud	Puntas micropipeta 100-1000 uL	51.00	0.03	1.53
42	MAT.42	ud	Punta pipeta 25 mL	10.00	0.47	4.70
43	MAT.43	ud	Puntas micropipeta 2-200 uL	43.00	0.04	1.72
44	MAT.44	ud	Spectra-Por® Float-A-Lyzer® G2 blue, 10 ml, MWCO 100 kDa	2.00	12.00	24.00
45	MAT.45	ud	Synvisc-One® HYLAN GF-20	1.00	56.67	56.67
46	MAT.46	ud	Tamiz troquelar	1.00	5.50	5.50
47	MAT.47	mg	Tripsina	4.40	0.19	0.81
48	MAT.48	ud	Tubo de vidrio cilíndrico	1.00	10.00	10.00
49	MAT.49	ud	Tubos de ensayo	24.00	1.15	27.60
50	MAT.50	ud	Tubos Falcon 50 ml	3.00	3.10	9.30
Precio total material fungible (€)						1804.39

1.1.3. Costes de material inventariable

El desglose de los costes de la maquinaria requerida para desarrollar el presente proyecto se muestra en la Tabla 16 calculado siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Precio total (€)} = \text{Precio unitario} \left(\frac{\text{€}}{\text{h}} \right) \cdot \text{Cantidad (h)}$$

donde el precio unitario se obtiene del coste total de la máquina dividido entre el período de amortización de la misma medido en horas.

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Cantidad	Precio Unitario (€)	Precio total (€)
1	MAQ.01	Horas	Sistema de purificación de agua pura y ultrapura Direct-Q™ 3 de Merck Millipore	2.00	0.30	0.60
2	MAQ.02	Horas	Espectrofotómetro de masas Victor3 Perkin Elmer 8000	10.00	0.14	1.40
3	MAQ.03	Horas	Liofilizadora Cool vacuum	24.00	0.20	4.80
4	MAQ.04	Horas	Reómetro Discovery HR 20	15.00	0.52	7.80
5	MAQ.05	Horas	PH-metro de sobremesa PH50 marca Violab	7.50	0.23	1.73
6	MAQ.06	Horas	Espectrofotómetro Cary 60 uv-vis Agilent technologies	12.00	0.11	1.32
7	MAQ.07	Horas	Centrifugadora marca Eppendorf, modelo 5804R	6.00	3.63	21.78
Precio total maquinaria (€)						39.43

2. Presupuesto total

Por último, el presupuesto total se muestra en la Tabla 17 donde los costes directos indicados anteriormente, así como el IVA (21 %) y los costes indirectos, que incluyen los gastos generales (13 %) y el beneficio industrial (6 %), que suelen suponer hasta el 18 % de los costes directos.

Descripción	Precio (€)
COSTES DIRECTOS:	
Precio de la mano de obra	18460.00
Precio materiales	1804.39
Precio maquinaria	39.43
Total	20303.81
COSTES INDIRECTOS:	
(18% de los costes directos)	3654.69
Presupuesto parcial	23958.50
IVA 21%	5031.28
Presupuesto final	28989.78

