

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



**Desarrollo de un sistema de liberación prolongada de factor neural del crecimiento a partir de micropartículas de gelatina introducidas en dos scaffolds de ácido hialurónico y poli(etil acrilato).**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: Alejandro Rodríguez Ruiz

TUTOR: Manuel Monleón Pradas

*Curso Académico: 2013-2014*

VALENCIA, 30 de Junio de 2014



**Título del TFG:** Desarrollo de un sistema de liberación prolongada de factor neural del crecimiento a partir de micropartículas de gelatina introducidas en dos scaffolds de ácido hialurónico y poli(etil acrilato).

**Titulación:** Grado en Biotecnología

**Autor:** Don Alejandro Rodríguez Ruiz

**Tutor académico:** Don Manuel Monleón Pradas.

**Localidad y fecha:** 30 de Junio de 2014 ,Valencia.

### Resumen:

En la actualidad existen gran cantidad de enfermedades de tipo neurológico, donde el marcador patológico común es la pérdida de grupos de neuronas específicas, por ejemplo: en la enfermedad de Parkinson es clave la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigrales; en la enfermedad de Alzheimer, lo es la pérdida degenerativa de neuronas septohipocampales, serotoninérgicas y corticales, y en la enfermedad de Huntington, la muerte de las neuronas gabaérgicas de proyección del estriado. Muchas de estas enfermedades carecen de cura, y sólo hay propuestas distintas alternativas para la disminución o reducción de sus efectos. Por ello, la ingeniería tisular, una de las ramas más emergentes de la regeneración biomédica, tratará de solventar dichas dificultades, y llegar a la creación de un sistema que elimine dicho problema desde su base. De este modo, en este estudio se contempla la idea de la liberación continuada de un factor de crecimiento, el factor de crecimiento neuronal (NGF), una proteína que permite el crecimiento y mantenimiento de ciertos tipos de neuronas, impidiendo de ese modo el atrofiamiento y muerte de éstas cuando se produce algún tipo de lesión.

Para ello se propone su introducción en micropartículas de gelatina, cuya degradación continuada provocará una liberación de NGF durante las primeras horas más críticas a lo largo del tiempo y promoverá el crecimiento neuronal. El principal problema que se da con este tipo de micropartículas es su gran dispersión necesitando de algún tipo de estructura que las mantenga fijadas en la estructura deseada. Así pues, en este trabajo se plantea la idea de la introducción de dichas microesferas en distintos soportes tridimensionales o *scaffolds*. Estos soportes se encargarán de atrapar las microesferas en su estructura, y conforme éstas se degraden, irán liberando en la zona deseada el NGF.

La elección del soporte tridimensional también será decisiva para la introducción de las micropartículas, considerándose distintas variables como son el tamaño de los poros, su resistencia, y su tiempo de degradación. Por ello en este estudio se compararán dos materiales de naturaleza muy distinta: el ácido hialurónico, un biopolímero natural que se encuentra en la matriz extracelular del organismo; y el poli(etil acrilato) un polímero acrílico de gran resistencia. Otro de los temas de mayor importancia será la carga del NGF utilizando una proteína modelo llamada BSA que permitirá conocer la cinética de liberación de las micropartículas.

Finalmente, también es necesario comprobar la citotoxicidad de los distintos materiales empleados, debido a que deberán implantarse en el organismo, así como la realización de cultivos celulares in vitro para la comprobación de que se está consiguiendo el objetivo deseado.

### Palabras clave:

Regeneración neural, ingeniería tisular, micropartícula, gelatina, scaffold, ácido hialurónico, poli( etil acrilato).

### Abstract:

Nowadays there are lots of diseases with a neurologic origin where the pathogenic common marker is the loss of specific groups of neurons, for example; Parkinson disease with the degeneration of nigral dopaminergic neurons; in Alzheimer disease the loss of septohippocampal, serotonergic and cortical neurons; in the Huntington disease the death of gabaergic neurons. Lots of these diseases have no cure and there are proposed only some alternatives for the reducing its effects. Because of this, tissue engineering, one of the most emerging parts in biomedical regeneration will try to solve these difficulties and create a system that eliminates this problem from its base. In this way, in this study it is proposed the idea of a continue release of a neurologic growth factor (NGF), a protein that allows the growth and maintenance of some groups of neurons preventing its atrophy and death of these neurons when some kind of injury is produced.

For this reason in this article it is proposed the insertion of the NGF in microspheres of gelatin whose degradation will produce a releasement of the factor during the first most critical hours of the process promoting the neural growth. The main problem that these kind of microspheres have, it is its wide dispersion in the body, needing some kind of structure that maintains them fixed in the wished place. To solve this, it surged the idea of inserting these microparticles in a structure called scaffold. These scaffolds will maintain the microspheres in its structures and will allow them to degrade in the desired placed.

The election of the three-dimensional scaffold will also be conclusive for the insertion of the microspheres, considering different variables such as the size of the porous, its resistance to mechanical efforts and its degradation rate. Because of these reasons two very different materials will be compared: the hyaluronic acid a natural biopolymer that can be found in the extracellular matrix of the organism; and the poly(etyl acrylate) a very resistant acrylic polymer.

Also, another of the more important topics will be the loading of the neural growth factor using for this a model protein that will allow us to know the kinetics of the releasement of the microspheres.

Finally as these materials will be implanted in the organism, it will be necessary to prove the cytotoxicity of them, and make cell *in vitro* cultures to prove that the desired effect of the study is done.

### Key words:

Neural regeneration, tissue engineering, microsphere, gelatin, scaffold, hyaluronic acid, poly(etyl acrylate).

## **AGRADECIMIENTOS**

A escasos días de finalizar la Carrera de Biotecnología me gustaría agradecer a las siguientes personas todo lo que han contribuido en llevar este proyecto a buen puerto, y sin los cuales este trabajo no sería posible.

En primer lugar, me gustaría agradecer al director del Proyecto ,Manuel Monleón ,el haberme dejado formar parte de su equipo, y enseñarme a apreciar una disciplina tan poco vista en la carrera como es la medicina regenerativa.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a Cris, Manu y Sergiy su gran dedicación en enseñarme cómo crear los distintos materiales, realizar los distintos ensayos y su apoyo continuado a lo largo de todo este proyecto. Sin ellos no podría haber acabado a tiempo.

También, me gustaría dar las gracias a mis compañeros biotecnólogos Evy, Laura, Guille y Pablo por compartir tan buenos momentos de tanto alegrías como estrés.

Por supuesto tampoco he de olvidarme del equipo formado por Keila y Carmen, siempre trabajando duro, pero con una gran sonrisa. Muchas gracias por el apoyo personal que me habéis dado durante estos 6 meses y por compartir vuestros dulces manjares conmigo.

Ya concluyendo, me gustaría agradecer más que a nadie a mi familia el haberme apoyado y aconsejado siempre durante este camino, así como la gran paciencia mostrada en los momentos de incógnita de saber cuándo me iba al laboratorio pero nunca cuando volvía.

Finalmente, también me gustaría agradecer a Lucky su paciencia durante estos últimos meses. Pronto podré sacarte a pasear de nuevo como antes.

A todos ellos, muchas gracias.



## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 .LAS BASES DE LA INGENIERÍA TISULAR. ....	1
1.2. BIOMATERIALES: .....	2
1.2.1. <i>Ácido hialurónico: Aplicaciones</i> .....	2
1.2.2. <i>Poli(etil)acrilato: Aplicaciones</i> .....	3
1.2.3. <i>Gelatina: Aplicaciones</i> .....	4
1.3 .CÉLULAS: .....	5
1.4. FACTORES DE CRECIMIENTO:.....	6
<b>II. OBJETIVOS:</b> .....	<b>6</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS:</b> .....	<b>7</b>
3.1. PREPARACIÓN DE MATERIALES.....	7
3.1.1. <i>Preparación de scaffolds de ácido hialurónico:</i> .....	7
3.1.2. <i>Preparación de scaffolds de poli(etil)acrilato</i> .....	8
3.1.3. <i>Preparación de micropartículas de gelatina</i> .....	9
3.2. CARGA DE MICROESFERAS EN LOS SCAFFOLDS .....	10
3.3. CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES. ....	10
3.3.1. <i>Morfología por microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión</i> ..	10
3.3.2. <i>Estudio de degradación</i> .....	10
3.3.2.1. <i>Degradación por pérdida de peso</i> . ....	10
3.3.2.2. <i>Degradación morfológica</i> . ....	11
3.3.4. <i>Caracterización térmica</i> .....	11
3.3.3.1. <i>Espectrofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	11
3.3.3.2. <i>Calorimetría diferencial de barrido(DSC)</i> . ....	11
3.3.3.3. <i>Test de la ninhidrina</i> .....	11
3.4. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE UNA PROTEÍNA MODELO: PROTEÍNA DE ALBÚMINA SÉRICA (BSA). ....	12
3.5. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE NGF LIBERADO MEDIANTE UN KIT ELISA.....	12
3.6. CULTIVOS CELULARES. ....	13
3.6.1. <i>Acondicionamiento de los materiales</i> .....	13
3.6.2. <i>Ensayo in vitro de citotoxicidad por contacto directo e indirecto</i> . ....	13
3.6.2.1. <i>Ensayo por contacto indirecto</i> . ....	13
3.6.2.2. <i>Ensayo por contacto directo</i> . ....	14
3.6.3. <i>Técnicas inmunocitoquímicas</i> .....	14
3.6.3.1. <i>Ensayo de viabilidad celular : LIVE/DEAD assay kit</i> . ....	14
3.6.3.2. <i>Fijación y análisis morfológico: faloidina y DAPI</i> . ....	15
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>15</b>
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS COMO SISTEMA FÍSICO. ....	15
4.1.2. <i>Tamaño y morfología de la micropartícula por análisis al microscopio óptico</i> ..	15
4.1.2.1. <i>Velocidad de agitación</i> . ....	16
4.1.2.2. <i>Forma de carga</i> .....	17
4.1.2.3. <i>Entrecruzador empleado</i> .....	17
4.1.3. <i>Morfología por microscopía electrónica de barrido</i> . ....	18
4.1.5. <i>Espectrofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier(FTIR)</i> . ....	20
4.1.6. <i>Estudio de degradación de las microesferas</i> .....	20
4.1.6.1. <i>Degradación por pérdida de peso</i> . ....	20
4.1.6.2. <i>Degradación morfológica</i> . ....	21
4.2. MICROPARTÍCULAS COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN. ....	22
4.2.1. <i>Estudios de liberación de una proteína modelo: la proteína de albúmina sérica(BSA)</i> . ....	22

4. 2. 1. 1. Carga de BSA: Eficiencia de carga de los distintos grupos de micropartículas de gelatina. ....	22
4. 2. 1. 2. Liberación: Influencia de la forma de carga sobre la liberación de BSA.....	23
4. 2. 1. 3. Liberación: Influencia del entrecruzador sobre la liberación de BSA. ....	24
4. 2. 1. 4. Liberación: Cálculo del coeficiente de difusión por la Ley de Fick.....	24
4. 3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS COMO SISTEMA FÍSICO. ....	26
4. 3. 1. <i>Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido.....</i>	26
4. 4. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA SCAFFOLD-MICROPARTÍCULAS. ....	27
4. 4. 1. <i>Caracterización del sistema scaffold-micropartículas como sistema físico.....</i>	27
4. 4. 1. 1. Forma de carga de las micropartículas en los scaffolds. ....	27
4. 4. 1. 2. Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido. ....	28
4. 4. 1. 3. Calorimetría diferencial de barrido. ....	29
4. 4. 2. <i>Liberación de NGF desde el sistema híbrido scaffold-micropartícula.....</i>	30
4. 5. CULTIVOS CELULARES ....	31
4. 5. 1. <i>Ensayo in vitro de citotoxicidad por contacto directo e indirecto.....</i>	31
4. 5. 1. 1. Ensayo por contacto indirecto: ....	31
4. 5. 1. 2. Ensayo por contacto directo: ....	32
4. 5. 2. <i>Técnicas inmunocitoquímicas.....</i>	33
4. 5. 3. 1. Ensayo de viabilidad celular : LIVE:DEAD Assay kit. ....	33
4. 5. 3. 1. Ensayo de adhesión celular: faloidina y DAPI.....	34
4. 5. 3. 1. 1. Adhesión en las microsferas. ....	34
4. 5. 3. 1. 2. Adhesión en los scaffolds con microsferas: ....	35
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>35</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA:.....</b>	<b>36</b>

## ÍNDICE DE IMÁGENES Y TABLAS

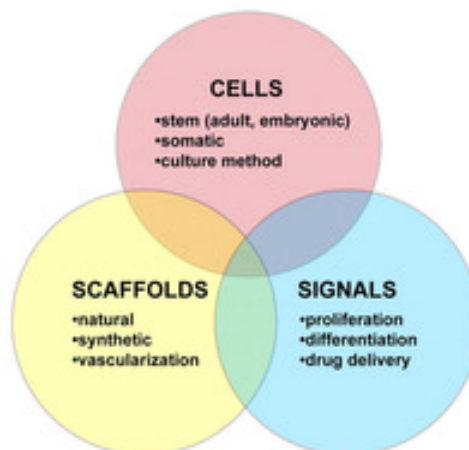
<i>Figura 1. Las bases de la ingeniería tisular .....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 2. Entrecruzamiento del HA con DVS. ....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 3. Estructura química del metil metacrilato y etil acrilato antes y después de polimerizar. ....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 4. Entrecruzamiento de la gelatina con el genipín.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 5. Imágenes de los distintos grupos de micropartículas al microscopio óptico. .</i>	<i>15</i>
<i>Figura 6. Tamaños de las micropartículas sin entrecruzar variando la velocidad de agitación.. ....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 7. Tamaños de las micropartículas sin entrecruzar variando la forma de carga.. ....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 8. Tamaños de las microapartículas según el entrecruzador empleado.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 9. Ratios de hinchado de los distintos grupos de micropartículas.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 10. Imágenes al SEM de los distintos grupos de micropartículas.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 1. Comparación de los tamaños en seco e hinchado de los distintos grupos de micropartículas.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 2. Ensayo de la ninhidrina. ....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 11. Espectofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier de los distintos grupos de micropartículas.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 12. Degradación por pérdida de peso de los distintos grupos de micropartículas.. ....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 13. Degradación morfológica de las micropartículas.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 3. Eficiencia de carga de BSA en los distintos grupos de micropartículas.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 14. Influencia de la forma de carga sobre la liberación de BSA.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 15. Influencia del entrecruzador sobre la liberación de BSA.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 4. Representación de los distintos grupos de micropartículas y sus coeficientes de difusión por la Ley de Fick.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 16. Resumen de los estudios de liberación anteriores.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 17. Porcentaje de liberación de BSA en los distintos grupos de micropartículas a tiempos más largos( A) y a tiempos más cortos( B). ....</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 5. Porcentaje de liberación de BSA en los distintos grupos de micropartículas hasta las 144 horas. ....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 18. Caracterización de los scaffolds como sistema físico.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 19. Forma de carga de las micropartículas en los scaffolds.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 20. Análisis morfológico del complejo scaffold-micropartículas de HA por microscopía electrónica de barrido. ....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 21. Análisis morfológico del complejo scaffold-micropartículas de PEA por microscopía electrónica de barrido. ....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 22. Imágenes de scaffolds inyectados con micropartículas con BSA-FITC. ....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 23. Ensayo de calorimetría diferencial de barrido de las micropartículas y del PEA por separado.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 24. Ensayo de calorimetría diferencial de barrido del complejo scaffold-micropartículas de gelatina. ....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 25. Liberación de NGF acumulada a partir de las micropartículas cargadas en los scaffolds a tiempos cortos por mg de gelatina empleados.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 26. Porcentaje de viabilidad de los distintos materiales empleados a 24, 48 y 72 horas. ....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 27. Panel de Citotoxicidad de los fibroblastos a las 48 y 72 horas. ....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 28. Panel de citotoxicidad de contacto directo. ....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 29. Panel de citotoxicidad mediante el ensayo LIVE:DEAD.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 30. Tinción con faloidina y DAPI de los distintos grupos de micropartículas. ....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 31. Imágenes al confocal de fibroblastos L929 sobre los scaffolds. ....</i>	<i>36</i>

## 1.INTRODUCCIÓN

### 1.1 .Las bases de la ingeniería tisular.

La regeneración de los distintos tejidos ha sido siempre uno de los temas que mayor controversia y curiosidad han despertado en la humanidad. De este modo durante años se han creado distintos tipos de herramientas, prótesis y materiales que ayudarían a recuperar la función de órganos cuya función se ha visto reducida o suprimida por alguna enfermedad o accidente. Asimismo en los casos en los que no se pueden reparar se utilizan los trasplantes de órganos cuyo principal problema de disponibilidad y rechazo se podrían ver resueltos si existiera algún modo de regenerar dichos tejidos en el propio organismo. Hasta hace algunos años, era impensable la posibilidad de reparación de tejidos con capacidad de regeneración limitada, pero gracias a los últimos avances en varias disciplinas científicas estos propósitos son cada vez más cercanos.

De este modo entra en acción una nueva disciplina de la medicina regenerativa, la ingeniería tisular, basada en una combinación de tres pilares fundamentales: el uso de biomateriales, de células, y de moléculas bioactivas o señales.



**Figura 1.** Las bases de la ingeniería tisular (Soria et al., 2007)

Existen ciertos tipos de tejidos con la capacidad de regenerarse o repararse después de algún daño o enfermedad, sin embargo, otros tejidos carecen de mecanismos de regeneración en un adulto, tales como el músculo cardíaco y las neuronas. Por ello, es esencial el uso de estructuras tridimensionales sintéticas que permitan un contacto entre las células, con la matriz extracelular y con factores de crecimiento. Estas estructuras reciben el nombre de *scaffolds*.

Los *scaffolds* pueden estar formados por distintos materiales y tienen que cumplir las siguientes propiedades:

1. Similitud de las propiedades mecánicas a las del tejido donde se vaya a realizar el implante, o suficientes para proteger a las células de los daños de compresión y fuerzas de tensión.
2. Biocompatibilidad y no toxicidad.
3. Simulación de la matriz extracelular.
4. Adherencia: el *scaffold* deberá promover la adhesión y proliferación celular, facilitando el contacto entre células y la migración celular.
5. Tasa de degradación adecuada: los *scaffolds* deberán ser bioabsorbidos tras un tiempo dado, posteriormente lo ocupará de nuevo el propio tejido ya regenerado. También existen *scaffolds* no biodegradables (bioestables), los cuales permanecerán durante un tiempo ilimitado dentro del organismo.

Otro factor a tener en cuenta será el origen del biomaterial, pudiendo dividirse en biomateriales de origen natural o sintético. Los polímeros de tipo sintético tienen una serie de propiedades entre las que destacan su bajo riesgo de transmisión de patógenos, un control muy definido de sus estructuras químicas, gran control de su degradación, así como buenas propiedades mecánicas. Algunos ejemplos son los poliésteres, los polipropilenos, o los acrilatos. Como contra ,es destacable citar su baja biocompatibilidad y la formación de posibles productos tóxicos.(Bhang et al., 2012; Gunatillake and Adhikari, 2003; Gunatillake et al., 2007; Nair and Laurencin., 2007; Sionkowska. A. 2011; Soria et al., 2007; Vacanti et al., 1991)

En cambio, los polímeros naturales como el colágeno, la gelatina o el ácido hialurónico presentan otras propiedades entre las que destacan su biocompatibilidad, su biodegradabilidad, su capacidad de adhesión celular y la capacidad de formar productos de degradación de baja toxicidad.(Furth et al., 2007; Malafaya et al. 2007; Seal et al., 2001; Sell et al., 2010). Asimismo ,tendrán unas propiedades mecánicas pobres, no se podrá controlar correctamente su perfil de degradación, y podrán variar con respecto a la planta o animal del que provengan, pudiendo tener patógenos y provocar un aumento de la respuesta inmune. Por tanto, las últimas investigaciones se están centrando en la creación de un material que combine las ventajas de los polímeros sintéticos y de los naturales.(Barnes et al., 2007; Hollister. J., 2005)

Este estudio se centró en la creación de un *scaffold* híbrido, es decir, formado por una combinación de dos materiales distintos (*scaffold* y micropartículas). La finalidad de la combinación de los distintos materiales empleados con las micropartículas de gelatina es lograr una liberación más controlada de los microesferas, así como que esta liberación se realice en una zona concreta y no se pierda tras su inserción en la zona deseada.

A continuación se presentarán los tres pilares fundamentales usados en la ingeniería tisular con los materiales empleados en este trabajo: biomateriales, células y factores de crecimiento.

## **1.2. Biomateriales:**

Este estudio se centró en 3 tipos de biomateriales: Un *scaffold* de ácido hialurónico (HA), un *scaffold* de Poli(etil) acrilato (PEA), y en microesferas de gelatina entrecruzadas con distintos compuestos.

### **1.2.1. Ácido hialurónico: Aplicaciones.**

El ácido hialurónico es un glicosaminoglucano no sulfatado, más concretamente un mucopolisacárido lineal de unas 2000-25000 unidades de repetición de disacáridos. Este polímero está formado por unidades repetidas de D -ácido glucurónico y n -acetil-D - glucosamina, tiene un elevado peso molecular( $10^2$ - $10^4$  kDa) y una longitud aproximada de 2-25  $\mu\text{m}$  que junto a su gran capacidad de formación de bloques para nuevos biomateriales biocompatibles y biodegradables hacen que sea un gran candidato para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos, e ingeniería tisular. Sus principales aplicaciones se deben a sus propiedades hidrofílicas e hidrodinámicas (hidrogel) que le permiten retener el agua y jugar un papel de gran relevancia en distintos tipos de tejidos, en la dermis, y en los fluidos sinoviales. De este modo como polisacárido de la matriz extracelular tendrá una variedad de propiedades estructurales, reológicas, fisiológicas y biológicas que repercutirán de manera decisiva en el organismo.(Brown and Jones., 2004; Chang. C.J., 2009; Necas et al., 2008; Wang et al., 2009). Algunas de estas funciones son:

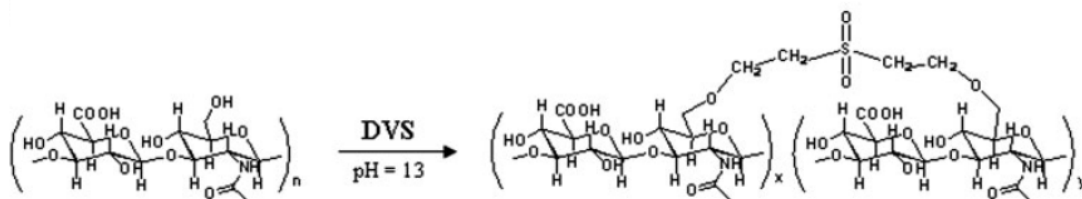
1. Mantener la conformación de la matriz celular que rodea a las células y crear espacios celulares libres tras su hidratación. Esto se debe principalmente a su naturaleza higroscópica, pudiendo formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua y logrando su retención.
2. Mantener la elasto-viscosidad de los tejidos conectivos, pudiendo adaptarse según el ambiente en el que se encuentre, controlando la hidratación de estos, el transporte de agua, y la unión de proteoglicanos en la matriz extracelular.

3. La activación de receptores celulares de manera autocrina o paracrina influenciando las cascadas de señalización que afectan a comportamientos celulares como el crecimiento, la migración, la diferenciación celular, la inflamación y el desarrollo de tumores. Así, por ejemplo, en el sistema nervioso el HA actúa en conjunto junto a proteoglicanos como el colágeno, observándose una regulación glial y migración neuronal, crecimiento de neuritas y guiado axonal.(Lurie et al., 2003; Turley et al., 2002)

4. Inflamación y angiogénesis. Se ha comprobado que cuando el peso molecular del HA es elevado tiene efectos antiinflamatorios y antiangiogénicos. Asimismo, se produce el efecto contrario cuando éste comienza a disminuir (<100 kDa), resultando en una angiogénesis, inflamación e inmuno-estimulación. La mayor parte de estos efectos antiinflamatorios e inmunosupresores se deberán principalmente a la capacidad del HA de alto peso molecular de cubrir las superficies celulares impidiendo el acceso a los receptores superficiales.(Hascall et al., 2004; Stern et al., 2006) En cambio, los efectos inflamatorios se deberán a la acumulación de los fragmentos de menor peso molecular que atraerán a monocitos y linfocitos e inducirán la expresión de citoquinas.

Otro de los temas de gran relevancia del HA es su degradación. Así, su vida media *in vivo* no es más larga de 24 horas ya que se degrada en el organismo por una serie de complejos enzimáticos formados por la hialuronidasa, los procesos de internalización celular, por los receptores celulares de superficie CD44 y por las especies reactivas de oxígeno(Schanté et al., 2011). Así pues, la degradación del HA es un proceso muy organizado y controlado que genera fragmentos con un tamaño concreto y preciso para una función biológica determinada.

En este estudio nos centramos en mejorar su vida media mediante su polimerización con divinil sulfona (DVS). Este entrecruzamiento ocurre mediante los grupos hidroxilos formando un enlace éter y consiguiendo un tiempo de degradación más lento, así como la modificación de muchas de las propiedades de este material.(Gunatillake et al., 2006)



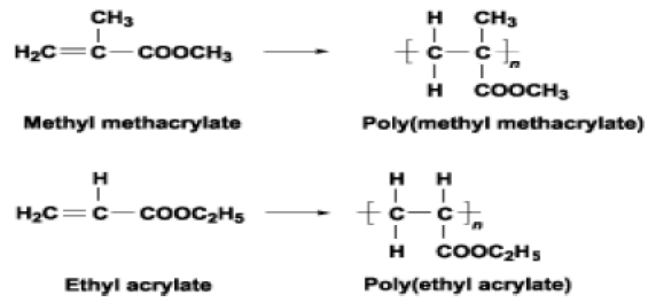
**Figura 2. Entrecruzamiento del HA con DVS.** El grupo Oh(1) del HA reacciona bajo condiciones alcalinas con el DVS formando entrecruzamientos bisetil divinil sulfonas.(Collins and Birkinshaw,2007)

Por tanto el HA tendrá gran cantidad de aplicaciones gracias a su biodegradabilidad, fácil procesamiento y su potencial de modificación de propiedades mecánicas(Collins and Birkinshaw, 2008) , estabilidad(Burugapalli et al., 2009), y perfil de degradación(Jui-Tang and Ja-Ting, 2011) mediante entrecruzadores que atacarán principalmente a los grupos hidroxilo y carboxilo del HA. Asimismo podrá actuar como material de soporte biocompatible usado para el crecimiento celular en *scaffolds*, el tratamiento de heridas y en embriología [Ljunberg et al., 1997; Shoemaker et al., 2006; Williams et al., 1986).

### 1.2.2. Poli(etil)acrilato: Aplicaciones.

El poli(etil) acrilato es un polímero hidrofóbico de gran utilidad en el mundo de la ingeniería tisular. Esto se debe a algunas de sus propiedades mecánicas que permitirán un correcto crecimiento celular, gran biocompatibilidad y rigidez. De este modo, el PEA viene de la familia de los acrilatos, ésteres con un grupo vinilo (CH<sub>2</sub>=CHCO<sub>2</sub>R) y con gran capacidad de formación de polímeros debido a dicho doble enlace. Asimismo será de gran importancia la utilización de un iniciador que rompa la molécula para permitir su posterior unión con el monómero insaturado deseado dejando un radical libre al final del polímero que podrá seguir

reaccionando hasta aumentar su longitud. Otra de sus principales características es que actúa como un elastómero a temperatura ambiente, y por tanto se puede recuperar tras la aplicación de diversos estreses.(Brígido et al., 2005; Rodríguez et al., 2008)



**Figura 3.** Estructura química del metil metacrilato y etil acrilato antes y después de polimerizar.(MACGRAW-HILL, 1992)

Asimismo el poli(etil acrilato) tendrá buenas propiedades elásticas, hidrófobas y será bioestable, pudiendo implantarse tras una operación sin ocasionar efectos perjudiciales a largo plazo. También permitirá el crecimiento de diversos tipos celulares distintos como condrocitos, células neurales, endoteliales, fibroblastos, células de Schwann y del tejido conjuntivo.(Martínez et al., 2012; Pérez et al., 2006; Soria et al., 2007;Soria et al., 2006)

### 1.2.3 .Gelatina: Aplicaciones

La gelatina es un polímero natural derivado del colágeno de gran utilidad en estudios farmacéuticos y biomédicos debido a su baja inmunogenicidad, buena biocompatibilidad y elevada biodegradabilidad.

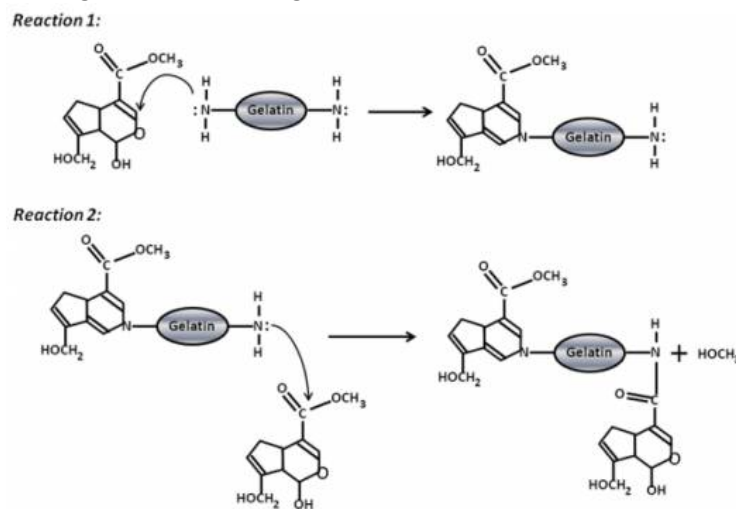
El hecho de que tenga una baja antigenicidad a pesar de su origen animal también será muy interesante, siendo la principal causa su desnaturalización. Además, la gelatina se puede obtener de dos métodos distintos con propiedades químicas diferentes. En primer lugar, la gelatina obtenida por procesos ácidos tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 9. En cambio la gelatina obtenida por un proceso alcalino tendrá varios grupos carboxilos y un pl de entorno a 5 con gran cantidad de cargas negativas(Hatanaka et al., 1988).La importancia de las cargas de la gelatina se deberá a que éstas podrán secuestrar distintos tipos de proteínas dependiendo de si estén cargadas de forma positiva o negativa, influyendo de este modo en último término en la tasa de liberación del factor con el que se cargue la micropartícula.(Espósito et al., 1996; Patel et al., 2008; Ye et al., 1997; Greene, L.A., 1978; Tabata and Ikada, 1998.)

Debido a todas estas propiedades se ha considerado a la gelatina como un vehículo ideal de transmisión de fármacos en el que la propia molécula a transportar estará protegida contra la degradación enzimática y la neutralización inmunológica logrando así una liberación controlada de la proteína. Asimismo, es importante conocer el grado de liberación de las moléculas cargadas en la gelatina dependiendo de varios factores como cuan rápido se degrada la micropartícula por metaloproteinasas como la colagenasa o su grado de entrecruzamiento. Así, la gelatina tiene una tasa de degradación muy rápida por lo que se suele disolver con distintos entrecruzadores para lograr aumentar ligeramente dichas tasas de degradación. Dependiendo del grado de entrecruzamiento se verán influidos tanto la tasa de carga de los distintos factores o moléculas como la de liberación de estos. La razón de esto es que a mayor grado de entrecruzamiento mayor grado de complejidad iónica y de enmarañamiento tendrá la micropartícula y será más complicado que el factor salga por difusión. De este modo en la actualidad existen gran cantidad de entrecruzadores algunos de los cuales son: formaldehído, glutaraldehído, vanilina o genipín. El principal problema que presentan estos entrecruzadores es la presencia de toxicidad decidiéndose usar en este

estudio la vanilina y el genipín debido a su menor toxicidad en las células. [Mladenovska et al., 2002; Vandelli et al., 2004; Young et al., 2005]

La vainilla destaca principalmente como entrecruzador por uno de sus componentes, la vanilina, un aldehído fenólico cuyos grupos aldehídos reaccionarán con los grupos aminos en la gelatina mediante una reacción de base Schiff formando una estructura que favorecerá tanto la estabilización como la liberación controlada de las moléculas contenidas en el interior de la microesfera. (Solorio et al., 2010)

El genipín es un glucósido iridoide extraído de los frutos de *Gardenia* utilizado tradicionalmente en la industria alimentaria. Su efecto entrecruzador se debe a un mecanismo de dos pasos. En primer lugar la molécula de genipín sufrirá un ataque nucleofílico por las aminas de la gelatina produciéndose una unión heterocíclica del genipín con la amina de la gelatina. A continuación el grupo éster del genipín sufrirá una sustitución nucleofílica resultando en los entrecruzamientos covalentes entre las aminas primarias, produciendo muy poca toxicidad y pudiendo formar complejos iónicos con moléculas cargadas. (Chang C.J., 2009; Liang et al., 2003; Peng et al., 2010; Sung et al., 2000; Wei et al., 2007)



**Figura 4.** Entrecruzamiento de la gelatina con el genipín. (Solorio et al., 2010)

Así, su toxicidad es del orden de entre 5000-10000 veces menor que otros tipos de entrecruzadores como el glutaraldehído y tiene una resistencia mecánica y contra la degradación similar. Además, el genipín se entrecruza mediante enlaces amina y se esperará gran cantidad de grupos amina libres en las caras de las micropartículas menos entrecruzadas, pudiendo promover la fijación celular, así como su viabilidad. (García et al., 2008)

Como contra uno de los principales problemas de las microesferas de gelatina es su dispersa capacidad de migración y su mal soporte para células y tejidos reduciendo de ese modo el uso de aplicaciones en las que se tiene que liberar un determinado fármaco en una sola zona o ha de actuar como *scaffold*. Como solución a estos problemas se plantea la posibilidad de incluir las microesferas dentro de los *scaffolds*, logrando de este modo no sólo una liberación en el sitio deseado evitando una difusión de nuestros factores de crecimiento o fármacos, sino también una liberación más prolongada. (Patel et al., 2008)

### 1. 3. Células:

Sin una nueva formación de células, el proceso de regeneración tisular no se puede llevar a cabo, por tanto es esencial conocer la morfogénesis en el desarrollo normal del organismo y como se regeneran de forma natural durante las heridas, intentando conocer así las distintas señales celulares y las estructuras funcionales de las células.

Una vez comprendido esto se tendrán que tener en cuenta otros factores, como son el modo de cultivo; la administración de las sustancias necesarias tanto *in vitro* como *in vivo* para el



mantenimiento de la vida de las células y el diseño de sistemas que permitan lograr dicho objetivo.(Habraken et al., 2009)

#### **1. 4. Factores de crecimiento:**

La aplicación de factores de crecimiento será esencial para que se produzca el crecimiento de las células en las zonas deseadas. De entre los factores de crecimiento más estudiados caben destacar el VEGF, BDNF, EGF (REFS).

En nuestro caso nos centraremos en el NGF. El factor de crecimiento neural o NGF es una proteína de un peso molecular de 26,5 kDa, muy bien caracterizada debido a sus actividades en el mantenimiento de las neuronas del sistema nervioso periférico y de la integridad de las neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central.(Fahnestock et al., 2004; Xu et al., 2002)

Otro papel destacable, es su poder sobre las neuronas colinérgicas del cerebro basal y las neuronas sensitivas en los ganglios dorsales pudiendo utilizarse para el tratamiento de enfermedades como el Parkinson y varias neuropatías. De este modo, se considera al NGF como un factor de crecimiento de gran cantidad de aplicaciones y muy selectivo para las neuronas sensitivas y del sistema simpático, así como para las células que vienen de la cresta neuronal. Así pues, debido al importante papel que ejercen en la supervivencia y función de las neuronas colinérgicas del complejo basal del cerebro (CBF), en diversas funciones como la memoria, la motivación y la consciencia, también se podría utilizar como agente protector o curativo para enfermedades neurodegenerativas asociadas con dichas neuronas, como es el caso de la enfermedad del Alzheimer.(Hatanaka et al., 1988; Mufson et al.,1999). Asimismo, se ha demostrado que la administración de NGF incrementa la tasa de las neuronas colinérgicas resultando en una disminución de la pérdida celular y de la atrofia, así como de la reducción de otros déficits cognitivos. [Franz, H., 1986; Ljunberg et al.,1999; Shoemaker et al., 2006; Williams et al, 1986)

Finalmente uno de los principales problemas que se encontrarán serán las propias barreras que creará el sistema nervioso central cuando se produzca algún daño. Principalmente, esto se debe a la formación de la cicatriz glial, formada mayoritariamente por astrocitos y proteoglicanos que impiden la regeneración completa de los axones donde ésta se esté formando.(Oudega and Hagg, 1999; Silver and Miller, 2004)

La administración de NGF promoverá el crecimiento de los axones de las neuronas sensitivas primarias y por tanto evitará que se impida su correcta regeneración por la presencia de la cicatriz glial.(Allen and Dawbarn, 2006; Aloe et al., 2012; Xu et al., 2002)

Para concluir, es esencial conocer que el principal problema que presenta este factor de crecimiento es su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica teniendo que ser administrado de forma continua para lograr el efecto deseado. De momento la única alternativa es la administración de forma quirúrgica pero se están desarrollando sistemas para conseguir un sistema de liberación continuada que reduzca al mínimo este tipo de intervenciones.(Pan et al., 1998)

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo es la creación de un *scaffold* híbrido, formado por la combinación de dos materiales distintos poli(etil acrilato) y ácido hialurónico con microesferas de gelatina entrecruzadas con distintos materiales. A continuación se habrá de realizar una caracterización mecánica, físico-química, y biológica de dicha combinación de biomateriales.

Por tanto los objetivos a realizar en este trabajo son:

1. Establecer una metodología para lograr una inserción adecuada de las microesferas en los distintos *scaffolds*.
2. Lograr una caracterización física de las micropartículas, de los *scaffolds*, y del sistema híbrido formado por ambos.

3. Obtener una caracterización de las micropartículas y de las micropartículas con los scaffolds como sistema de liberación.
4. Comprobar la biocompatibilidad de los materiales mediante un ensayo de citotoxicidad por contacto directo e indirecto.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3. 1. Preparación de materiales.

##### 3. 1. 1. Preparación de *scaffolds* de ácido hialurónico:

Se usó como porógeno el poli(etil)metacrilato o PEMA tamizado (PEMA; Elvacite 2043), con un tamaño de esferas de entre 180-250  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Su función era obligar a nuestro material a tener un tamaño de poro determinado, interconectado y adecuado para la posterior inserción de las microesferas. Una vez seleccionado el porógeno se procedió a su introducción en un molde metálico para lograr formar una estructura con forma de plantilla rectangular tras la aplicación de una serie de compresiones y calor determinado en la prensa Gumix TO-250/20. Esto se debe al proceso de transición vítrea que ocurre en el PEMA a 66°C, produciendo así su sinterización.

La primera compresión se realizó con la deposición de una primera placa metálica de 3mm, otra placa encima de ésta de 3 mm también, luego la deposición del porógeno, y finalmente una última placa de 1 mm de espesor. Durante esta primera compresión la temperatura debía ser de 110°C con una presión de 100 bares y durante un tiempo de 8 minutos en total, teniendo en cuenta un periodo de precalentamiento de 5 minutos. Posteriormente se procedió a una fase de enfriamiento a 40°C con una presión de entre 40 y 50 bares y durante un tiempo de 15 minutos. Una vez finalizada la fase de enfriamiento se procedió a la extracción de las placas metálicas de la prensa, a la eliminación del PEMA que había quedado adherido por los bordes de las placas y al cambio de la placa metálica superior por una de un espesor superior de 1,5 mm. Se procedió a la segunda compresión con un periodo de precalentamiento de 5 minutos y la misma temperatura de 110°C, una presión de 100 bares y durante un tiempo de 3,5 minutos.

Una vez finalizado el prensado se siguió con el corte de las placas de PEMA a 5 x 5 para que tuvieran el tamaño adecuado para introducirse en las placas Soxhlet durante la siguiente fase de polimerización. Asimismo también se procedió a la fase de lijado para eliminar la capa superficial sin poros obtenida al fusionarse las microesferas de PEMA durante el periodo de prensado.

Fase de polimerización. Para esta fase se preparó una disolución de ácido hialurónico (Sigma 53747) al 5% en NaOH (Scharlau) 0,2M. Para ello se añadió una masa de 1750 mg de HA y 35 mL de NaOH. Una vez preparada se agitó 1 hora con un agitador magnético a temperatura ambiente y oscuridad para evitar su degradación y luego se dejó agitando en vaivén durante 24 horas.

A continuación se procedió a la fase de entrecruzamiento, utilizando como entrecruzador la divinilsulfona (DVS). Para ello es necesario que ésta se encuentre en un ambiente básico que rompa las cadenas de ácido hialurónico y logrando que se entrecruce. De este modo, se tomaron 15 ml de la disolución de ácido hialurónico y se echaron 174,2  $\mu\text{L}$  de DVS gota a gota mientras se agitaba la solución con un agitador magnético. Posteriormente se procedió al vertido de la disolución en una placa Petri de vidrio donde se introdujo la plantilla porogénica de PEMA en cuestión. El objetivo de esta experiencia es que toda la dilución entrara en cada uno de los poros del porógeno de PEMA y para ello se empleó un montaje al vacío. Éste consistió en poner la placa Petri con la plantilla y la disolución en un cristallizador de Teflón y realizar 5 ciclos de vacío por cara de la placa de PEMA para lograr una mejor penetración de la disolución. Una vez finalizada la polimerización se rascó con una cuchilla la disolución que no

logró entrar correctamente y se dejó semitapada en una placa Petri de plástico grande durante 4 horas hasta que llegue el momento de su lavado.

A continuación se realizó la fase de lavado cuyo objetivo era eliminar los restos de porógeno. El primer lavado se realizó en un cristizador de Teflón en el que se depositó acetona y los scaffolds en placas Soxhlet, y se realizaron dos fases de vacío suave durante 30 minutos cada una. La segunda fase de lavado se realizó en reflujos de acetona con Soxhlet, realizando 4 lavados de una duración de 8 horas cada uno y cambiando la acetona cada 16 horas. La tercera fase consistió en un lavado 1/1 con acetona y agua a vacío durante 30 minutos y dejando el *scaffold* en un agitador durante 12 horas. A continuación se procedió a realizar un lavado de sólo agua a vacío durante 30 minutos y durante 3 días se cambió el agua cada día, realizando de este modo la fase de intercambio de agua y eliminando todos los restos posibles de acetona en el *scaffold*.

El último paso consistió en la liofilización de los *scaffolds* y su conservación en el desecador hasta el momento de su uso.

### **3. 1. 2. Preparación de *scaffolds* de poli(etil)acrilato**

Para la creación de *scaffolds* de poli(etil)acrilato(PEA) se procedió a la obtención de plantillas por porógeno como en el caso del ácido hialurónico. En este caso se utilizaron otras microesferas como porógeno, el poli(metil metacrilato) PMMA (Lucite International) debido a que el PEA reacciona con el PEMA antes empleado produciendo su disolución. Así pues, se empleó un porógeno de entre 100-140  $\mu\text{m}$  y se introdujo en un molde metálico, bajo el cual se colocaron dos placas de 3 mm cada una y sobre él una placa que fue variando según la compresión en la que se encontrara.

Se realizaron tres compresiones: la primera se realizó a 150°C, 100 bares, a 5 minutos de precalentamiento y 8 de calentamiento con una placa de 1mm; la segunda se realizó bajo las mismas condiciones pero cambiando la placa a 1,5mm y con 1 minuto de precalentamiento y 4 de calentamiento; y la tercera a 140°C, 200 bares y con una placa de 2 mm realizando 1 minuto de precalentamiento y 1 de calentamiento. Asimismo, entre cada compresión se realizó una fase de enfriamiento hasta 50°C con una presión de entre 40 y 50 bares. Para finalizar la fase de prensado se cortaron las plantillas en placas de 3,5cm x 3,5cm y se realizaron dos fases de lijado con el objetivo de lograr eliminar la superficie continua formada por la fusión de las microesferas de PMMA para ello se hizo una con una lija más gruesa de 6 mm y otra con otra más fina de 3 mm.

A continuación se realizó la fase de polimerización. Para ello se preparó una disolución monomérica de acrilato de etilo (Sigma-Aldrich), de un agente entrecruzador, el etilenglicol dimetilacrilato (Sigma-Aldrich) al 1% que se encargará de unir las cadenas que se formen en los monómeros de acrilato de etilo, y de benzoína al 1% (Scharlau) que actuará como iniciador de la reacción; agitándose la disolución durante 20 minutos. Posteriormente, se procedió a la inserción de la disolución en el interior de las placas de PMMA. En este caso se observó la entrada directa de la disolución debida a la menor viscosidad de ésta introduciéndose en toda la plantilla por capilaridad. Mientras tanto, se creó un dispositivo formado por dos placas de vidrio tapadas con celo, con un cable en su interior, y unidas por pinzas evitando así la entrada de oxígeno que impediría la esterificación de la polimerización y logrando una posición vertical que favoreciera la entrada de luz ultravioleta en el siguiente paso.

Inmediatamente después se introdujeron en la cámara de ultravioleta donde se produjo la polimerización tras 24 horas y luego se dispusieron otras 24 horas en una estufa a 90°C con la finalidad de conseguir la evaporación del monómero que no hubiera reaccionado. Tras finalizar la fase de polimerización se realizó una fase de lijado en la que se eliminó toda la capa polimérica que había quedado en las plantillas y dificultaría la entrada del solvente en la posterior fase de lavado.

Fase de lavado. Durante la fase de lavado se procedió a la introducción de las placas con la disolución polimérica en Soxhlet, y lavarlos reflujos de acetona durante 4 días de 8 horas cambiando la acetona cada día.

Una vez conseguido el lavado del *scaffold* del PEA se realizó un intercambio de agua para eliminar cualquier resto de disolvente empleado en el lavado. Para ello se dispuso el *scaffold* de PEA en un cristalizador con 200 ml de acetona, de forma que todo el *scaffold* quedara cubierto por ella, y se procedió a añadir 5 ml de agua mili-Q cada 10 minutos y gota a gota. Esto se realizó intentando formar la mínima cantidad de burbujas posible así como evitando que se colapsara el *scaffold* y perdiera su estructura porosa tridimensional. Una vez se llegó a los 100 mL de agua mili-Q se empezaron a añadir 10 mL cada 10 minutos, y al llegar a los 200 mL se vertió aproximadamente la mitad del contenido, y se comenzó de nuevo a añadir agua mili-Q, sólo que esta vez 15 mL cada 5 minutos, logrando obtener una concentración de 90% agua y 10% acetona. Finalmente se pasó a un recipiente con sólo agua mili-Q, logrando una concentración de agua del 100% y evitando el colapso del material.

Una vez lavado el material y realizado el intercambio de agua se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas y a continuación se procedió al troquelamiento del PEA (discos de 5 mm de diámetro), su inmersión en agua mili-Q y a su sonicación para la eliminación de partículas adheridas a la superficie.

A continuación, se dejó secar otras 24 horas a temperatura ambiente y se realizó el vacío para eliminar cualquier partícula de agua que quedara en su interior. Finalmente se dispusieron en bolsitas individuales al vacío que se guardaron hasta que fueron esterilizadas en el autoclave.

### **3. 1. 3. Preparación de micropartículas de gelatina**

Para la creación de micropartículas de gelatina se siguió un procedimiento general de doble emulsión en agua, aceite, agua en el que sólo se modificaba uno de los aspectos dependiendo del entrecruzador empleado.

La fase interna de agua contenía la proteína a incorporarse, la fase orgánica contenía el polímero, y la fase de agua externa contenía el agente que realizaba la emulsión.

En primer lugar se procedió a añadir 100 mL de aceite en un vaso alto. A continuación se comenzó a agitar por medio de un agitador a una velocidad de 2000 rpm para crear la fase continua de aceite. Mientras el aceite se agitaba se realizó la preparación de la disolución de gelatina al 10%. Para ello se añadieron 1,5 g de gelatina (Sigma-Aldrich) en 15 mL de DPBS agitándose durante 15 minutos a una temperatura de 50°C logrando así una disolución transparente y homogénea de gelatina. Después se procedió a preparar la disolución del entrecruzador hasta lograr los grupos buscados:

**Sin entrecruzar:** No se añade ninguna sustancia más. Para lograr que las condiciones sean constantes con el resto de entrecruzadores se añadieron 10 mL de acetona.

**Entrecruzados con vanilina:** Se añadieron 500 mg de vanilina (Sigma-Aldrich ,V2375) en 10 mL de acetona.

**Entrecruzados con genipín:** Se preparó una disolución de genipín( Sigma-Aldrich ,G4796) 20mM añadiendo 0,054 g de genipín en 12 mL de acetona agitando 30 minutos y teniendo cuidado de realizar todo el proceso en oscuridad.

**Sin entrecruzar con BSA:** En lugar de 15 mL de DPBS se añadieron 14500 µL y 500 µL de BSA, logrando una concentración de BSA del 1%.

**Entrecruzados con genipín y FITC-BSA:** Se preparó de nuevo una disolución de 14500 µL de DPBS y 500 µL de FITC-BSA logrando una concentración de FITC-BSA al 1%.

Una vez finalizada la creación de la disolución con los distintos entrecruzadores se comenzó a añadir 10 mL de la disolución de gelatina preparada por medio de una jeringa a una velocidad de flujo de 1mL/min cuidando que las gotas cayeran siempre en la zona lateral del vaso y manteniendo dicha agitación durante un periodo de 45 minutos a 2000 rpm.

A continuación se añadieron 10 mL de la disolución del entrecruzador empleado a una velocidad de 1 mL/min por medio de una jeringa. Para mantener las condiciones constantes se

añadieron también 10 mL de acetona en el caso del no entrecruzado, teniendo así el mismo volumen en todos los grupos. Luego se dejó agitar 12 horas a 2000 rpm en todos los casos, teniendo especial atención en mantener la oscuridad en el caso de las micropartículas entrecruzadas con genipín. Una vez finalizado dicho tiempo, se paró el dispositivo y se añadieron las micropartículas contenidas en el vaso en un recipiente mayor, donde se introdujeron 600 mL de acetona para su lavado a temperatura ambiente. Estos lavados con acetona se basaban en dejar las micropartículas sedimentar en el fondo del vaso, y eliminar el resto de la emulsión al precipitar y cambiar la acetona durante 3 lavados. Tras cada lavado se procedió a la agitación de las micropartículas sedimentadas por medio de una varilla evitando de ese modo la formación de agregados.

Finalmente se añadieron las micropartículas en tubos de 50 mL con acetona y se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm tres veces cambiando la acetona cada vez. Para la eliminación del máximo volumen de acetona se decidió por liofilizar las microesferas y guardarlas a 2°C hasta el momento de su uso.

### **3. 2. Carga de microesferas en los *scaffolds*.**

Para la combinación de los *scaffolds* de HA y PEA con las micropartículas se procedió al empleo de dos métodos distintos: por vórtex y por inyección.

**Por vórtex.** Se añadieron 2 mg/mL de microesferas en etanol absoluto para permitir una mayor dispersión de éstas, y a continuación se dispuso en un vial donde se agitó en el vórtex durante 1 minuto.

**Por inyección.** Se añadieron 2mg/mL de microesferas en etanol absoluto y se aspiró con una jeringa. Tras comprobar que no había aire en su interior se procedió a realizar 10 emboladas al vacío para lograr la mayor cantidad de carga de microesferas posibles en los *scaffolds*. Se hubo de tener un mayor cuidado con las emboladas en los *scaffolds* de HA debido a las menores propiedades mecánicas que estos ofrecen.

### **3. 3. Caracterización de materiales.**

#### **3. 3. 1. Morfología por microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.**

Tras la obtención de los distintos grupos de materiales se procedió a su observación al microscopio óptico Nikon 3000. De este modo se pudo comprobar si la realización de los *scaffolds* era la correcta y si estos tenían el tamaño adecuado para albergar a los distintos tipos de microesferas. Para el análisis morfológico de las microesferas se tomaron imágenes a 10X, 20X y 40X, en seco y tras un proceso de hinchado, al añadir PBS durante 30 minutos. En el caso de las micropartículas que contenían FITC-BSA se observaron a una longitud de onda de 488 nm. Una vez obtenidas las imágenes se procedió al análisis de sus diámetros mediante el programa ImageJ.

Asimismo se realizaron también varias observaciones al microscopio electrónico de barrido(SEM) obteniendo unas imágenes de mayor resolución y profundidad debido a que en vez de utilizar una fuente de luz se utilizó un haz de electrones. Además los materiales empleados tuvieron que ser previamente tratados con la liofilizadora para eliminar cualquier resto de agua que pudiera evaporarse durante el proceso, ya que las muestras en el SEM se analizan a vacío. Además, debido a que los materiales empleados no son conductores se colocaron sobre una cinta de carbono, y finalmente fueron cubiertos con oro. El equipo empleado fue un Hitachi 4800.

#### **3. 3. 2. Estudio de degradación.**

##### **3. 3. 2. 1. Degradación por pérdida de peso.**

En primer lugar se procedió a la medida de la masa de los grupos de micropartículas de gelatina sin entrecruzar, entrecruzados con vanilina y entrecruzados con genipín. Una vez obtenidas sus masas se les añadió 500 µL de PBS y se dejaron respectivamente 6 días, 3 días y

1 día a temperatura fisiológica. Una vez finalizado el proceso se realizó 1 lavado con acetona y 2 lavados con agua mili-Q, se liofilizó y se pesó de nuevo.

De este modo:

$$\text{Pérdida de peso(\%)} = \frac{M_0 - M_t}{M_0} \times 100$$

Donde  $M_0$  es la masa inicial de micropartículas, y  $M_t$  la masa al tiempo dado.

### **3. 3. 2. 2. Degradación morfológica.**

A la vez que se realizaba el experimento de degradación por pérdida de peso, se procedió a su observación al SEM de los grupos de micropartículas a los 6, a los 3 y 1 día después de su inserción en PBS.

### **3. 3. 4. Caracterización térmica.**

#### **3. 3. 3. 1. Espectrofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR).**

Esta técnica consiste en lanzar un haz que contiene distintos tipos de frecuencias a la vez y en medir como la muestra lo absorbe. A continuación dicho haz es modificado para incidir con otra combinación de frecuencias y así sucesivamente midiendo la absorción a cada longitud distinta de la onda.

Para el análisis de esta técnica se analizaron distintos grupos, el de micropartículas de gelatina sin entrecruzar y el de micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín. Para ello se realizó un blanco con bromuro de potasio y luego se procedió a la toma de masas de los distintos materiales de modo que estuvieran en una concentración del 10% con respecto del total del bromuro de potasio con el cual se mezclaba. En el programa se tomaron 64 medidas con una resolución de  $16 \text{ cm}^{-1}$  y unas longitudes de onda comprendidas entre  $700$  y  $3700 \text{ cm}^{-1}$ . Los *scaffolds* tuvieron que congelarse en nitrógeno líquido y triturarse rápidamente para poder mezclarse correctamente con el bromuro de potasio.

#### **3. 3. 3. 2. Calorimetría diferencial de barrido(DSC).**

Esta técnica consiste en observar la diferencia de calor aplicado entre dos muestras, una de referencia cuya capacidad calorífica estará bien definida, y otra en la que no lo está, midiéndose como una función de la temperatura.

De este modo, cuando en la muestra se vaya a producir algún cambio de fase se requerirá una cantidad superior o inferior de calor para mantener ambas muestras a la misma temperatura.

Así se escogieron varios grupos: micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín, un *scaffold* de PEA y un *scaffold* de PEA con micropartículas de gelatina entrecruzada con genipín y se osciló con un rango de temperaturas de entre  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **3. 3. 3. Test de la ninhidrina.**

El test de la ninhidrina se usa para determinar el número de grupos aminos libres de cada microesfera de gelatina, permitiendo conocer así el grado de entrecruzamiento de ésta. Para ello se pesaron 3 mg de tres grupos de microesferas de gelatina: Micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín, micropartículas de gelatina entrecruzadas con vanilina y micropartículas sin entrecruzar de gelatina. Mientras tanto se crearon dos soluciones, la primera de un buffer de acetato de litio 4M, disolviendo 4g de acetato de litio en 5 ml de agua y ajustando con agua destilada hasta tener un volumen de 10 ml; y la segunda una disolución de ninhidrina con 0,8 g de ninhidrina y 0,12 g de hydrindantín en 40 mL de etilenglicol. A continuación, se mezclaron 10 ml de la disolución de acetato de litio y 40 ml de la de ninhidrina. Luego se añadió 1 mL de la solución en cada uno de los eppendorfs donde se pesaron las microesferas y se dejó 20 minutos en un baño de agua a  $100^\circ\text{C}$ . Finalmente se diluyó la muestra hasta 5mL con isopropanol y agua con una proporción 50:50 y se midió la

absorbancia en el VICTOR a 570 nm. De este modo, la cantidad de grupos aminos libres en las micropartículas de gelatina antes y después del entrecruzamiento eran proporcionales a la absorbancia óptica de la solución.

Finalmente se utilizó la siguiente ecuación para el cálculo del grado de entrecruzamiento:

$$\text{Grado de entrecruzamiento}(\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100\%$$

Donde  $C_i$  es la cantidad de grupos aminos libres iniciales, es decir, antes del entrecruzamiento, y  $C_f$  la cantidad de grupos aminos libres tras su entrecruzamiento con el genipín.

### **3. 4. Estudios de liberación de una proteína modelo: proteína de albúmina sérica (BSA).**

Para conocer la cinética de liberación desde las microesferas se utilizó una proteína modelo, la albúmina sérica. Para ello se elaboraron varios estudios para aclarar cuáles eran las mejores condiciones para posteriormente poder insertar el NGF, así como para analizar qué tipo de micropartícula liberaría BSA durante un periodo de tiempo más prolongado.

De este modo en el primer estudio se crearon dos grupos de micropartículas de gelatina sin entrecruzar con BSA añadido *in situ* en la creación de las micropartículas y en las que sólo variaba la velocidad de agitación, de 1500 rpm a 2000 rpm. La forma de inserción del BSA *in situ* es tal como se explica en el punto 3. 1. 3.

En el segundo estudio se creó un grupo de micropartículas de gelatina sin entrecruzar a 2000 rpm en las que el BSA se añadió *a posteriori* y otro con micropartículas de gelatina sin entrecruzar en el que el BSA se añadió *in situ* a 2000 rpm. Para el primer caso se añadieron 1000  $\mu\text{L}$  de PBS con el BSA diluido al 1% y se esperó 1 hora a que éste se introdujera en las microesferas en un baño a 37°C. A continuación se guardó el sobrenadante de dicha operación para saber la cantidad de BSA que no se había introducido en las microesferas. La forma de inserción del BSA *in situ* es la misma que la del punto 3 .1 .3. El objetivo de este estudio era comparar qué forma de inserción del BSA era mejor para lograr una mejor carga de éste.

En el tercer estudio se crearon 3 grupos de micropartículas de gelatina a 2000 rpm , el primero sin entrecruzar, el segundo entrecruzado con vanilina y el tercero entrecruzado con genipín. En todos ellos se realizó la carga del BSA *a posteriori* como se explica en el apartado anterior. El objetivo de este estudio fue comparar el mejor tipo de entrecruzador para la liberación continuada del BSA.

En los tres estudios se realizó una extracción de 500  $\mu\text{L}$  de PBS durante cada una de las primeras 5 horas de los experimentos. Así se realizaba una centrifugación durante 5 minutos a 12000 rpm y a continuación se añadían 500  $\mu\text{L}$  de PBS nuevo, agitándose en el vórtex para una distribución más homogénea de las micropartículas y agitándose de nuevo en un baño a 37°C hasta el siguiente tiempo. A partir de las 5 horas se recogió el sobrenadante a cada día. Los sobrenadantes se guardaron a -20°C hasta su uso y se realizaron tres réplicas de cada grupo de micropartículas. Finalmente se realizaron estudios con el kit BCA (Pierce Biotechnology, 23225).

El kit de BCA es un método para la detección de la colorimetría y la cuantificación total de proteínas. Para ello utiliza el ácido bicínico\*(BCA) como agente de detección para la formación de  $\text{Cu}^{+1}$  que se produce al reducirse por una proteína en ambiente alcalino. Así, cuando se produzca la quelación de dos moléculas de BCA con 1 de  $\text{Cu}^{+1}$  se producirá un cambio de color que virará del verde al morado. Este complejo exhibe una gran absorbancia a 562 nm lineal con las concentraciones de proteínas que permitirá detectar fácilmente la concentración de BSA en los distintos sobrenadantes.

### **3. 5. Determinación de la cantidad de NGF liberado mediante un Kit ELISA.**

Para conocer la cantidad exacta de NGF liberado se realizó un estudio de liberación desde las microesferas de gelatina entrecruzadas con genipín dentro de los *scaffolds* de HA y PEA.

Así, se crearon las micropartículas del mismo modo que en el punto 3. 1. 3., pero en la disolución de PBS y BSA se disminuyó la cantidad de BSA al 0,1% y se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de NGF.

A continuación, se comenzó el estudio de liberación durante las 5 primeras horas y luego durante el día 1, 2 y 3.

Para ello se pusieron los distintos grupos con 750  $\mu$ L de PBS y se fue cambiando a cada tiempo dado por PBS fresco mientras se recogían 250  $\mu$ L del sobrenadante. Una vez recogidos todos los sobrenadantes se comenzó el protocolo del kit ELISA ChemiKine™ para NGF. Este protocolo consistía en primer lugar realizar una curva patrón con concentraciones conocidas de una muestra estándar mientras se añaden los distintos sobrenadantes a una placa tratada con el anticuerpo policlonal de oveja anti ratón. Luego dicha placa se dejó incubando a 2-8°C para que se fijara bien el NGF al anticuerpo. Al día siguiente, se lavó la placa 4 veces para reducir el ruido de fondo y se añadió una disolución específica de lavado del kit mediante un lavador automático. Una vez acabado el lavado se añadió el anticuerpo monoclonal anti ratón NGF en cada uno de los pocillos y se dejó actuar durante 2 horas. Al acabar se realizaron 4 lavados. A las 2 horas se añadieron 100  $\mu$ L de anticuerpo policlonal diluido anti ratón IgG de burro conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) dejándose actuar durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación se realizaron de nuevo 4 lavados en el lavador automático y se añadió tetrametilbencidina como sustrato que al ser degradado por la HRP dará un color azulado. Finalmente se añadió una solución de parada que virará el color de la disolución de azul a amarillo y se leyó la placa en el VICTOR a 450 nm.

### **3. 6. Cultivos celulares.**

#### **3. 6. 1. Acondicionamiento de los materiales.**

Tras la creación de los materiales fue necesario sanitizarlos para poder realizar posteriormente el resto de estudios sobre cultivos celulares y comprobar si presentan toxicidad y esta se debe únicamente al material o no. De este modo se sanitizaron los materiales mediante dos protocolos:

Los *scaffolds* de PEA y de HA se sanitizaron mediante dos lavados de etanol 70º filtrado (Scharlau). A continuación, se fue eliminando el resto de etanol mediante lavados de etanol con concentraciones reducidas (50º y 30º) cada 10 minutos. Luego se hicieron 3 lavados con agua mili-Q y los materiales quedaron listos para su uso. En el caso de las micropartículas se realizaron dos lavados con etanol 70º filtrado (Scharlau), centrifugando cada vez a 10000 rpm durante 4 minutos para que las micropartículas sedimentaran. Posteriormente, se retiró el etanol y se realizó un lavado con agua mili-Q, centrifugando cada vez 4 minutos a 10000 rpm. Una vez se intercambié todo el etanol por agua mili-Q, se realizaron dos lavados en DMEM y se incubó en dicho medio justo antes de realizar la siembra.

#### **3. 6. 2. Ensayo in vitro de citotoxicidad por contacto directo e indirecto.**

Tras la realización del proceso de sanitización de los materiales se realizó un ensayo de citotoxicidad para comprobar si dichos materiales eran tóxicos para las células del organismo. Para ello se siguió el protocolo de la norma española UNE-EN ISO 10993-5, protocolo basado en la utilización de distintos parámetros como el crecimiento celular para determinar la respuesta biológica de las células de mamífero *in vitro*.

Así, se realizaron dos ensayos distintos, uno indirecto en el que las células se incubaban con un extracto del material, y otro directo en el que las células se cultivaban directamente sobre el material. De este modo, se empleó la línea celular de fibroblastos de ratón L929 (C34/An connective tissue, Sigma Aldrich) en pase 11. Así para ello se les añadió un medio de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen), con un 10% de Suero Fetal Bovino (FBS, Gibco) y un 1% de penicilina/estreptomina (Fisher).

##### **3. 6. 2. 1. Ensayo por contacto indirecto.**

Tras la sanitización de las micropartículas de gelatina sin entrecruzar, entrecruzadas con vanilina y entrecruzadas con genipín, así como del scaffold de HA con micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín se procedió a comenzar el ensayo por contacto indirecto.



Para ello se realizó un control positivo con discos de polietileno de alta densidad cuya no citotoxicidad está altamente probada, favoreciendo el crecimiento celular, y un control negativo, utilizando guantes de látex, debido a la citotoxicidad de este material para las células. A parte de estos controles se realizó un blanco donde únicamente había medio de cultivo celular. De este modo, se pusieron en contacto los materiales y los controles con los fibroblastos durante 24 horas a 37°C, en un ambiente de CO<sub>2</sub> del 5% y una humedad del 90% en el incubador Thermo Fisher Scientific modelo 3111. A las 24 horas se dispusieron en 3 placas de 96 pocillos para su análisis a las 24, 48 y 72 horas, sembrándose con una densidad de fibroblastos de 10.000 células por pocillo.

Mientras tanto, se preparó una disolución de MTT 1X con medio DMEM sin rojo de fenol (Gibco). El MTT o bromuro de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniletiazolio es un compuesto que las células vivas pueden reducir a formazán, una sustancia insoluble en agua. Así, nos puede servir para la determinación de la cantidad de células vivas detectando su número mediante la intensidad del color. A continuación, se retiraron los medios de cultivos de los pocillos para evitar que alguno de los productos químicos del cultivo pudiera reducir el MTT, y se añadieron 100 µL de MTT 1X a los pocillos de la P96. Transcurridas 2 horas se eliminó el medio y se añadieron 100 µL de isopropanol, compuesto que ayudará a la solubilización del formazán y a reducir la interferencia de posibles restos que hayan quedado del medio de cultivo. Luego se realizó una lectura de su absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro Victor de Perkin Elmer modelo 1420. Finalmente se calculó el porcentaje de viabilidad celular con la siguiente ecuación:

$$\%viabilidad = \frac{100 \times OD570e}{OD570b}$$

donde *OD570e* es el valor medio de la densidad óptica medida en los extractos 100% de la muestra de ensayo y *OD570b* es el valor medio de la densidad óptica medida de los blancos.

### **3. 6. 2. 2. Ensayo por contacto directo.**

En el ensayo por contacto directo los fibroblastos L929 se sembraron sobre los materiales con una densidad de 50.000 células por material. Tras 7 días de cultivo *in vitro* se estudió la capacidad de adhesión de las células sobre los *scaffolds* y las micropartículas de gelatina. Para la observación de los materiales con los fibroblastos se realizó una fijación de las células cultivadas a dichos biomateriales.

### **3. 6. 3. Técnicas inmunocitoquímicas.**

#### **3. 6. 3. 1. Ensayo de viabilidad celular : LIVE/DEAD assay kit.**

El ensayo de viabilidad LIVE/DEAD es una técnica que se basa en la identificación de las células muertas y vivas mediante la medición de dos parámetros de viabilidad celular: la actividad intracelular esterasa y la integridad del plasma de membrana. De este modo el ensayo se basa en la utilización de dos tinciones: la calceína y el etidio.

La calceína es un compuesto no fluorescente que en presencia de células vivas se convierte en fluorescente debido a la actividad esterasa intracelular. Así pues, la tinción polianiónica de calceína se retiene en el interior de las células vivas permitiendo su correcta visualización en el espectro de onda de emisión de entre 495 y 515 nm.

En cambio el etidio sólo entrará en las membranas dañadas uniéndose a los ácidos nucleicos y produciendo una fluorescencia de color rojo intenso con un espectro de emisión de 495-635 nm en las células muertas. Asimismo el etidio no podrá entrar en las células vivas siendo excluido por sus membranas plasmáticas y logrando crear un kit de detección muy eficaz para la citotoxicidad de los fibroblastos empleados en el cultivo. Por tanto, a las 24 horas de cultivo *in vitro* se preparó una disolución con 10 mL de PBS, 2 µL de etidio y 0,5 µL de calceína, añadiendo en total 500 µL de dicha disolución por muestra. A continuación se dejó incubando

a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos y finalmente las muestras fueron observadas en el microscopio de fluorescencia (Nikon 3000).

### **3. 6. 3. 2. Fijación y análisis morfológico: faloidina y DAPI.**

La fijación celular es una técnica muy usada en distintos tipos de ensayos inmunohistoquímicos en las que se detiene el proceso de degradación autolítico propio de las células mediante la adición de distintos componentes a éstas. Para ello, en primer lugar se eliminó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados en tampón fosfato PB 0,1 M, eliminando así todas las células muertas posibles o restos de medio que pudieran quedar. Posteriormente se añadió una disolución de paraformaldehído al 4% (PFA, Sigma-Aldrich) durante 20 minutos. A continuación se eliminó el paraformaldehído y se realizaron dos lavados con PB 0,1 M, intentando no eliminar las micropartículas que estuvieran más disgregadas.

Una vez transcurridos 7 días de cultivo y fijadas las muestras, se permeabilizaron por medio de un tampón bloqueo. Esto se realizó para conseguir que los fluoróforos pudieran penetrar en el interior de las células y bloquearlas para evitar que se produjeran reacciones inespecíficas.

Los fluoróforos empleados fueron la faloidina (Sigma Aldrich, P1951) para la tinción de las fibras de actina y el DAPI (Sigma-Aldrich, D9542) para la tinción de los núcleos de los fibroblastos. De este modo se creó dicho tampón formado por PB 1X, 10% FBS y 0,01% de tritón (Sigma-Aldrich). El FBS se utiliza debido a que aporta proteínas que bloquearán a los radicales libres evitando uniones inespecíficas. Asimismo el Tritón es un detergente que permeabilizará la membrana celular debido a los lípidos que ésta tiene. Así se dejaron actuar durante 1 hora y a continuación se añadió faloidina diluyéndolo con una relación de 1  $\mu$ L por cada 200  $\mu$ L de tampón bloqueo. Se dejó actuar la faloidina en agitación y oscuridad durante 2 horas eliminándose a continuación, y se realizaron dos lavados con PB para eliminar los posibles restos que aún quedaran. Luego se añadió DAPI con una dilución 1/5000 dejándolo actuar durante 10 minutos y realizando otros dos lavados en PB para conseguir eliminar todo el fluoróforo que no hubiera entrado en las células. Finalmente se observaron las muestras al microscopio de fluorescencia a 488 para la faloidina y 405 nm para el DAPI y con microscopio confocal.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4. 1. Caracterización de las micropartículas como sistema físico.**

Para la caracterización de las micropartículas se utilizó la siguiente nomenclatura:

Grupo 1: Micropartículas de gelatina no entrecruzadas a 2000 rpm y con BSA cargado *in situ*.

Grupo 2: Micropartículas de gelatina no entrecruzadas a 2000 rpm y con BSA cargado *in situ*.

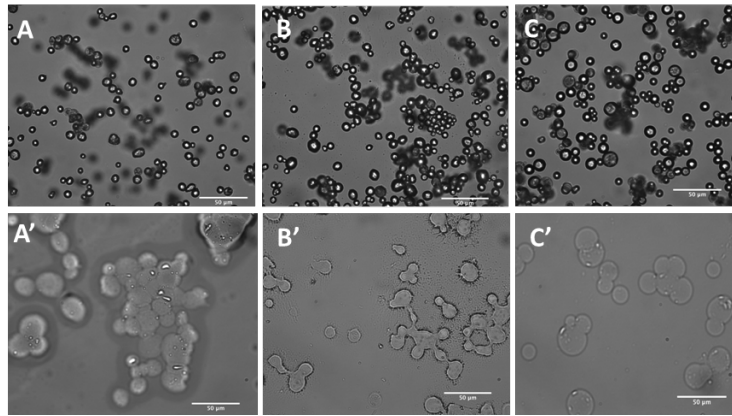
Grupo 3: Micropartículas de gelatina no entrecruzadas a 2000 rpm.

Grupo 4: Micropartículas de gelatina entrecruzadas con vanilina a 2000 rpm.

Grupo 5: Micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín a 2000 rpm.

### **4. 1. 2. Tamaño y morfología de la micropartícula por análisis al microscopio óptico.**

En primer lugar, se determinó la morfología de las micropartículas a partir de imágenes de microscopio de campo claro en seco, y después de hincharse en PBS 1X durante 1 hora.



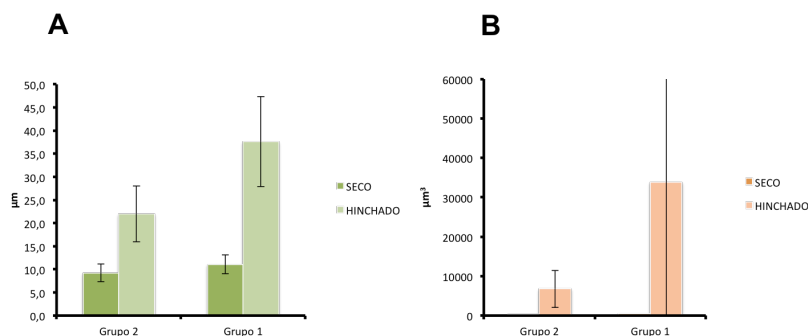
**Figura 5. Imágenes de los distintos grupos de micropartículas al microscopio óptico.** Imágenes tomadas al microscopio óptico a campo claro de los distintos grupos de micropartículas tomadas a 20X y 40X. A y A' son el grupo 3(sin entrecruzar) a 20X y 40X; B y B' el grupo 4 (entrecruzado con vanilina) a 20X y 40X; C y C' son el grupo 5 ( entrecruzado con genipín) a 20X y 40X.

Como se puede observar, la formación de agregados es superior en las micropartículas del grupo 3, siendo esto un problema si se quiere implantar este material en los *scaffolds* de PEA y HA cuyo tamaño de poro es limitado. Asimismo, las micropartículas del grupo 4 tienen una morfología no esférica y continúan formando agregados como en el grupo anterior. En cambio, las micropartículas del grupo 5 no forman tal cantidad de agregados y conservan a la vez su estructura esférica.

Una vez determinada su morfología, se procedió a la determinación del diámetro y del volumen de las micropartículas mediante el estudio de tres factores que podían afectar a dichos parámetros.

#### 4. 1. 2. 1. Velocidad de agitación.

Hay distintos parámetros que pueden afectar al tamaño de una micropartícula, entre ellos uno de los más importantes es la velocidad de agitación, afectando de manera decisiva al área y al diámetro de la microsfera. De este modo, cuanto mayor sea la velocidad de agitación menor será el tamaño de éstas. Por ello, se determinó la velocidad de agitación óptima durante la síntesis de microsferas estudiando el rango de tamaño de las micropartículas obtenidas. Para ello se crearon dos grupos de microsferas de gelatina sin entrecruzar en los que sólo variaba la velocidad de agitación (1500 y 2000 rpm) y se obtuvieron los siguientes resultados:



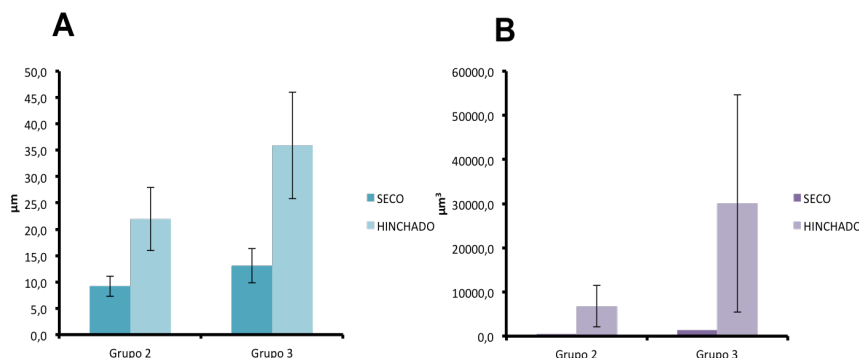
**Figura 6. Tamaños de las micropartículas sin entrecruzar variando la velocidad de agitación.** Representación del diámetro (A) y del volumen (B) de las grupos de micropartículas 1 (sin entrecruzar a 1500 rpm) y 2 (sin entrecruzar a 2000 rpm) en seco e hinchado (PBS).

Como se puede observar, entre 1500 rpm y 2000 rpm (la velocidad máxima del agitador) no se ven afectados los parámetros del tamaño de la micropartícula, debido principalmente a la poca diferencia entre ambas velocidades. Sin embargo, se observa un aumento del hinchado a

1500 rpm que podría deberse a un mayor conteo al azar de partículas de mayor tamaño, como se puede observar con la barra de error, indicando que estas diferencias no son estadísticamente significativas. De todas maneras, para lograr el objetivo de formar un *scaffold* híbrido interesará que las micropartículas no hinchen tanto, por lo que nos quedaremos con las micropartículas preparadas a 2000 rpm.

#### 4. 1. 2. 2. Forma de carga.

A continuación se procedió a comparar la forma de carga (*in situ* y *a posteriori*) de una proteína modelo, el BSA, en ambos grupos de microesferas.

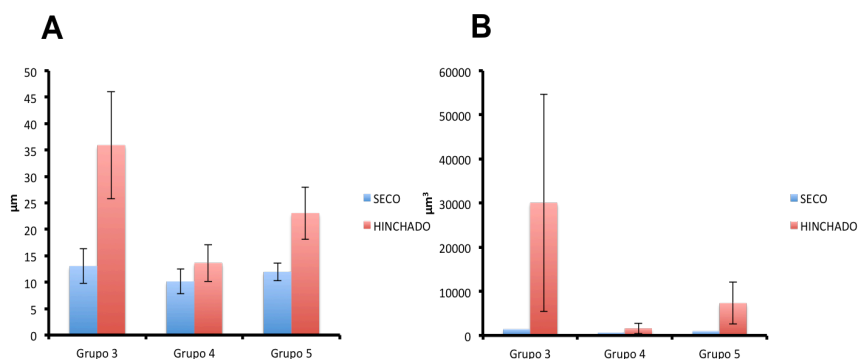


**Figura 7. Tamaños de las micropartículas sin entrecruzar variando la forma de carga.** Representación del diámetro (A) y del volumen (B) de las grupos de micropartículas 2 (sin entrecruzar a 2000 rpm con BSA cargado *in situ*) y 3 (sin entrecruzar a 2000 rpm con BSA cargado *a posteriori*) en seco e hinchado (PBS).

De este modo, se observa que al cargar el BSA *a posteriori* parece haber un mayor aumento de seco a hinchado, pudiendo deberse a que el BSA cargado *in situ* puede neutralizar las cargas de la gelatina, contrayendo sus cadenas, y por tanto reduciendo el hinchado. Esto se puede comparar con el hecho de que la carga *in situ* es mayor, por tanto este efecto es más acusado. Sin embargo, las barras de error dicen que este efecto es estadísticamente no significativo.

#### 4. 1. 2. 3. Entrecruzador empleado.

Por último, se caracterizó el tipo de entrecruzamiento en la fabricación de micropartículas a una velocidad de agitación de 2000 rpm. Para ello se estudió el diámetro y el volumen comparando microsferas entrecruzadas con vainilina, genipin y sin entrecruzar (grupo 3, 4 y 5 respectivamente).

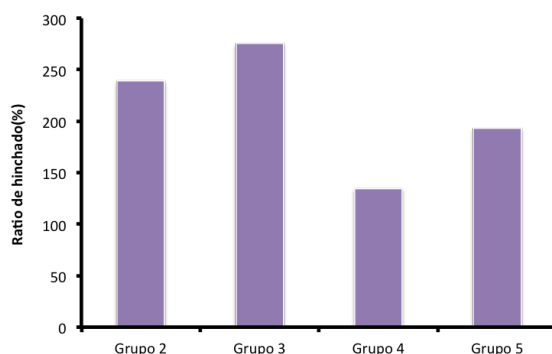


**Figura 8. Tamaños de las micropartículas según el entrecruzador empleado.** Representación del diámetro (A) y del volumen (B) de las grupos de micropartículas 3 (sin entrecruzar), 4 (entrecruzados con vainilina) y 5 (entrecruzados con genipín) en seco e hinchado (PBS).

Así se observa que las microesferas entrecruzadas con vanilina presentan un aumento mínimo de tamaño, seguidas por las de genipín y finalmente por las no entrecruzadas, las cuales tienen un aumento de diámetro y volumen muy superior comparadas con las entrecruzadas. A continuación se obtuvo el ratio de hinchado a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Ratio de hinchado} = \frac{V_f - V_i}{V_i} \times 100$$

Donde  $V_f$  es el volumen de la microesfera tras el hinchado con PBS y  $V_i$  es el volumen de la microesfera seca.

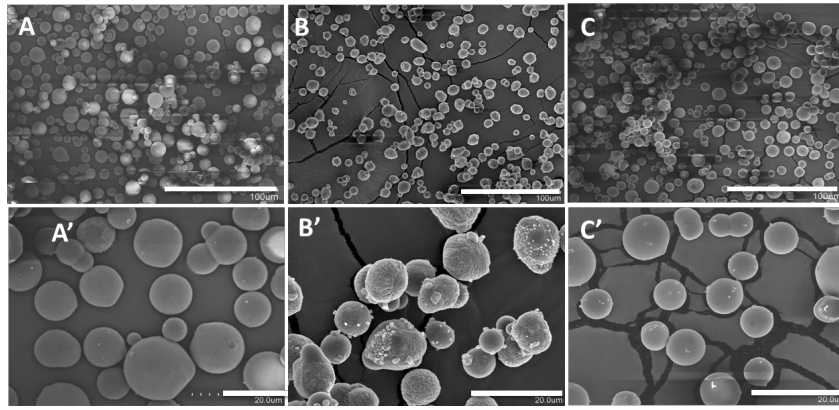


**Figura 9. Ratios de hinchado de los distintos grupos de micropartículas.** Representación de los ratios de hinchado de los grupos de micropartículas 2 (sin entrecruzar a 2000 rpm con el BSA cargado *in situ*), 3 (sin entrecruzar a 2000 rpm) 4 (entrecruzadas con vanilina a 2000 rpm), y 5 (entrecruzadas con genipín a 2000 rpm).

Como se puede observar, la reticulación de las micropartículas repercutirá de forma decisiva sobre el volumen y el tamaño de éstas. Este fenómeno se puede explicar debido a que las uniones formadas por los distintos entrecruzadores forman una especie de red que impediría a las micropartículas tomar la cantidad de agua suficiente para alcanzar el tamaño que adquirirían al no estar reticuladas. Asimismo, la eficiencia de entrecruzamiento de ambos entrecruzadores será decisiva para la determinación del grado de hinchamiento como se verá en el punto 4. 1. 4.

#### 4. 1. 3. Morfología por microscopía electrónica de barrido.

Se procedió al análisis morfológico de las micropartículas por microscopía electrónica de barrido observando a escalas inferiores la forma de los distintos grupos de micropartículas. De este modo, la morfología del grupo 3 y del grupo 5 era esférica, como se esperaba de una micropartícula, en cambio la del grupo 4 tenía una estructura arrugada y rugosa probablemente debida a un entrecruzamiento desigual con la vanilina. Asimismo, se procedió al análisis del tamaño de las micropartículas obtenidas por SEM mediante el análisis con el programa informático Image J, obteniendo unos resultados de tamaño en seco similares a los obtenidos por microscopía de campo claro y confirmando por otra técnica su tamaño.



**Figura 10. Imágenes al SEM de los distintos grupos de micropartículas.** Imágenes tomadas al SEM de las micropartículas de gelatina sin entrecruzar (A, A'), entrecruzadas con vanilina (B, B') y entrecruzadas con genipín (C, C') a 450X y 2000X .

**Tabla 1. Comparación de los tamaños en seco e hinchado de los distintos grupos de micropartículas.** Comparación del diámetro en seco y en hinchado de los distintos grupos de micropartículas, sin entrecruzar a 1500 rpm y con BSA(grupo 1), sin entrecruzar a 2000 rpm y con BSA (grupo 2), sin entrecruzar a 2000 rpm (grupo 3), entrecruzadas con vanilina( grupo 4), y entrecruzadas con genipín (grupo 5) obtenidos por campo claro(en seco e hinchado) y por SEM( sólo en seco).

	Diámetro seco( $\mu\text{m}$ )	Volumen seco( $\mu\text{m}^3$ )	Diámetro hinchado( $\mu\text{m}$ )	Volumen hinchado( $\mu\text{m}^3$ )
<b>Grupo 1</b>	11,1	786,4	37,6	33844,2
<b>Grupo 2</b>	9,2	460,6	22	6747
<b>Grupo 3</b>	13	1396	35,9	30070,9
<b>Grupo 4</b>	10,1	630,5	13,6	1607,6
<b>Grupo 5</b>	12	945	23,1	7317,1

#### 4. 1. 4. Test de la ninhidrina.

Se realizó el test de la ninhidrina para la comprobación del grado de entrecruzamiento en los grupos 3, 4 y 5 de micropartículas, obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla 2. Ensayo de la ninhidrina.** Grado de entrecruzamiento de las micropartículas tras el ensayo de la ninhidrina en los grupos 3(sin entrecruzar),4 (entrecruzados con vanilina) y 5 (entrecruzadas con genipín).

Grupo de micropartículas	Grado de entrecruzamiento (%)
Grupo 3	0
Grupo 4	42,2
Grupo 5	16,5

En la tabla se puede observar que el grado de entrecruzamiento de las micropartículas es bajo, pudiendo deberse al hecho de que se trabajara con una gelatina de tipo B( obtenida de forma alcalina),y requiriendo así una mayor cantidad de tiempo para conseguir un mayor grado de entrecruzamiento, ya que la mayor parte de sus grupos amina están en estado protonado y para que se produzca la reacción deben estar en estado desprotonado. Además, debido a que la reacción se produce a pH neutro, habrá todavía un número mayor de aminas protonadas y se requerirá de tiempos más largos para que ésta se produzca. En cambio, la

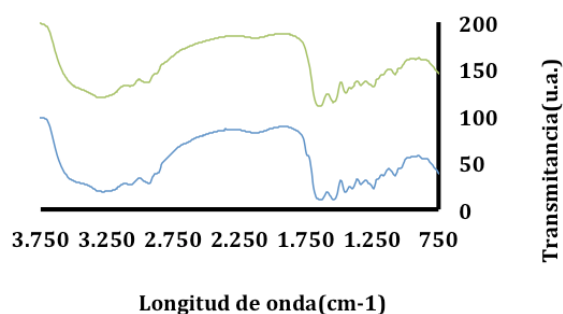
presencia de los grupos carboxilo de la gelatina tipo B le otorgará una carga neta negativa a pH neutro pudiendo lograr interacciones más fuertes con las moléculas que se carguen en el interior de la micropartícula, y logrando así una liberación ligeramente más lenta.

Por otro lado, los grupos positivos en la gelatina debidos a la presencia de aminos protonadas permitirán la interacción con el sistema de *scaffolds* planteado en el punto 4. 4. , pudiendo crear interacciones electrostáticas con el *scaffold* de HA. Además, la presencia de grupos capaces de formar puentes de hidrógeno, tanto en la gelatina como en el HA, podría dar lugar a una mayor interacción entre ambos por medio de este tipo de interacciones débiles. Esta atracción no se dará con el *scaffold* de PEA ya que no tiene cargas.

Así pues, con estos resultados se puede comprender el ratio de hinchamiento del punto 4. 1. 2. 3. , explicando el hecho de que las micropartículas entrecruzadas con vanilina aumentarán menos de ratio que las entrecruzadas con genipín, siendo la causa el menor grado de reticulación de las segundas.

#### 4. 1. 5. Espectrofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR).

Se realizó el análisis de FTIR en el grupo 3 y el grupo 5 de micropartículas de gelatina.



**Figura 11. Espectrofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier de los distintos grupos de micropartículas.** FTIR de las micropartículas sin entrecruzar, grupo 3 (línea azul), y de las micropartículas entrecruzadas con genipín, grupo 5 (línea verde).

De este modo se puede observar los picos característicos de la gelatina en  $1653\text{ cm}^{-1}$  y  $1545\text{ cm}^{-1}$  del estiramiento de los enlaces N-H. Además, el pico de  $1653\text{ cm}^{-1}$  incluye el estiramiento del grupo C=O asociado, presente en los ácidos carboxílicos. En los casos de microesferas sin entrecruzar y entrecruzadas con genipín se puede observar un pico característico a  $1235\text{ cm}^{-1}$ , asociado con la pérdida de la conformación de la triple hélice debido a la desnaturalización del colágeno para conseguir la gelatina. La banda que aparece cerca de  $3250\text{ cm}^{-1}$  se debe principalmente a una vibración de estiramiento de N-H. La gran banda que aparece en el grupo de microesferas sin entrecruzar desde  $2300\text{ cm}^{-1}$  a  $3250\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento de los enlaces O-H del agua y de los N-H de la molécula asociados por interacciones débiles intra e intermoleculares. Como se puede ver, no hay diferencia apreciable entre ambos grupos de micropartículas. Esto se debe a que la cantidad de genipín es mínima y los picos que corresponderían a su estructura no se pueden apreciar.

#### 4. 1. 6. Estudio de degradación de las microesferas.

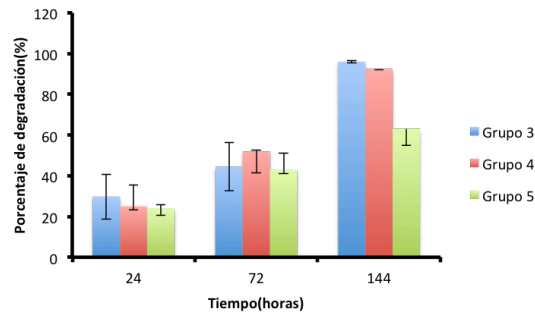
##### 4. 1. 6. 1. Degradación por pérdida de peso.

Tras dejar los distintos grupos de microesferas entrecruzados con vanilina, genipín y sin reticular durante 24, 72 y 144 horas en PBS 1X a  $37^{\circ}\text{C}$  se observó una degradación similar durante los primeros tres días.

A las 72 horas el grupo que más se había degradado eran las microesferas entrecruzadas con vanilina (grupo 4), mientras que las no entrecruzadas (grupo 3) y con genipín (grupo 4) se mantenían constantes.



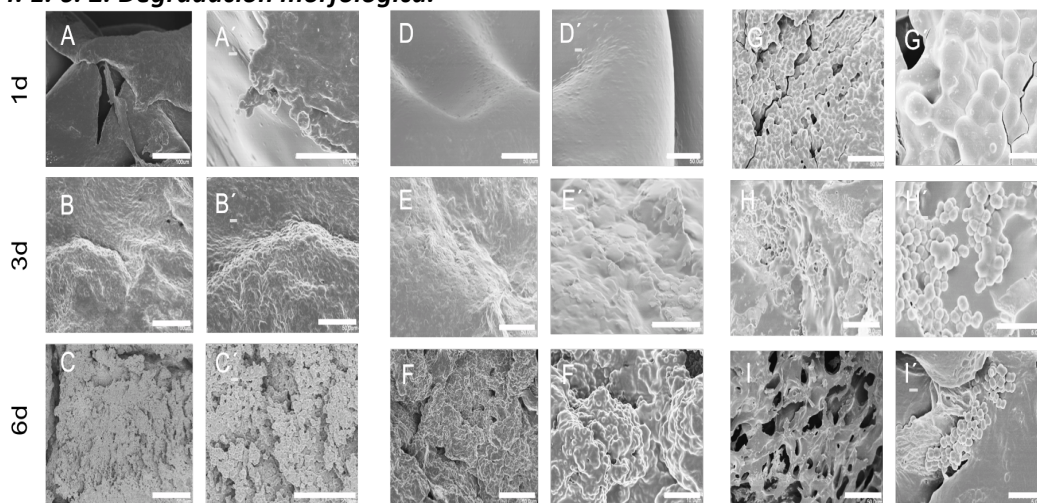
Finalmente a las 144 horas el grupo de microesferas que menos se degradó con respecto al resto fue la entrecruzada con genipín. Las micropartículas de gelatina no entrecruzadas y las entrecruzadas con vanilina mostraron una degradación similar.



**Figura 12. Degradación por pérdida de peso de los distintos grupos de micropartículas.** Porcentaje de degradación de los grupos de micropartículas sin entrecruzar (grupo 3), entrecruzados con vanilina (grupo 4) y entrecruzados con genipín (grupo 5) a las 24, 72 y 144 horas en PBS.

La tendencia que se observa es un incremento de la degradación uniforme conforme se aumenta el tiempo que están las micropartículas en PBS. En cambio, se puede apreciar que las micropartículas de gelatina entrecruzadas con vanilina se degradan más rápido que las entrecruzadas con genipín. Teóricamente, las micropartículas entrecruzadas con vanilina deberían mantenerse más en el tiempo que las micropartículas con genipín, ya que el grado de reticulación es superior en el primer grupo, pero en la práctica no sucede. Esto se puede deber a la pérdida de algunas de las micropartículas de ambos grupos cuando se realizan los distintos lavados en agua y acetona, ya que las partículas a las 72 y 144 horas se encuentran muy dispersas y es más sencillo que se puedan eliminar por error de pipeteo, o también se puede deber a que las micropartículas entrecruzadas con genipín forman entre ellas una masa continua que impide que se puedan eliminar por un error de pipeteo y a la vez dificultan la entrada de PBS a ciertas zonas del agregado, manteniéndolo intacto durante más tiempo.

#### 4. 1. 6. 2. Degradación morfológica.



**Figura 13. Degradación morfológica de las micropartículas.** Panel de degradación del grupo 3, con micropartículas sin entrecruzar (A, A', B, B', C, C'), con micropartículas entrecruzadas con vanilina (D, D', E, E', F, F') y 5, con micropartículas entrecruzadas con genipín (G, G', H, H', I, I') a las 24, 72 y 144 horas. Las imágenes fueron tomadas en el SEM a 600X y 4000X.



Se observó la degradación morfológica al SEM de los grupos 3, 4, y 5 de micropartículas de gelatina:

**Grupo 3(sin entrecruzar).** Se observó una gran fusión de las micropartículas durante las 24 horas. La visualización de micropartículas de forma individual no es posible y todo forma parte de un gran agregado que se forma al añadir el PBS. A las 72 horas las micropartículas continúan formando un gran agregado, pero se puede vislumbrar las formas esféricas de las distintas esferas. Esto se debe a que ya se ha degradado gran parte del conjunto de micropartículas y se van dejando huecos que permiten visualizar muchas de éstas. A las 144 horas la visualización de las microesferas es completa y se puede distinguir completamente cada micropartícula por separado, observándose una media de tamaños de alrededor de 1  $\mu\text{m}$ .

**Grupo 4(entrecruzadas con vanilina).** Después de 1 día se obtuvo un agregado de microesferas de gran tamaño en el que no se pueden distinguir de modo alguno las micropartículas de forma individual. Este agregado es mayor incluso que en el caso de las micropartículas de gelatina. A las 72 horas se puede observar como el agregado uniforme que se había formado a las 24 horas está desapareciendo, y se comienzan a observar agregados de menor tamaño. A las 144 horas ya se observa la morfología de estas micropartículas por separado, teniendo una media de tamaños de 2  $\mu\text{m}$ . No se observa tantas como en el caso de las micropartículas de gelatina sin entrecruzar lo que explicaría el porqué de su mayor duración en el tiempo.

**Grupo 5 (entrecruzadas con genipín).** A las 24 horas ya se distinguían la mayor parte de las microesferas por separado, habiendo una cantidad muy inferior de agregados con respecto a los dos grupos anteriores. A las 72 horas sigue disminuyendo el número de agregados. A las 144 horas se pueden ver las microesferas por separado con una media de tamaños de 1  $\mu\text{m}$  y los pocos agregados que quedan están rompiéndose y formando grandes huecos que indican que las microesferas que estaban fusionadas en ese lugar se han degradado por completo.

Por tanto, según este estudio de degradación morfológica, las microesferas que parecen mantener mejor su conformación de microesfera sin alterar su morfología y aguantar una mayor cantidad de tiempo sin degradarse son las microesferas de gelatina entrecruzadas con genipín.

#### **4. 2. Micropartículas como sistema de liberación.**

Para la caracterización de las micropartículas como un sistema de liberación se utilizó la siguiente nomenclatura.

Grupo 1: Micropartículas de gelatina no entrecruzadas a 2000 rpm y con BSA cargado *in situ*.

Grupo 2: Micropartículas de gelatina no entrecruzadas a 2000 rpm y con BSA cargado *in situ*.

Grupo 3: Micropartículas de gelatina no entrecruzadas a 2000 rpm y con BSA cargado *a posteriori*.

Grupo 4: Micropartículas de gelatina entrecruzadas con vanilina a 2000 rpm y con BSA cargado *a posteriori*.

Grupo 5: Micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín a 2000 rpm y con BSA cargado *a posteriori*.

##### **4. 2. 1. Estudios de liberación de una proteína modelo: la proteína de albúmina sérica(BSA).**

Tras la obtención de los sobrenadantes a cada tiempo dado durante las 5 primeras horas y los 6 primeros días se realizó el estudio de BCA, obteniéndose los siguientes resultados.

##### **4. 2. 1. 1. Carga de BSA: Eficiencia de carga de los distintos grupos de micropartículas de gelatina.**

El nivel de carga de BSA en las distintos grupos de microesferas se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de carga} = \frac{M_c}{M_t} \times 100\%$$

Donde la  $M_c$  es la masa del BSA cargado en cada grupo de micropartículas, y  $M_t$  la masa teórica de BSA que se utilizó para hacer la disolución.

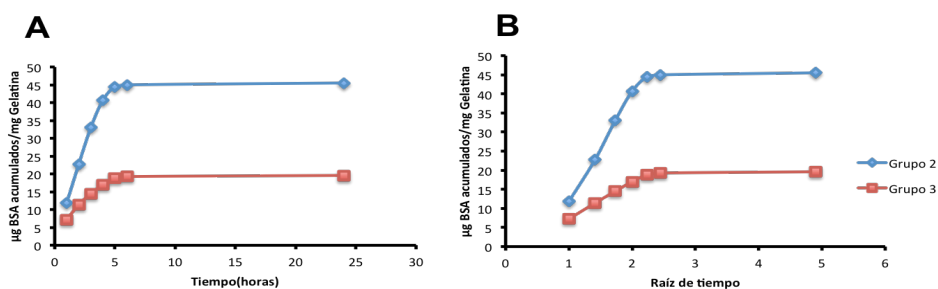
**Tabla 3.** Eficiencia de carga de BSA en los distintos grupos de micropartículas. Sin entrecruzar a 1500 rpm y con BSA *in situ* (grupo 1), sin entrecruzar a 2000 rpm y con BSA *in situ* (grupo 2), sin entrecruzar añadiendo BSA *a posteriori* (grupo 3), entrecruzados con vanilina y con BSA *a posteriori* (grupo 4) y entrecruzados con genipín y con BSA *a posteriori* (grupo 5)

Eficiencia de carga	Porcentaje(%)
Grupo 1	100
Grupo 2	100
Grupo 3	47,39
Grupo 4	50,98
Grupo 5	43,03

La  $M_c$  se obtendrá a partir de la concentración de BSA en el sobrenadante donde se cargan las microesferas, restándole a la concentración teórica de BSA dicha concentración. Así se podrá conocer exactamente cuanto BSA se ha cargado en la micropartícula. Esto en cambio no sucede en el proceso *in situ* de carga de BSA en la microesfera, donde se considera la carga teórica del 100%. Evidentemente, esto no sucede siempre ya que durante el proceso de creación de la microesfera se pueden quedar restos del BSA en el agitador, paredes del vaso, etc, por lo que no se puede conocer en este caso cuanto BSA se ha cargado exactamente y se sigue considerando del 100%. En el estudio de liberación del punto 4. 1. 2. 1. 4. se puede observar como prácticamente se libera la cantidad total de BSA cargado, confirmando este supuesto.

#### 4. 2. 1. 2. Liberación: Influencia de la forma de carga sobre la liberación de BSA.

El siguiente estudio tenía como objetivo comprender si la liberación del BSA desde las micropartículas estaba influenciada por la forma de carga de éstas, y si así era, cómo lo hacía. Por tanto, una vez creados los dos grupos de micropartículas de gelatina sin entrecruzar se cargaron durante la propia disolución en el primer grupo (*in situ*) y *a posteriori* en el segundo. A continuación se representaron los microgramos de BSA acumulados por miligramo de gelatina empleado según la siguiente ecuación:

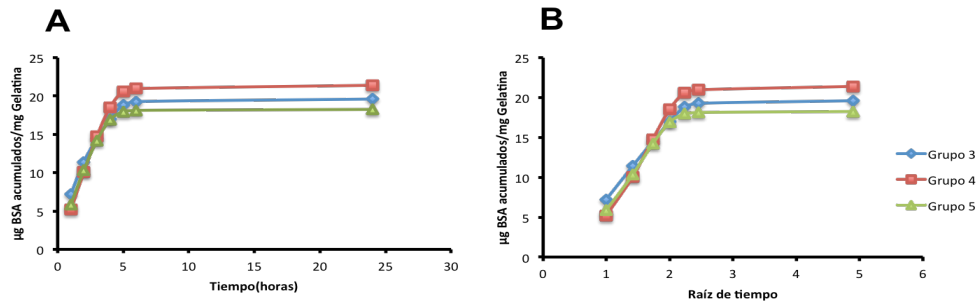


**Figura 14.** Influencia de la forma de carga sobre la liberación de BSA. Representación de los  $\mu\text{g}$  de BSA acumulados por  $\text{mg}$  de gelatina frente al tiempo (A) y a la raíz del tiempo (B) de los grupos de micropartículas sin entrecruzar y variando la forma de carga a *in situ* (grupo 2) o *a posteriori* (grupo 3).

El mejor método de carga será aquel en el que se introduzca mejor el componente a cargar en el material empleado, siendo por tanto el método *in situ* el más adecuado. Así, se observan unas cinéticas similares habiendo liberado en ambos casos la casi totalidad de BSA a las 6 horas.

**4. 2. 1. 3. Liberación: Influencia del entrecruzador sobre la liberación de BSA.**

Se crearon tres grupos de microsferas entrecruzados con vanilina(grupo 4), genipín(grupo 5) y sin entrecruzar (grupo 3) y se les añadió el BSA a *posteriori*, logrando las siguientes cinéticas de liberación:



**Figura 15. Influencia del entrecruzador sobre la liberación de BSA.** Representación de los µg de BSA acumulados por mg de gelatina frente al tiempo (A) y a la raíz del tiempo (B) de los grupos de micropartículas sin entrecruzar (grupo 3), entrecruzados con vanilina (grupo 4) y entrecruzados con genipín (grupo 5).

La cinética de los tres grupos de micropartículas es similar. Sin embargo, se observa que el grupo de micropartículas sin entrecruzar libera una mayor cantidad de microgramos de BSA a tiempos iniciales, siendo superado posteriormente por el grupo entrecruzado con vanilina que libera una mayor cantidad a tiempos finales debido a que su eficiencia de carga es superior. El grupo de microesferas entrecruzadas con genipín libera la menor cantidad de BSA debido a que su eficiencia de carga fue inferior.

**4. 2. 1. 4. Liberación: Cálculo del coeficiente de difusión por la Ley de Fick.**

Otro de los factores a tener en cuenta en el estudio de liberación de BSA, fue el coeficiente de difusión de los distintos grupos de microesferas. Para ello se aplicó la ecuación de la Ley de Fick:

$$\frac{M(t)}{M(\infty)} = 6 \sqrt{\frac{D \times t}{R^2}} \left[ \frac{1}{\sqrt{\pi}} + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \text{ierfc} \frac{nR}{\sqrt{Dt}} \right] - 3 \frac{Dt}{R^2}$$

Donde  $M(t)$  es la cantidad de BSA liberada a cada tiempo,  $M(\infty)$  la cantidad total liberada,  $D$  es el coeficiente de difusión,  $t$  el tiempo dado y  $R$  el radio de las microesferas. Así se obtuvo la siguiente tabla:

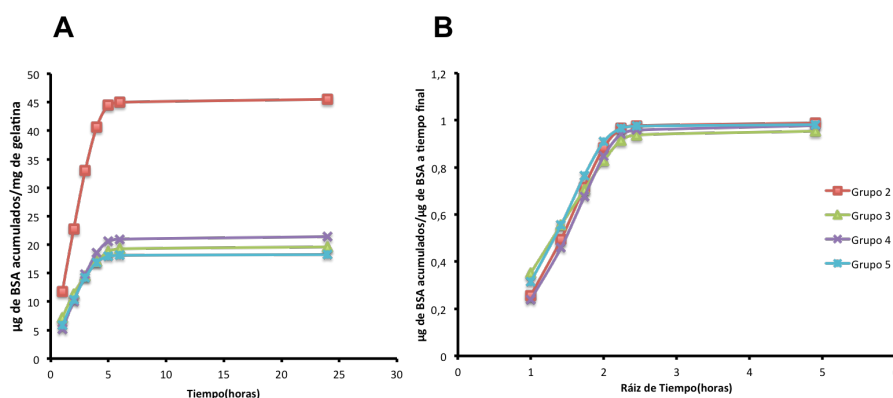
**Tabla 4. Representación de los distintos grupos de micropartículas y sus coeficientes de difusión por la Ley de Fick.** El grupo 2 son las micropartículas sin entrecruzar y con el BSA cargado *in situ*, el grupo 3, las micropartículas de gelatina sin entrecruzar y con el BSA cargado *a posteriori* y el grupo 4 y 5 las micropartículas con el BSA cargado *a posteriori*, entrecruzadas con vanilina y genipín respectivamente.

Microesfera	Coficiente de Difusión(cm <sup>2</sup> /s)
Grupo 2	2,40×10 <sup>-11</sup>
Grupo 3	1,28×10 <sup>-11</sup>
Grupo 4	3,17×10 <sup>-12</sup>
Grupo 5	7,44×10 <sup>-12</sup>

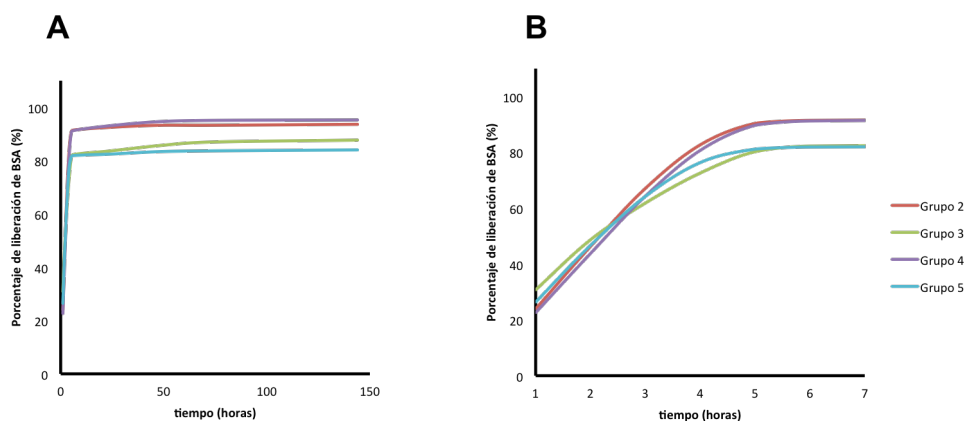
Por tanto se puede observar que todas las micropartículas tienen un coeficiente de difusión similar, explicando esto sus parecidas cinéticas de liberación del BSA. También se observa que el grupo cargado con el BSA *in situ* tiene un coeficiente de difusión ligeramente mayor que el de cargado *a posteriori*. Este coeficiente de difusión varía tan poco de un grupo a otro que no es significativo.

Asimismo, el Grupo 2 y el Grupo 3 tendrán un coeficiente de difusión más rápido que el Grupo 4, y 5 debido a que estas dos últimas se encuentran reticuladas y el entrecruzador crea una estructura tortuosa que dificulta la liberación del BSA.

De este modo, el grupo 5 liberará más rápido el contenido de BSA que el grupo 4 debido a que el grado de entrecruzamiento del genipín es inferior al de la vanilina y por tanto la estructura reticulante es inferior y se libera más rápidamente.



**Figura 16. Resumen de los estudios de liberación anteriores:** A) µg de BSA acumulado en los distintos grupos de micropartículas, a cada tiempo por mg de gelatina empleado. B) µg de BSA acumulados a cada tiempo por µg de BSA liberados en los distintos grupos de micropartículas a tiempo final. El grupo 2 son las micropartículas sin entrecruzar y con el BSA cargado *in situ*, el grupo 3, las micropartículas de gelatina sin entrecruzar y con el BSA cargado *a posteriori* y el grupo 4 y 5 las micropartículas con el BSA cargado *a posteriori*, entrecruzadas con vanilina y genipín respectivamente.



**Figura 17. Porcentaje de liberación de BSA en los distintos grupos de micropartículas a tiempos más largos (A) y a tiempos más cortos (B).** El grupo 2 son las micropartículas sin entrecruzar y con el BSA cargado *in situ*, el grupo 3, las micropartículas de gelatina sin entrecruzar y con el BSA cargado *a posteriori* y el grupo 4 y 5 las micropartículas, con el BSA cargado *a posteriori*, entrecruzadas con vanilina y genipín respectivamente.

**Tabla 5. Porcentaje de liberación de BSA en los distintos grupos de micropartículas hasta las 144 horas.** El grupo 2 son las micropartículas sin entrecruzar y con el BSA cargado *in situ*, el grupo 3, las micropartículas de gelatina sin entrecruzar y con el BSA cargado *a posteriori* y el grupo 4 y 5 las micropartículas con el BSA cargado *a posteriori*, entrecruzadas con vanilina y genipín respectivamente.

Tiempo (h)	1	2	3	4	5	6	24	48	72	144
Grupo 2	24%	46,28%	67,09%	82,68%	90,38%	91,45%	92,52%	93,28%	93,28%	93,63%
Grupo 3	30,84%	48,68%	61,83%	72,58%	80,24%	82,23%	83,63%	85,66%	86,96%	87,71%
Grupo 4	22,65%	43,77%	64,30%	80,69%	89,69%	91,24%	93,10%	94,65%	95,09%	95,27%
Grupo 5	26,45%	46,88%	64,20%	76,33%	81,15%	81,91%	82,46%	83,38%	83,66%	84,03%

Analizando los porcentajes de liberación de cada grupo de micropartículas se observa que la liberación se da casi por completo en todos los casos excepto en el Grupo 5. Esto se debe probablemente a la formación de un agregado que impedía al PBS entrar en el resto de micropartículas e impide por tanto la liberación completa del contenido de la micropartícula. Así pues, según este estudio de liberación, los grupos que más interesarían en nuestro estudio para una liberación más controlada de NGF serían el grupo de las microesferas reticuladas con vanilina o con genipín y con una carga del factor *in situ* para conseguir una mejor carga del factor.

Asimismo, analizando los resultados de la caracterización morfológica de los distintos grupos de microesferas, se puede observar que la vanilina no es tan indicada como el genipín para el propósito de este estudio, principalmente debido a su mayor formación de agregados que impedirían que se deposite de forma más disgregada en los distintos poros de los scaffolds, tampoco interesará debido a la pérdida de su forma de microesfera, teniendo también una superficie de mayor rugosidad debido a que el entrecruzamiento se ha realizado de forma desigual en las distintas partes de la micropartícula. Por tanto, el grupo más indicado con el que se trabajará en el resto del proyecto serán las microesferas reticuladas con genipín.

#### **4. 3. Caracterización de los scaffolds como sistema físico.**

##### **4. 3. 1. Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido.**

Se realizó un análisis morfológico de los scaffolds de PEA y HA al SEM para observar su morfología y porosidad y comprobar que ésta era óptima para la introducción de las micropartículas.

De este modo, los scaffolds de PEA presentan una estructura porosa muy bien interconectada y con poros con un tamaño medio de 106 µm repartidos de forma homogénea por toda su estructura. Asimismo, se observa que la estructura de las gargantas es muy firme y rígida comparada con el scaffold de HA.

En cambio, el scaffold de HA presenta un tamaño de poro medio de 180 µm, formando una estructura porosa repartida equitativamente a lo largo del scaffold pero con una rigidez y firmeza mucho menor si se compara con la del PEA. De este modo parece formar ciertas láminas y los poros estarán menos uniformes.

Habrá que tener en cuenta las propiedades morfológicas de ambos scaffolds así como la forma de inserción en estos para ocasionar el menor daño posible a dichas estructuras. Así pues, el scaffold de PEA será mucho menos frágil y podrá someterse a métodos de inserción de las micropartículas más agresivos como las emboladas a vacío. En cambio se deberá tener mucho más cuidado en la manipulación e inserción de las micropartículas en el scaffold de HA.

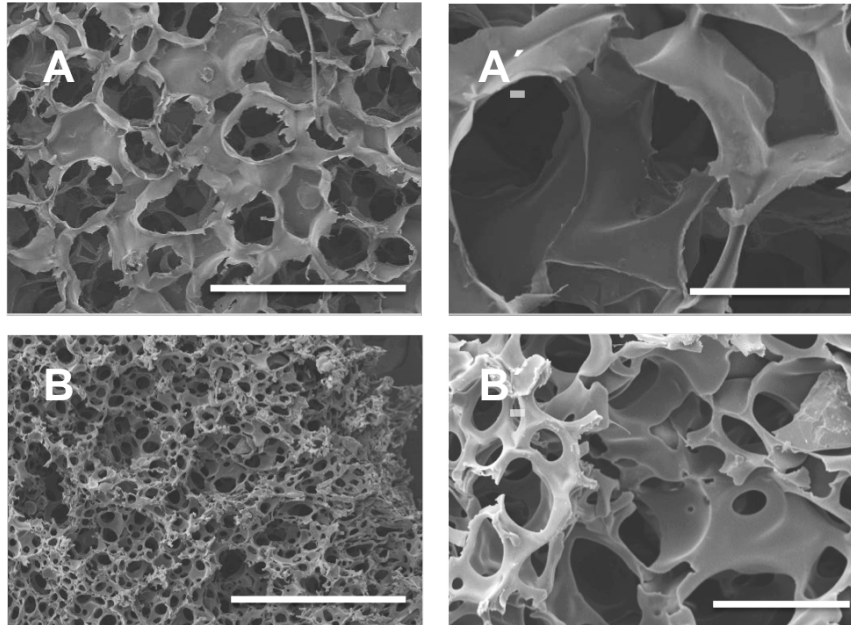


Figura 18. Caracterización de los scaffolds como sistema físico. Scaffolds de HA (A, A') y PEA( B, B'), tomados al SEM 100X(A,B) y 500X(A',B').

#### 4. 4. Caracterización del sistema scaffold-micropartículas.

##### 4. 4. 1. Caracterización del sistema scaffold-micropartículas como sistema físico.

##### 4. 4. 1. 1. Forma de carga de las micropartículas en los scaffolds.

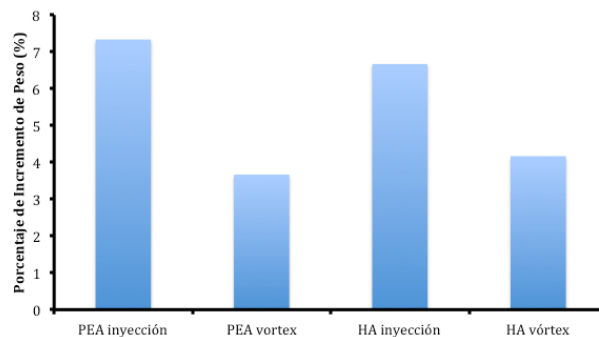


Figura 19. Forma de carga de las micropartículas en los *scaffolds*. Porcentaje de micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín que entraron en los *scaffolds* de PEA y HA por inyección y vacío.

Como se puede observar en la figura 19 el método de carga por vórtex no es tan efectivo para la carga de microesferas, logrando una carga de micropartículas en los *scaffolds* del orden del 4%. En cambio, la carga por inyección es ligeramente más efectiva, logrando cargarse cerca del 7% del total de micropartículas empleadas.

En si, la carga de los *scaffolds* con las micropartículas es poco efectiva por ambos métodos debido a que el tamaño de las gargantas formadas entre los distintos poros dificulta mucho que se fijen y puedan entrar en ellos. El mayor éxito del uso de las emboladas a vacío se puede deber al hecho de aplicar una mayor presión comparada con el uso del vórtex, permitiendo entrar a agregados de micropartículas que por el vórtex no podrían penetrar. Asimismo, el porcentaje de micropartículas que se han fijado en el *scaffold* de PEA es sutilmente superior que en el caso del HA. El tamaño del poro en el *scaffold* de PEA es del orden de 106  $\mu\text{m}$  y el del



HA de 180  $\mu\text{m}$ , por tanto ambos grupos de micropartículas pueden entrar perfectamente en los poros y fijarse. El principal problema serán las gargantas cuyo tamaño es del orden de 30  $\mu\text{m}$  e impedirá entrar a grupos muy numerosos de micropartículas. Estas gargantas son mucho más pequeñas y numerosas en el caso del PEA pudiendo suponer una desventaja para la entrada de las micropartículas pero a su vez una ventaja para que las que ya hayan entrado no salgan con tanta facilidad. El caso contrario sucederá con el HA cuyo mayor tamaño de poro y garganta facilitará la entrada de las micropartículas pero también facilitará su salida. Por esto mismo los resultados de la carga por vórtex son superiores en el caso del HA que comparándolo con el mismo caso por vórtex en el PEA. Por tanto, se puede concluir que el mejor método de introducción de microesferas en ambos *scaffolds* será por inyección al vacío, incluyéndose muchas de estas esferas al material y formando una unión que permitirá una liberación más lenta a lo largo del tiempo.

#### 4. 4. 1. 2. Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido.

Se realizó un análisis morfológico de los *scaffolds* de PEA y HA al SEM una vez inyectadas las micropartículas en los *scaffolds* para observar su morfología y porosidad y comprobar que éstas se habían fijado correctamente.

De este modo se pudo observar la inmersión completa de las micropartículas en los *scaffolds* de HA, en las que éstas estaban embebidas dentro de su estructura, formando como una capa formada por las láminas de HA en las que las micropartículas estaban fusionadas en su estructura. Asimismo, el tamaño de los poros era adecuado para una buena fijación de las micropartículas, quedando éstas retenidas en sus paredes sin ningún problema.

En cambio, la fusión de micropartículas con el *scaffold* que se veía en el caso del HA no se observó en el caso del *scaffold* de PEA, en el cual las micropartículas aparecían agrupadas en los distintos poros, pero formando estructuras independientes la una de la otra. Esto se puede deber a que los *scaffolds* de PEA no tienen carga, y por tanto las micropartículas de gelatina sólo se verán retenidas debido a estructuras físicas y no a interacciones débiles como en el caso del HA. De este modo, las micropartículas de gelatina parecían quedar únicamente retenidas debido al tamaño más pequeño de los poros y la mayor cantidad de gargantas e interconexiones entre estos.

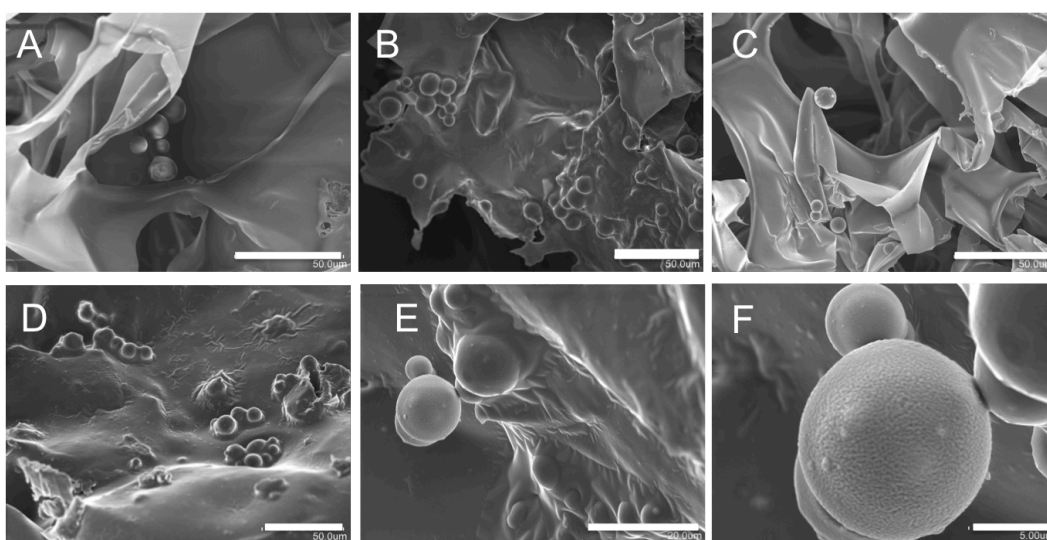
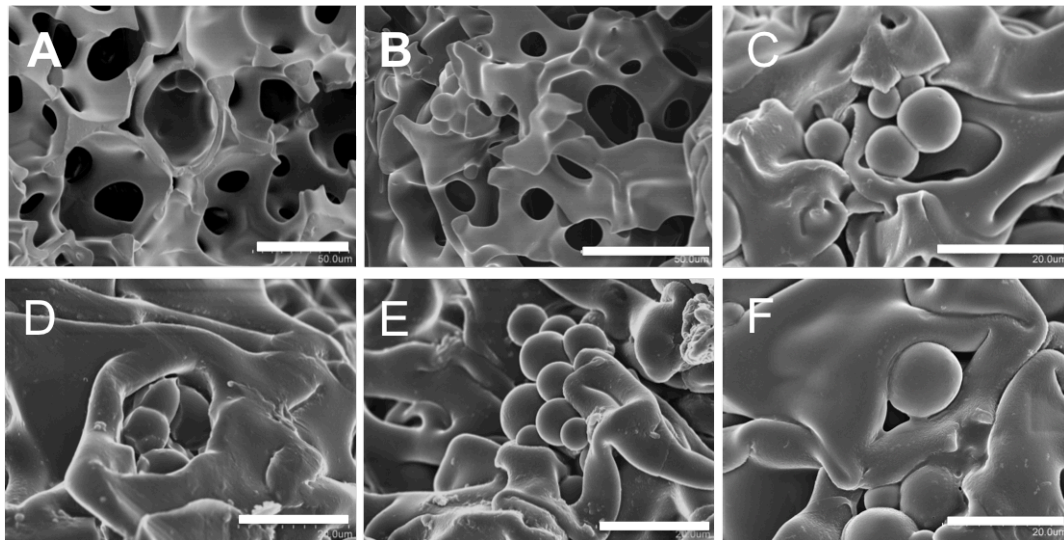
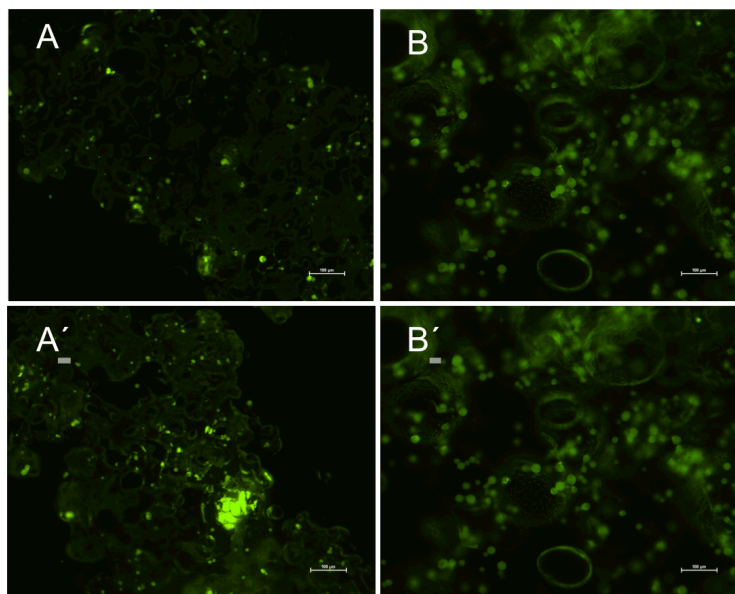


Figura 20. Análisis morfológico del complejo *scaffold*-micropartículas de HA por microscopía electrónica de barrido. Imágenes tomadas al SEM de *scaffolds* de HA con micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín e inyectadas al vacío a 600X (A , B y C), 2000X (D y E) y 6000X(F).



**Figura 21. Análisis morfológico del complejo *scaffold*-micropartículas de PEA por microscopía electrónica de barrido.** Imágenes tomadas al SEM de *scaffolds* de PEA con micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín e inyectadas al vacío a 700X (A' y B') y a 2000X (C, D, E, F).

Asimismo también se insertaron en ambos *scaffolds* micropartículas de gelatina con BSA-FITC entrecruzadas con genipín para poder visualizar de forma más sencilla las micropartículas en los distintos *scaffolds* tras realizar cortes en el criostato. En las imágenes se puede observar la distribución desigual de micropartículas en las zonas cercanas a los poros, encontrándose una gran cantidad en las gargantas de estos. Las zonas que presentan una mayor fluorescencia en sólo un punto dado se deben a la formación de agregados de las microesferas.



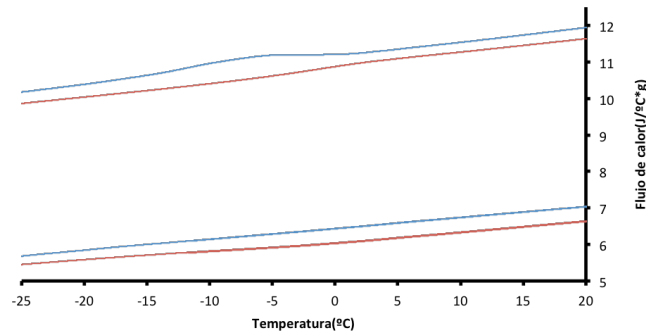
**Figura 22. Imágenes de *scaffolds* inyectados con micropartículas con BSA-FITC.** Imágenes tomadas al microscopio óptico de fluorescencia de micropartículas de gelatina con BSA-FITC y entrecruzadas con genipín en *scaffolds* de PEA (A, A') y de HA (B, B').

#### 4. 4. 1. 3. Calorimetría diferencial de barrido.

Se realizó un ensayo de calorimetría diferencial de barrido para la obtención de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) a partir del método de inflexión. Esta temperatura será aquella por debajo de la cual se da una pseudotransición termodinámica, aumentando la densidad, rigidez



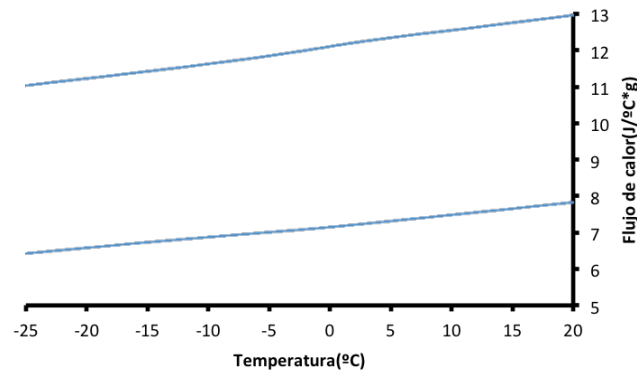
y dureza del polímero, así como disminuyendo su capacidad de elongación. De este modo se comparó en primer lugar la Tg del PEA y de la gelatina.



**Figura 23. Ensayo de calorimetría diferencial de barrido de las micropartículas y del PEA por separado.** DSC de las micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín y del PEA. La línea naranja es el PEA, y la línea azul representa a las micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín.

El pico que aparece en el grupo de micropartículas entrecruzadas con gelatina a -10°C se trata de agua que ha quedado en el interior de las microesferas. En cambio, en el PEA la Tg es apenas apreciable distinguiéndose una ligera curvatura en el rango de -5°C y 5°C.

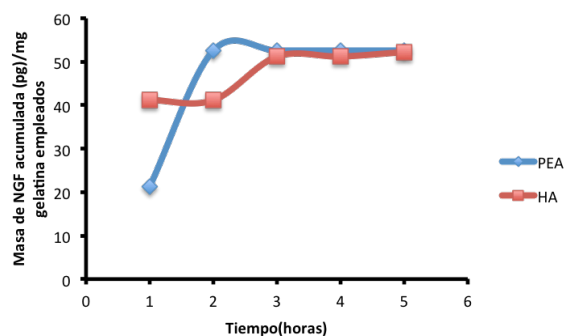
Luego se realizó un DSC del scaffold de PEA al cual se le inyectaron las microesferas de gelatina entrecruzadas por genipín, obteniendo una curva similar a la del PEA de la figura anterior. Esto es debido a la poca cantidad de microesferas cargadas en el *scaffold*.



**Figura 24. Ensayo de calorimetría diferencial de barrido del complejo scaffold-micropartículas de gelatina.** DSC de las micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín inyectadas a vacío en el PEA.

#### 4. 4. 2. Liberación de NGF desde el sistema híbrido scaffold-micropartícula.

Se realizó un ELISA para comprobar las cinéticas de liberación de las micropartículas en los *scaffolds* obteniéndose los siguientes resultados:



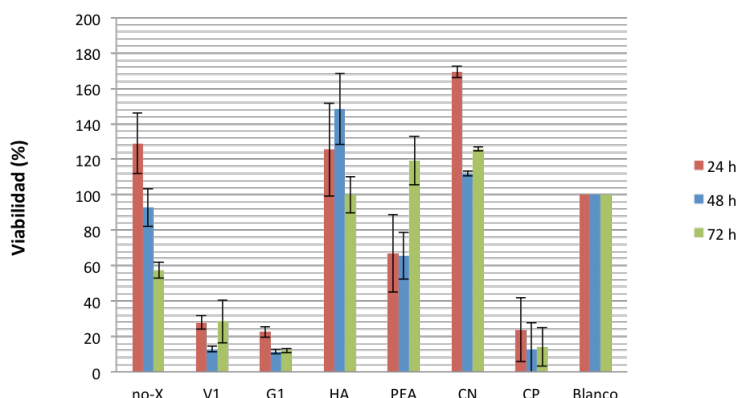
**Figura 25.** Liberación de NGF acumulada a partir de las micropartículas cargadas en los *scaffolds* a tiempos cortos por mg de gelatina empleados.

Se puede observar que la mayoría de NGF se libera durante las 2 primeras horas en el caso del PEA y durante las 5 primeras horas en el caso del HA. También se observaron periodos en los que no había liberación alguna y al tiempo siguiente sí, indicando una cinética distinta al estar incluidos en los poros de los *scaffolds*. Asimismo, la cantidad de NGF liberado en ambos casos es casi la misma, demostrando que la carga de micropartículas por inyección en ambos *scaffolds* es similar como se demostró en el punto 4. 4. 4. 1. Finalmente se ha comprobado que la carga *in situ* del NGF a temperaturas elevadas y con agitación de 2000 rpm no lo ha desnaturizado, pudiendo utilizarse este método de carga a la vez que la carga *a posteriori*.

#### 4. 5. Cultivos celulares

##### 4. 5. 1. Ensayo *in vitro* de citotoxicidad por contacto directo e indirecto.

##### 4. 5. 1. 1. Ensayo por contacto indirecto:



**Figura 26.** Porcentaje de viabilidad de los distintos materiales empleados a 24, 48 y 72 horas. No-X son las micropartículas no entrecruzadas, V1 las micropartículas entrecruzadas con vainilina, G1 las micropartículas entrecruzadas con genipín, CN es el control negativo(guantes de látex), CP es el control positivo(discos de polietileno) y blanco es el medio de cultivo.

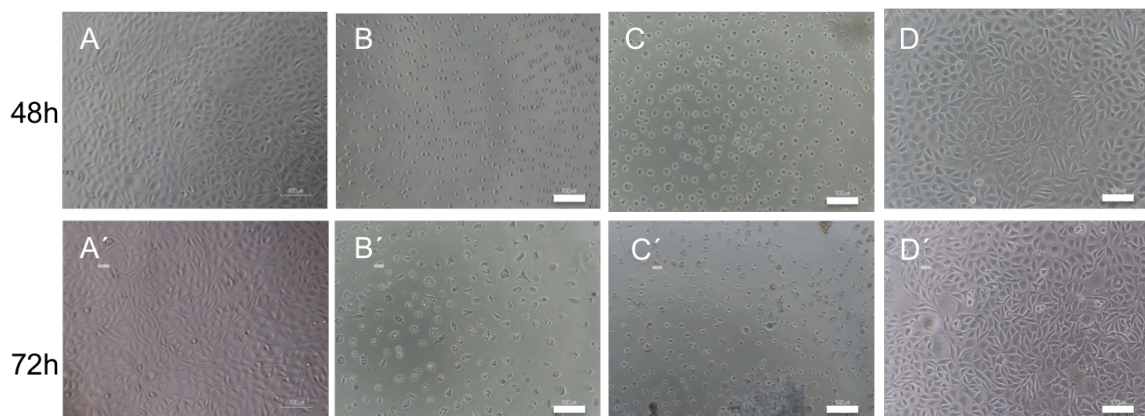
Para confirmar la ausencia de citotoxicidad de los grupos empleados, el porcentaje de viabilidad deberá ser superior al 70% a los 3 días de cultivo según el protocolo UNE-EN ISO

10993-5. De este modo, según los resultados obtenidos, el único material que no sería citotóxico serían los scaffolds de HA y de PEA con un porcentaje de viabilidad celular respecto al blanco (control) mayores del 70% tras 24,48 y 72h de cultivo celular, Como contra, están las microesferas reticuladas con genipín cuya toxicidad es la más acusada de los tres grupos de micropartículas empleadas, siguiéndole las microesferas entrecruzadas con vanilina y las microesferas de gelatina sin entrecruzar, las cuales no son tóxicas durante los dos primeros días, pero sí durante el tercero. La ausencia de toxicidad de estos materiales está comprobada en gran parte de la literatura consultada, lo que hace plantearse nuevas incógnitas durante el proceso de creación de las microesferas. Así pues, la toxicidad de las microesferas podría deberse a varias causas:

En primer lugar cuando se realiza la reticulación de las microesferas se procede a una serie de varios lavados en acetona. La acetona comprime a las micropartículas, haciéndolas pasar de su forma hinchada a su forma más comprimida, pudiendo quedar restos del entrecruzador en el interior de la microesfera que no pueden salir de ésta hasta que se produce su hinchado de nuevo. De este modo, se puede considerar el hecho de lavar las microesferas con agua mili-Q al comienzo, para eliminar los restos de entrecruzadores que hayan podido quedar en el interior de la micropartícula y que no podrían salir si se realiza únicamente un lavado con acetona. Una vez acabado el lavado con agua mili-Q y ya eliminados los restos de entrecruzadores ya se pueden realizar el resto de lavados en acetona.

Otro punto a considerar sería el de la concentración de entrecruzador, así pues, a mayor concentración de éste mayor será la toxicidad del extracto. Por lo que habría que realizar nuevos grupos de microesferas con una cantidad menor de genipín y vanilina hasta conseguir eliminar totalmente la toxicidad pero intentando lograr tener el mismo nivel de reticulación.

Otro tema a tener en cuenta sería el modo de esterilización. Todas las micropartículas fueron esterilizadas de igual manera, pero las microesferas de genipín tienden a formar una masa más compacta de microesferas que podría impedir la entrada del etanol durante el proceso de esterilización. Ésta podría ser la causa de la citotoxicidad en este grupo de micropartículas. Igualmente existe la posibilidad de que todas las micropartículas fueran esterilizadas de forma incorrecta, requiriendo de otro tipo de técnicas que lograsen la completa esterilización sin dañar la estructura de la gelatina.

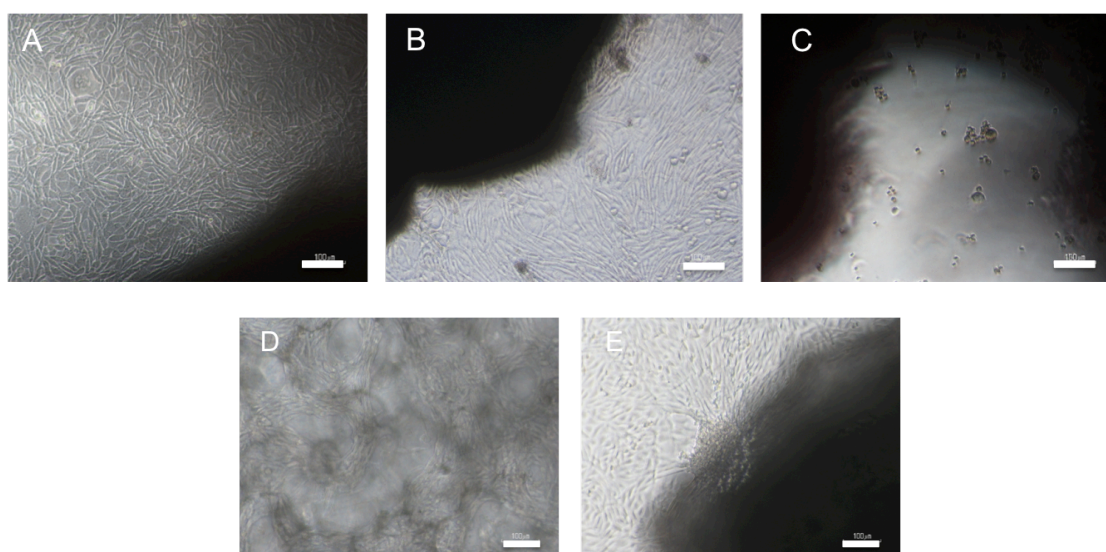


**Figura 27. Panel de Citotoxicidad de los fibroblastos a las 48 y 72 horas.** La imagen A corresponde a las micropartículas de gelatina sin entrecruzar a 48 horas y la A' a las 72 horas. La imagen B corresponde a las micropartículas de gelatina entrecruzadas con vanilina a las 48 horas y la B' a las 72 horas. La imagen C corresponde a las micropartículas de gelatina entrecruzadas con genipín a las 48 horas y la C' a las 72 horas. La imagen D corresponde a los scaffolds de HA a las 47 horas y la D' a las 72 horas.

#### **4. 5. 1. 2. Ensayo por contacto directo:**

En el ensayo por contacto directo se puede observar que hay un gran desarrollo de fibroblastos en las microesferas de gelatina no entrecruzadas. Comparando este estudio con el

de contacto indirecto se observa una gran cantidad de fibroblastos, cuya causa puede haber sido el añadir mayor cantidad de medio, con lo cual el agente citotóxico quedó más diluido. Lo mismo sucede en el caso de las microesferas entrecruzadas con vainilina, cuya concentración es inferior a la de micropartículas no entrecruzadas pero se ve una buena proliferación. En el grupo de microesferas entrecruzadas con genipín no se observan células vivas, confirmando una vez más su citotoxicidad a esa concentración. En los grupos de los *scaffolds* en los que las microesferas de genipín fueron inyectadas a vacío se observa un gran crecimiento celular en sus poros y en el resto de su estructura. Esto se debe a que la cantidad de micropartículas de genipín es muy baja comparada con el resto de grupos. Por tanto se puede seguir considerando el genipín como un medio a futuro estudio, donde una posible solución para evitar su citotoxicidad sería inyectarlo en los distintos *scaffolds*. Si se inyectarán por si solas en la zona dada las microesferas entrecruzadas con genipín, la cantidad de éstas sería muy superior y resultaría en citotoxicidad.



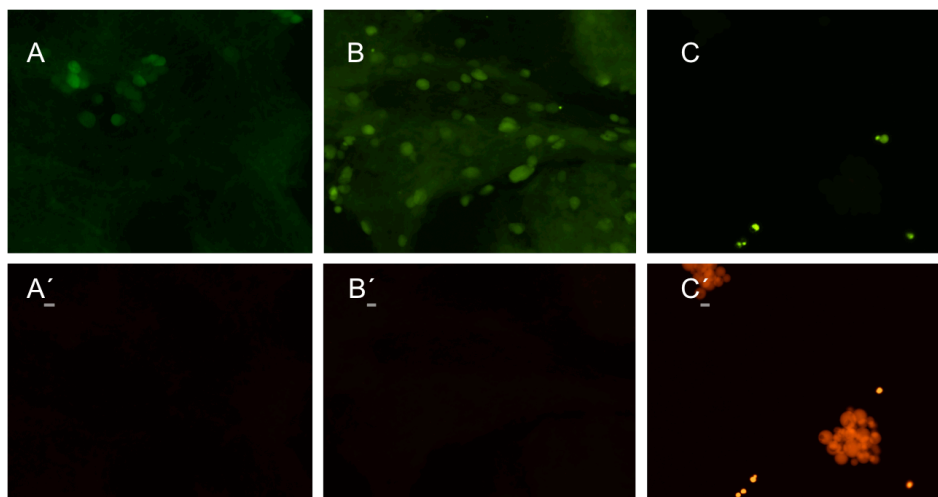
**Figura 28. Panel de citotoxicidad de contacto directo.** Citotoxicidad del grupo de micropartículas sin entrecruzar (A), entrecruzadas con vainilina (B) y con genipín (C), del *scaffold* de HA con micropartículas de genipín (D), y del *scaffold* de PEA con micropartículas de genipín (E).

#### 4. 5. 2. Técnicas inmunocitoquímicas

##### 4. 5. 3. 1. Ensayo de viabilidad celular : LIVE:DEAD Assay kit.

Se comprobaron la cantidad de células vivas y muertas a las 24 horas mediante el Kit LIVE:DEAD observándose las células vivas gracias a la calceína a 515 nm y con un color de fluorescencia verde ,así como las muertas a 635 nm con un color de fluorescencia rojo gracias al etidio.

Por tanto se puede observar que en las microesferas sin entrecruzar y entrecruzadas con vainilina y sin entrecruzar (Figura X A, B) hay una gran cantidad de fibroblastos y no se observan células muertas, pero esto cambia en el caso del genipín (C), en el que las células vivas apenas son visible pero hay gran cantidad de células muertas, volviendo a reforzar el hecho de que a dicha concentración y con este protocolo de preparación de microesferas produce citotoxicidad en las células estudiadas.

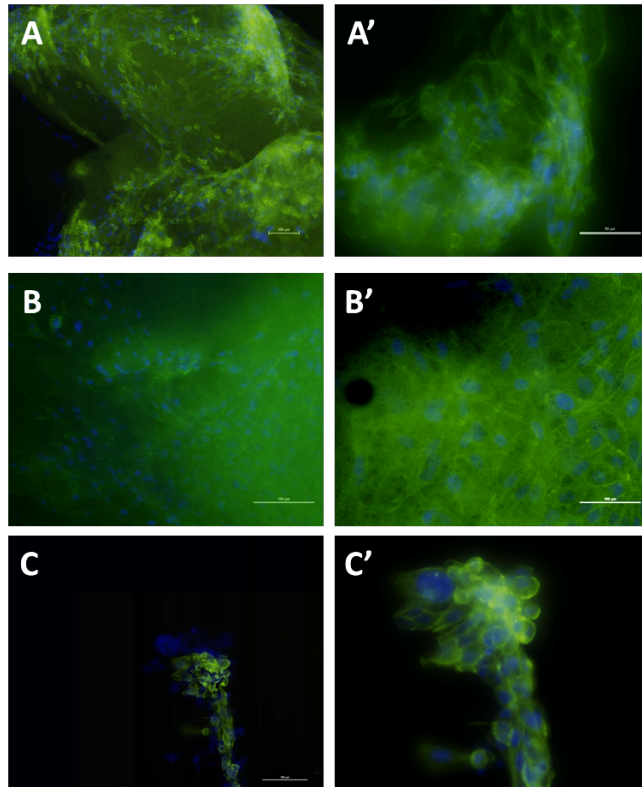


**Figura 29. Panel de citotoxicidad mediante el ensayo LIVE:DEAD.** Citotoxicidad de los tres grupos de microesferas de gelatina sin entrecruzar (A,A'), entrecruzadas con vanilina (B,B')y entrecruzadas con genipín (C,C').

#### **4. 5. 3. 1. Ensayo de adhesión celular: faloidina y DAPI.**

##### **4. 5. 3. 1. 1. Adhesión en las microsferas.**

Los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que el citoplasma de los fibroblastos teñidos con faloidina (tiñe las fibras de actina) y los núcleos teñidos con DAPI tras 7 días de cultivo *in vitro*, se hallaban con una elevada densidad, observándose una buena adhesión, así como permitiendo una adecuada proliferación sobre las micropartículas ensayadas. La citotoxicidad en todos estos grupos se vio reducida, debido a que las micropartículas junto con las células fueron incubadas con exceso de medio de cultivo, diluyendo extremadamente el efecto citotóxico de éstas para poder estudiar cómo se adherían a los diferentes grupos de estudio y como proliferaban con el tiempo. Así pues, como se observa en la Figura 30 se pudo observar diferencias en la adhesión de estas células en las micropartículas ensayadas, obteniéndose una menor adhesión en el caso de las micropartículas de genipín. En esta última también se disponían alrededor de las micropartículas adquiriendo una morfología más redondeada comparándola con los otros grupos donde tapizaban cubriendo las micropartículas.



**Figura 30. Tinción con faloidina y DAPI de los distintos grupos de micropartículas.** Imágenes del microscopio de fluorescencia de las microesferas de gelatina sin entrecruzar (A,A'), entrecruzadas con vanilina (B,B') y entrecruzadas con genipín (C,C'), tras la tinción con faloidina y DAPI a 20X (A,B,C) y 40X (A',B',C').

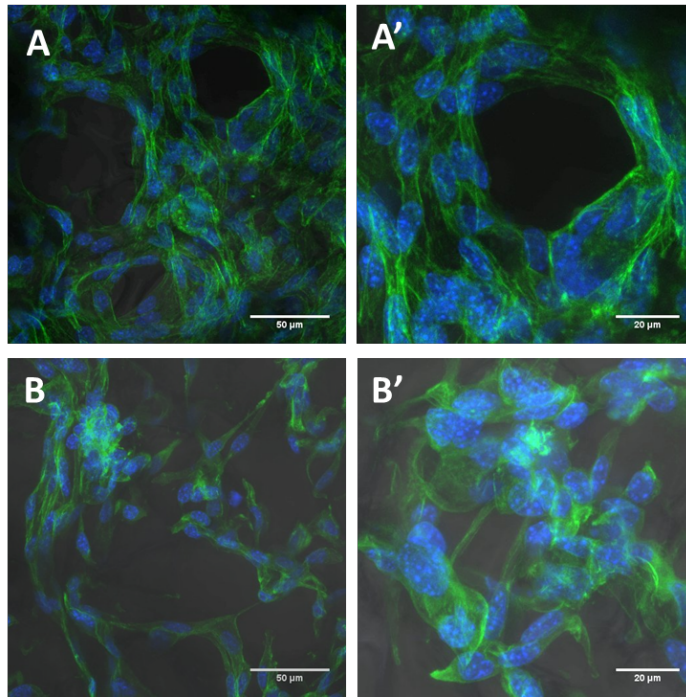
#### **4. 5. 3. 1. 2. Adhesión en los *scaffolds* con microsferas:**

Los resultados obtenidos en los biomateriales (HA y PEA) en los que se insertaron las micropartículas de genipín que anteriormente daban citotoxicidad en el estudio indirecto y directo no resultaban citotóxicos. La causa de que ya no se vea esta citotoxicidad se debe a que la cantidad de microesferas que consiguieron introducirse en los *scaffolds* es muy inferior a la cantidad de microesferas cultivadas en los dos ensayos de citotoxicidad, viéndose tal cantidad de células que incluso llegan a tapar los poros de ambos *scaffolds*. Asimismo, la morfología de los fibroblastos es más circular si estos se encuentran cerca de un poro en los *scaffolds*, mientras que si están yaciendo sobre el material su forma será más alargada.

De este modo en los *scaffolds* de HA (Figura 31 A, A') los fibroblastos se encuentran de forma más agrupada y desigual disponiéndose en forma de grupos y estableciendo fuertes contactos célula-célula más que célula-*scaffold*. En cambio en los *scaffolds* de PEA (Figura 31 B, B') hay menos cantidad de fibroblastos por superficie del *scaffold* y se encuentran más separados unos de otros, esto es debido a que las gargantas que se encuentran entre los poros son mayores y proporcionan una mayor superficie para el crecimiento de los fibroblastos, rodeando los diferentes poros y adhiriéndose a ellos.

Se observó una diferencia con respecto a la densidad y la adhesión celular debido a las características que poseen estos *scaffolds*, así, por un lado, el HA al ser un hidrogel con tamaños de poros más grandes, promueve que las células se agrupen y se unan más entre ellas; por otro lado, en el *scaffold* de PEA los fibroblastos proliferan y se adhieren tapizando toda la superficie y los alrededores de los poros por el menor tamaño de estos, además al tratarse de un material de naturaleza hidrofóbica se favorecerá la mejor adhesión de las células al *scaffold*.





**Figura 31. Imágenes al confocal de fibroblastos L929 sobre los scaffolds.** Imágenes tomadas al microscopio confocal de fibroblastos de ratón L929 sobre *scaffolds* de PEA (A,A') y de HA (B,B') cargados por inyección con micropartículas de genipín.

## 5. CONCLUSIONES

Tras la finalización de este estudio se consiguió obtener un *scaffold* híbrido PEA-micropartículas y HA-micropartículas escogiendo la inyección a vacío como el mejor método de introducción de éstas. Asimismo, se llegó a la conclusión de que el entrecruzador que mejores propiedades ofrecía, por tamaño de las micropartículas, menor formación de agregados, tasa de degradación inferior a la del resto de entrecruzadores, así como una tasa de liberación similar a la del resto de entrecruzadores fue el genipín, y la mayoría de ensayos se realizaron con este entrecruzador hasta realizar el ensayo de citotoxicidad en la que ésta se confirmó.

La toxicidad de este material se puede deber a varias causas, como se comentó en el punto 4. 5. 1. 1. ,por tanto el siguiente paso a realizar en el futuro será preparar un nuevo grupo de micropartículas de genipín en el que se realice un lavado previo en agua mili-Q para la eliminación de los restos de genipín no entrecruzado, así como dejarlo entrecruzar durante un tiempo de aproximadamente 96 horas para conseguir aumentar la reticulación hasta más del 80% y conseguir tiempos de degradación inferiores.

La caracterización morfológica del sistema concluyó que la integración de ambos sistemas fue exitosa, formando un sistema *scaffold*-micropartículas muy bien integrado. Además, tras la realización de los ensayos térmicos, se observó que la cantidad de micropartículas que se incluía en el *scaffold* era tan pequeña comparada con el resto del *scaffold* que no era apenas detectable por los distintos equipos. También se llegó a la conclusión de que habría que realizar un secado al vacío durante un tiempo más prolongado para evitar la presencia de agua que se puede apreciar en estos ensayos.

Otro punto a tener en cuenta, fue el de la cinética de liberación de las micropartículas, considerando como óptimas la mayor velocidad de agitación para lograr un menor tamaño de microesferas, así como una inserción del factor *in situ* durante la preparación de las micropartículas.

La degradación de las microesferas entrecruzadas con genipín fue superior a 6 días observándose una tasa de degradación de en torno al 65%, mientras que con la vanilina y sin entrecruzar era del orden del 90%, logrando mantenerse durante un mayor tiempo sin degradarse. Este punto tendrá que ser estudiado en el futuro tras la integración del *scaffold* con las micropartículas y realizando de nuevo un estudio de degradación en ambos materiales ya que su cinética será distinta al establecer nuevas interacciones con los *scaffolds*. Además, ya que el propósito último del ensayo es la implantación de este sistema en un organismo, se tendrá que hacer un estudio de degradación en el que se añadan enzimas al medio, observando cómo responden los distintos materiales y si la presencia del agente entrecruzador ayuda a las micropartículas de gelatina a esconder los grupos que más se podrían ver afectados por estas enzimas.

Finalmente, se deberán realizar estudios de liberación con el nuevo grupo de micropartículas con un grado de reticulación mayor y cargadas con el NGF a tiempos superiores tras la integración del sistema en el *scaffold* así como la comprobación de la liberación de dicho factor en neuroesferas. Si sigue con la cinética de liberación actual se podría emplear para la encapsulación de fármacos que requieran una acción inmediata como antiinflamatorios, o angiogénicos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN, J. AND DAWBARN, D. 2006. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clinical Science* 110: 175-191.
- ALOE, L; ROCCO, M. L.; BIANCHI, P AND MANNI, LI.2012.Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *Journal of Translational Medicine* 10: 239.
- BARNES, P; SELL, A; BOLAND, D; SIMPSON, G AND BOWLING, L. 2007. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Volume 59*: 1413-1433.
- BHANG, S. H. ; LIM, J. S. ; CHOI, C. Y. ; KWON, Y. K. AND KIM, B. S. . 2012. The behavior of neural stem cells on biodegradable synthetic polymers. *Biomaterials Science* 18; 223-239.
- BRÍGIDO DIEGO, R; PÉREZ OLMEDILLA, M; SERRANO AROCA, A; GÓMEZ RIBELLES, J.L.; MONLEÓN PRADAS, M; GALLEGO FERRER, G AND SALMERÓN-SÁNCHEZ, M. 2005. Acrylic scaffolds with interconnected spherical pores and controlled hydrophilicity for tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16: 693-698.
- BROWN, MB AND JONES, SA. 2004. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *European Academy of Dermatology and Venereology* 19: 308-318.
- BURUGAPALLI, K; CHAN, C.Y ; HEMANTKUMAR, N; KELLY, L AND PANDIT, A. 2009.Tailoring the properties of Cholecyst-Derived Extracellular Matrix Using Carbodiimide Cross-Linking. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 20: 1049-1063.
- CAMPOCCIA, D; DOHERTY, P AND RADICE, M. 1998. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials* 19: 2101-2127.
- CHANG C.J. .2009. The effect of pulse-released nerve growth factor from genipin-crosslinked gelatin in schwann cell seeded polycaprolactone conduits on large-gap peripheral nerve regeneration. *Tissue Engineering Part A* 15: 547-557.
- COLLINS, N AND BIRKINSHAW, C. 2007. Comparison of the Effectiveness of Four Different Crosslinking Agents with Hyaluronic Acid Hydrogel Films for Tissue Culture Applications. *Journal of Applied Polymer Science* 104:3183-3191.
- COLLINS, N AND BIRKINSHAW, C. 2008. Investigation of the swelling behavior of crosslinked hyaluronic acid films and hydrogels produced using homogeneous reactions. *Journal of Applied Polymer Science* 109: 923-931.



COLLINS, M. N. AND BIRKINSHAW, C. 2006. Comparison of the Effectiveness of Four Different Crosslinking Agents with Hyaluronic Acid Hydrogel Films for Tissue-Culture Applications. *Journal of Applied Polymer Science* 104: 3183-3191.

ESPOSITO, E; CORTESI AND NASTRUZZI, C .1996. Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. *Biomaterials* 17 2009-2020.

FAHNESTOCK, M; YU, G; MICHALSKI, B; SILVY, M; COLQUHOUN, A; ROSS, G AND COUGHLIN, M.2004.The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *Journal of Neurochemistry* 89: 581-592.

FRANZ, H. 1986. Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *Journal of Neuroscience* 8:2155-2162.

FURTH, M. E. ; ATALA, A; AND M. E. VANDYKE. 2007. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 28; 5068-5073.

GARCÍA CRUZ, D.M; ESCOBAR IVIRICO, J. L. ;GOMES M. M; GÓMEZ RIBELLES, J. L. ,SALMERÓN SÁNCHEZ, M; REIS, L AND MANO, F. 2008. Chitosan microparticles as injectable scaffolds for tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2: 378-380.

GREENE, LA. 1978. Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *Journal of Cell Biology* 78:747-755.

GUNATILLAKE, P AND ADHIKARI, R. 2003. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials* 5:1-16.

GUNATILLAKE, P. A. ;MAYADUNNE, R; ADHIKARI, R..2006. Recent developments in biodegradable synthetic polymers. *Biotechnology Annual Review* 12; 301-347.

HABRAKEN , W. J. ; BOERMAN, O. C. ; WOLKE, J. G. ; MIKOS, A.G. AND JANSEN, J. A. 2009. In vitro growth factor release from injectable calcium phosphate cements containing microspheres. *Journal of Biomedical Materials Research* 91: 614-22.

HASCALL, C; MAJORS, K; CAROL, A; EVANKO, P; WANG, A; DRAZBA, A; STRONG, A AND WIGHT, N. 2004. Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation?. *Biochimica et Biophysica Acta* 1673: 3-12.

HATANAKA, H; NIHONMATSU, I AND TSUKUI, H.1988.Nerve growth factor promotes survival of cultured magnocellular cholinergic neurons from nucleus basalis of meynert in postnatal rats. *Neuroscience Letters* 90: 63-68.

HOLLISTER, J. 2005. Porous scaffold for tissue engineering. *Nature Materials* 4: 518-524.

JUI-TANG, L AND YA-TING, L 2011. Influence of Cross-Linker Concentration on the Functionality of Carbodiimide Cross-Linked Gelatin Membranes for Retinal Sheet Carriers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 22: 277-295.

LIANG, H. C. CHANG, W. H. AND LIN, K. J. 2003.Genipin crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: in vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical materials research* 65: 271-282.

LJUNGBERG, C; NOKIKOV, L; KELLERTH, J-O AND WIBERG, M 1999. The neurotrophins NGF and NT-3 reduce sensory neuronal loss in adult rat after peripheral nerve lesion. *Neuroscience Letters* 262; 29-32.

LURIE, Z; OFFER, T; AND RUSSO, A. 2003. Do stable nitroxide radicals catalyze or inhibit the degradation of hyaluronic acid?. *Free Radical Biology and Medicine* 35: 169-178.

MALAFAYA, B ; SILVA, A AND REIS, L. 2007.Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007: 207-233.

MARTÍNEZ-RAMOS, C; VALLÉS-LLUCH, A; GARCÍA VERDUGO, J. L. ; GÓMEZ RIBELLES, J. L. ; BARCIA ALBACAR, J. A; BAIGET ORTS, A; SORIA LÓPEZ, J. M. AND MONLEÓN PRADAS; M. 2012. Channeled scaffolds implanted in adult rat brain. *Journal of Biomedical Materials Res Part A* 100; 3276-3286.

MLANDENOVSKA, K.; KUMBARADZI, E; DOGOV, G; MAKRADULI, L AND GORACINOVA, K 2002. Biodegradation and drug release studies of BSA loaded gelatin microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 242: 247-249.

MUFSON, E.J; KROIN, J. S.; SENDERA, T. J. AND SOBRIELA, T 1999. Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system: functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Progress in Neurobiology* 57:451-484.

NAIR, S AND LAURENCIN, T. 2007. Biodegradable Polymers as Biomaterials *Polymers in Biomedical Application* 32: 8-9.

NECAS, J; BARTOSIKOVA, L; BRAUNER, P AND KOLAR, J. et al. 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina* 53: 397-411.

OHBA, S; YANO, F AND CHUNG, U. 2009. Tissue engineering of bone and cartilage. *International bone and mineral society* 11: 405-419.

OUDEGA, M AND HAGG, T. 1996. Nerve growth factor promotes regeneration of Sensory Axons into Adult Rat Spinal Cord. *Experimental Neurology* 140 :218-229.

OUDEGA, M AND Hagg, T. 1999. Neurotrophins promote regeneration of sensory axons in the adult rat spinal cord. *Brain Research* 818: 431-438.

PAN, W. H.; BANKS, W. A. AND KASTIN, A. J. 1998. Permeability of the blood-brain barrier to neurotrophins. *Brain research* 788:87-94.

PATEL, S; YAMAMOTO, M; UEDA, HIROKI; TABATA, Y AND MIKOS, G. 2008. Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomaterialia* 4: 1126-1138.

PENG, H; XIONG H; LI, J; XIE, M; LIU, Y; BAI, C AND CHEN, L. 2010. Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. *Food Chemistry* 121: 23-28.

PÉREZ OLMEDILLA, M; GARCÍA GIRALT, N; MONLEÓN PRADAS, M; BENITO RUIZ, P; GÓMEZ RIBELLES, J. L. ; CÁRCERES PALOU, E. AND CARLES, J.,. 2006. Response of human chondrocytes to a non-uniform distribution of hydrophilic domains on poly(ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymers. *Biomaterials* 27; 1003-1012.

RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ J. C. ; SERRANO AROCA, A; GÓMEZ RIBELLES, J.L. AND MONLEÓN PRADAS, M. 2008. Three-Dimensional Nanocomposite Scaffolds With Ordered Cylindrical Orthogonal Pores. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 541-549.

SCHANTÉ, E. ZUBER, G AND VANDAMME, F. 2011. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* 85: 469-489.

SEAL, B. L.; OTERO, T. C. AND PANITICH, A.. 2001. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering : R: Reports* 34; 147-230.

SELL, S; WOLFE, P; GARG, K; MCCOOL, M; RODRIGUEZ, I. AND BOWLIN, G. L. 2010. The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on electrospun Extracellular Matrix analogues. *Polymers* 2; 522-553.

SHOEMAKER, S. E. ; SACHS, H; VACCARIELLO, S. A. AND ZIGMOND, R. E.. 2006. Reduction in nerve growth factor availability leads to a conditioning lesion-like effect in sympathetic neurons. *Journal of Neurobiology* 66; 1322-1337.

SILVER, J AND MILLER, J. H. 2004 Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 146-146.

SINGH, K; SURI, R; TIWARY, A.K AND RANA, V. 2012. Chitosan films: crosslinking with EDTA modifies physicochemical and mechanical properties. *Journal of Materials in Medicine* 23: 687-695.

SIONKOWSKA, A. 2011. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials. *Progress in polymer science: Review* 36; 1254-1276.

SOLORIO, L; ZWOLINSKI, C AND STEGEMANN, P. 2010. Gelatin microspheres crosslinked with genipin for local delivery of growth factors. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 4: 514-523.

SORIA, J. M.; MARTÍNEZ-RAMOS, C; BAHAMONDE, O; GARCÍA CRUZ, D. M. ; SALMERÓN SÁNCHEZ, M; GARCÍA ESPARZA, M. A. ; CASAS, C; GUZMÁN, M; NAVARRO, X; GÓMEZ RIBELLES; GARCÍA VERDUGO, J. M. ; MONLEÓN PRADAS; M AND BARCIA, J. A. 2007. Influence of the substrate's hydrophilicity on the in vitro Schwann cells viability. *Journal Biomedical Materials Res A* 83; 463-470.

SORIA, J. M.; MARTÍNEZ RAMOS, C; SALMERÓN SÁNCHEZ, M; BENAVENT, V; CAMPILLO FERNÁNDES, A; GÓMEZ RIBELLES, J. L. ; GARCÍA VERDUGO, J. M. ; MONLEÓN PRADAS, M; BARCIA, J. A. .2006. Survival and differentiation of embryonic neural explants on different biomaterials. *Journal Biomedical Materials Res Part A* 79; 495-502.

SOKOLSKY-PAPKOV, M,; AGASHI, K; OLAYE, A,; SHAKESHEFF, K AND DOMB ,AJ. 2007. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59:187-206.

STERN, R; ASARI ,AA AND SUGAHARA, KN. 2006. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology* 85: 699-715.

SUNG, H. W; CHEN, C. N; HUANG, R. N; HSU, J. C AND CHANG, W. H. 2000. In vitro surface characterization of a biological patch fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Biomaterials* 21: 1353-1362.

TABATA Y AND IKADA, Y.1998. Protein release from gelatin matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 31: 287-301.

TMCGRAW-HILL. *The McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology*, Inc.; 1992.

TURLEY, E.A; NOBLE, P.W AND BOURGUIGNON L.Y.W. 2002. Signaling Properties of Hyaluronan Receptors. *The journal of Biological Chemistry* 277: 4589-4592.

VACANTI, C. A. ; KIM, W. S.; UPTON, J; VACANTI, M. P. MOONEY, D; SCHLOO, B AND VACANTI, J. P. 1991. Synthetic Polymers Seeded with Chondrocytes Provide a Template For New Cartilage Formation. *Plastic and Reconstructive Surgery* 88:2106-2112.

VANDELLI, M.A; ROMAGNOLI, M; MONTI, A; GOZZI, M; GUERRA, P; RIVASI, F AND FORNI, F.2004. Microwave-treated gelatin microspheres as drug delivery system. *Journal of controlled Release* 96: 67-84.

WANG, T.W AND SPECTOR,M. 2009. Development of hyaluronic acid-based scaffold for tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 5: 2371-2384.

WEI, H; YANG, H; CHEN, C; LIN, W; CHEN, S; LAI, P; CHANG, Y AND SUNG, H..2007. Gelatin microspheres encapsulated with a nonpeptide angiogenic agent, ginsenoside Rg1, for intramyocardial injection in a rat model with infarcted myocardium. *Journal of Controlled Release* 120: 27-34.

WILLIAMS, L.R. ; VARON, S; PETERSON G. M.; WICTORIN, K AND FISCHER, W. 1986. Continuous infusion of nerve growth factor prevents basal forebrain neuronal death after fimbria fornix transection. *Neurobiology* 83; 9231-9235.

XU, X; YU, H; GAO, S; MAO, H. Q.; LEONG, K. M. AND WANG, S.. 2002. Polyphosphoester microspheres for sustained release of biologically active nerve growth factor. *Biomaterials* 23 : 3765-3772.

YAMAMOTO, M; IKADA, Y AND TABATA, Y. 2001-Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel. *Journal of Biomaterial Science* 12: 77-88.

YE, J. H. AND HOULE, J. D. 1997. Treatment of the Chronically Injured Spinal Cord with Neurotrophic Factors Can Promote Axonal Regeneration from Supraspinal Neurons. *Experimental Neurology* 143:70-81.

YE, M; KIM, S; PARK, K 2010. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *Journal of controlled Release* 146: 241-260.

YOUNG, S; WONG, M AND TABATA , YI. 2005. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release* 109: 256-274.