

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***HIDROGELES BIODEGRADABLES PARA LA REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO ARTICULAR***

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: PETRA CANTÓ LORAS

TUTORA: GLORIA GALLEGO FERRER

*Curso Académico: 2013/2014*

VALENCIA, Septiembre de 2014



**Título:** HIDROGELES BIODEGRADABLES PARA LA REGENERACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

**Alumna:** Petra Cantó Loras

**Tutora:** Prof. Dña. Gloria Gallego Ferrer

**Localidad y fecha:** Valencia, Septiembre de 2014

**Lugar de realización:** Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular. Universitat Politècnica de València.

**RESUMEN**

El cartílago articular es un tejido conectivo muy especializado presente en las articulaciones, que actúa como amortiguador soportando enormes cargas y proporcionando una superficie de deslizamiento de baja fricción. Las patologías del cartílago articular suponen la pérdida de la estructura y de la función del tejido y son una de las principales causas de discapacidad en personas mayores. Se trata de un tejido avascular que presenta una capacidad de autoreparación limitada. Se han desarrollado numerosos procedimientos para tratar de paliar temporalmente el dolor articular, pero éstos presentan muchas limitaciones y conducen a la degeneración del tejido a largo plazo. Nuevas estrategias terapéuticas basadas en la ingeniería tisular emplean el cultivo de células sobre matrices tridimensionales para desarrollar sustitutos biológicos capaces de restaurar, mantener o mejorar las funciones del tejido. En este trabajo se han obtenido hidrogeles biodegradables inyectables de ácido hialurónico (HA) injertado con tiramina (Tyr) mediante entrecruzamiento enzimático con peroxidasa (HRP) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Los hidrogeles son estructuras tridimensionales formados por polímeros reticulados, capaces de absorber gran cantidad de agua y de proporcionar un microambiente acuoso muy similar al de la matriz extracelular. Son porosos, por lo que permiten el paso de nutrientes y de productos de desecho, necesarios para la supervivencia celular. Además tienen que ser biodegradables para poder ser sustituidos por la matriz extracelular una vez se haya regenerado el tejido. El HA es un glicosaminoglicano muy abundante en la matriz extracelular del cartílago que presenta unas funciones biológicas interesantes. A partir de HA de alto peso molecular se ha obtenido HA de menor peso molecular para tratar de disminuir su viscosidad en disolución y así facilitar el manejo, la esterilización y el cultivo celular. Se han llevado a cabo ensayos de hinchado, morfología y cultivos in vitro para evaluar la citotoxicidad de los hidrogeles de HA degradado al 1 y al 2% (w/v) y de HA de alto peso molecular al 1%. Todos los hidrogeles presentan una estructura microscópica de poros interconectados. A mayor peso molecular y mayor concentración de HA presentan un mayor grado de reticulación, y a mayor peso molecular una mayor capacidad para retener agua. Se ha comprobado que los hidrogeles no son citotóxicos y que se mantiene la viabilidad celular hasta 14 días en cultivo in vitro.

**PALABRAS CLAVE**

Ácido hialurónico, cartílago articular, ingeniería tisular, hidrogel, peso molecular, reticulación, viabilidad.

## **ABSTRACT**

The articular cartilage is a highly specialized connective tissue present in the joints, which acts as shock-absorbing in order to carry enormous loads, providing a sliding surface with low friction. The articular cartilage pathologies include the loss of structure and function of the tissue and so they are one of the leading causes of disability in the elderly. It is an avascular tissue which has a limited ability to self-repair. Numerous methods have been developed to try to temporarily alleviate the joint pain, but they have many limitations and lead to tissue degeneration over time. New therapeutic strategies based on tissue engineering use the cell culture on three-dimensional matrices to develop biological substitutes that can restore, maintain or improve tissue functions. In this project, injectable and biodegradable hydrogels of hyaluronic acid (HA) grafted with tyramine (Tyr) have been obtained by enzymatic crosslinking with peroxidase (HRP) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Hydrogels are three-dimensional structures composed of cross-linked polymers capable of absorbing large amounts of water and provide an aqueous microenvironment similar to that of the extracellular matrix. They are porous, so they allow the passage of nutrients and waste products required for cell survival. Moreover, they must also be biodegradable in order to be replaced with the extracellular matrix once the tissue has been regenerated. HA is an abundant glycosaminoglycan in the extracellular matrix of the cartilage, having interesting biological functions. From high molecular weight HA, lower molecular weight HA has been obtained, in order to try to decrease the solution viscosity, thereby facilitating the handling, sterilization and cell culture. Assays of swelling, morphology and in vitro cultures have been carried out to assess cytotoxicity of HA hydrogels degraded at 1 and 2% (w / v) and high molecular weight HA at 1%. All hydrogels have a microscopic structure of interconnected pores. Higher molecular weight and higher concentration of HA show a higher degree of crosslinking and water holding capacity. It has been shown that hydrogels are non-cytotoxic and cell viability was maintained up to 14 days in vitro culture.

## **KEYWORDS:**

Hyaluronic acid, articular cartilage, tissue engineering, hydrogel, molecular weight, crosslinking, viability.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar me gustaría darle las gracias a mi tutora Gloria Gallego Ferrer por haberme dado la oportunidad de emprender este proyecto en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT), estoy muy agradecida por su dedicación e interés

También me gustaría darle las gracias a Sara Poveda Reyes, por haberme dedicado tanto tiempo en el laboratorio y por haberme enseñarme todo lo necesario para poder llevar a cabo este trabajo. Agradecerle también la ayuda y el apoyo que me ha prestado siempre que lo he necesitado.

Gracias a todos los compañeros del CBIT, en especial a Esther y a Félix, por todos los momentos buenos y los no tan buenos que hemos compartido, por vuestra ayuda y por haber hecho que estos meses hayan sido inolvidables.

Por último, mi agradecimiento personal a Bárbara y Montse.

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. El cartílago articular .....	1
1.2. Patología del cartílago articular .....	2
1.2.1. Osteoartritis .....	2
1.2.2. Lesiones traumáticas.....	3
1.3. Terapias celulares regenerativas del cartílago articular .....	4
1.3.1. Ingeniería tisular.....	5
1.4. Hidrogeles en ingeniería tisular del cartílago articular.....	5
1.4.1. Hidrogeles inyectables .....	6
1.5. El ácido hialurónico.....	7
1.6. Entrecruzamiento enzimático .....	7
2. Objetivos.....	9
3. Materiales y métodos .....	10
3.1. Materiales .....	10
3.2. Síntesis del ácido hialurónico modificado con tiramina (HA-Tyr).....	10
3.3. Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular .....	11
3.4. Formación de hidrogeles.....	12
3.5. Peso molecular del ácido hialurónico.....	13
3.6. Grado de injerto de tiramina.....	13
3.7. Procedimiento de esterilización de las disoluciones de ácido hialurónico .....	14
3.8. Ensayo de grado de hinchado .....	14
3.9. Morfología .....	14
3.10. Cultivo de fibroblastos .....	15
3.11. MTS.....	15
3.12. Live/Dead .....	16
3.13. Actina/DAPI.....	16
3.13.1. Obtención de secciones de los hidrogeles cultivados mediante micrótopo criogénico .....	17
3.14. Análisis estadístico .....	17
4. Resultados y discusión .....	18
4.1. Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular .....	18
4.2. Síntesis de ácido hialurónico injertado con tiramina (HA-Tyr) .....	19
4.3. Peso molecular.....	19
4.4. Grado de injerto de la tiramina .....	21
4.5. Formación de hidrogeles. Entrecruzamiento enzimático .....	22
4.6. Ensayo de grado de hinchado .....	24
4.7. Morfología .....	25
4.8. MTS.....	26
4.9. Live/Dead .....	29
4.10. Actina/DAPI.....	33
5. Conclusiones.....	36
6. Bibliografía.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación de las distintas zonas del cartílago articular .....	2
<b>Figura 2.</b> Estructura del ácido hialurónico.....	7
<b>Figura 3.</b> Reacción de entrecruzamiento enzimático del ácido hialurónico (HA) injertado con tiramina (Tyr) mediado por la enzima horseradish peroxidasa (HRP) y peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	8
<b>Figura 4.</b> Curva de calibrado patrones Cromatógrafo de Permeación de Gel (GPC) para determinar el peso molecular del ácido hialurónico (HA) .....	19
<b>Figura 5.</b> Curvas de distribución de pesos moleculares en el Cromatógrafo de Permeación de Gel (GPC) .....	20
<b>Figura 6.</b> Resultados medidas del peso molecular con el <i>Cromatógrafo de Permeación de Gel (GPC)</i> .....	21
<b>Figura 7.</b> Recta de calibrado para determinar la concentración de tiramina (mg/ml) .....	21
<b>Figura 8.</b> Hidrogeles de ácido hialurónico (HA) .....	22
<b>Figura 9.</b> Método del vial invertido para la determinación del tiempo de gelificación de los hidrogeles.....	23
<b>Figura 10.</b> Hidrogeles mezcla gelatina/ácido hialurónico degradado (Gel/HAdeg) al 2%.....	24
<b>Figura 11.</b> Resultados contenido de agua en equilibrio (EWC).....	25
<b>Figura 12.</b> Imágenes del microscopio electrónico de barrido (SEM) .....	26
<b>Figura 13.</b> Resultados de absorbancia ensayo MTS a día 2, 7 y 14.....	27
<b>Figura 14.</b> Resultados de absorbancia ensayo MTS a día 2 .....	28
<b>Figura 15.</b> Resultados de absorbancia ensayo MTS a día 7 .....	28
<b>Figura 16.</b> Resultados de absorbancia ensayo MTS a día 14 .....	29
<b>Figura 17.</b> Resultados ensayo Live/Dead a día 2 .....	30
<b>Figura 18.</b> Resultados ensayo Live/Dead a día 7 .....	31
<b>Figura 19.</b> Resultado ensayo Live/Dead a día 14.....	32
<b>Figura 20.</b> Resultados tinción celular Actina/DAPI a día 2.....	33
<b>Figura 21.</b> Resultados tinción celular Actina/DAPI a día 7.....	34
<b>Figura 22.</b> Resultados tinción celular Actina/DAPI a día 14.....	35

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ratios molares para la síntesis de ácido hialurónico (HA) injertado con tiramina (Tyr).....	10
<b>Tabla 2.</b> Composición en porcentajes para un hidrogel .....	12
<b>Tabla 3.</b> Pesos moleculares (Da) de los patrones empleados para la obtención de la recta de calibrado .....	13
<b>Tabla 4.</b> Resultados grado de injerto (mol grupos fenol/mg HA) y grado de sustitución (%) para el ácido hialurónico (HA) de alto peso molecular y el ácido hialurónico degradado (HAdeg) .....	22
<b>Tabla 5.</b> Tiempos de gelificación hidrogeles de ácido hialurónico (HA) de alto peso molecular y degradado a concentraciones del 1 y 2% (w/v) .....	23

## ABREVIATURAS

ACI: trasplante autólogo de condrocitos  
CF-KRB: Calcium Free Krebs Ringer Buffer  
DAPI: 4'-6-diamidino-2-phenyindole dilactate  
DPBS: Dulbecco's phosphate buffered saline  
EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida  
FBS: Fetal Bovine Serum  
GPC: Cromatógrafo de Permeación de Gel  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno  
HA: ácido hialurónico  
HEPES: ácido 4-(3-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico  
HRP: horseradish peroxidasa  
MES: ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico  
NaCl: cloruro sódico  
NaHCO<sub>3</sub>: bicarbonato sódico  
NaOH: hidróxido de sodio  
NHS: N-Hidroxisuccinimida  
PEO: polióxido de etileno  
Tyr: tiramina  
UV: ultravioleta

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El cartílago articular

El cartílago articular es un tejido conectivo muy especializado que cubre los extremos de las articulaciones diartrodiales. Se trata de un tejido sólido, pero con cierta elasticidad que presenta unas propiedades biomecánicas únicas. Es poroso, no lineal, viscoelástico y multifásico. (Sophia Fox et al., 2009; Lu y Mow, 2008; Poole, 1997)

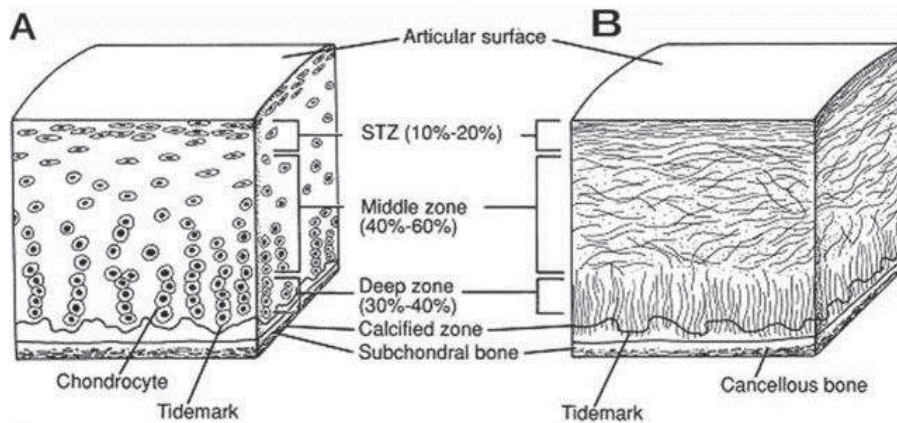
Es un tejido avascular, que carece de inervación y que se nutre a través de la membrana sinovial, la cual permite la difusión de nutrientes y oxígeno. Está compuesto por una densa matriz extracelular en la que se encuentran distribuidos de forma dispersa los condrocitos, que son las únicas células que componen el tejido y los responsables del desarrollo, el mantenimiento y la reparación de la matriz extracelular. La compleja estructura y composición de la matriz extracelular proporcionan las propiedades mecánicas características del tejido. (Sophia Fox et al., 2009; Poole, 1997; Freed et al., 2009)

En la matriz extracelular se distinguen dos fases, una fase líquida y otra sólida. El agua es el principal componente de la fase líquida, que constituye hasta el 80% del peso húmedo del tejido. La fase sólida está compuesta principalmente por colágeno tipo II y proteoglicanos. El colágeno se agrega formando una red que proporciona propiedades de tensión y restringe el grado de hinchado del tejido. Los proteoglicanos, en cambio, presentan grupos sulfato y carboxilo repetidos a lo largo de sus cadenas que proporcionan cargas negativas y facilitan que el agua quede retenida en la matriz, aumentando el grado de hinchado y proporcionando resistencia a la compresión. La interacción entre estas dos fases permite al tejido soportar grandes cargas y reducir el coeficiente de fricción. (Cohen et al., 1998; Sophia Fox et al., 2009; Roughley, 2006, Buckwalter, 1998, Kim et al., 2011)

La composición y estructura del cartílago articular varían en función de la profundidad del tejido de manera que, como se muestra en la figura 1, se pueden distinguir cuatro zonas: (Sophia Fox et al., 2009; Poole, 1997; Bhosale y Richardson, 2008)

- Zona superficial: presenta pocos proteoglicanos y una elevada concentración de fibras de colágeno orientadas en dirección paralela a la superficie del tejido. Hay un mayor número de condrocitos que en las capas profundas y éstos son más pequeños y aplanados. Esta zona se encuentra en contacto con el líquido sinovial y protege a las capas más profundas del cartílago.
- Zona intermedia: es una zona de transición entre la zona superficial y la profunda que corresponde al 40-60% del volumen total del cartílago. Conforme aumenta la profundidad del tejido, disminuye el contenido de agua y aumenta la concentración de proteoglicanos que proporcionan una mayor resistencia a las fuerzas de tracción.
- Zona profunda: se encuentra en la interfase cartílago-hueso, es muy rica en proteoglicanos y presenta las fibras de colágeno orientadas de forma perpendicular a la superficie. Los condrocitos presentan una forma más redondeada y se disponen en columnas paralelas a las fibras de colágeno.
- Zona calcificada: es la zona de anclaje al hueso. Presenta muy pocas células y carece de proteoglicanos. Las fibras de colágeno se encuentran dispuestas radialmente.





**Figura 1.** Representación de las distintas zonas del cartílago articular: A. Organización celular; B. Estructura de las fibras de colágeno. (Sophia Fox et al., 2009)

Tanto la composición como la estructura característica del tejido, le permiten llevar a cabo sus funciones correctamente: actúa como amortiguador, repartiendo las cargas por toda la superficie y minimiza la presión sobre el hueso subcondral. Además permite la movilidad de las articulaciones de forma fluida sin causar dolor, proporcionando una superficie de deslizamiento de baja fricción. (Bhosale y Richardson, 2008; Sophia Fox et al., 2009)

## 1.2. Patología del cartílago articular

El dolor articular es un problema clínico muy común que causa discapacidad, sobretodo en personas mayores. A lo largo de la vida, el cartílago se ve expuesto a grandes cargas mecánicas, por lo que se va desgastando; esto supone la pérdida de la estructura y de la función del tejido, causando dolor y pérdida de movilidad. (Temenoff y Mikos, 2000; Gomoll y Minas, 2014; Buckwalter y Mankin, 1998)

### 1.2.1. Osteoartritis

La osteoartritis es la enfermedad articular más común que causa disfunción y dolor en las articulaciones. Es una enfermedad degenerativa y multifactorial que se caracteriza por la pérdida progresiva de la estructura y la función del cartílago. Se puede relacionar con otros trastornos como la diabetes mellitus tipo II o la obesidad. También está asociada con la edad. Se trata de un proceso degenerativo que suele empezar en la superficie articular pero acaba afectando a todos los tejidos que forman la articulación y va pasando por distintas fases: (Grenier et al., 2014; Hosseini et al., 2014; Buckwalter et al., 2005)

En la primera fase de la enfermedad disminuye la agregación de proteoglicanos así como la longitud de las cadenas de glicosaminoglicanos, lo que conlleva un aumento en el contenido de agua. Todo esto altera la matriz extracelular, aumentando su permeabilidad y disminuyendo su rigidez.

Cuando los condrocitos detectan estos cambios en la matriz comienza la segunda fase. Tiene lugar una respuesta celular basada en la síntesis y la degradación de la matriz, así como en la proliferación de condrocitos. Los condrocitos producen factores anabólicos y de crecimiento mitogénico para estimular la síntesis de componentes de la matriz. Las moléculas presentes en el tejido dañado también promueven la síntesis de óxido nítrico, que se difunde

rápidamente e induce la producción de la citoquina interleuquina 1, la cual estimula la expresión de metaloproteasas que degradan los componentes de la matriz extracelular. En esta fase el aumento de la síntesis de los componentes de la matriz y la proliferación celular contrarrestan el efecto catabólico de las proteasas y en algunos casos se puede llegar a restaurar completamente el tejido.

La última etapa se caracteriza por la pérdida progresiva del cartílago articular. En ella disminuye la actividad anabólica y la proliferación de condrocitos, y predomina la actividad catabólica. Esta pérdida del tejido conduce a los síntomas de la enfermedad. El cartílago articular acaba desapareciendo por completo, dejando desnuda la superficie ósea. (Buckwalter y Mankin 1998)

### 1.2.2. Lesiones traumáticas

Las lesiones traumáticas que afectan al cartílago articular suelen ser el resultado de someter a las articulaciones a impactos fuertes y repentinos o a cargas prolongadas o repetitivas. Cuando se aplica una carga sobre una superficie articular, el fluido de la matriz extracelular se mueve, deformando reversiblemente el tejido para amortiguar. Además, las contracciones musculares absorben parte de la energía del movimiento y estabilizan la articulación. Cuando dicha carga se aplica de forma rápida o inesperada por un impacto repentino o por un movimiento de torsión, las contracciones musculares no pueden absorber la suficiente energía, por lo que se dañan la matriz extracelular y los condrocitos, causando lesiones en la articulación, las cuales suelen terminar en osteoartritis. (Buckwalter, 1998; Spahn et al., 2013)

Las lesiones que afectan al cartílago articular se pueden clasificar en tres grupos atendiendo a su profundidad: (Temenoff y Mikos, 2000; Hunziker, 1999)

- Las lesiones superficiales solo dañan la matriz extracelular sin afectar demasiado a las células, por lo que los condrocitos viables aumentan su actividad sintetizando proteoglicanos y colágeno para tratar de reparar el tejido dañado.
- Las lesiones condrales o de espesor parcial son aquellas que afectan al cartílago articular, sin penetrar en el hueso subcondral. Este tipo de lesiones son muy similares a las fisuras observadas en las primeras etapas de la osteoartritis, y a pesar de los intentos por parte de las células cercanas al sitio de la lesión para reemplazar el tejido dañado, la reparación es muy poco frecuente.
- Las lesiones osteocondrales abarcan todo el espesor del cartílago articular y penetran en el hueso subcondral. En este tipo de lesiones las células madre mesenquimales de la médula ósea, los macrófagos y las células sanguíneas tienen acceso a la lesión, por lo que en primer lugar se produce una respuesta inflamatoria y la formación de un coágulo de fibrina. Después, las células madre mesenquimales migran al lugar de la lesión para sustituir el coágulo de fibrina por tejido cartilaginoso. El problema es que el tejido que se forma suele ser menos rígido y más permeable que el tejido original y conduce a la degradación.

De esta forma se reducía la longitud y el número de incisiones y el procedimiento quirúrgico era más sencillo. El desarrollo de nuevas estrategias basadas en la ingeniería tisular han dado paso a la tercera generación ACI en las que se combina el cultivo de condrocitos autólogos sobre matrices tridimensionales.(Marlovits et al., 2006; Steinwachs, 2009)

### 1.3.1. Ingeniería tisular

Los procedimientos clásicos para la regeneración del cartílago articular descritos anteriormente consiguen paliar temporalmente el dolor, pero presentan muchas limitaciones y conducen a la degeneración del cartílago a largo plazo. Por ello, en los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas basadas en la ingeniería tisular.(Johnstone et al., 2013)

El concepto de ingeniería tisular fue descrito por primera vez en los años 90 por Langer y Vacanti (1993) como la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y de las ciencias de la vida para comprender la relación entre la estructura y la función de los tejidos mamíferos normales y patológicos y el desarrollo de sustitutos biológicos que permitan restaurar, mantener o mejorar las funciones de los tejidos. Las estrategias basadas en ingeniería tisular implican el uso de estructuras tridimensionales (scaffolds) en las que se encapsulan un gran número de células para proporcionar un soporte mecánico biocompatible con el crecimiento celular y el desarrollo del tejido sano.(Langer, 2000; Terada et al., 2000)

Los scaffolds tienen un papel importante en la regulación de la migración, la proliferación celular y la diferenciación o mantenimiento del fenotipo celular, según el caso. Actúan como matriz extracelular de forma temporal hasta que las células proliferan y sintetizan su propia matriz. Los scaffolds ideales para la regeneración del cartílago articular deben cumplir una serie de requisitos:(Kim et al., 2011; Bae et al., 2013)

- Proporcionar las propiedades mecánicas y biológicas características del tejido para poder llevar a cabo sus funciones.
- Ser biodegradables para poder ser reemplazados por el tejido nativo una vez éste haya sido reparado.
- Promover la viabilidad, la diferenciación y la señalización celular, así como la producción de matriz extracelular.
- Permitir el transporte de nutrientes y de productos de desecho.
- Adherirse al sitio de la lesión para integrarse con el cartílago nativo.

### 1.4. Hidrogeles en ingeniería tisular del cartílago articular

Los hidrogeles son un tipo de scaffolds ampliamente utilizados para distintas aplicaciones biomédicas, como la regeneración de cartílago articular, ya que presentan unas características únicas.(Bae et al., 2013)

Son estructuras tridimensionales insolubles e hidrofílicas formadas por polímeros reticulados. Son ampliamente biocompatibles, puesto que son capaces de absorber gran

cantidad de agua, y proporcionan un microambiente acuoso muy similar al de la matriz extracelular y promueven el crecimiento celular. Además son estructuras porosas muy permeables que permiten el paso de nutrientes y solutos de bajo peso molecular, necesarios para la supervivencia y el crecimiento de las células. Deben ser biodegradables para facilitar su eliminación y la formación del tejido sano.(Van Tomme et al., 2008; Bae et al., 2013)

Se han estudiado un gran número de polímeros naturales y sintéticos para la obtención de hidrogeles. Los polímeros naturales se asemejan más a la matriz extracelular y pueden interactuar con los condrocitos favoreciendo su adhesión, crecimiento, proliferación, diferenciación y secreción de la matriz. Además no son tóxicos, por lo que no estimulan reacciones inmunológicas o inflamatorias. El principal inconveniente de estos polímeros es la falta de resistencia mecánica, hecho que limita sus aplicaciones. Por otro lado, los polímeros sintéticos no interaccionan con las células y los subproductos de la degradación pueden ser tóxicos y producir una respuesta inflamatoria. La ventaja que presentan es que son más fáciles de controlar, y se pueden alterar sus propiedades mecánicas y de degradación.(Zhao et al., 2013; Balakrishnan y Banerjee, 2011)

Los hidrogeles obtenidos a partir de polímeros naturales presentan una mayor biocompatibilidad, biodegradabilidad y bioactividad y por tanto se utilizan más que los polímeros sintéticos y presentan muchas ventajas para distintas aplicaciones biomédicas. En función del polímero natural que se emplee, el hidrogel presenta unas propiedades características de resistencia mecánica, tasa de degradación y grado de hinchado. Además estas propiedades se pueden variar modificando los polímeros.(Tavakol et al., 2014)

#### 1.4.1.Hidrogeles inyectables

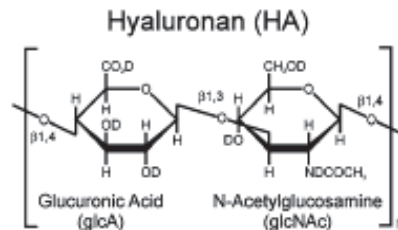
Los hidrogeles inyectables son aquellos en los que las células se incorporan al gel antes de la gelificación o reticulación y que se forman *in situ* tras ser inyectados en el lugar de la lesión. No tienen que ser citotóxicos ni inflamatorios y tienen que ser fáciles de inyectar y biodegradables.(Bae et al., 2013; Teixeira et al., 2012)

El interés por estos hidrogeles inyectables ha aumentado considerablemente, puesto que presentan una serie de ventajas frente a los hidrogeles ya preformados:(Bidarra et al., 2014; Li et al., 2013; Bae et al., 2013; Lee et al., 2013)

- Su implantación es mínimamente invasiva, no requiere procedimientos quirúrgicos complicados, por lo que es más cómoda para el paciente y permite una recuperación más rápida. Además minimiza los costes del tratamiento.
- Se inyectan con facilidad directamente en el sitio de la lesión y pueden llenar los defectos de la lesión ajustándose a su forma y tamaño.
- Tiene una mayor capacidad para encapsular células y proteínas de forma homogénea.
- Permiten un mejor contacto entre el tejido nativo y el hidrogel.

### 1.5. El ácido hialurónico

El ácido hialurónico (HA) es un polisacárido lineal compuesto por la repetición de unidades de disacáridos unidos por enlaces beta(1-4). Cada uno de los disacáridos está constituido por ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidos por un enlace beta(1-3). (Darr y Calabro, 2009)(Figura 2)



**Figura 2.** Estructura del ácido hialurónico(Darr y Calabro 2009).

Se trata de una glicosaminoglicano muy abundante en la matriz extracelular del cartílago, y además es el componente principal del líquido sinovial. Presenta muchas propiedades interesantes que se ajustan a sus diferentes funciones biológicas. Tiene una masa molecular elevada y un gran número de grupos aniónicos que se repelen mutuamente convirtiéndolo en una molécula rígida y muy hidratada, que en solución ocupa un volumen mucho mayor que en su estado seco. Las soluciones de ácido hialurónico tienen un comportamiento viscoelástico, que las convierte en excelentes absorbentes de impactos y lubricantes biológicos para las articulaciones.(Shu et al., 2002; Tadmor et al., 2002)

Es una molécula flexible y muy versátil que interacciona con proteínas de unión específica al HA para formar agregados en el cartílago. Tiene una función importante en la proliferación celular, la morfogénesis, la inflamación y la reparación de heridas. Además proporciona puntos de unión entre los condrocitos y la matriz extracelular gracias a los receptores de HA de la superficie celular. CD44 es una familia de receptores de superficie expresados en distintos tipos celulares, entre los que se encuentran los condrocitos. Se trata del principal receptor para HA que está implicado en varias funciones celulares como la activación de células T, la metástasis tumoral o el crecimiento celular de tumores. (Day y de la Motte, 2005; Zhao et al., 2013; Ishida et al., 1997)

El ácido hialurónico puede ser modificado mediante distintas reacciones químicas que suelen implicar a sus dos grupos funcionales: los grupos carboxilo y los hidroxilo. Estas modificaciones crean la posibilidad de reticular el HA para formar hidrogeles.(Darr y Calabro, 2009)

### 1.6. Entrecruzamiento enzimático

Existen diferentes métodos de entrecruzamiento físicos y químicos para la formación de hidrogeles. En el proceso de entrecruzamiento hay que tener en cuenta la temperatura y el pH de la solución polimérica, puesto que tienen que ser apropiados para mantener la máxima viabilidad celular. Además el entrecruzamiento no debe ser ni demasiado rápido, puesto que podría obstruirse la jeringa, ni demasiado lento.(Balakrishnan y Banerjee, 2011; Bae et al., 2013)

El entrecruzamiento físico tiene lugar mediante la formación de enlaces no covalentes, como interacciones hidrofóbicas, iónicas o puentes de hidrógeno. Los hidrogeles obtenidos por

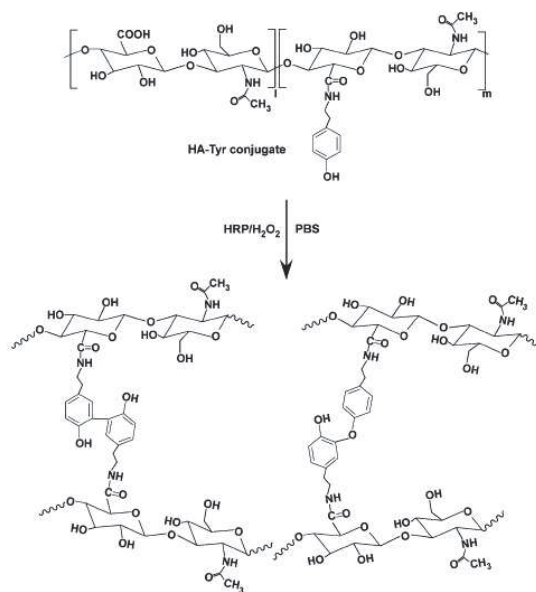
estos métodos de entrecruzamiento presentan la ventaja de que son reversibles y que no requieren reacciones químicas, pero suelen tener una resistencia mecánica baja, por lo que suelen deformarse con facilidad sin recuperar su forma original. (Lee et al., 2008; Bae et al., 2013)

El entrecruzamiento químico sí que emplea enlaces covalentes entre las cadenas de los polímeros, por lo que los hidrogeles obtenidos mediante este tipo de entrecruzamiento presentan una mayor resistencia mecánica y una mayor estabilidad. Por ello se considera que son más apropiados para la reparación del cartílago articular. El problema que presentan es que se utilizan compuestos tóxicos que limitan la viabilidad celular. (Lee et al., 2008; Bae et al., 2013)

El entrecruzamiento enzimático es un método de entrecruzamiento químico muy empleado para la obtención de hidrogeles *in situ*, cuya principal ventaja es que ocurre en condiciones fisiológicas suaves, a pH neutro a una temperatura moderada y en medio acuoso. Además la alta especificidad de la enzima por el sustrato permite controlar y predecir la reacción de entrecruzamiento, ajustando los tiempos de gelificación y evitando reacciones secundarias no deseadas. (Bae et al., 2013; Teixeira et al., 2012)

La horseradish peroxidasa (HRP) es una enzima que se utiliza frecuentemente para la obtención de hidrogeles por entrecruzamiento enzimático. Como sustrato utiliza peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que oxida la HRP formando un intermedio. Este complejo intermedio oxida grupos hidroxifenol presentes, por ejemplo, en la tiramina. Esta reacción de reticulación permite controlar el tiempo de gelificación, la resistencia mecánica y la velocidad de degradación mediante la variación de las concentraciones de HRP y  $H_2O_2$ . (Sun et al., 2013; Teixeira et al., 2012; Lee et al., 2008; Tavakol et al., 2014)

En estudios recientes se han obtenido hidrogeles de HA injertado con tiramina mediante entrecruzamiento enzimático utilizando HRP y  $H_2O_2$  (figura 3). Estos hidrogeles no son citotóxicos y presentan propiedades físico-mecánicas comparables a las del tejido nativo. (Sun, Deng et al. 2013)



**Figura 3.** Reacción de entrecruzamiento enzimático del ácido hialurónico (HA) injertado con tiramina (Tyr) mediado por la enzima horseradish peroxidasa (HRP) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Lee et al., 2008)

## 2. OBJETIVOS

El ácido hialurónico que se puede conseguir a un precio razonable tiene un peso molecular muy alto. Para preparar hidrogeles con este ácido hialurónico de alto peso molecular, que tengan resistencia mecánica y que puedan ser mezclados con gelatina, el HA se tiene que disolver a una concentración elevada, de al menos el 2%.

El problema que surge es que el HA de alto peso molecular a una concentración del 2% es muy viscoso y difícil de pipetear. No se puede esterilizar mediante el método de filtración, porque la solución de HA se queda obstruida en el filtro, y además, presenta una mala homogeneización con la gelatina y al formarse el hidrogel se observan dos fases diferenciadas.

Para tratar de poner solución a estos problemas, en este trabajo se plantean tres objetivos principales:

1. Puesta a punto del procedimiento de encapsulación de células utilizando HA de alto peso molecular.
2. Síntesis de HA de bajo peso molecular mediante un procedimiento de degradación ácida.
3. Evaluación de la viabilidad celular del HA de bajo peso molecular.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

En la síntesis del ácido hialurónico modificado con tiramina se emplea cloruro sódico (Scharlab), ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico (>99%, MES), hidróxido sódico (Sigma-Aldrich), ácido hialurónico (sal sódica) de *Streptococcus equi* (Sigma-Aldrich), hidrocloreuro de tiramina (98%) (Sigma-Aldrich), hidrocloreuro N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich), N-Hidroxisuccinimida (98%, NHS) (Sigma-Aldrich) y tubos de diálisis de 12.400 MWCO para el ácido hialurónico de alto peso molecular (Sigma-Aldrich) y de 3.500 para el ácido hialurónico degradado (SpectruLabs).

Para llevar a cabo el proceso de entrecruzamiento enzimático se utiliza horseradish peroxidase de tipo VI (HRP) (Sigma-Aldrich), solución de peróxido de hidrógeno (30% w/w en H<sub>2</sub>O, con estabilizador) (Sigma-Aldrich) y disolución Calcium Free Krebs Ringer Buffer (CF-KRB) preparada con 115 mM de cloruro sódico, 5 mM de cloruro potásico (Scharlab), 1 mM de dihidrógenofosfato de potasio (extrapuro) (Scharlab) y 25 mM de ácido 4-(3-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) (Sigma-Aldrich).

También se utiliza azida de sodio (99,5%, ReagentPlus®) y Dulbecco's phosphate buffered saline solution 10x w/o Ca, Mg (DPBS) (Sigma-Aldrich).

Para el cultivo celular se ha empleado medio DMEM 4,5 g/L glucosa de Fisher suplementado con L-glutamina 200 mM (Lonza), penicilina-streptomina, Liquid de Life technology (FISHER) y FBS (Fetal Bovine Serum) (GIBCO). Dulbecco's Modified Eagles Medium-low glucose (Sigma-Aldrich), bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich) y tripsina-EDTA (0.25% Trypsin and EDTA (1:5000) in Puck's Saline A) (Invitrogen).

En los ensayos de viabilidad se emplea el kit Live/Dead cell viability/toxicity (Invitrogen), el kit Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), Bodipy FL Phalloidin (Invitrogen), DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole, dilactate) (Sigma-Aldrich) y Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) y Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10x (DPBS) (Sigma-Aldrich)

#### 3.2. Síntesis del ácido hialurónico modificado con tiramina (HA-Tyr)

Siguiendo el protocolo descrito en el artículo de Darr y Calabro (2009) se sintetiza HA modificado con tiramina (HA-Tyr). Se forman enlaces amida entre los grupos carboxilo de las moléculas de HA y los grupos amina de las moléculas de tiramina (Tyr). De esta forma el HA adquiere los grupos fenol necesarios para poder llevar a cabo el entrecruzamiento enzimático con la enzima HRP. En la tabla 1 están representados los ratios molares empleados para la síntesis de HA modificado con tiramina.

**Tabla 1.** Ratios molares para la síntesis de ácido hialurónico injertado con tiramina (Tyr). COOH: grupos carboxilo del ácido hialurónico; EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; NHS: N-Hidroxisuccinimida.

Tyr/COOH	EDC/COOH	EDC/Tyr	NHS/EDC
2:1	1:1	1:2	1:10



Las disoluciones de HA se mantienen siempre en la oscuridad, cubiertas con papel de aluminio, para evitar la fotodegradación.

En primer lugar, se prepara una disolución de NaCl a una concentración de 150 mM. Se toman 20 ml de la disolución preparada de NaCl y se añaden 1,08 gramos de MES y 0,3 ml de NaOH 5M. El MES es un amortiguador biológico que ayudan a mantener el pH.

El siguiente paso consiste en ajustar el pH de la disolución a 5,75 (pHmeter CyberScan pH 1500, Eutech Instruments) y después añadir 100 mg de ácido hialurónico (0,5% w/v). El HA se va añadiendo poco a poco y en agitación para evitar la formación de agregados. Se deja 3 horas en agitación a 500 rpm hasta que se disuelve completamente.

Una vez disuelto, se añaden 86,54 mg de hidrocloreuro de tiramina y se mantiene en agitación durante 15-20 min, hasta que se disuelve. Se comprueba el pH y se vuelve a ajustar a 5,75. A continuación se añaden 2,87 mg de NHS y 47,77 mg de EDC y se deja reaccionar durante 24 horas. El EDC es necesario para la activación de los grupos carboxilo de las moléculas de HA y el NHS actúa como catalizador para facilitar la reacción y minimizar las posibles reacciones secundarias.

Pasadas 24 horas, una vez finalizada la reacción de sustitución, se transfiere la solución de HA-Tyr a un tubo de diálisis para eliminar las moléculas de tiramina que no se han reaccionado y que no han sido injertadas, el EDC y el NHS. La diálisis se lleva a cabo durante dos días y se hacen tres lavados cada día. Las primeras 24 horas se dializa contra NaCl 150 mM y las restantes 24 horas contra agua desionizada.

Por último, la disolución de HA-Tyr dializada se somete a un proceso de liofilización (LyoQuest, Telstar Life Science Solutions, Japan) durante 4 días. Para ello, antes de introducir la disolución en la liofilizadora se congela a -80 °C. En el interior de la liofilizadora se genera vacío y tiene lugar un proceso de sublimación del agua de la muestra quedando un polvo liofilizado de HA-Tyr.

### 3.3. Síntesis de HA de bajo peso molecular

Siguiendo un protocolo descrito por Shu et al. (2002) para la degradación ácida del ácido hialurónico, se prepara el HA de bajo peso molecular.

En primer lugar, se disuelven 0,5 gramos de HA de alto peso molecular en 50 ml de agua miliQ. Se ajusta el pH a 0,5 añadiendo HCl concentrado y se deja durante 24 horas en agitación a 130 rpm a 37°C para que tenga lugar la degradación.

A continuación, se ajusta el pH a 7 añadiendo NaOH 1M y se transfiere la disolución de HA degradado a un tubo de diálisis de 3.500 MWCO. Se dializa durante 4 días contra agua desionizada para que los fragmentos de HA que son demasiado pequeños salgan de la disolución. Se hacen tres cambios de agua al día.

Por último, la disolución de HA se centrifuga (Eppendorf 5804R, Hamburgo) 10 minutos a 5.000 rpm, se recoge el sobrenadante y se liofiliza durante tres días para eliminar el agua.

### 3.4. Formación de hidrogeles

El ácido hialurónico injertado con tiramina liofilizado se disuelve en el buffer CF-KRB para obtener unas disoluciones de HA a unas concentraciones del 1% w/v y del 2% w/v. Estas disoluciones se dejan en la nevera a 4°C, cubiertas con papel de aluminio durante 48 horas, para que el HA se disuelva completamente.

También se preparan disoluciones separadas de HRP (12,5 U/ml) y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) en el buffer CF-KRB. La disolución de HRP se prepara justo antes de iniciar la gelificación para evitar su desactivación. Hay que asegurarse de que ambas disoluciones están correctamente homogeneizadas.

En la tabla 2 se representa la composición de cada hidrogel en función a su volumen total. Para los ensayos de grado de hinchado y morfología se preparan hidrogeles de 300 µl, mientras que para los ensayos de citotoxicidad los hidrogeles son de 50 µl.

**Tabla 2.** *Composición en porcentajes de un hidrogel. HA: ácido hialurónico; HRP: horseradish peroxidase; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno*

80%	HA
10%	HRP
10%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Los hidrogeles se preparan en una placa multipocillo p48. En primer lugar se añade la disolución de HA, a continuación la peroxidasa (HRP), y por último el peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El peróxido inicia la reacción de reticulación, y por ello una vez añadido empieza a contarse el tiempo de gelificación.

Se prepara una serie de hidrogeles mezcla gelatina/ácido hialurónico degradado (Gel/HAdeg) a una concentración del 2%. El procedimiento es el mismo, se preparan las disoluciones de HAdeg-Tyr y de Gel-Tyr en CF-KRB al 2% w/v, la gelatina se sintetizó según estudios previos (Mellera-Oglialoro et al., 2013). La disolución de gelatina se prepara el mismo día de la gelificación y se introduce en una estufa a 27°C durante 20-30 minutos. También se preparan las disoluciones de HRP (12,5 U/ml) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) en CF-KRB. La composición de los geles es la misma. Se prepararon las siguientes mezclas Gel/HA: 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 y 0/100 v/v. que corresponden al 80% del volumen total del hidrogel.

Para determinar el tiempo de gelificación se prepara el hidrogel en un vial de cristal. El vial se va girando poco a poco para comprobar si el hidrogel aún está líquido o si ya ha gelificado. En el momento en que se puede girar completamente el vial sin que el hidrogel caiga se considera que ha gelificado. Este método basado en la inversión del vial se combina con el uso de una espátula para comprobar si se puede separar el hidrogel de las paredes del vial y así corroborar que ha gelificado.

### 3.5. Peso molecular del HA

El peso molecular del HA se mide con el Cromatógrafo de Permeación de Gel (GPC Waters Breeze compuesto por waters 1525 binary HPLC pump, waters 2707 autosamples, waters 2489 UV/visible detector y waters 2414 refractive index detector, Waters corporation, Massachusetts). Se toman medidas del HA de alto peso molecular y del HA degradado antes y después del injerto de tiramina. El volumen de cada inyección es de 10 µl y el flujo de solvente de fase móvil es de 0,8 ml/min.

El solvente de fase móvil está compuesto por 150 mM de cloruro sódico (NaCl) y 0,05% de azida de sodio. Se emplea un sistema de 4 columnas Ultrahydrogel conectadas en serie con tamaño de poro decreciente (1.000, 500, 250 y 120). La longitud de las columnas es de 7,8 mm x 30 cm.

En primer lugar se construye una curva de calibrado utilizando 4 patrones de polióxido de etileno (PEO) a una concentración de 1 mg/ml y un patrón de HA de alto peso molecular a una concentración de 0,8 mg/ml de pesos moleculares (Da) conocidos (tabla 6):

**Tabla 3.** Pesos moleculares(Da) de los patrones empleados para la obtención de la recta de calibrado

<b>Patrón 1</b>	106	12.600	176.000
<b>Patrón 2</b>	400	24.000	310.000
<b>Patrón 3</b>	1.400	44.000	558.000
<b>Patrón 4</b>	4.290	82.500	810.000
<b>Patrón 5</b>	2.875.164,24		

Se disuelve el HA en 150 mM de NaCl con 0,05% de azida de sodio a una concentración de 0,8 mg/ml y se deja durante 24 horas en nevera a 4°C antes de tomar las medidas.

Se hacen dos inyecciones de cada muestra de HA. El tiempo requerido para cada inyección es de 80 minutos. Los resultados que se exportan del programa del GPC están en formato Excel con dos columnas: tiempo (minutos) y la señal que llega al detector (mV).

### 3.6. Grado de injerto de tiramina

Se determina la concentración de tiramina injertada en el producto HA-Tyr. Para ello se mide la absorbancia a 275 nm con el espectrofotómetro de doble haz visible/UV (Cecil CE9200 Super Aquarius, Buck Scientific, Reino Unido). A dicha longitud de onda aparece un máximo de absorbancia que corresponde al grupo fenol de la tiramina. A partir de los valores de absorbancia obtenidos se calcula la concentración de tiramina con ayuda de una recta de calibrado.

La recta de calibrado se construye midiendo la absorbancia de distintas disoluciones de tiramina en agua miliQ de concentraciones conocidas (0,025, 0,05, 0,1 y 0,125 mg/ml).

Para determinar el grado de injerto de los grupos tiramina en el HA se disuelven 1,5 mg del producto HA-Tyr liofilizado en 1,5 ml de agua miliQ.

### 3.7. Procedimiento de esterilización de las disoluciones de HA

Para la esterilización de las disoluciones de HA degradado a 1 y al 2% y las de HA de alto peso molecular al 1%, se hace pasar la disolución a través del filtro de polietersulfona con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  bajo campana de cultivos. De la misma manera se esterilizan también las disoluciones de HRP y  $\text{H}_2\text{O}_2$  empleadas para llevar a cabo la reacción de entrecruzamiento.

El HA de alto peso molecular a una concentración del 2% es muy viscoso, por lo que no pasa a través del filtro. Se han probado tres métodos alternativos para su esterilización:

1. Aumentar el pH de la disolución de HA a 8 para tratar de disminuir su viscosidad y así poder filtrarla.
2. Sumergir el polvo liofilizado obtenido tras la síntesis de HA injertado con tiramina en etanol puro al 100% y dejarlo secar bajo campana de cultivos.
3. Dejar el polvo liofilizado bajo luz ultravioleta en campana de cultivos durante 1 hora.

### 3.8. Ensayo de grado de hinchado

Se lleva a cabo un ensayo de hinchado de los hidrogeles de HA degradado al 1%, HA degradado al 2% y HA de alto peso molecular al 1% para determinar la masa de agua que es capaz de retener cada hidrogel. El ensayo de hinchado se lleva a cabo por inmersión en DPBS con un 0,02% de azida de sodio. Se trata de una solución salina que se aproxima a las condiciones fisiológicas del tejido, que suplementado con el azida de sodio evita la proliferación de microorganismos.

En primer lugar se preparan los hidrogeles de 300  $\mu\text{l}$ , al menos 5 réplicas de cada tipo. Una vez gelificados se introducen en un vial con DPBS + 0,02% de azida y se dejan 24 horas en nevera a 4°C. A continuación se toman las medidas del peso de los hidrogeles en su estado hinchado ( $m_w$ ), para ello se sacan del vial y se les quita el agua adsorbida en la superficie externa con papel.

El siguiente paso consiste en la liofilización de los hidrogeles para tomar medidas de su peso seco ( $m_d$ ). Antes de liofilizar se introducen en agua miliQ para eliminar las sales. Con los datos obtenidos de peso hinchado y peso seco se calcula la cantidad de agua en equilibrio (EWC) para cada tipo de hidrogel con la siguiente ecuación (Zhou et al., 2013):

$$EWC (\%) = \frac{m_w - m_d}{m_d} \cdot 100$$

### 3.9. Morfología

Se observa la estructura microporosa de los hidrogeles de HA degradado al 1%, HA degradado al 2% y HA de alto peso molecular al 1% mediante microscopía electrónica de

barrido SEM (JSM-6300 Scanning Electron Microscope, Tokio, Japón) a 500, 1.000 y 2.000 aumentos y a un voltaje de 10 kV.

Para ello, en primer lugar se preparan hidrogeles y se liofilizan. Una vez liofilizados se hacen cortes con una cuchilla para tomar secciones finas y así poder observar la superficie transversal del gel. Antes de observar al microscopio, se recubren las muestras con oro a 40 mA durante 90 segundos.

### 3.10. Cultivo de fibroblastos

Para el cultivo celular se emplean fibroblastos de ratón de la línea celular L929. Los fibroblastos son cultivados en medio DMEM 4,5 g/L glucosa, +NEAA, -glutamina, -piruvato; suplementado con: 1% de L-glutamina, 1% de Penicilina/Streptomina y 10% de FBS. Se deja que proliferen en flascos durante dos días.

Una vez los cultivos alcanzan entre el 80-90% de confluencia se despegan las células. Para ello se retira el medio y se hace un lavado con 10 ml de DPBS--. A continuación, se retira el DPBS-- y se añaden 5 ml de tripsina/EDTA. La tripsina se deja actuar durante 5 minutos en el incubador a 37 °C. Pasados los 5 minutos se neutraliza con un volumen igual de medio de cultivo fresco.

Se quiere obtener una concentración de 150.000 células/ml de HA. Para ello se cuenta el número total de células que se tiene en cada flascón con un contador de células automático (Bio-Rad TC20, California) y se centrifugan las células en suspensión durante 5 minutos a 1.000 rpm. Se desecha el sobrenadante, y el pellet, donde se encuentran los fibroblastos, se resuspende con la cantidad correspondiente HA previamente esterilizado.

Inmediatamente después de mezclar las células con el HA, se preparan los hidrogeles sobre un cubre de vidrio en una placa multipocillo p24. Se preparan hidrogeles de HA degradado al 1%, HA degradado al 2% y HA de alto peso molecular al 1% con un volumen total de 50 µl, quedando las células encapsuladas en su interior donde irán creciendo y proliferando. Cada dos o tres días se hace cambio de medio.

Los cubres de vidrio se emplean para facilitar el manejo de los hidrogeles dentro de los pocillos. Es necesario su esterilización, para ello se sumergen en etanol puro durante unos minutos y luego se dejan secar bajo campana de cultivos.

### 3.11. MTS

El ensayo de MTS es un método colorimétrico para determinar el número de células viables. El reactivo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-(5-(3-carboximetoxifenil)-2(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) es biorreducido a un producto coloreado llamado formazán, el cual es soluble en el medio de cultivo. Esta reacción de reducción la llevan a cabo enzimas deshidrogenasas mitocondriales que están presentes en las células metabólicamente activas (viables). Se mide la absorbancia del formazán en un espectrofotómetro a 490 nm, siendo ésta proporcional al número de células vivas.

En los ensayos de MTS se utiliza un medio DMEM sin rojo fenol para que el rojo fenol no interfiera en las medidas de absorbancia. Para preparar 100 ml de medio se añade 1 gramo de DMEM suplementado con: 10% FBS, 1% Penicilina/Streptomocina y 0,37 gramos de NaHCO<sub>3</sub>.

En primer lugar, se lavan los hidrogeles dos o tres veces para eliminar el medio y los restos de rojo fenol. A continuación se añade en cada pocillo 500 µl de MTS-medio (1:5). Se deja 3 horas en el incubador a 37 °C y en oscuridad para que tenga lugar la reducción del reactivo MTS.

Tras la incubación, se pasan 100 µl del producto de la reducción (formazán) a una placa multipocillo p93 y se lee la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 490 nm en el espectrofotómetro (Victor 3, Multilabel Counter model 1420-051, Perkin Elmer, Cleveland, Ohio).

### 3.12. Live/Dead

Para llevar a cabo este ensayo se emplea el kit comercial Live/Dead cell Viability/Cytotoxicity de la casa Invitrogen. Se trata de un ensayo colorimétrico para determinar la viabilidad celular. Se basa en la integridad de la membrana plasmática y en la actividad esterasa intracelular. Permite diferenciar rápidamente las células vivas de las muertas mediante una tinción simultánea con calceína (verde) y con etidio (rojo). La calceína indica la actividad esterasa intracelular que presentan las células vivas, mientras que el etidio indica la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, tiñendo de color rojo las células muertas.

En primer lugar se lavan los hidrogeles dos veces con DPBS-- para eliminar completamente el medio. A continuación se añaden 500 µl de de la solución con los fluoróforos en cada pocillo y se deja la placa 15 minutos en el incubador a 37°C. El fluoróforo se prepara con DPBS a una proporción 1:4000 de calceína y 1:1000 de etidio. Por último se hace un lavado con DBPBS— antes de mirar las células en el microscopio (Nikon Eclipse TS100, Japón).

### 3.13. Actina/DAPI

El ensayo Actina/DAPI permite observar la estructura celular. DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) es un marcador fluorescente que tiñe las secuencias de ADN nuclear de color azul mediante la unión a los pares de bases adenina:timina. El Phalloidin también es un colorante fluorescente que tiñe el citoesqueleto de las células de color verde.

En primer lugar se lava con DPBS-- , se fijan las células con 3.7% de formaldehído y se dejan 10 minutos en la nevera a 4 °C. A continuación, se lava dos veces para eliminar los restos de formaldehído, se añaden 500 µl en cada pocillo de tritón 0,5 v/v en DPBS++ y se deja 10 minutos a temperatura ambiente para que las células permeabilicen. Hay que tener en cuenta que el tritón es muy viscoso, por lo que hay que cortar la punta de la pipeta para poder pipetearlo.

Después, se lava y se añaden en cada pocillo 500 µl de la solución de phalloidin. La solución de phalloidin se prepara con DPBS++ (1:100 DPBS:Phalloidin). Se deja una hora en la oscuridad a temperatura ambiente. Pasada la hora se lava y se añade la solución de DAPI a

una concentración de 10 µg/ml en DPBS++. Se deja 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Por último se vuelve a lavar y se añade sacarosa al 30% en DPBS++ overnight.

Para ver los resultados del ensayo de Actina/DAPI en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Japón) , se hacen cortes y se obtienen secciones de los hidrogeles.

#### 3.13.1.Obtención de secciones de los hidrogeles cultivados mediante micrótopo criogénico

Para poder obtener secciones de los hidrogeles, éstos deben incluirse previamente en OCT y congelarse a -80°C. El OCT es un medio sintético que favorece la realización de cortes en criostato a temperaturas muy bajas.

Para hacer los cortes se emplea un micrótopo criogénico (Leica CM1520, Alemania). El micrótopo criogénico presenta un mecanismo de rotación y corte dentro de una cámara refrigerada a una temperatura de -30°C. En esta cámara se encuentra la cuchilla con la que se hacen los cortes. La muestra que se quiere cortar se adhiere con unas gotas de OCT a un soporte portamuestras, el cual se fija a un eje que avanza sobre la cuchilla. De esta forma se obtienen secciones de la muestra de espesor variable que se recogen con un portaobjetos.

#### 3.14.Análisis estadístico

Se ha llevado a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos mediante el programa Statgraphics. El análisis ha consistido en una prueba de múltiples rangos, en la que se ha demostrado si las diferencias entre varias medias eran o no significativas con p-value < 0,05.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular

En un principio el objetivo del proyecto era buscar un método de esterilización para poner a punto el procedimiento de encapsulación de células en hidrogeles de ácido hialurónico de alto peso molecular a una concentración del 2%. El problema que presenta este HA de alto peso molecular al 2% es su elevada viscosidad, que dificulta mucho su manejo y no puede ser esterilizado mediante filtración.

Se llevó a cabo la puesta a punto de 3 métodos de esterilización del HA de alto peso molecular para ensayar posteriormente la citotoxicidad de los hidrogeles con células encapsuladas.

En primer lugar se aumentó el pH de la disolución de HA de alto peso molecular al 2% para tratar de disminuir su viscosidad y así poder filtrarla. El resultado obtenido no fue el esperado, no se observaron diferencias con respecto a la disolución de HA de menor pH, puesto que continuaba teniendo un aspecto viscoso y no se podía filtrar.

Los otros dos métodos de esterilización que se probaron consistían en esterilizar el polvo liofilizado que se obtiene tras la síntesis del HA injertado con tiramina. En uno de ellos se sumergía en etanol puro y en el otro se colocaba bajo luz ultravioleta durante una hora. A continuación el polvo liofilizado esterilizado se disolvía con el buffer CF-KRB para obtener una disolución de HA a una concentración del 2%.

El inconveniente que presentaban estos métodos de esterilización seguía siendo la elevada viscosidad de la disolución de HA de alto peso molecular al 2%. Aunque la disolución ya se había esterilizado, resultó imposible llevar a cabo el cultivo celular para ensayar la citotoxicidad. Se perdía mucho HA al pipetear y era muy difícil resuspender las células.

Como consecuencia de todos los inconvenientes que presentó el HA de alto peso molecular se optó por recurrir al protocolo de degradación de HA para la obtención de un producto más líquido y más fácil de manejar.

El HA de bajo peso molecular se puede comprar, pero su precio es bastante superior que el del HA de alto peso molecular. Por ello, se recurrió al protocolo de degradación ácida del HA de alto peso molecular, para la obtención HA de menor peso molecular a un precio más asequible.

Las disoluciones de HA degradado son mucho menos viscosas que las de HA de alto peso molecular, por lo que son más fáciles de pipetear y se pueden esterilizar mediante filtración.

Se parte de 500 mg de HA de alto peso molecular, y tras el proceso de degradación se recuperan 360 mg de HA degradado. Por lo tanto, el porcentaje de pérdida de HA en la degradación es del 28%. Teniendo en cuenta que con el HA de alto peso molecular a una concentración del 2% se pierde aproximadamente la mitad de la disolución al pipetear, sale rentable llevar a cabo el protocolo de degradación.

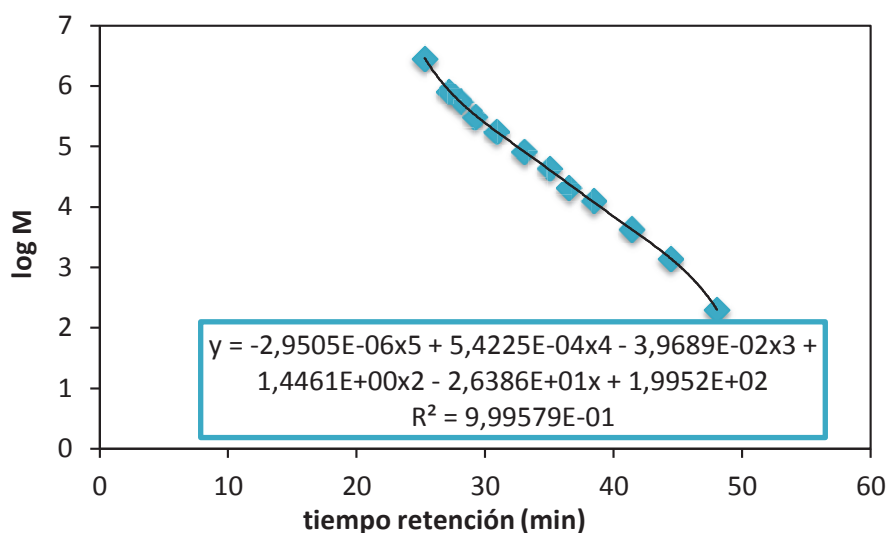


#### 4.2. Síntesis de ácido hialurónico injertado con tiramina (HA-Tyr)

El resultado de la síntesis es un polvo liofilizado de ácido hialurónico injertado con tiramina. Se forma un enlace amida entre los grupos carboxilo del ácido hialurónico y los grupos amina de la tiramina, quedando las moléculas de HA injertadas con tiramina, la cual proporciona los grupos fenol necesarios para llevar a cabo el posterior entrecruzamiento.

#### 4.3. Peso molecular

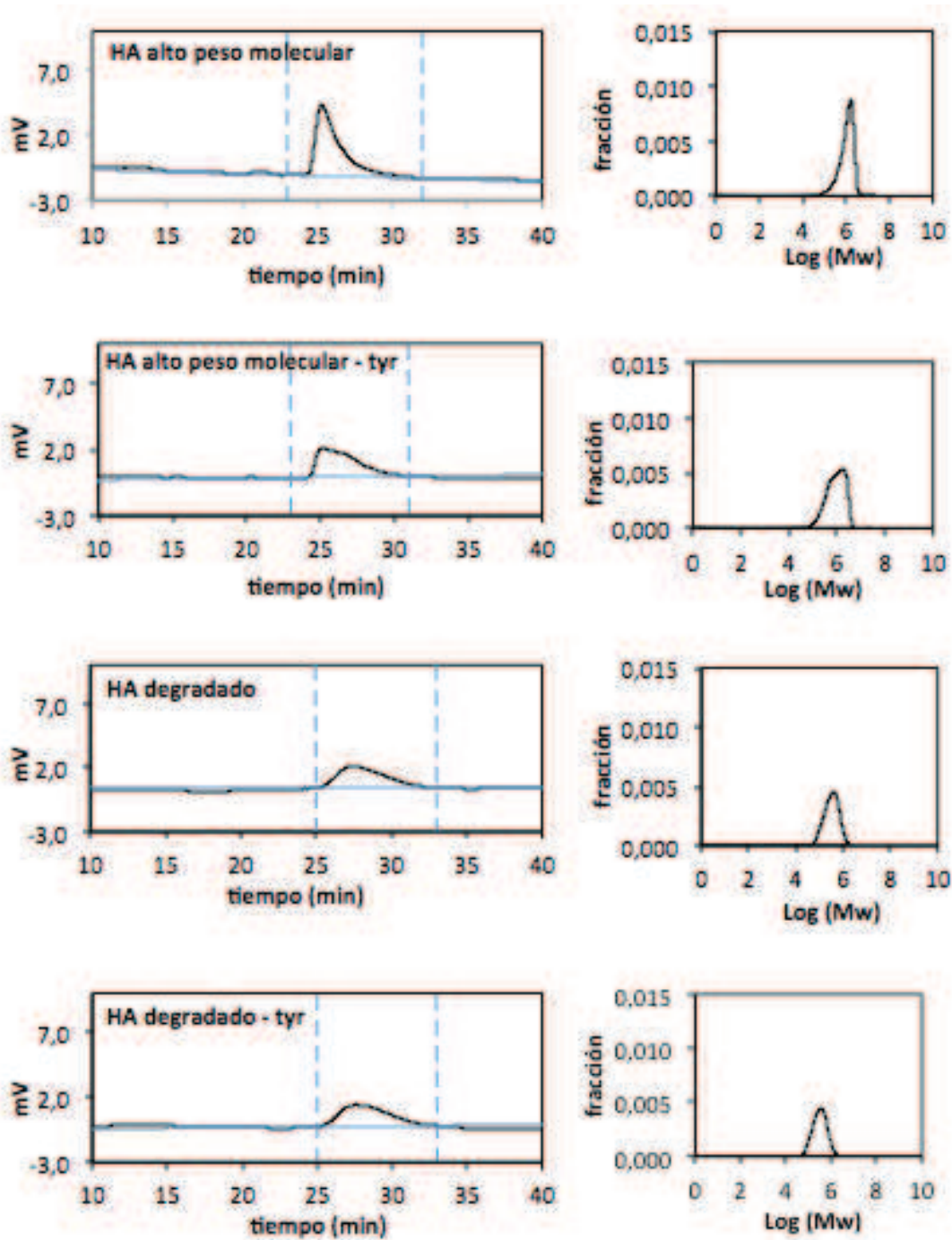
Se determina el peso molecular del HA de alto peso molecular y del HA degradado antes y después del injerto de tiramina. En primer lugar se construye una recta de calibrado utilizando unos patrones de PEO de peso molecular conocido (figura 4).



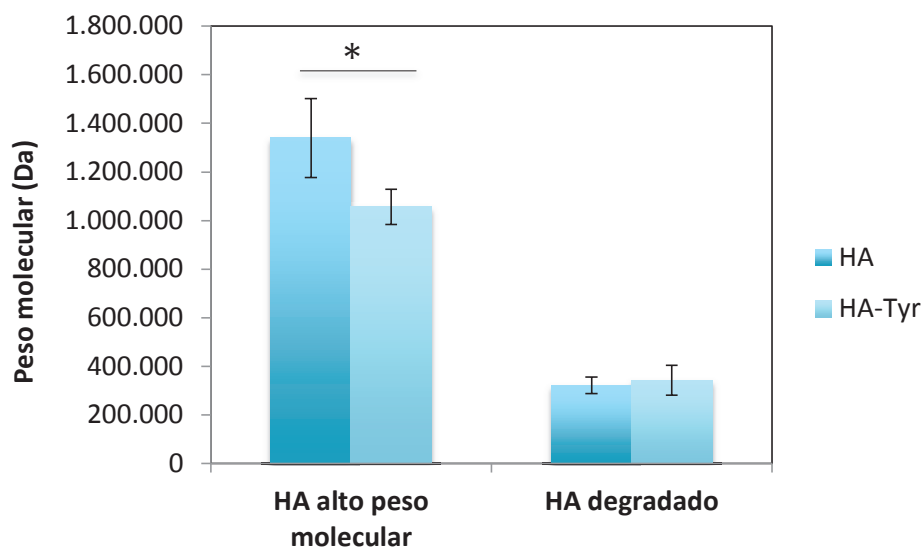
**Figura 4.** Curva de calibrado patrones Cromatógrafo de Permeación de Gel (GPC) para determinar el peso molecular del ácido hialurónico (HA).

En la figura 5 se observan las gráficas con la distribución de los pesos moleculares. Cuanto mayor es el peso molecular, el pico sale más alto y más estrecho, puesto que el HA atraviesa más rápido las columnas y llega antes al detector.

En la figura 6 se reflejan los resultados obtenidos tras las medidas del peso molecular con el GPC. Se observa una gran disminución en el peso molecular del HA tras el proceso de degradación, de 1.340.295 Da del HA de alto peso molecular a 321.149 Da del HA degradado. El HA de alto peso molecular sin injerto de tiramina presenta un mayor peso molecular que el HA con injerto de tiramina. Aunque este resultado no es el esperado, tampoco es de extrañar, puesto que durante el proceso de síntesis de HA en el que tienen lugar el injerto de tiramina, el HA en disolución puede hidrolizarse. En el HA degradado no ocurre lo mismo, la diferencia entre el HA degradado sin injerto y con injerto de tiramina no es significativa, probablemente porque el HA ya está muy degradado.



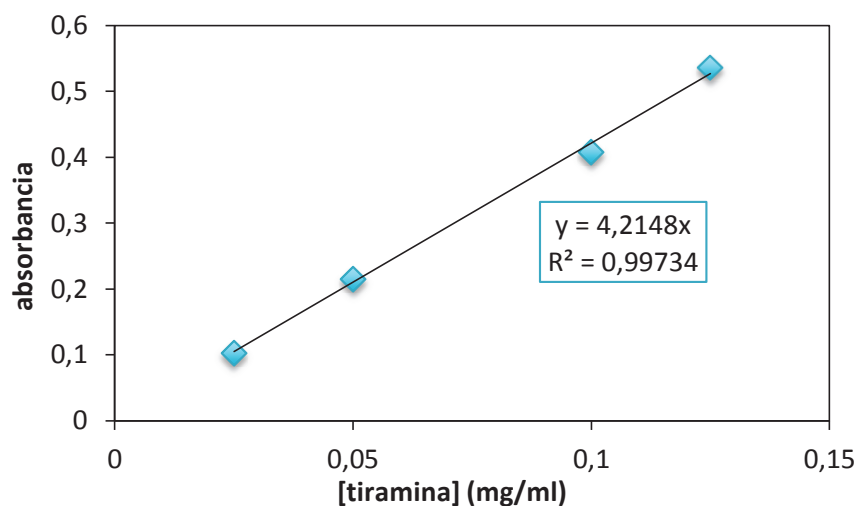
**Figura 5.** Curvas de distribución de pesos moleculares en el Cromatógrafo de Permeación de Gel (GPC). Se ha medido el peso molecular del el ácido hialurónico (HA) de alto peso molecular con injerto y sin injerto de tiramina (Tyr) y del el ácido hialurónico degradado (HAdeg) con injerto y sin injerto de tiramina. La curva de la izquierda es sin tratar y la derecha es tratada.



**Figura 6.** Resultados medidas del peso molecular con el Cromatógrafo de Permeación de Gel (GPC). Medidas para el ácido hialurónico de alto peso molecular (HA alto peso molecular) sin injerto (HA) y con injerto de tiramina (HA-tyr) y para el ácido hialurónico degradado (HA degradado) sin injerto (HA) y con injerto de tiramina (HA-Tyr). El asterisco indica que existe una diferencia significativa.

#### 4.4. Grado de injerto de la tiramina

Se mide la absorbancia del HA de alto peso molecular y del HA degradado injertado con tiramina con el espectrofotómetro UV a 275 nm. A partir de los datos de absorbancia obtenidos y con ayuda de la recta de calibrado (figura 7) se determina el grado de injerto de los grupos tiramina en el HA.



**Figura 7.** Recta de calibrado para determinar la concentración de tiramina (mg/ml).

El HA de alto peso molecular presenta un mayor grado de sustitución que el HA degradado. Cuanto mayor es el grado de sustitución de los grupos tiramina en el HA, el grado de reticulación del gel formado es mayor. Por ello, los hidrogeles obtenidos a partir HA de alto peso molecular tendrán un mayor grado de reticulación que los de HA degradado y por tanto se espera que tengan una mayor resistencia mecánica y una menor capacidad de absorber agua.

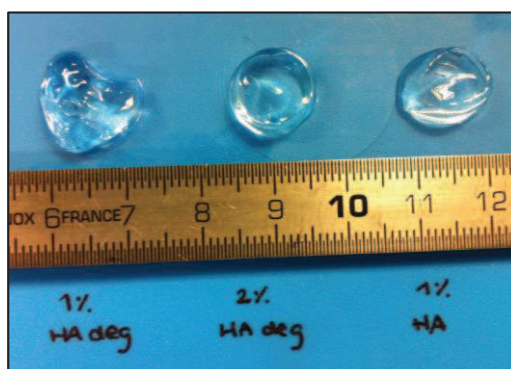
**Tabla 4.** Resultados grado de injerto (mol grupos fenol/mg HA) y grado de sustitución (%) para el ácido hialurónico (HA) de alto peso molecular y para el ácido hialurónico degradado (HA degradado). El grado de sustitución corresponde al número de grupos COOH del ácido hialurónico que han reaccionado con los grupos NH<sub>2</sub> de la tiramina con respecto al total que podían reaccionar.

	Grado de injerto (mol grupos fenol/mg HA)	Grado de sustitución (%)
HA alto peso molecular	$1,23 \cdot 10^{-7}$	4,66
HA degradado	$9,69 \cdot 10^{-8}$	3,65

#### 4.5. Formación de hidrogeles. Entrecruzamiento enzimático

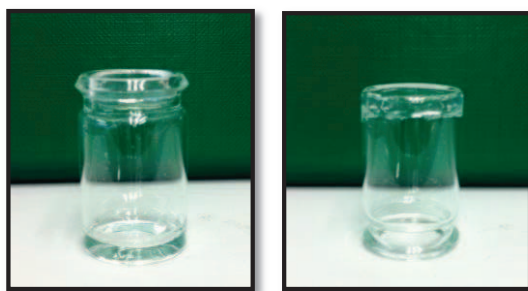
Los hidrogeles se obtienen mediante entrecruzamiento enzimático. Tiene lugar una reacción de oxidación catalizada por la peroxidasa (HRP), la cual utiliza como sustrato el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para formar un enlace covalente entre los grupos fenol de la tiramina. Se forman múltiples enlaces entre tiraminas adyacentes obteniéndose una red tridimensional (hidrogel).

Se obtuvieron hidrogeles de HA de alto peso molecular y de HA degradado a unas concentraciones del 1 y 2% (w/v) (Figura 8). A mayor concentración y mayor peso molecular del HA los hidrogeles presentan un mayor grado de reticulación. Por ello, los hidrogeles de HA de alto peso molecular al 2% son los más resistentes y por tanto son más fáciles de manipular, aunque debido a su elevada viscosidad no se consigue obtener un hidrogel uniforme. Los hidrogeles de HA de alto peso molecular al 1% y los de HA degradado al 2% presentan un aspecto bastante similar, son consistentes y mantienen bien la forma. Los hidrogeles de HA degradado al 1% son bastante más blandos y se deforman y se rompen con mucha facilidad.



**Figura 8.** Hidrogeles de ácido hialurónico (HA). Hidrogeles de ácido hialurónico degradado al 1% (1%HA deg), HA degradado al 2% (2%HA deg) y HA de alto peso molecular al 1% (1%HA).

El tiempo de gelificación se determina con el método del vial invertido junto con el uso de una espátula como se explica en el apartado 3.4. de materiales y métodos. (figura 9).



**Figura 9.** Método del vial invertido para la determinación del tiempo de gelificación de los hidrogeles.

Los tiempos de gelificación están reflejados en la tabla 5. Para el HA de alto peso molecular el tiempo de gelificación aumenta al aumentar la concentración de la disolución. Esto es así porque al aumentar la concentración aumenta la viscosidad y por tanto la difusión de la enzima es peor y tarda más en gelificar. Para el HA degradado no varía el tiempo de gelificación al aumentar la concentración porque la disolución ya es lo suficientemente líquida como para que la enzima difunda con facilidad. El tiempo de gelificación del HA degradado es ligeramente mayor que el del HA de alto peso molecular. Esto se debe al menor grado de sustitución de tiramina del HA degradado, lo que implica que hay menos grupos fenol disponibles para llevar a cabo el entrecruzamiento.

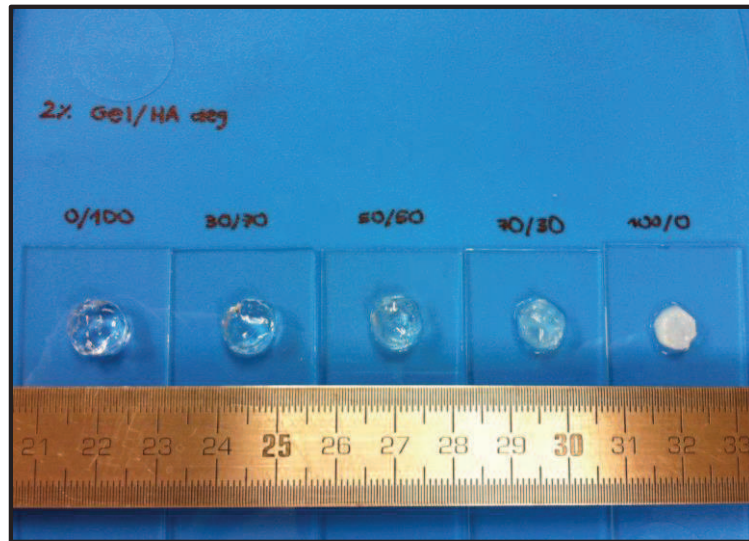
**Tabla 5.** Tiempo de gelificación hidrogeles de ácido hialurónico (HA) de alto peso molecular y degradado a concentraciones del 1 y 2%.

HIDROGEL	TIEMPO DE GELIFICACIÓN
HA alto peso molecular al 1%	7 minutos
HA alto peso molecular al 2%	8 minutos
HA degradado al 1%	8.30 minutos
HA degradado al 2%	8.30 minutos

Se prepararon unos hidrogeles mezcla gelatina/ácido hialurónico degradado (gel/HAdeg) a una concentración del 2% con distintas composiciones (v/v) (0/100, 30/70, 50/50, 70/30 y 100/0) (figura 10). De esta forma se pretendía comprobar cómo se mezclan los dos componentes en un mismo hidrogel para así asegurar su aplicabilidad. En un futuro se pretende caracterizar estos hidrogeles para obtener un scaffold mezcla proteína/polisacárido que sea más similar a la matriz extracelular del cartílago articular.

Como se ve en la figura 10, el hidrogel puro de ácido hialurónico degradado es transparente y presenta una forma más definida y de mayor tamaño. Conforme aumenta la composición de gelatina, el hidrogel adquiere un aspecto más blanquecino y de menor tamaño, puesto que la gelatina absorbe menos cantidad de agua.

Hay una buena homogenización de los dos componentes, no se observa separación de fases entre zonas más ricas en HA y zonas más ricas en gelatina. Además los tiempos de gelificación son bastante homogéneos, toda la serie gelifica entre 5 y 6 minutos, a excepción del hidrogel puro de HA degradado que tarda más en gelificar.



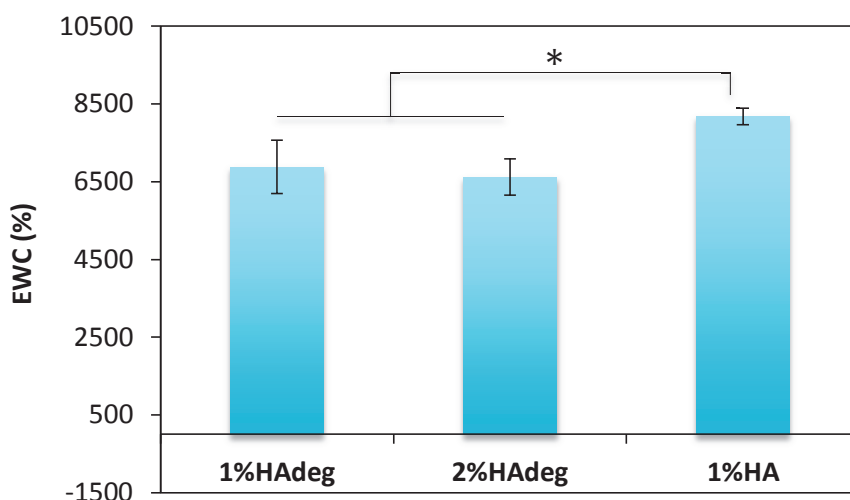
**Figura 10.** Hidrogeles mezcla gelatina/ácido hialurónico degradado (Gel/HAdeg) al 2%. A la izquierda hidrogel puro de HA degradado (0/100), hacia la derecha va aumentando la composición de gelatina (30/70), (50/50) y (70/30), hasta llegar al hidrogel de la derecha es puro de gelatina.

#### 4.6. Ensayo de hinchado

Se llevó a cabo el ensayo de grado de hinchado en los hidrogeles de HA degradado al 1%, HA degradado al 2% y HA de alto peso molecular al 1% para determinar la cantidad de agua que es capaz de retener cada hidrogel. El contenido de agua de un hidrogel tiene una gran influencia en las sus propiedades mecánicas, en el comportamiento elástico y en la rigidez del mismo. Además, la difusión y el intercambio de nutrientes y de productos de desecho de las células cultivadas en los hidrogeles también están relacionadas con sus capacidades de hinchado. (Correia et al., 2011)

El grado de hinchado de los de los hidrogeles depende de su estructura molecular, de la densidad de entrecruzamiento y de la formación de enlaces covalentes y no covalentes. A mayor peso molecular y mayor cantidad de HA, los hidrogeles presentan una mayor capacidad para retener agua, mientras que cuanto mayor es el grado de entrecruzamiento, los hidrogeles presentan una estructura más compacta y tienen menor capacidad para retener agua. (Ouasti et al., 2011).

En la figura 11 se observa como los hidrogeles de HA de alto peso molecular tienen una mayor capacidad para absorber agua que los hidrogeles de HA degradado. Esto indica que la disminución del peso molecular influye más en la capacidad para retener agua de los hidrogeles que el grado de reticulación. Para los hidrogeles de HA degradado no se observan diferencias significativas con respecto al grado de hinchado, aunque se esperaría que los hidrogeles al 1% presentaran mayor capacidad para retener agua puesto que presentan un menor grado de reticulación.



**Figura 11.** Resultados contenido de agua en equilibrio (EWC). EWC para los hidrogeles de ácido hialurónico degradado al 1% (1%HAdeg), de ácido hialurónico degradado al 2% (2%HAdeg) y de ácido hialurónico de alto peso molecular al 1% (1%HA). El asterisco indica que los hidrogeles de ácido hialurónico de alto peso molecular al 1% presentan diferencias significativas en cuanto al contenido de agua en equilibrio con respecto a los hidrogeles de ácido hialurónico degradado tanto al 1 como al 2%.

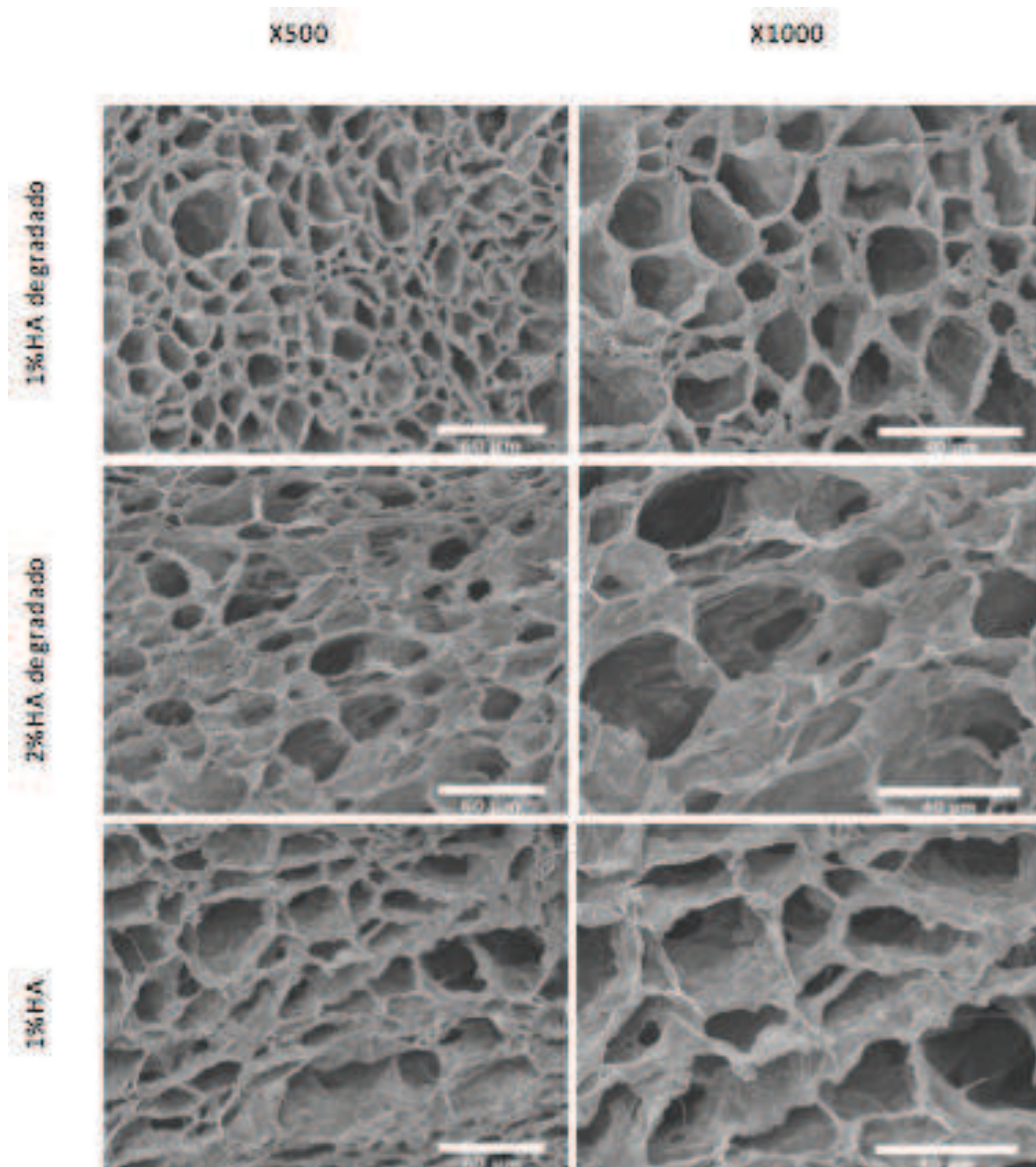
#### 4.7. Morfología

Los hidrogeles sintetizados para el ensayo de hinchado (hidrogeles de HA degradado al 1%, HA degradado al 2% y HA de alto peso molecular al 1%) se observaron al microscopio electrónico de barrido (SEM) para ver su estructura y sus principales características microscópicas.

En la figura 12 se muestran las imágenes obtenidas para cada uno de los hidrogeles ensayados. Todos ellos muestran una estructura de poros irregulares interconectados.

Comparando la estructura microscópica de los hidrogeles de HA degradado se observa que estos hidrogeles a una concentración del 1% presentan una estructura porosa más organizada, con un mayor número de poros de menor tamaño que los hidrogeles al 2%. Además, los hidrogeles a una concentración del 2%, presentan un mayor grosor de las paredes de los poros debido a una mayor concentración del polímero.

Los hidrogeles de HA degradado al 1% presentan un aspecto similar a los de HA de alto peso molecular a la misma concentración, aunque éstos últimos tienen un tamaño de poro mayor. Esto probablemente es debido a la mayor capacidad para retener agua que presentan los hidrogeles de HA de alto peso molecular.



**Figura 12.** Imágenes de SEM. Imágenes obtenidas a distintos aumentos (500X y 1000X) para los hidrogeles de ácido hialurónico degradado al 1% (1%HA degradado), ácido hialurónico degradado al 2% (2%HA degradado) y ácido hialurónico de alto peso molecular al 1% (1%HA).

#### 4.8. MTS

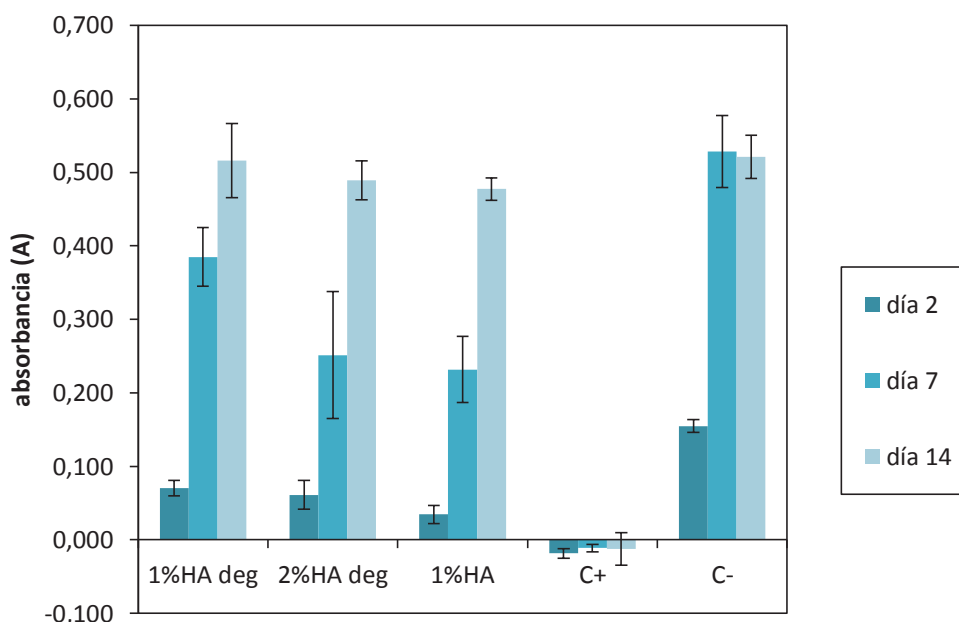
Se llevó a cabo un ensayo MTS a días 2, 7 y 14 (figura 13) para evaluar la actividad metabólica de las células cultivadas en los hidrogeles. En este ensayo se mide la absorbancia del formazán, producto de la reacción de reducción del MTS que tiene lugar en las células vivas. Estas medidas de absorbancia proporcionan información sobre la actividad proliferativa de los fibroblastos cultivados.



Los fibroblastos son células adherentes, cuya supervivencia depende tanto de la difusión de nutrientes y de productos de desecho como de las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular. El HA es un compuesto hidrofílico y no iónico en el que la insignificante adsorción de proteínas, así como la falta de fuerzas de adhesión polares dificultan la adhesión de los fibroblastos. Además la adhesión celular también disminuye al aumentar el peso molecular del HA. (Ouasti et al., 2011)

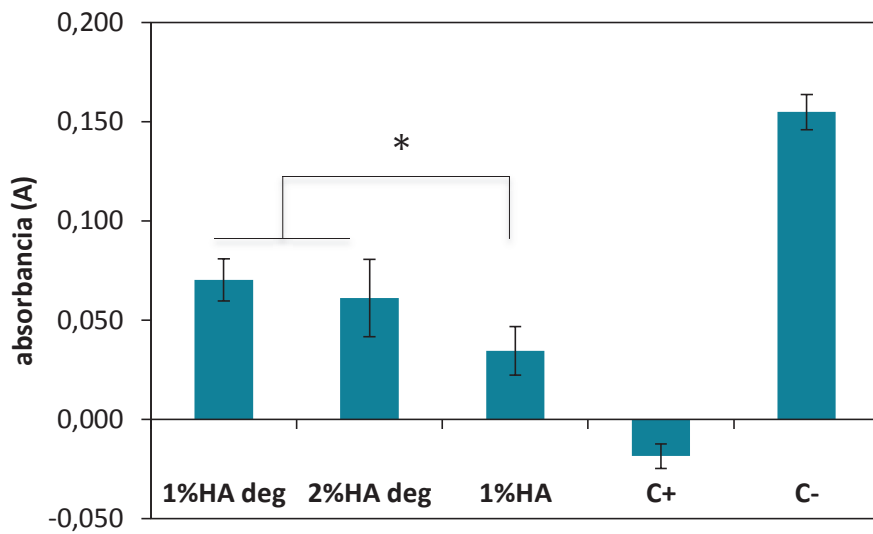
Debido a la falta de puntos de unión entre las células y el HA, muchas de las células cultivadas salen fuera del hidrogel y se adhieren al fondo del pocillo. Hay que tener en cuenta que el ensayo MTS se realizó en el mismo pocillo en el que se cultivaron las células, por lo que los valores de absorbancia obtenidos corresponden tanto a las células que se encuentran encapsuladas en el interior del hidrogel como a aquellas que han proliferado fuera de él.

Los valores de absorbancia aumentan con el paso de los días, lo que implica que las células proliferan tanto dentro como fuera de los hidrogeles de HA al menos hasta 14 días en cultivo.



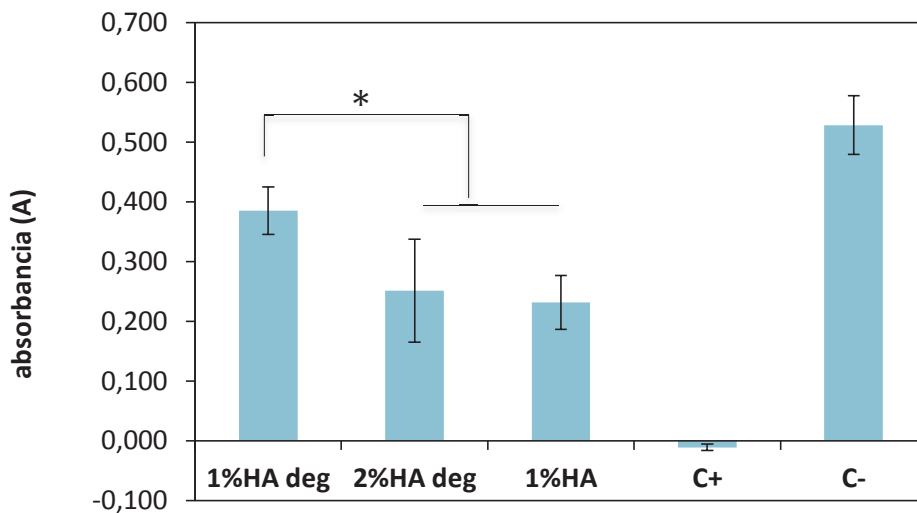
**Figura 13.** Resultados absorbancia ensayo MTS a día 2, 7 y 14. Medidas de absorbancia del formazán para los hidrogeles de ácido hialurónico degradado al 1% (1%HAdeg), de ácido hialurónico degradado al 2% (2%HAdeg), de ácido hialurónico de alto peso molecular al 1% (1%HA) y los controles positivo (C+) y negativo (C-).

En la figura 14 se muestran los resultados del ensayo MTS a día 2. Las células no han empezado a proliferar fuera del hidrogel, por lo que se considera que los valores de absorbancia obtenidos corresponden únicamente a las células que se encuentran encapsuladas dentro de los hidrogeles. Se observa una mayor proliferación celular en los hidrogeles de HA degradado que en los de HA de alto peso molecular, puesto que al aumentar el peso molecular del HA disminuye la adhesión celular, y por lo tanto la proliferación es menor. (Ouasti et al., 2011)



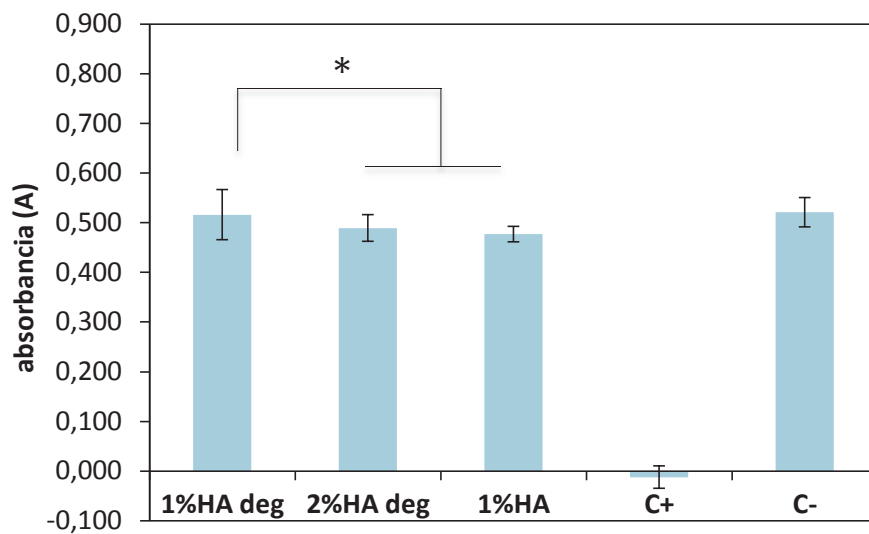
**Figura 14.** Resultados de absorbancia ensayo MTS a día 2. Los asteriscos relacionan las muestras que presentan diferencias significativas.

A día 7 (figura 15) se observa una mayor proliferación celular en los hidrogeles de HA degradado al 1%. Esto se atribuye al menor grado de reticulación y al mayor tamaño de poro de estos hidrogeles, lo que facilita que las células migren fuera del hidrogel y proliferen a mayor velocidad.



**Figura 15.** Resultados de absorbancia ensayo MTS a día 7. Los asteriscos relacionan las muestras que presentan diferencias significativas.

A día 16 (figura 14), aunque sigue habiendo una mayor proliferación celular en los hidrogeles de HA degradado al 1%, las diferencias entre los tres tipos de hidrogeles son mucho menores. Aunque a tiempos cortos salen más células en los hidrogeles de HA degradado al 1%, a tiempos largos las células acaban migrando fuera en los tres tipos de hidrogeles, alcanzando prácticamente la concentración celular del control negativo.



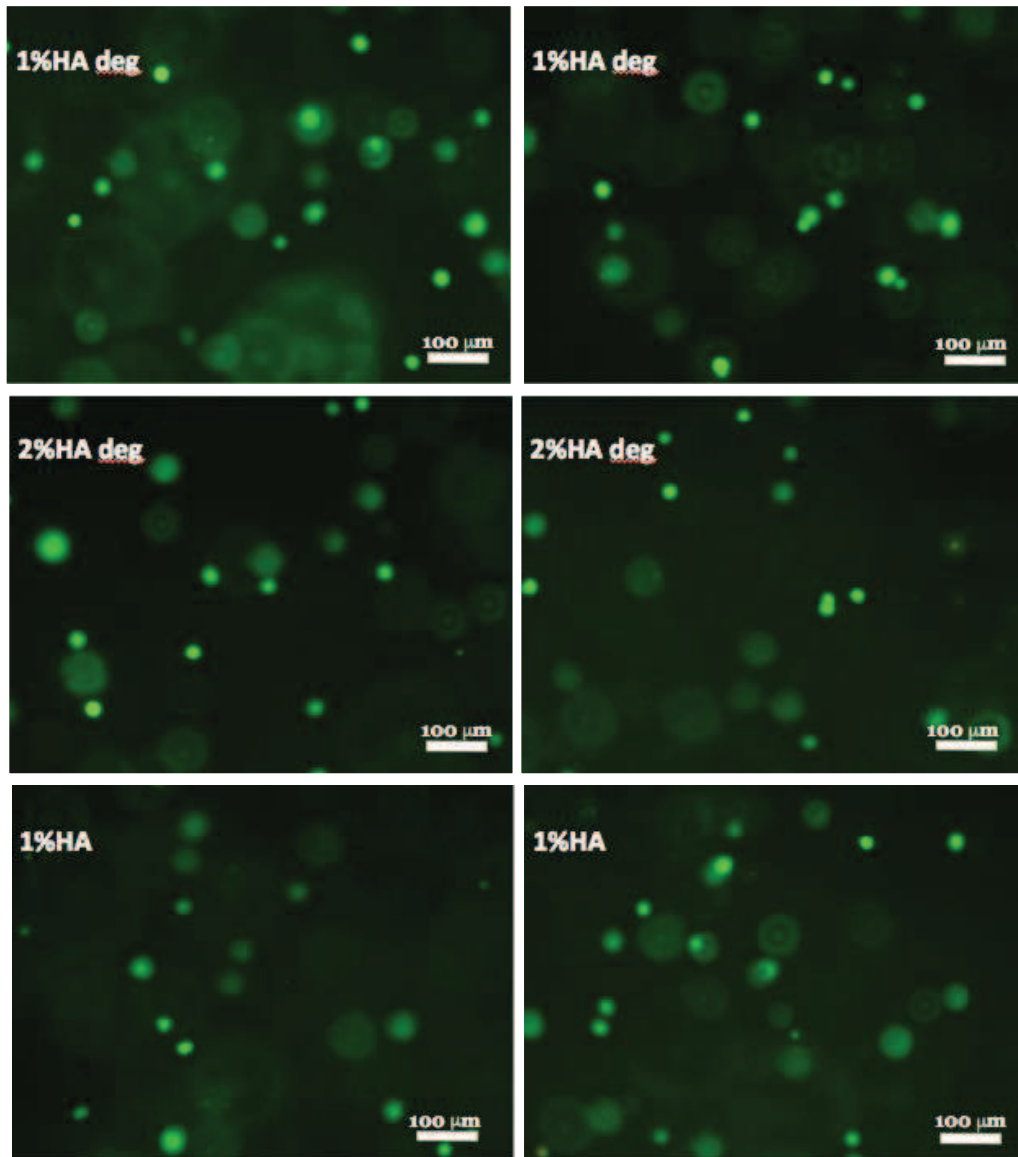
**Figura 16.** Resultados de absorbancia ensayo MTS a día 14. Los asteriscos relacionan las muestras que presentan diferencias significativas.

#### 4.9. Live/Dead

El ensayo Live/Dead permite evaluar la viabilidad de las células cultivadas en los distintos tipos de hidrogeles de HA a largo plazo. Se distinguen las células vivas de las muertas mediante tinción fluorescente con calceína y etidio, quedando las células vivas de color verde y las muertas de color rojo.

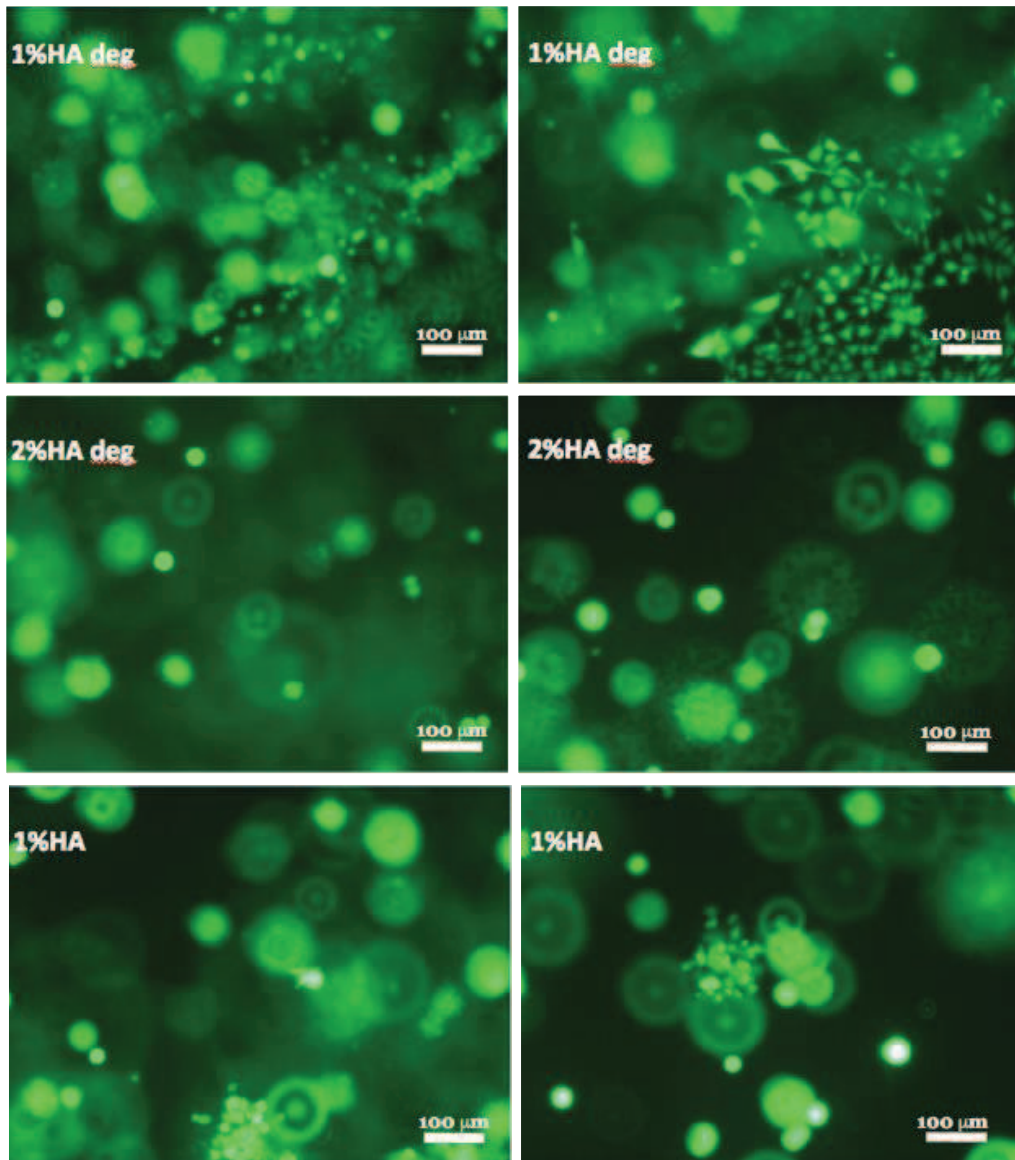
Las figuras 17, 18 y 19 muestran los resultados de los ensayos de Live/Dead a día 2, 7 y 14 respectivamente. Todas las células se tiñen de color verde, lo que indica que la difusión de nutrientes y de productos de desecho a través de la matriz es suficiente para mantener la viabilidad celular al menos 14 días en cultivo in vitro, y además que ninguno de los hidrogeles de HA es citotóxico.

A día 2 (figura 17) las células se encuentran distribuidas de forma homogénea en el interior de los hidrogeles manteniendo su forma redondeada. No se observan diferencias en la distribución celular entre los distintos tipos de HA.



**Figura 17.** Resultados ensayo Live/Dead a día 2. El ensayo se ha llevado a cabo en hidrogeles de ácido hialurónico degradado al 1% (1%HAdeg), hidrogeles de HA degradado al 2% (2%HAdeg), e hidrogeles de HA de alto peso molecular al 1% (1%HA).

A día 7 (figura 18) las células proliferan dentro y fuera del hidrogel. Las células que migran fuera del hidrogel se adhieren al cubre de vidrio del fondo del pocillo y crecen en monocapa. Estas células empiezan a diferenciarse adquiriendo las prolongaciones del citoesqueleto características de los fibroblastos. Las células que proliferan dentro del hidrogel empiezan a adherirse unas a otras formando agregados celulares y manteniendo la forma redondeada.



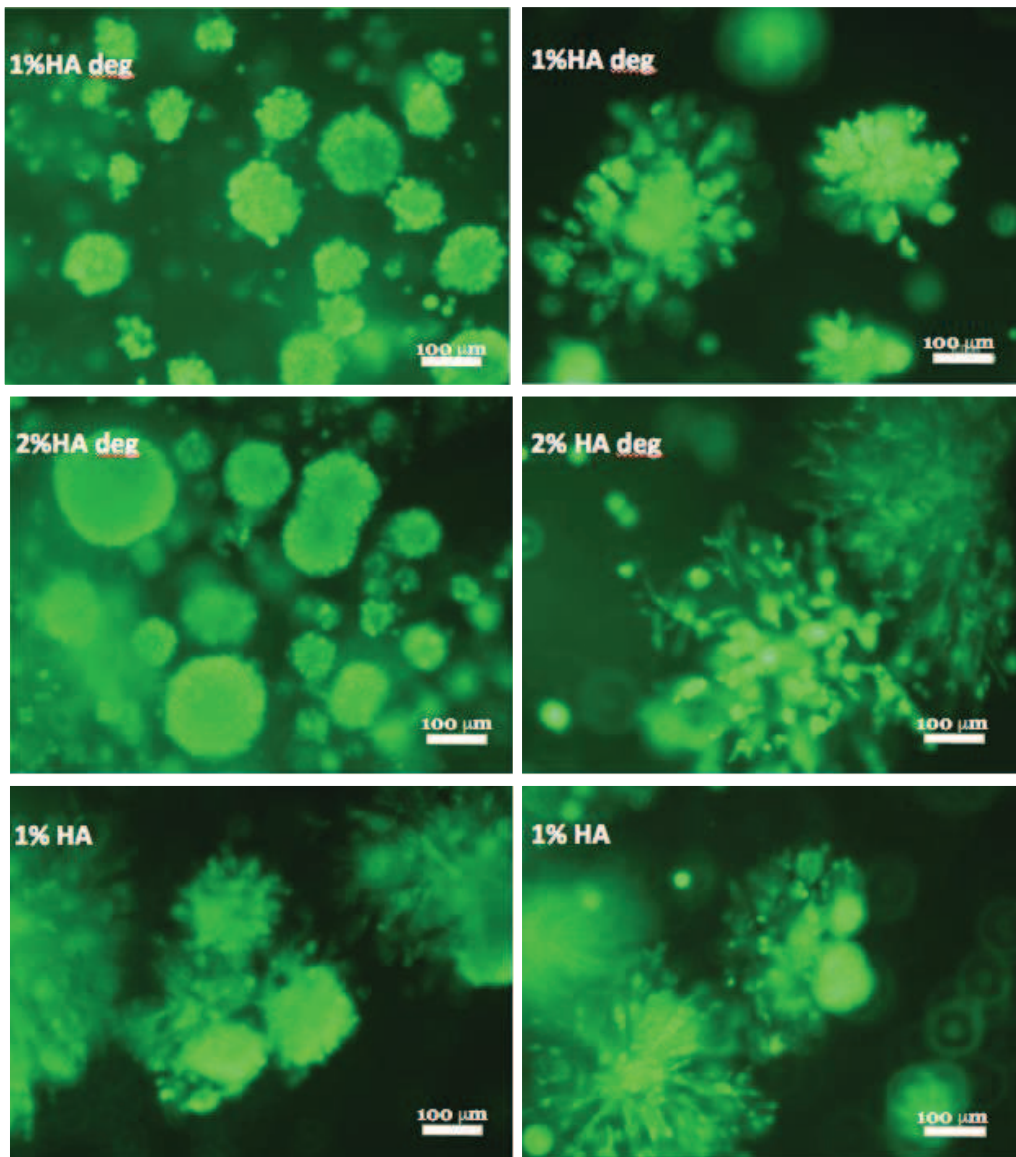
**Figura 18.** Resultados ensayo Live/Dead a día 7. El ensayo se ha llevado a cabo en hidrogeles de ácido hialurónico degradado al 1% (1%HAdeg), hidrogeles de HA degradado al 2% (2%HAdeg), e hidrogeles de HA de alto peso molecular al 1% (1%HA).

La mayoría de células necesitan adherirse a un sustrato para extenderse sobre él y proliferar. Una mala adherencia al sustrato puede inhibir la proliferación celular promoviendo la formación de grandes agregados celulares. En los hidrogeles de HA a día 14 (figura 19) se observa este fenómeno en el que las células establecen interacciones célula-célula y forman grandes agregados con forma redondeada. Esta respuesta celular se atribuye a las propiedades químicas del HA, que limitan o dificultan la adhesión de los fibroblastos. Además la superficie rugosa de los poros del hidrogel también dificulta el anclaje. (Janvikul et al., 2007).

Las adhesiones focales célula-matriz extracelular están mediadas por integrinas. Las integrinas son una familia de receptores de superficie celular que median la unión de las células a la matriz extracelular. Los receptores de las integrinas presentan un papel muy importante en la organización del citoesqueleto celular así como en la transmisión de señales desde la matriz extracelular hasta el interior celular. (Cukierman et al., 2001). Se puede inducir la interacción de las células con el HA para promover la supervivencia, la proliferación y la

diferenciación celular proporcionando señales biológicas presentes en la matriz extracelular nativa del tejido que promuevan la adhesión y la proliferación celular. Un ejemplo de esto es la secuencia RGD, presente en varias proteínas y tejidos del cuerpo. Estas secuencias se pueden introducir en las cadenas poliméricas que forman el hidrogel para promover la adhesión celular al material a través de los receptores de integrina. (Lam et al., 2014)

Se mantiene la viabilidad celular al menos hasta el día 14, pero se espera que llegado un determinado momento, las células de los agregados mueran por falta de difusión de nutrientes y de productos de desecho.



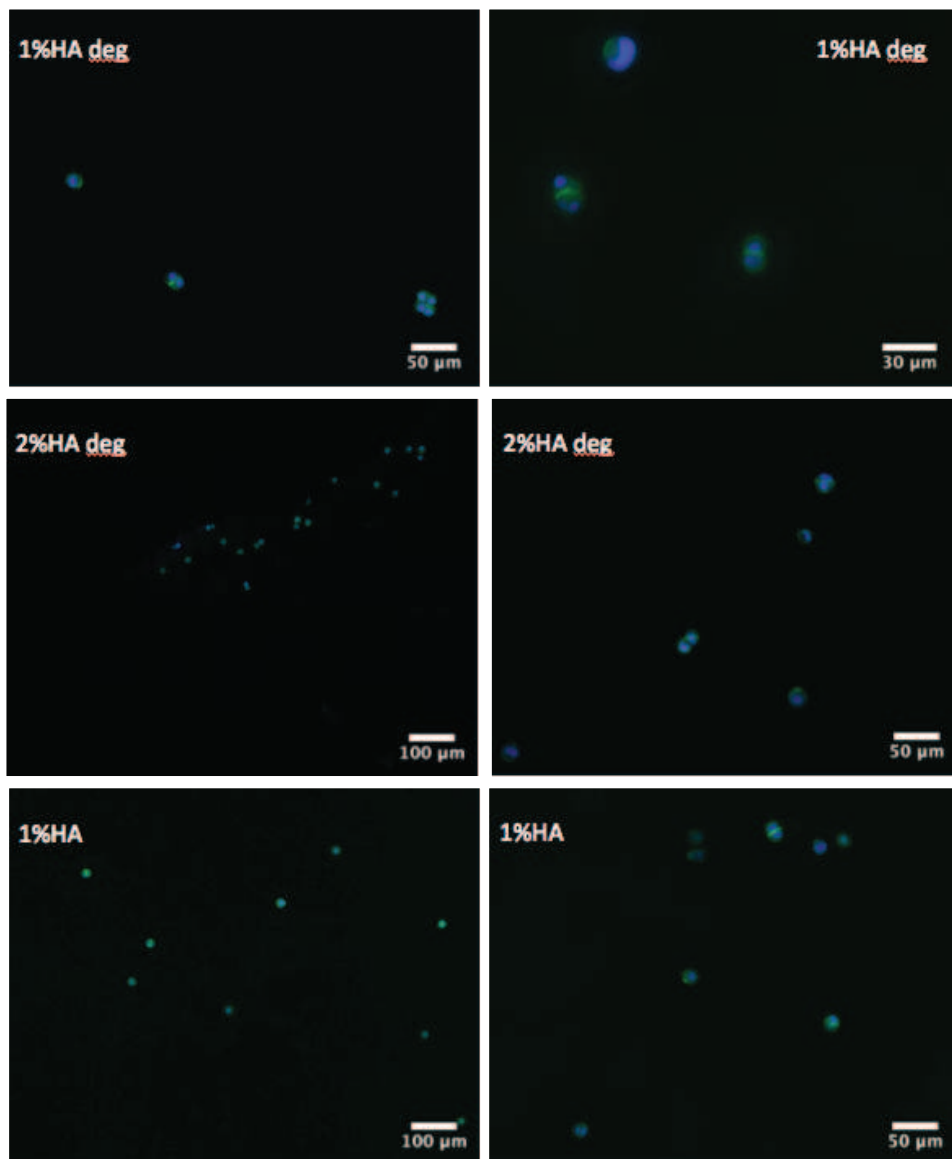
**Figura 19.** Resultados ensayo Live/Dead a día 14. El ensayo se ha llevado a cabo en hidrogeles de ácido hialurónico degradado al 1% (1%HAdeg), hidrogeles de HA degradado al 2% (2%HAdeg), e hidrogeles de HA de alto peso molecular al 1% (1%HA).

#### 4.10. Actina/DAPI

En el ensayo Actina/DAPI se hace una tinción fluorescente del núcleo (azul) y del citoesqueleto (verde) para ver la estructura celular.

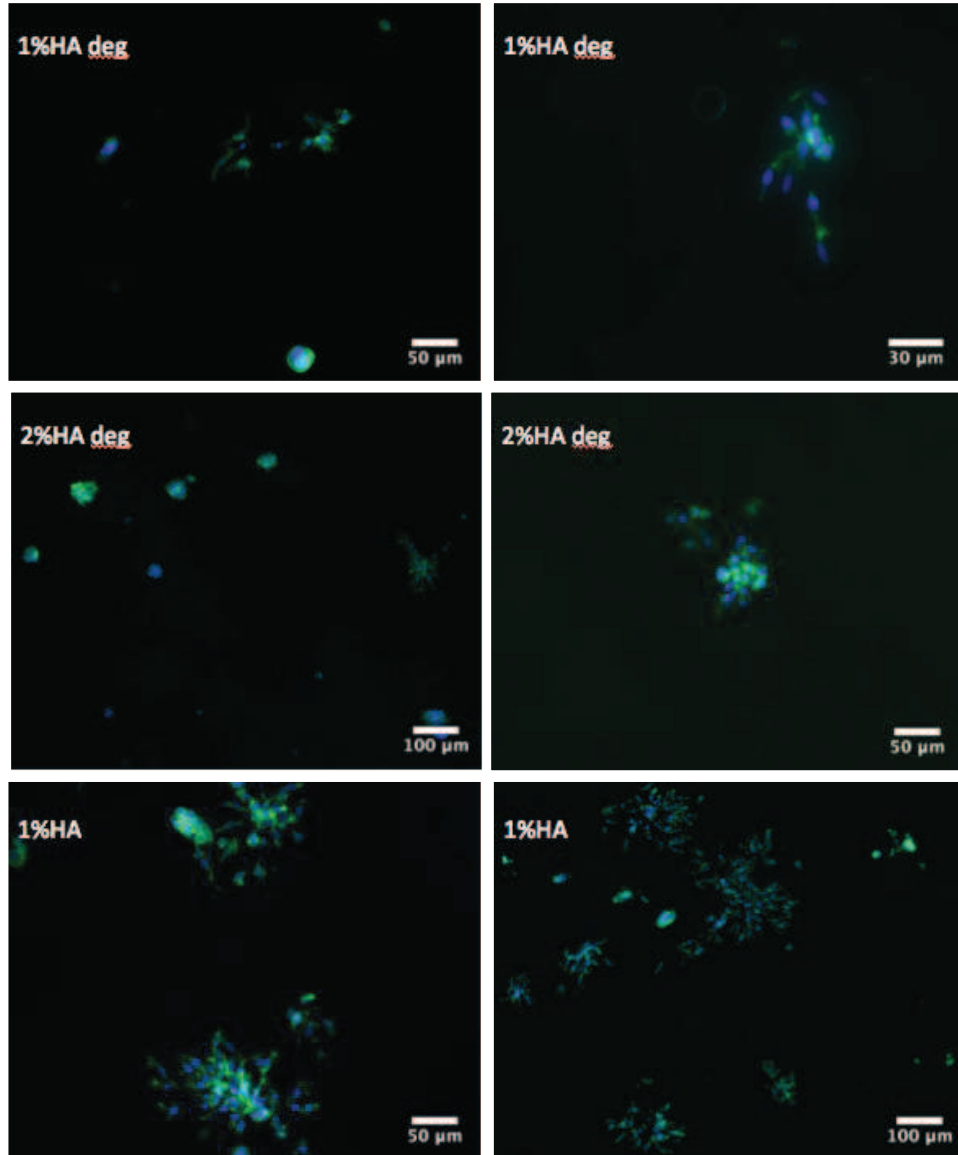
Por lo general, los fibroblastos encapsulados en cualquier matriz 3D tienden a mostrar un fenotipo del citoesqueleto menos desarrollado, con menos prolongaciones y una menor propagación celular que en las matrices 2D (Hakkinen et al., 2011)

A día 2 (figura 20) no se observan diferencias entre los distintos tipos de hidrogeles. En todos ellos hay muy pocas células, algunas de ellas en división, distribuidas de forma homogénea. Las células tienen el citoesqueleto muy poco desarrollado, lo que indica que no se han adherido al hidrogel.



**Figura 20.** Resultados tinción celular DAPI/Actina a día 2. Ensayo en hidrogeles de ácido hialurónico degradado al 1% (1%HAdeg), HA degradado al 2% (2%HAdeg) y HA de alto peso molecular (1%HA).

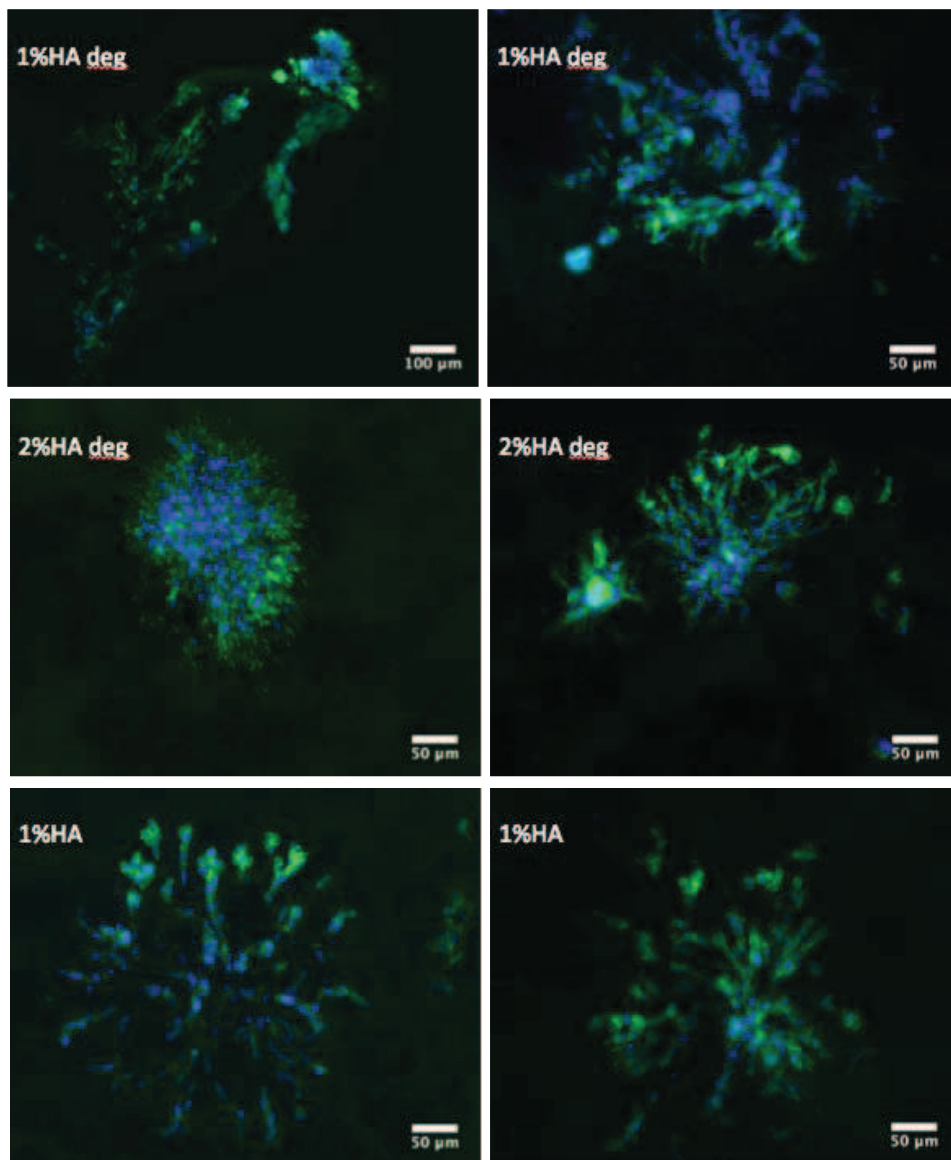
A día 7 (figura 21) las células establecen interacciones entre ellas y ya se empiezan a formar los agregados celulares. Cuando esto ocurre, los fibroblastos desarrollan y difunden fibras de estrés, a diferencia de las células observadas a día 2, donde las células permanecían aisladas unas de otras y mantenían su morfología redondeada. (Yeung et al., 2005)



**Figura 21.** Resultados tinción celular DAPI/Actina a día 7. Ensayo en hidrogeles de ácido hialurónico degradado al 1% (1%HAdeg), HA degradado al 2% (2%HAdeg) y HA de alto peso molecular (1%HA).

A día 14 (figura 22), los agregados celulares han aumentado considerablemente su tamaño. Se observa como en los hidrogeles de HA de alto peso molecular las células se aglutinan menos que en los hidrogeles de HA degradado, esto probablemente se deba al mayor grado de reticulación de los hidrogeles de HA de alto peso molecular, que dificulta la migración de las células y por tanto su aglutinación. Además también parece que en los hidrogeles de HA de alto peso molecular la adhesión de las células al polímero es mayor, seguramente debido al mayor peso molecular de las cadenas de HA.





**Figura 22.** Resultados tinción celular DAPI/Actina a día 14. Ensayo en hidrogeles de ácido hialurónico degradado al 1% (1%HAdeg), HA degradado al 2% (2%HAdeg) y HA de alto peso molecular al 1% (1%HA).

## 5. CONCLUSIONES

Se ha obtenido HA degradado, el cual presenta una menor viscosidad que el HA de alto peso molecular. De esta forma se solucionan los problemas que presenta el HA alto peso molecular, el cual se pipetea con dificultad y no puede ser esterilizado mediante filtración.

Se ha determinado el peso molecular del HA de alto peso molecular y del HA degradado con y sin injerto de tiramina. Se observa una gran disminución en el peso molecular tras el proceso de degradación. También se ha medido el grado de injerto de los grupos fenol de la tiramina en el HA de alto peso molecular y en el HA degradado. El degradado presenta un grado de sustitución menor, lo que implica que los hidrogeles obtenidos a partir de él tendrán un menor grado de reticulación.

Se han obtenido hidrogeles de HA degradado y de HA de alto peso molecular a unas concentraciones del 1 y del 2% (w/v) mediante la reacción de entrecruzamiento enzimático con la peroxidasa (HRP) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

Los hidrogeles de HA de alto peso molecular al 2% se han descartado debido a su elevada viscosidad. Los hidrogeles de HA degradado al 2% y de HA de alto peso molecular al 1% presentan un aspecto macroscópico similar, son resistentes y mantienen bien la forma. En cambio los hidrogeles de HA degradado al 1% son demasiado frágiles y se rompen con facilidad.

En cuanto al contenido de agua en equilibrio, se ha determinado que los hidrogeles de HA de alto peso molecular presentan un mayor grado de hinchado y por tanto son capaces de retener mayor cantidad de agua que los hidrogeles de HA degradado. Esto es debido al mayor peso molecular del HA.

Con el SEM se ha estudiado la morfología de los hidrogeles y se ha observado que todos ellos presentan una estructura de poros irregulares interconectados. Esta estructura porosa junto con el contenido de agua en equilibrio es imprescindible para permitir la difusión de nutrientes y de productos de desecho a través del scaffold necesarios para mantener la supervivencia de las células.

Por último se han llevado a cabo diferentes ensayos de citotoxicidad. De esta forma se ha comprobado que los hidrogeles no son citotóxicos y que se mantiene la viabilidad celular al menos hasta 14 días en cultivo. Con estos ensayos también se ha podido ver la falta de adhesión de las células al HA. Los primeros días de cultivo, los fibroblastos aislados mantienen la forma redondeada y el citoesqueleto poco desarrollado. Con el paso de los días aumenta la población celular, se establecen interacciones célula-célula y se forman grandes agregados celulares.

Por todo ello, se ha cumplido el objetivo del trabajo, y se ha obtenido un producto válido para la obtención de hidrogeles biodegradables inyectables para la regeneración de cartílago articular. Se escogerían como óptimos, los hidrogeles HA degradado a una concentración del 2%. En estudios próximos se tendrían que llevar a cabo ensayos con los hidrogeles mezcla gelatina/HA al 2%, puesto que estos hidrogeles imitan de forma más precisa la matriz extracelular del cartílago articular y mejoran la adhesión celular gracias a las secuencias RGD presentes en las cadenas de gelatina.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- BAE, K.H.; WANG, L. and KURISAWA, M., 2013. Injectable biodegradable hydrogels: progress and challenges. *Journal of Materials Chemistry B*, **1**(40), pp. 5371-5388.
- BALAKRISHNAN, B. and BANERJEE, R., 2011. Biopolymer-Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Chemical reviews*, **111**(8), pp. 4453-4474.
- BHOSALE, A.M. and RICHARDSON, J.B., 2008. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British medical bulletin*, **87**(1), pp. 77-95.
- BIDARRA, S.J.; BARRIAS, C.C. and GRANJA, P.L., 2014. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, **10**(4), pp. 1646-1662.
- BRITTBURG, M.; LINDAHL, A.; NILSSON, A.; OHLSSON, C.; ISAKSSON, O. and PETERSON, L., 1994. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *New England Journal of Medicine*, **331**(14), pp. 889-895.
- BUCKWALTER, J.A. and MANKIN, H.J., 1998. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instructional course lectures*, **47**, pp. 487-504.
- BUCKWALTER, J., 1998. Articular cartilage: Injuries and potential for healing. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, **28**(4), pp. 192-202.
- BUCKWALTER, J.A.; MANKIN, H.J. and GRODZINSKY, A.J., 2005. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instructional course lectures*, **54**, pp. 465-480.
- COHEN, N.; FOSTER, R. and MOW, V., 1998. Composition and dynamics of articular cartilage: Structure, function, and maintaining healthy state. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, **28**(4), pp. 203-215.
- CORREIA, C.R.; MOREIRA-TEIXEIRA, L.S.; MORONI, L.; REIS, R.L.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; KAPERIEN, M. and MANO, J.F., 2011. Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering. *Tissue engineering part c-methods*, **17**(7), pp 717-730.
- CUKIERMAN, E.; PANKOV, R.; STEVENS, D.R. and YAMADA, K.M., 2001. Taking cell-matrix adhesion to the third dimension. *Science*, **294**(5547), pp 1708-1712.
- DARR, A. and CALABRO, A., 2009. Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, **20**(1), pp. 33-44.
- DAY, A. and DE LA MOTTE, C., 2005. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends in immunology*, **26**(12), pp. 637-643.
- FREED, L.E.; ENGELMAYR, G.C.; Jr., BORENSTEIN, J.T.; MOUTOS, F.T. and GUILAK, F., 2009. Advanced Material Strategies for Tissue Engineering Scaffolds. *Advanced Materials*, **21**(32-33), pp. 3410-3418.
- FRENKEL, S. and DI CESARE, P., 2004. Scaffolds for articular cartilage repair. *Annals of Biomedical Engineering*, **32**(1), pp. 26-34.

- GIANNINI, S.; BUDA, R.; RUFFILLI, A.; CAVALLO, M.; PAGLIAZZI, G.; BULZAMINI, M.C.; DESANDO, G.; LUCIANI, D. and VANNINI, F., 2014. Arthroscopic autologous chondrocyte implantation in the ankle joint. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*, **22**(6), pp. 1311-1319.
- GOMOLL, A.H. and MINAS, T., 2014. The quality of healing: Articular cartilage. *Wound Repair and Regeneration*, **22**, pp. 30-38.
- GRENIER, S.; BHARGAVA, M.M. and TORZILLI, P.A., 2014. An in vitro model for the pathological degradation of articular cartilage in osteoarthritis. *Journal of Biomechanics*, **47**(3), pp. 645-652.
- HAKKINEN, K.M.; HARUNAGA, J.S.; DOYLE, A.D. and YAMADA, K.M., 2011. Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. *Tissue engineering Part A*, **17**(5-6), pp. 713-724.
- HOSSEINI, S.M.; WILSON, W.; ITO, K. and VAN DONKELAAR, C.C., 2014. A numerical model to study mechanically induced initiation and progression of damage in articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, **22**(1), pp. 95-103.
- HUNZIKER, E., 1999. Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis and Cartilage*, **7**(1), pp. 15-28.
- ISHIDA, O.; TANAKA, Y.; MORIMOTO, I.; TAKIGAWA, M. and ETO, S., 1997. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. *Journal of Bone and Mineral Research*, **12**(10), pp. 1657-1663.
- JANVIKUL, W.; UPPANAN, P.; THAVORNUTIKARN, B.; PRATEEPASEN, R. and SWASDISON, S., 2007. Fibroblast interaction with carboxymethylchitosan-based hydrogels. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, **18**(5), pp. 943-949.
- JOHNSTONE, B.; ALINI, M.; CUCCHIARINI, M.; DODGE, G.R.; EGLIN, D.; GUILAK, F.; MADRY, H.; MATA, A.; MAUCK, R.L.; SEMINO, C.E. and STODDART, M.J., 2013. Tissue Engineering for Articular Cartilage Repair - the State of the Art. *European Cells & Materials*, **25**, pp. 248-267.
- KIM, I.L.; MAUCK, R.L. and BURDICK, J.A., 2011. Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. *Biomaterials*, **32**(34), pp. 8771-8782.
- LAM, J.; TRUONG, N. F. and SEGURA, T., 2014. Design of cell-matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds. *Acta Biomaterialia*, **10**(4), pp. 1571-1580.
- LANGER, R., 2000. Tissue engineering. *Molecular Therapy*, **1**(1), pp. 12-15.
- LANGER, R. and VACANTI, J., 1993. Tissue Engineering. *Science*, **260**(5110), pp. 920-926.
- LEE, F.; CHUNG, J.E. and KURISAWA, M., 2008. An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid-tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate. *Soft Matter*, **4**(4), pp. 880-887.
- LEE, Y.; BAE, J.W.; OH, D.H.; PARK, K.M.; CHUN, Y.W.; SUNG, H. and PARK, K.D., 2013. In situ forming gelatin-based tissue adhesives and their phenolic content-driven properties. *Journal of Materials Chemistry B*, **1**(18), pp. 2407-2414.

- LI, X.; LIU, X.; CUI, L.; BRUNSON, C.; ZHAO, W.; BHAT, N.R.; ZHANG, N. and WEN, X., 2013. Engineering an in situ crosslinkable hydrogel for enhanced remyelination. *Faseb Journal*, **27**(3), pp. 1127-1136.
- LU, X.L. and MOW, V.C., 2008. Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Medicine and science in sports and exercise*, **40**(2), pp. 193-199.
- MARLOVITS, S.; ZELLER, P.; SINGER, P.; RESINGER, C. and VECSEI, V., 2006. Cartilage repair: Generations of autologous chondrocyte transplantation. *European Journal of Radiology*, **57**(1), pp. 24-31.
- MCGAHAN, P.J. and PINNEY, S.J., 2010. Current Concept Review: Osteochondral Lesions of the Talus. *Foot & Ankle International*, **31**(1), pp. 90-101.
- MELLERA-OGIALORO, L.R.; GAMBOA-MARTINEZ, T. C.; POVEDA-REYES, S.; GÓMEZ RIBELLES, J.L. and GALLEGO FERRER, G., Madrid, Spain, 2013. Gelatin gels reinforced with polymeric microfibers for tissue engineering. *25<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials (ESB 2013)*, pp. 86.
- OUASTI, S.; DONNO, R.; CELLESI, F.; SHERRATT, M.J.; TERENCE, G. and TIRELLI, N., 2011. Network connectivity, mechanical properties and cell adhesion for hyaluronic acid/PEG hydrogels. *Biomaterials*, **32**(27), pp. 6456-6470.
- POOLE, C., 1997. Articular cartilage chondrons: Form, function and failure. *Journal of anatomy*, **191**, pp. 1-13.
- REDMAN, S.N.; OLDFIELD, S.F. and ARCHER, C.W., 2005. Current strategies for articular cartilage repair. *European cells & materials*, **9**, pp. 23-32;dsusson23-32.
- ROUGHLEY, P.J., 2006. The structure and function of cartilage proteoglycans. *European Cells & Materials*, **12**, pp. 92-101.
- SHU, X.; LIU, Y.; LUO, Y.; ROBERTS, M. and PRESTWICH, G., 2002. Disulfide cross-linked hyaluronan hydrogels. *Biomacromolecules*, **3**(6), pp. 1304-1311.
- SOPHIA FOX, A.J.; BEDI, A. and RODEO, S.A., 2009. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health*, **1**(6), pp. 461-468.
- SPAHN, G.; FELMET, G. and HOFMANN, G.O., 2013. Traumatic and degenerative cartilage lesions: arthroscopic differentiation using near-infrared spectroscopy (NIRS). *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, **133**(7), pp. 997-1002.
- SPAHN, G.; HOFMANN, G.O. and KLINGER, H.M., 2013. The effects of arthroscopic joint debridement in the knee osteoarthritis: results of a meta-analysis. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*, **21**(7), pp. 1553-1561.
- STEINWACHS, M., 2009. New Technique for Cell-Seeded Collagen Matrix-Supported Autologous Chondrocyte Transplantation. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, **25**(2), pp. 208-211.

SUN, Y.; DENG, Z.; TIAN, Y. and LIN, C., 2013. Horseradish peroxidase-mediated in situ forming hydrogels from degradable tyramine-based poly(amido amine)s. *Journal of Applied Polymer Science*, **127**(1), pp. 40-48.

TADMOR, R.; CHEN, N. and ISRAELACHVILI, J., 2002. Thin film rheology and lubricity of hyaluronic acid solutions at a normal physiological concentration. *Journal of Biomedical Materials Research*, **61**(4), pp. 514-523.

TAVAKOL, M.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; SOLEIMANI, M.; MOHAMMADIFAR, M.A.; HASHEMI-NAJAFABADI, S. and HAFIZI, M., 2014. Synthesis and Characterization of an Enzyme Mediated in situ Forming Hydrogel Based on Gum Tragacanth for Biomedical Applications. *Iranian Journal of Biotechnology*, **12**(1),.

TEIXEIRA, L.S.M.; FEIJEN, J.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; DIJKSTRA, P.J. and KAPERIEN, M., 2012. Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials*, **33**(5), pp. 1281-1290.

TEMENOFF, J. and MIKOS, A., 2000. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, **21**(5), pp. 431-440.

TERADA, S.; SATO, M.; SEVY, A. and VACANTI, J., 2000. Tissue engineering in the twenty-first century. *Yonsei medical journal*, **41**(6), pp. 685-691.

VAN TOMME, S.R.; STORM, G. and HENNINK, W.E., 2008. In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International journal of pharmaceutics*, **355**(1-2), pp. 1-18.

YEUNG, T.; GEORGES, P. C.; FLANAGAN, L. A.; MARG, B.; ORTIZ, M.; FUNAKI, M.; ZAHIR, N.; MING, W.Y.; WEAVER, V. and JANMERY, P.A., 2005. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*, **60**(1), pp. 24-34.

ZHAO, W.; JIN, X.; CONG, Y.; LIU, Y. and FU, J., 2013. Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **88**(3), pp. 327-339.

ZHOU, Z.; YANG, Z.; HUANG, T.; LIU, L.; LIU, Q.; ZHAO, Y., ZENG, W., YI, Q. and CAO, D., 2013. Effect of Chemical Cross-linking on Properties of Gelatin/Hyaluronic Acid Composite Hydrogels. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, **52**(1), pp. 45-50.