



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE MASTER EN INGENIERÍA QUÍMICA

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES INYECTABLES INSPIRADOS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS BLANDOS

AUTORA: Esther Sanmartín Masiá

TUTOR: José Luís Gómez Ribelles

COTUTORES: Gloria Gallego Ferrer
Sara Poveda Reyes

Curso Académico: 2015-16

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer el apoyo financiero del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) a través del proyecto MAT2013-46467-C4-1-R que nos ha permitido realizar este trabajo.

Me gustaría agradecer a mis tutores, Dr. José Luíz Gómez Ribelles y Dra. Gloria Gallego Ferrer, por hacerme partícipe de este proyecto. Agradecerles su profesionalidad y dedicación, sus explicaciones y aclaraciones, que han convertido este proyecto en un proceso de aprendizaje continuo, haciéndome crecer tanto a nivel personal como profesional.

Por otra parte, agradecer a la Dra. Sara Poveda Reyes su ayuda constante tanto dentro como fuera del laboratorio, el interés mostrado y su apoyo en tantos momentos durante la realización del proyecto. Gracias por resolver mis dudas siempre con una sonrisa.

Gracias al Servicio de Microscopía de la Universitat Politècnica de València por su ayuda durante las sesiones de microscopía realizadas durante la consecución del proyecto.

También me gustaría agradecer a Ulrica Edlund del Royal Institute of Technology (KTH) de Estocolmo su ayuda en las medidas de resonancia magnética nuclear y a Luis Quintanilla del grupo BIOFORGE (Universidad de Valladolid) por su ayuda en la caracterización reológica de los materiales.

No me gustaría olvidarme de todos los compañeros y el personal del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular por hacerme formar parte de una gran familia. En especial, gracias a Sandra por ser un apoyo y por todo lo que he aprendido trabajando a su lado. Gracias a Carmen Antolinos por su inestimable ayuda en el laboratorio y por ser una trabajadora incansable. Gracias a Laura Teruel por su paciencia y dedicación, por tener siempre tiempo para ayudarme cuando lo he necesitado.

Finalmente, gracias a Carmen por su ayuda y determinación, por hacerme ver las cosas desde otro punto de vista. Gracias a Adela, Ana y Yissel por interesarse e implicarse en mis problemas y por saber sacarme siempre una sonrisa.

Por último y no menos importante, gracias a mi familia por su apoyo incondicional, por creer en mí y no dejar que me rinda nunca. Gracias a todos.

Índice general

RESUMEN	1
RESUM	2
ABSTRACT	3
DOCUMENTO I: MEMORIA	5
1. Objetivos.....	9
2. Motivación.....	10
3. Introducción	11
4. Justificación	25
5. Normativa.....	26
6. Materiales y métodos.....	27
7. Resultados y discusión.....	38
8. Conclusiones.....	63
9. Referencias	65
ANEXOS	73
DOCUMENTO II: PRESUPUESTO	87
1. Financiación.....	91
2. Presupuesto.....	91

RESUMEN

La gelatina es un material de origen proteico derivado de la hidrólisis del colágeno que ha sido propuesta como soporte para la regeneración de tejidos blandos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y disponibilidad a bajo coste. A temperatura corporal, la gelatina es soluble en disoluciones fisiológicas, y debe ser entrecruzada para formar hidrogeles estables. Los hidrogeles inyectables son materiales hidrofílicos capaces de entrecruzar desde sus disoluciones acuosas mediante reacciones no citotóxicas. La ventaja de estos sistemas, frente a los hidrogeles convencionales, está en que se pueden inyectar en el organismo en disolución acuosa y solidifican *in situ*, permitiendo la encapsulación de células y rellenando perfectamente defectos no uniformes de tejidos dañados. Tal es el caso de los derivados de tiramina de la gelatina, que gelifican *in situ* mediante la acción combinada de la enzima peroxidasa y el peróxido de hidrógeno (este último en cantidades muy pequeñas y no citotóxicas). Sin embargo, los hidrogeles de gelatina obtenidos mediante este método carecen de propiedades mecánicas, resultando necesario su refuerzo. La reacción de preparación de derivados de tiramina puede ser aplicada al ácido hialurónico, un polisacárido presente en la matriz extracelular de muchos tejidos, y capaz de formar hidrogeles con mayores propiedades mecánicas que la gelatina, debido a la mayor rigidez de sus cadenas y la menor permeabilidad al agua. A pesar de estas ventajas, los hidrogeles puros de ácido hialurónico presentan una adhesión celular muy pobre, inhibiendo la proliferación celular y la regeneración de tejidos.

La hipótesis que se presenta se basa en que la combinación de derivados de tiramina de gelatina y ácido hialurónico puede dar lugar a hidrogeles inyectables con propiedades mejoradas respecto a los hidrogeles puros, y que serán ventajosas en los procesos de regeneración de tejidos blandos. Por un lado, la gelatina proporciona secuencias de adhesión celular (RGD), y, por otro lado, el ácido hialurónico proporciona mayor hidratación y mejores propiedades mecánicas. Tal combinación mimetiza la composición de la matriz extracelular de muchos tejidos, y por ello, puede tener un efecto beneficioso sobre las células encapsuladas en los hidrogeles mixtos.

El objetivo de este trabajo consiste en sintetizar y caracterizar hidrogeles inyectables mixtos de gelatina y ácido hialurónico homogéneos, de cara a su empleo como materiales soporte para la regeneración de tejidos blandos. Antes de la gelificación de los hidrogeles, se optimizará la miscibilidad de los componentes variando el peso molecular y la viscosidad de las disoluciones precursoras. Además, se estudiará el empleo de soportes poliméricos de ácido poliláctico (PLLA) que puedan emplearse en combinación con los hidrogeles sintetizados para aquellas aplicaciones en las que se requiera mayores propiedades mecánicas. La caracterización incluirá tanto ensayos físico-químicos para la determinación de sus propiedades como ensayos biológicos que demuestren la viabilidad de estos sistemas en el campo de la ingeniería tisular.

RESUM

La gelatina és un material d'origen proteic derivat de la hidròlisi del col·lagen que ha sigut proposta com a suport per la regeneració de teixits tous gràcies a la seua biocompatibilitat, biodegradabilitat i disponibilitat a baix cost. A temperatura corporal, la gelatina és soluble en dissolucions fisiològiques, i ha de ser entrecreuada per formar hidrogels estables. Els hidrogels injectables són materials hidrofílics capaços d'entrecreuar des de les seues dissolucions aquoses mitjançant reaccions no citotòxiques. L'avantatge d'aquests sistemes, en comparació amb hidrogels convencionals, està en què es poden injectar en l'organisme en dissolució aquosa i solidifiquen *in situ*, permetent l'encapsulació de cèl·lules i reomplint perfectament defectes no uniformes en teixits danyats. Aquest és el cas dels derivats de tiramina de la gelatina, que gelifiquen *in situ* mitjançant l'acció combinada de l'enzim peroxidasa i el peròxid d'hidrogen (aquest últim en quantitats molt menudes i no citotòxiques). No obstant això, els hidrogels de gelatina obtinguts mitjançant aquest mètode manquen de propietats mecàniques, resultant necessari el seu reforç. La reacció de preparació de derivats de tiramina pot ser aplicada a l'àcid hialurònic, un polisacàrid present en la matriu extracel·lular de molts teixits, i capaç de formar hidrogels amb majors propietats mecàniques que la gelatina, a causa de la major rigidesa de les cadenes i la menor permeabilitat a l'aigua. Malgrat d'aquests avantatges, els hidrogels purs d'àcid hialurònic presenten una adhesió cel·lular molt pobre, inhibint la proliferació cel·lular i la regeneració de teixits.

La hipòtesi que es presenta es basa en què la combinació de derivats de tiramina de gelatina i àcid hialurònic pot donar lloc a hidrogels injectables amb propietats millorades respecte als hidrogels purs, i que seran avantatjoses en els processos de regeneració de teixits tous. Per una banda, la gelatina proporciona seqüències d'adhesió cel·lular (RGD), i d'altra banda, l'àcid hialurònic proporciona millor hidratació i millors propietats mecàniques. Aquesta combinació mimetitzava la composició de la matriu extracel·lular de molts teixits, i per aquest motiu, pot tindre un efecte beneficiós sobre les cèl·lules encapsulades en hidrogels mixtos.

L'objectiu d'aquest treball consisteix en sintetitzar i caracteritzar hidrogels injectables mixtos de gelatina i àcid hialurònic homogenis, de cara al seu ús com materials suport per a la regeneració de teixits tous. Abans de la gelificació dels hidrogels, s'optimitzarà la miscibilitat dels components variant el pes molecular i la viscositat de les dissolucions precursors. A més, s'estudiarà l'ús de suports polimèrics d'àcid polilàctic (PLLA) que poden ser utilitzats en combinació amb els hidrogels sintetitzats per a aquelles aplicacions en les quals es necessiten majors propietats mecàniques. La caracterització inclourà tant assajos físic-químics per la determinació de les seues propietats com assajos biològics que demostren la viabilitat d'aquests sistemes en el camp de l'enginyeria tissular.

ABSTRACT

Gelatin is a protein-based material product of the hydrolysis of collagen. This material has been proposed as a support for the regeneration of soft tissue because of its biocompatibility, its biodegradability and its availability at low price. At body temperature, gelatin is soluble in physiological solutions, and it must be crosslinked to form stable hydrogels. Injectable hydrogels are hydrophilic materials able to crosslink with its aqueous solution by non-cytotoxic reactions. The advantage of this system, in comparison with conventional hydrogels, is that they can be injected in the organism in aqueous solution and they solidify *in situ*. It allows the encapsulation of cells and fills perfectly the non-uniform defects of the damaged tissues. This is the case of gelatin with tyramine, which gel *in situ* by the action of peroxidase and hydrogen peroxide (the last one in small and non-cytotoxic quantities). However, gelatin hydrogels obtained by this method have poor mechanical properties and its reinforcement is necessary. The preparation reaction of tyramine derivate can be applied to hyaluronic acid, a polysaccharide present in the extracellular matrix of many tissues that can form hydrogels with better mechanical properties due to its chains stiffness and its lower water permeability. Despite the advantages described, pure hyaluronic acid hydrogels exhibit a poor cell adhesion that inhibit cell proliferation and tissue regeneration.

The hypothesis that is presented here is based on the combination of tyramine derivatives from gelatin and hyaluronic acid. These hydrogels can have better properties than the pure ones, and it can be advantageous in the regeneration of soft tissues. On the one hand, gelatin gives sequences of cellular adhesion (RGD). On the other hand, hyaluronic acid provides higher hydration and an enhancement of the mechanical properties. This combination mimics the extracellular matrix composition of many tissues, and because of that, it can be beneficial for the encapsulated cells in mixed hydrogels.

The aim of this work is to synthetize and characterize injectable mixed homogeneous hydrogels of gelatin and hyaluronic acid. These hydrogels can be used as support materials in the regeneration of soft tissues. Before hydrogel gelation, we will optimize the miscibility of the components by changes in its molecular weight and viscosity of precursor solutions. Moreover, the use of polymeric supports of polylactic acid (PLLA) will be studied in combination with hydrogels for the applications where high mechanical properties are required. The characterization will include physical and chemical assays for the determination of its properties and biological assays that can demonstrate the viability of these systems in the field of tissue engineering.

DOCUMENTO I:

MEMORIA

Índice de la memoria

1.	Objetivos.....	9
2.	Motivación.....	10
3.	Introducción	11
3.1.	Matrices extracelulares biomiméticas para la regeneración de tejidos blandos	11
3.2.	Hidrogeles. Hidrogeles naturales de proteínas y polisacáridos	12
3.3.	Hidrogeles de gelatina y ácido hialurónico	14
3.3.1.	Gelatina	15
3.3.2.	Ácido hialurónico.....	16
3.4.	Técnicas de reticulación de hidrogeles	17
3.5.	Hidrogeles inyectables	18
3.6.	Antecedentes	22
4.	Justificación	25
5.	Normativa.....	26
6.	Materiales y métodos.....	27
6.1.	Materiales	27
6.2.	Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular (HA-LMW)	28
6.3.	Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular con injerto de tiramina (HA-Tyr) ..	28
6.4.	Síntesis de gelatina con injerto de tiramina (Gel-Tyr).....	29
6.5.	Determinación del grado de injerto	31
6.6.	Formación de hidrogeles Gel/HA	31
6.7.	Determinación del tiempo de gelificación	32
6.8.	Morfología.....	32
6.9.	Grado de hinchado.....	33
6.10.	Ensayo de degradación enzimática	33
6.11.	Ensayo de compresión	33
6.12.	Preparación de scaffolds de ácido poliláctico (PLLA)	34
6.13.	Introducción de hidrogeles de gelatina como relleno en scaffolds de PLLA.....	34
6.14.	Ensayo mecánico a compresión de los scaffolds	35
6.15.	Cultivos celulares sobre los compuestos scaffold+hidrogel.....	35
6.15.1.	Ensayo de citotoxicidad (Live/Dead)	36
6.15.2.	Morfología celular. Tinción Actina/DAPI	36
6.16.	Análisis estadístico	37
7.	Resultados y discusión.....	38
7.1.	Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular	38
7.2.	Cuantificación del injerto de tiramina en las cadenas de Gel y HA.....	39
7.3.	Obtención de hidrogeles inyectables Gel/HA	41

7.4.	Grado de hinchado de los hidrogeles Gel/HA.....	46
7.5.	Degradación enzimática de los hidrogeles Gel/HA.....	49
7.6.	Ensayo de compresión de hidrogeles Gel/HA.....	52
7.7.	Fabricación de scaffolds de PLLA y empleo de hidrogeles de gelatina como relleno.	54
7.8.	Ensayo de compresión sobre los scaffolds.....	56
7.9.	Cultivos celulares sobre los compuestos scaffold+hidrogel	58
8.	Conclusiones.....	63
9.	Referencias	65
ANEXOS		73
	ANEXO I: Determinación de pesos moleculares con GPC.....	73
	ANEXO II: Cuantificación del grado de injerto de tiramina.....	77
	ANEXO III: Determinación del grado de hinchado.....	79
	ANEXO IV: Determinación de los parámetros de red de los hidrogeles.....	81
	ANEXO V: Ensayo de compresión	83

1. Objetivos

La pérdida de funcionalidad, la degeneración de algunos órganos y tejidos y la aparición de defectos en los mismos son problemas frecuentes que impiden su correcto funcionamiento. Entre las técnicas más avanzadas para la reparación de dichos defectos destaca la ingeniería tisular, cuyo objetivo es la regeneración del tejido dañado a partir de biomateriales capaces de mimetizar de forma temporal las funciones y propiedades de estos tejidos, estimulando la generación de nuevo tejido sano y funcional.

Los tejidos blandos se caracterizan por poseer una elevada hidratación, siendo el agua uno de los componentes mayoritarios en la matriz extracelular junto con moléculas de glicosaminoglicanos y colágeno. Nuestro trabajo se basa en la hipótesis de que el empleo de hidrogeles biodegradables sintetizados con componentes que se encuentran en la matriz extracelular del tejido natural puede favorecer la regeneración del tejido dañado de forma más efectiva que otros materiales.

Estos hidrogeles mimetizan la matriz extracelular de forma temporal, permitiendo la proliferación celular en su interior y ofreciendo un entorno celular similar al natural capaz de estimular la secreción de nueva matriz extracelular para reemplazar el hidrogel.

El objetivo principal de este Trabajo Final de Máster es desarrollar nuevos hidrogeles inyectables de gelatina y ácido hialurónico para la regeneración de defectos en tejidos blandos con técnicas de ingeniería tisular. El papel de la gelatina es imitar la matriz de colágeno y proporcionar secuencias adhesión celular. A su vez el ácido hialurónico puede conferir mayor hidratación y resistencia mecánica. Para alcanzar este objetivo principal, será necesario abordar los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar las características y propiedades principales de los tejidos blandos
- Adecuar y modificar correctamente los materiales de partida (gelatina y ácido hialurónico) para la obtención de hidrogeles inyectables homogéneos
- Caracterizar los hidrogeles obtenidos mediante ensayos físico-químicos y ensayos biológicos
- Estudiar la adecuación del sistema obtenido para su uso en la regeneración de tejidos blandos

2. Motivación

El proyecto desarrollado se enmarca dentro de los Trabajos Final de Máster (TFM), siendo de ámbito académico y englobando diversos conocimientos adquiridos por el alumno durante la titulación. Se han aplicado y reforzado de forma particular a este proyecto las siguientes aptitudes y conocimientos:

- Conocimientos de síntesis química
- Estudio de las aplicaciones de los materiales poliméricos en el ámbito de la biomedicina
- Estudio de las características fundamentales de los materiales empleados
- Realización de ensayos de caracterización físico-química
- Introducción a los cultivos celulares y ensayos biológicos
- Búsquedas bibliográficas, redacción de informes y representación de resultados experimentales
- Análisis estadístico de resultados

Por otro lado, mi motivación personal ha sido poder contribuir al desarrollo de nuevos productos con aplicaciones en el campo de los biomateriales y la ingeniería tisular. A su vez, este trabajo me ha permitido profundizar en técnicas de laboratorio que pueden ser de gran valor para mi carrera profesional futura. Asimismo, he consolidado mi capacidad de trabajo en grupo y la habilidad de pensamiento crítico.

3. Introducción

3.1. Matrices extracelulares biomiméticas para la regeneración de tejidos blandos

La aparición de defectos y enfermedades que afectan a los tejidos es uno de los problemas de salud más frecuentes que provoca, en muchos casos, la disfunción de los órganos afectados. Sin embargo, el tratamiento de estas enfermedades ha ido evolucionando con el paso del tiempo y la tendencia actual no se limita a sustituir y reemplazar el órgano o tejido dañado, sino que se busca la incorporación de un biomaterial capaz de inducir la regeneración de dicho tejido.

En este contexto se enmarca la ingeniería tisular que combina la medicina y la ingeniería con el objetivo de favorecer la formación o la regeneración de tejidos y órganos. El concepto de ingeniería tisular fue definido por Langer y Vacanti como la aplicación de principios y métodos de ingeniería y de la medicina para comprender la relación entre la función y la estructura de los tejidos y el desarrollo de sustitutos biológicos que reparen, mantengan y mejoren la función del tejido [1]. Para conseguir estos objetivos se necesitan tres componentes fundamentales:

- **Células** que permitirán la generación de nuevo tejido.
- **Factores de crecimiento bioactivos** capaces de estimular la proliferación y la diferenciación celular.
- **Scaffolds**, esto es, soportes para el desarrollo celular y la regeneración del tejido.

Además, estos soportes serán los encargados de mimetizar temporalmente la matriz extracelular mientras el proceso de regeneración tiene lugar, aportando a su vez estabilidad mecánica y guía para el crecimiento celular.

En muchas ocasiones, los tejidos no tienen la capacidad de auto-reparación o solo pueden repararse pequeños daños, como es el caso de las quemaduras en la piel. Sin embargo, cuando el área afectada es mayor es necesario recurrir a implantes para restaurar el tejido afectado. En el caso de los ataques de corazón, la necrosis de cardiomiocitos conduce a la disminución de la función de dicho órgano [2], mientras que en el caso del cartílago articular su capacidad de auto-reparación es muy baja al tratarse de un tejido avascular donde las células reciben los nutrientes por difusión [3].

Los casos expuestos son ejemplos de tejidos blandos que se encuentran en el organismo. De forma general, los tejidos blandos se caracterizan porque presentan una matriz extracelular muy hidratada formada principalmente por agua, glicoproteínas

como colágeno, elastina o fibronectina y glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico. Debido a su naturaleza hidratada, la ingeniería tisular para la regeneración de tejidos blandos como la piel, el miocardio, el cartílago o el músculo debe perseguir la obtención de un biomaterial que garantice una buena hidratación, proporcione las señales celulares adecuadas a las células, por interacción con ellas, y posea una resistencia mecánica similar a la matriz extracelular natural para que las células del tejido puedan desempeñar la función regeneradora.

3.2. Hidrogeles. Hidrogeles naturales de proteínas y polisacáridos

Los hidrogeles están formados por cadenas poliméricas hidrófilas unidas por puntos de entrecruzamiento, constituyendo una red tridimensional. Esta estructura básica que presentan es la responsable de sus propiedades: la presencia de cadenas poliméricas hidrófilas permite a estos materiales absorber grandes cantidades de agua, mientras que los puntos de entrecruzamiento entre dichas cadenas evitan su disolución en agua (Figura 1), permitiendo su estabilidad en el entorno biológico.

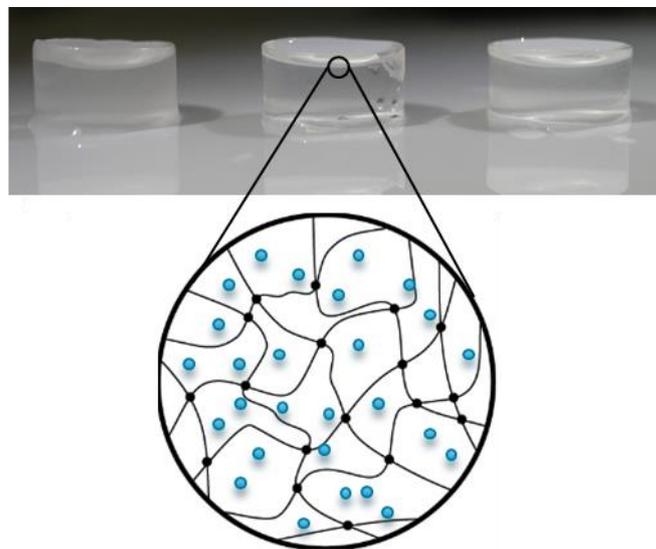


Figura 1. Imagen macroscópica de hidrogeles. Detalle de su microestructura

De forma general, los tejidos blandos presentan un gran contenido en agua en su composición, por lo que es necesario que el material empleado para el tratamiento y regeneración de estos tejidos posea también una gran capacidad de absorción de agua, siendo uno de los requisitos fundamentales para estas aplicaciones. Así, la capacidad de retención de agua de estos materiales convierte a los hidrogeles en una de las mejores alternativas para la regeneración de los tejidos blandos.

Además, los hidrogeles ofrecen un entorno tridimensional que facilita la estimulación mecánica de las células. Este factor es muy importante puesto que evita la desdiferenciación de las células y la pérdida de su fenotipo y, por otro lado, induce su rediferenciación a distintos tipos celulares como condrocitos [4], cardiomiocitos [5] y hepatoblastos [6] en función del tejido en donde se encuentren.

Los enlaces que se establecen entre las cadenas poliméricas de los hidrogeles y el agente empleado como entrecruzador pueden ser de diferentes naturalezas. De este modo, el enlace entre las cadenas poliméricas y el entrecruzador puede ser covalente (hidrogeles químicos), por puentes de hidrógeno o fuerzas de van der Waals y enlaces de tipo físico (hidrogeles físicos) [7]–[9].

Por otro lado, los hidrogeles son materiales muy versátiles, en cuanto a componentes y propiedades, por lo que la combinación de diferentes materiales poliméricos permite obtener hidrogeles con propiedades específicas para las diferentes aplicaciones [10], [11]. La estructura final, el grado de entrecruzamiento de los hidrogeles y su biodegradabilidad dependerán tanto de los monómeros empleados como del proceso de síntesis utilizado, siendo estos factores determinantes en sus propiedades fisicoquímicas tales como su capacidad de absorción de agua o sus propiedades mecánicas [12], [13].

Los hidrogeles pueden estar constituidos tanto por polímeros naturales como sintéticos. Los hidrogeles sintéticos presentan, por lo general, mejores propiedades mecánicas y sus características pueden controlarse y regularse fácilmente, pero su falta de interacción con las células y la posibilidad de que sus productos de degradación sean citotóxicos limitan su uso en medicina regenerativa [10], [14]. Por su parte, los polímeros naturales permiten imitar mejor la matriz extracelular de los tejidos blandos, favoreciendo la adhesión, proliferación y diferenciación celular sin presentar problemas de citotoxicidad, aunque en algunas ocasiones suelen necesitar un refuerzo estructural que mejore sus propiedades mecánicas.

La mayoría de los hidrogeles naturales empleados como biomateriales son proteínas como el colágeno, la gelatina, la elastina y la fibrina, o polisacáridos como el ácido hialurónico, el alginato, la agarosa, la celulosa o el quitosano [9]. Muchos de estos componentes se encuentran presentes en la matriz extracelular del tejido natural, compuesta principalmente por colágeno de diversos tipos y polisacáridos, por lo que actualmente se están desarrollando diferentes sistemas que emplean estos materiales con el objetivo de mimetizar el tejido natural.

En este sentido, con el objetivo de mimetizar el entorno celular se han ido desarrollando hidrogeles combinados proteína-polisacárido. Uno de los componentes

más empleados en la síntesis de hidrogeles es el colágeno (tipo I y tipo II), presente en la matriz extracelular de forma natural y que permite la diferenciación celular [15], [16]. Otros sistemas plantean la combinación de esta proteína con polisacáridos como la celulosa [17], el quitosano [18] o el ácido hialurónico [19], [20], obteniéndose un entorno biomimético similar al tejido natural.

Por otro lado, muchos estudios emplean gelatina, proteína derivada de la hidrólisis del colágeno, para la síntesis de hidrogeles por su biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y disponibilidad comercial a bajo coste. Del mismo modo que con el colágeno, se suele combinar con polisacáridos para obtener hidrogeles de naturaleza proteína-polisacárido, también biodegradables y biocompatibles. Diferentes estudios se han basado en la combinación de la gelatina con celulosa, alginato [21], quitosano [22], [23] y ácido hialurónico [24]–[26], confirmándose que su combinación con uno o varios polisacáridos mejora sus propiedades y proporciona un entorno celular asimilable al presente en el tejido natural.

Con todo ello, el uso de hidrogeles está justificado puesto que consiguen mimetizar de forma precisa la matriz extracelular y permite la interacción célula-matriz. Por otro lado, el empleo de hidrogeles evita la desdiferenciación celular [6] y su naturaleza viscoelástica permite la transferencia de carga a las células para que se encuentren estimuladas mecánicamente de manera semejante a como lo están en el tejido natural.

3.3. Hidrogeles de gelatina y ácido hialurónico

Los compuestos empleados para la realización de este proyecto son la gelatina y el ácido hialurónico (HA). Como ya se ha comentado, ambos componentes se encuentran presentes de forma natural en la matriz extracelular de los tejidos por lo que su combinación permite obtener hidrogeles mezcla proteína-polisacárido que mimeticen el tejido natural. Además, puesto que se trata de compuestos naturales presentes en la matriz extracelular de los tejidos, son compuestos totalmente biocompatibles y que no presentan ningún tipo de reacción de rechazo tras su implantación.

3.3.1. Gelatina

La gelatina es un polímero de origen natural que se obtiene a partir de la desnaturalización e hidrólisis parcial del colágeno, presentando las mismas secuencias peptídicas que el colágeno natural [27], [28]. Está formada por la combinación de aminoácidos, principalmente glicina, prolina e hidroxiprolina (Figura 2), unidos por enlaces peptídicos formando cadenas poliméricas de peso molecular variable entre 10000 g/mol y 40000 g/mol [29]. Además, los grupos amina y carboxilos que incorpora le permiten reaccionar con otros compuestos modificando sus propiedades.

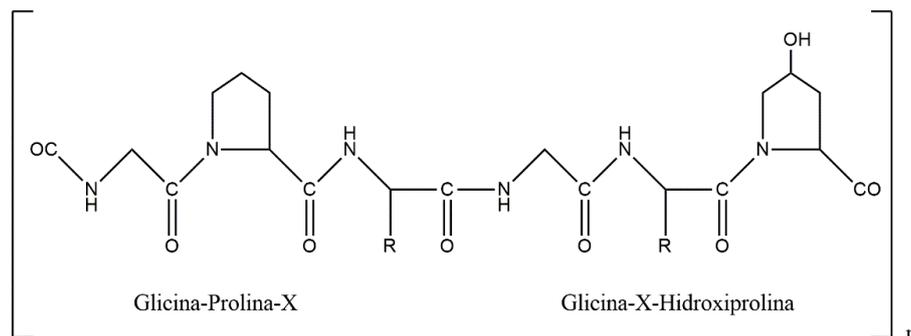


Figura 2. Estructura general de la gelatina

La gelatina forma un hidrogel físico por debajo de su temperatura de fusión a unos 23 °C, mientras que por encima de dicha temperatura es soluble en agua. Estas diferencias en cuanto a la conformación de la gelatina se deben a la organización de las cadenas que la forman en función de la temperatura. Así, por debajo de su temperatura de fusión, algunas cadenas presentan una conformación en hélice que es estable debido a los enlaces intramoleculares, actuando como puntos de entrecruzamiento, lo que posibilita su reticulación física [30]. Sin embargo, por encima de 23 °C la conformación en hélice no es estable, debilitándose los enlaces intramoleculares y favoreciendo la disolución de la gelatina en agua.

Como su precursor el colágeno, la gelatina es biocompatible, enzimáticamente biodegradable por la colagenasa [31]–[33] y no tóxica por lo que se emplea para aplicaciones médicas y farmacéuticas [34]. Sin embargo, la baja resistencia mecánica que presenta limita sus aplicación de forma directa por lo que es habitual su empleo en combinación con otros polímeros [35], [36]. El problema fundamental que presenta es su solubilidad en el ambiente fisiológico y a la temperatura corporal, por lo que en la mayoría de aplicaciones médicas se requiere su entrecruzamiento químico [37].

La gelatina se emplea frecuentemente en diferentes aplicaciones biomédicas como vehículo para la liberación controlada de fármacos [38] y como matriz para la regeneración de diferentes tipos de tejidos blandos, tanto tejido cartilaginoso como

tejido adiposo [36], participando activamente en la revascularización de los tejidos, como muestran los estudios de Tabata *et al.* [39] y Hosaka *et al.* [40].

En cuanto a su interacción con las células para estimular su adhesión, proliferación y síntesis de tejido, la gelatina presenta la ventaja de poseer la secuencia de adhesión arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) [41], [42]. Esta secuencia es de gran importancia en los procesos de regeneración. Las células reconocen estas secuencias a través de las integrinas presentes en su membrana celular, uniéndose a ellas y formando complejos de adhesión más fuertes, conocidos como adhesiones focales [43], [44]. La formación de adhesiones focales desencadena en el interior de las células la formación del citoesqueleto de actina y la expresión de diferentes genes para la proliferación, diferenciación y movilidad [42], [45]. Así, la presencia de gelatina que incorpore secuencias RGD a los hidrogeles implantados permitirá inducir el proceso de regeneración.

3.3.2. Ácido hialurónico

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano que se encuentra presente en la matriz extracelular de forma natural. Está formado por largas cadenas de los disacáridos ácido glucurónico y N-acetil glucosamina unidos por enlaces β -1,3-glicosídicos [46], [47], tal como se muestra en la Figura 3.

Se trata de un polímero soluble en agua, no tóxico y degradable enzimáticamente por la hialuronidasa [10], [48] que provoca la ruptura de los enlaces β -1,3-glicosídicos que lo componen [49].

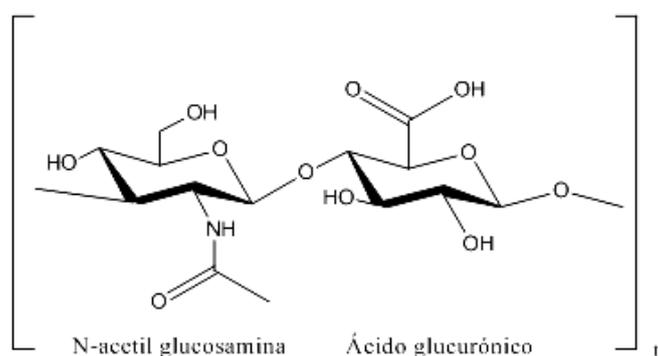


Figura 3. Estructura del ácido hialurónico. Está constituido por una repetición de unidades de ácido glucurónico y N-acetil glucosamina

El ácido hialurónico es uno de los principales componentes de la matriz extracelular de los tejidos blandos y puede ser modificado químicamente para posibilitar su entrecruzamiento y obtener hidrogeles estables. En cuanto a su función biológica,

participa en el proceso de curación de heridas, regula la actividad celular y proporciona puntos de unión entre distintos tipos celulares y la matriz extracelular gracias a los receptores CD44 presentes en el mismo [50]. La familia de receptores CD44 presentes en el ácido hialurónico participa en los procesos de migración celular durante la angiogénesis, diferenciación y proliferación celular, regulando la adhesión celular y las interacciones que se establecen entre las células [51].

En el campo de la ingeniería tisular es habitual el empleo del ácido hialurónico en el tratamiento de defectos en tejidos blandos, en sistemas de liberación controlada de fármacos y en forma de apósito o adhesivo para el tratamiento de heridas y quemaduras cutáneas [31], [52].

La selección de estos dos componentes permite que los hidrogeles sintetizados empleando gelatina y ácido hialurónico sean mezcla de proteína y polisacárido, obteniendo materiales de la misma naturaleza que la matriz extracelular del tejido original.

Así, estos hidrogeles proteína-polisacárido aportan numerosas ventajas para su uso en la reparación y regeneración de tejidos blandos. Por un lado, la proteína (gelatina) confiere secuencias de adhesión a la matriz lo que permite a las células reconocerla mediante las integrinas y unirse a ella mejorando la viabilidad celular y su proliferación mientras que, por otro lado, el polisacárido (ácido hialurónico) proporciona gran hidratación y adecuada difusión de nutrientes y sustancias de desecho a las células encapsuladas. Al tratarse de una cadena más rígida en estado hidratado [53], puede conferir mayores propiedades mecánicas al compuesto, lo que es ventajoso para su implantación en el lugar del defecto.

3.4. Técnicas de reticulación de hidrogeles

Existen ejemplos donde se emplean diferentes procedimientos de síntesis para la obtención de hidrogeles a partir de macromoléculas solubles en agua. El trabajo de Shu *et al.* [26] estudia el comportamiento y la velocidad de degradación de hidrogeles de gelatina y ácido hialurónico entrecruzados por la reacción entre grupos tiol, mientras que Weng *et al.* [54] y Chen *et al.* [55] obtienen los hidrogeles mediante la oxidación del ácido hialurónico para generar grupos aldehídos capaces de entrecruzarse con la gelatina posteriormente.

Por su parte, Liu *et al.* [33] propone la síntesis de un film hidrófilo compuesto de colágeno, gelatina y ácido hialurónico entrecruzado mediante reacción entre los tres componentes tras activar el ácido hialurónico con carbodiimidas y succiniimidas (EDC y

NHS). Estos films presentan propiedades ópticas y mecánicas similares a la córnea, pudiendo emplearse en terapias regenerativas.

Otra de las estrategias de síntesis que puede emplearse consiste en modificar los componentes con metacrilatos con el objetivo de poder polimerizarlo por radicales libres empleando luz UV como iniciador. El trabajo de Ondeck *et al.* muestra la posibilidad de regular las propiedades mecánicas del hidrogel obtenido en función de la concentración de ácido hialurónico empleada, el tiempo de exposición a la luz UV y el grado de sustitución [56].

Sin embargo, en la mayoría de los casos, las reacciones de entrecruzamiento que se producen son citotóxicas, empleando sustancias como divinilsulfona o glutaraldehído por lo que impide que puedan emplearse *in vivo* [57]. En estos casos los hidrogeles son pre-formados en el laboratorio, se troquelan con la forma del defecto antes de su implantación, y la siembra celular o migración celular en ellos resulta complicada. Presentan la desventaja de que, al degradarse el hidrogel, las moléculas de entrecruzador sean liberadas al organismo, produciendo toxicidad. En otras ocasiones, incorporan solventes que limitan la viabilidad celular, o la presencia de reactivos sin reaccionar en los hidrogeles puede presentar problemas a nivel biológico. Con el objetivo de evitar esta problemática, es necesario realizar lavados de los materiales una vez sintetizados para garantizar la eliminación de cualquier producto de reacción o solvente que resulte citotóxico [58].

Los hidrogeles entrecruzados enzimáticamente se presentan como una alternativa que evita cualquier problema de toxicidad asociada a las reacciones de entrecruzamiento. Suelen emplear transglutaminasa o peroxidasa como agente entrecruzador y puesto que el proceso no es citotóxico, pueden emplearse para la reticulación *in situ* [59].

3.5. Hidrogeles inyectables

Los hidrogeles inyectables, también llamados *in situ*, presentan ventajas con respecto a los convencionales. En primer lugar, suelen emplear reacciones enzimáticas de entrecruzamiento que no son citotóxicas ni afectan a la viabilidad celular. Además, la reticulación de estos hidrogeles tiene lugar en el propio defecto o daño que se quiere reparar. De este modo, al ser inyectados antes de formarse el hidrogel, son capaces de rellenar perfectamente el defecto, aunque éste presente formas irregulares y la técnica quirúrgica es menos invasiva que en el caso de los hidrogeles preformados. Por otra parte, en la disolución precursora de los hidrogeles inyectables pueden incorporarse

células de forma sencilla, además de poder añadir factores de crecimiento u otras sustancias que se distribuirán de forma homogénea en todo el hidrogel una vez formado [60], [61].

Las enzimas más empleadas para la síntesis de hidrogeles inyectables son la transglutaminasa, la tirosinasa y la peroxidasa (Figura 4).

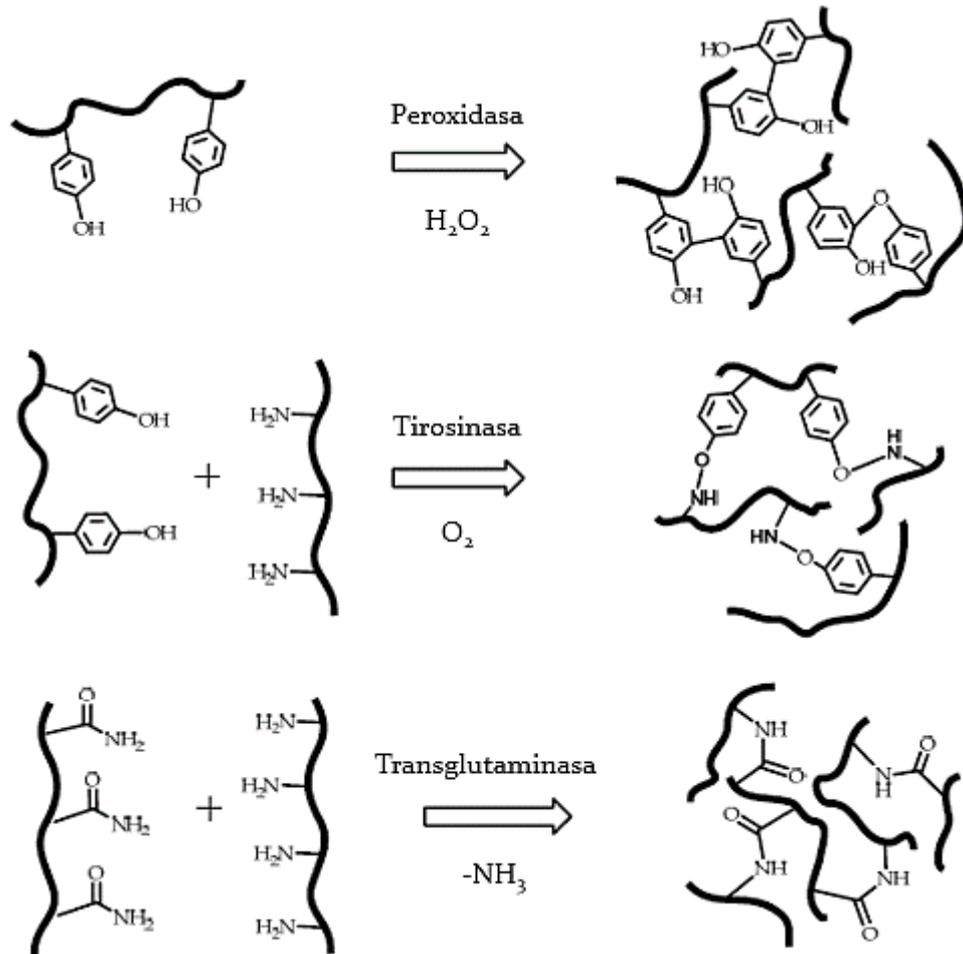


Figura 4. Esquema de reacciones de entrecruzamiento enzimático empleando peroxidasa, tirosinasa y transglutaminasa, respectivamente [62]

Por un lado, la transglutaminasa cataliza la reacción de entrecruzamiento entre los grupos γ -carboxamida de la glutamina presente en proteínas y péptidos y grupos amina. El inconveniente que presenta el uso de transglutaminasa para la reticulación es que puede producirse respuesta inflamatoria lo que limita su aplicabilidad [59]. Por otro lado, la tirosinasa cataliza la oxidación de fenoles, facilitando su reacción con un grupo amina o hidroxilo posteriormente aunque no ha sido probado para aplicaciones biomédicas y las redes de hidrogel generadas son menos estables [59]. Frente a estas alternativas, el uso de peroxidasa garantiza una mayor velocidad de reticulación y, además, en muchos casos permite la reticulación del hidrogel inyectado con la propia matriz extracelular natural por lo que se garantiza una mejor integración del hidrogel.

Para la síntesis de hidrogeles inyectables de gelatina y ácido hialurónico empleando peroxidasa como agente entrecruzador, es necesario modificar químicamente las cadenas de ambos compuestos. La adición de grupos fenol en las cadenas de gelatina y ácido hialurónico será lo que permita la reticulación posterior.

Para incorporar estos grupos fenol se injerta tiramina en las cadenas de ambos componentes, usando EDC (N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) y NHS (N-Hidroxisuccinimida) como activador y estabilizador de la reacción [63], [64]. La reacción entre las cadenas de gelatina o ácido hialurónico con el EDC provoca la formación de una O-acilisourea (Figura 5).

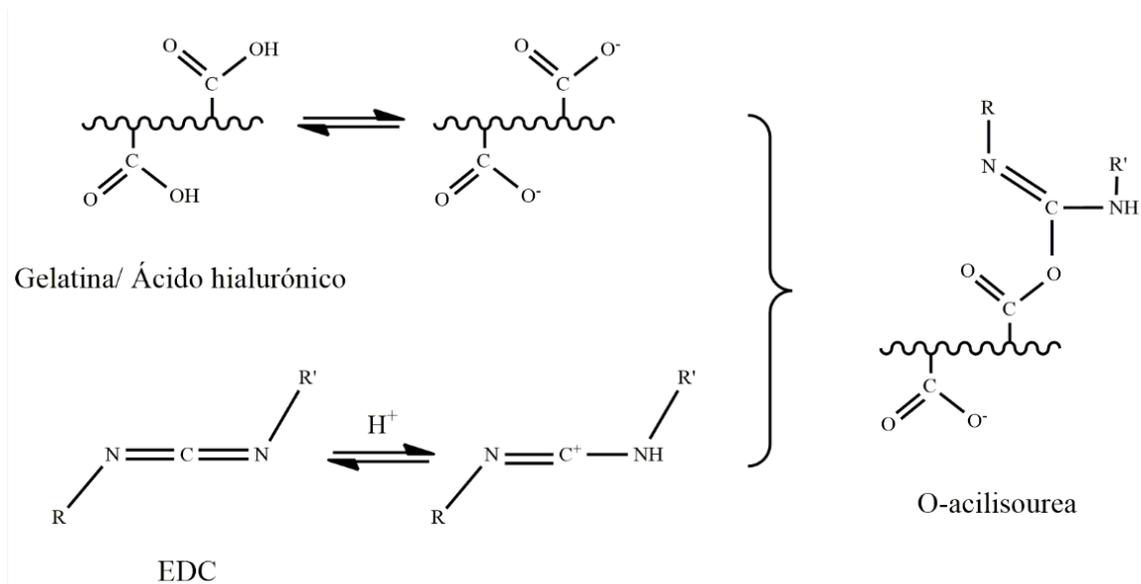


Figura 5. Reacción de las cadenas de gelatina o ácido hialurónico con el EDC. Formación de O-acilisourea

A continuación, la O-acilisourea formada reacciona con el NHS, que actúa como estabilizador, y con el grupo amina de la tiramina para formar un enlace amida y obtener las cadenas de gelatina y ácido hialurónico modificadas con grupos fenol que permitirán la reticulación posterior (Figura 6).

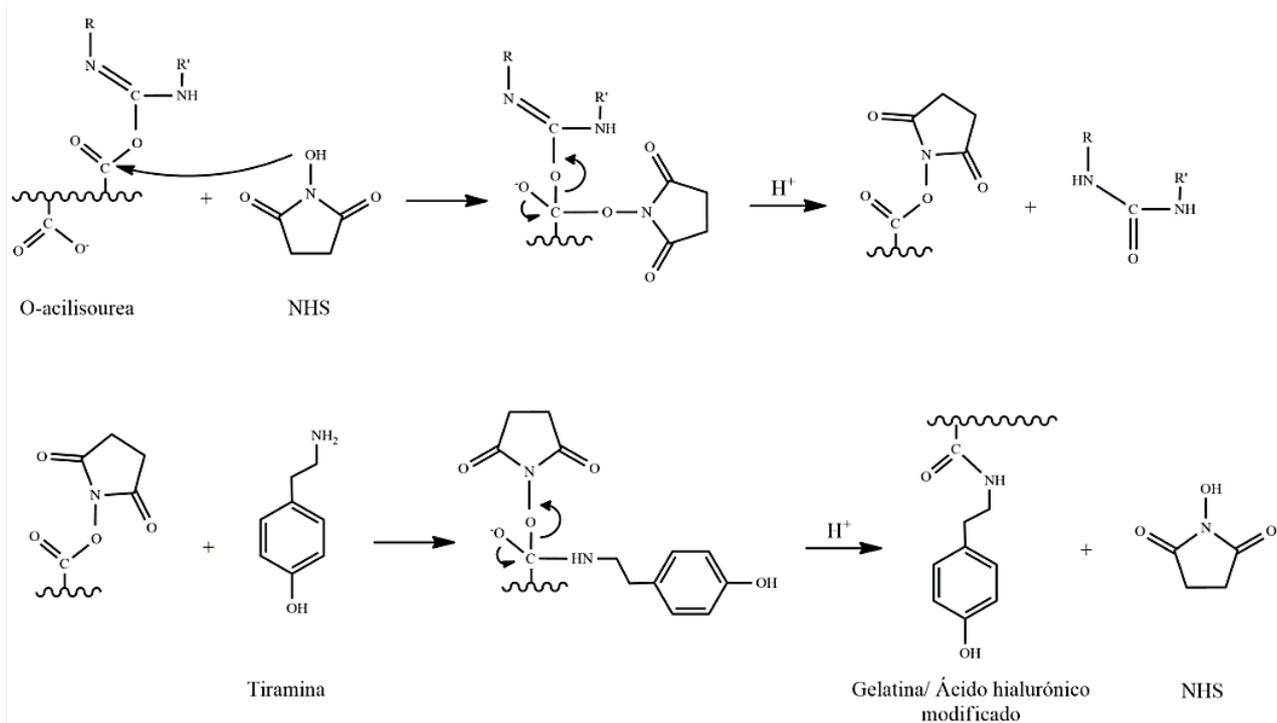


Figura 6. Esquema de reacción de la obtención de gelatina o ácido hialurónico injertado con tiramina a partir de O-acilisourea

De este modo, la gelatina y el ácido hialurónico modificado se entrecruza empleando peroxidasa (HRP), que cataliza la reacción de entrecruzamiento y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que actúa como agente oxidante de las moléculas de tiramina [48] (Figura 7).

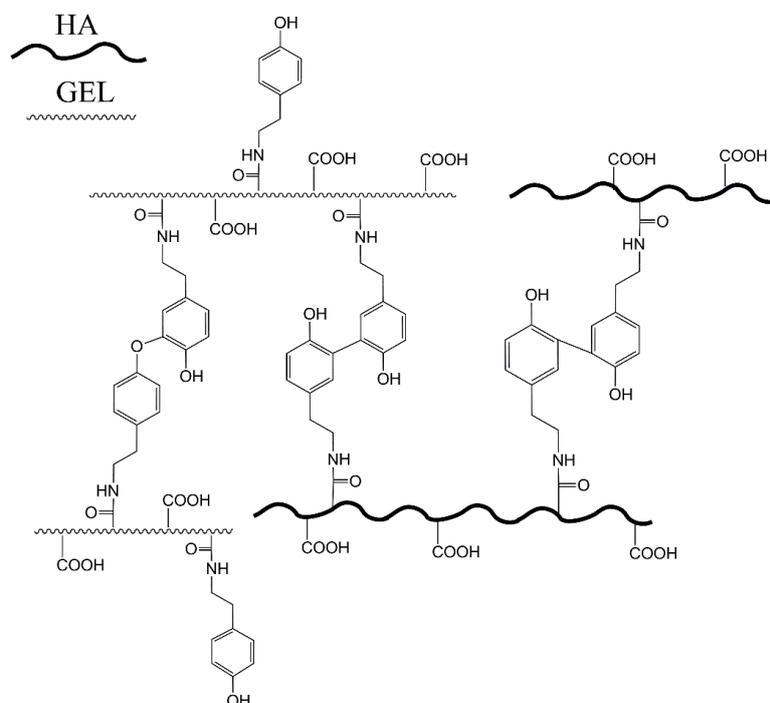


Figura 7. Esquema de los enlaces de entrecruzamiento formados en la gelificación de hidrogeles de gelatina y ácido hialurónico empleando peroxidasa y peróxido

3.6. Antecedentes

Realicé mi Trabajo de Fin de Grado en sistemas similares a los que se presentan en este Trabajo Fin de Máster. En aquél entonces propusimos ya la síntesis de hidrogeles mezclados de gelatina y ácido hialurónico en diferentes proporciones, reticulados enzimáticamente mediante el injerto previo de tiramina. Aquellos sistemas estaban destinados a una aplicación concreta de regeneración, el cartílago articular.

En ese trabajo previo, se sintetizaron hidrogeles empleando gelatina y ácido hialurónico a concentraciones del 1% y del 2% w/v barriando todo el intervalo de composiciones, desde la gelatina pura hasta el hialurónico puro. Los resultados obtenidos fueron alentadores, pues la combinación de la gelatina con el ácido hialurónico permitió preparar sistemas con mejores propiedades mecánicas que la gelatina pura. Sin embargo, el sistema se separaba en fases, gelificando las regiones ricas en gelatina en tiempos más cortos y las ricas en hialurónico en tiempos más largos. De este modo, el aspecto macroscópico y microscópico de estos hidrogeles no fue homogéneo, identificándose una clara separación de fases, como muestra la Figura 8.

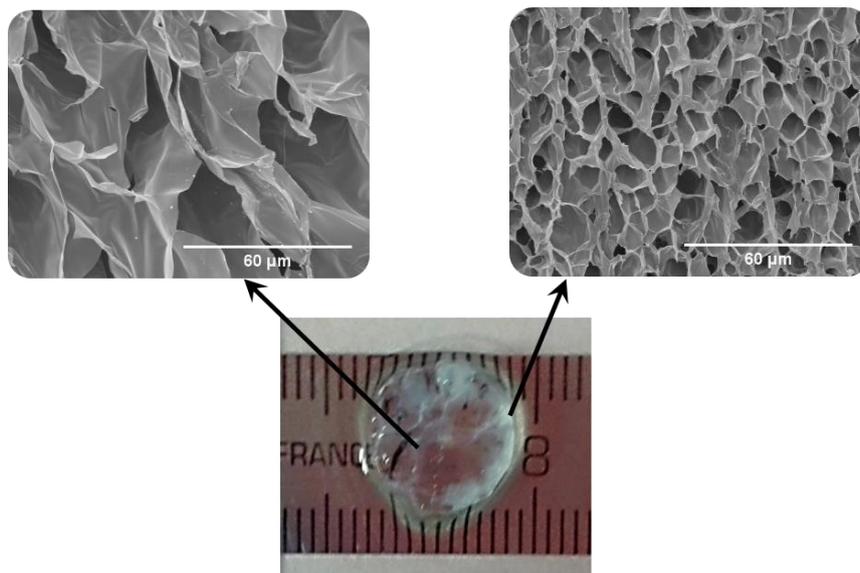


Figura 8. Hidrogel mezcla gelatina y ácido hialurónico obtenido empleando el sistema desarrollado durante mi TFG. Se aprecian dos microestructuras diferentes que evidencian la separación de fases entre componentes

En el estudio se comprobó que la falta de homogeneidad de los hidrogeles estaba ligada a la diferencia entre los tiempos de gelificación de ambos componentes. Así, mientras que la gelatina gelifica en un par de minutos, el ácido hialurónico necesita unos 8-9 minutos para estar gelificado por completo. Como consecuencia, los hidrogeles obtenidos presentaban separación de fases visibles a nivel macroscópico, esto es, zonas en las que predomina la gelatina junto con zonas de ácido hialurónico, por lo que no se

lograba obtener un hidrogel que presentara una mezcla homogénea de ambos compuestos.

La diferencia entre los tiempos de gelificación de ambos compuestos viene determinada, en última instancia, por la diferencia en sus pesos moleculares. De este modo, la gelatina gelifica en un tiempo inferior debido a que tiene un peso molecular inferior al del ácido hialurónico ($1,75 \times 10^5$ Da frente a $1,5 - 1,8 \times 10^6$ Da) que hace que la movilidad de sus cadenas sea mayor y que los enlaces se produzcan más rápidamente, mientras que durante dicha gelificación el ácido hialurónico (de mayor peso molecular y cuya solución es mucho más viscosa) se mantiene en estado líquido generándose la disgregación de las fases e iniciándose su gelificación más tarde.

Por otra parte, se comprobó que un aumento de la concentración de ácido hialurónico empleado provocaba un aumento de la viscosidad de la disolución precursora del hidrogel, dificultando la movilidad de las cadenas poliméricas de ácido hialurónico y aumentando los tiempos de gelificación. Además, el aumento de la viscosidad de la disolución también provoca la aparición de problemas de difusión de la enzima responsable de la gelificación. Así, el hecho de que la disolución de ácido hialurónico al 2% fuese demasiado viscosa y presentara problemas para su manipulación podía provocar, además, problemas de difusión de la enzima peroxidasa y del H_2O_2 a través de la disolución de HA, por lo que el tiempo de gelificación necesario para la formación del hidrogel se veía incrementado. Además, la elevada viscosidad de las disoluciones de ácido hialurónico impedía que pudieran ser filtradas por lo que su esterilización para llevar a cabo un cultivo celular o un implante era casi imposible.

A pesar de estos problemas, los resultados de mi TFG fueron positivos, en el sentido de que conseguimos reforzar la gelatina con la adición de diferentes cantidades de ácido hialurónico. Además, pudimos preparar sistemas con velocidad de gelificación modulable e hidrofiliicidad dependiente de la cantidad de ácido hialurónico. Así como poner a punto la síntesis de hidrogeles inyectables híbridos de gelatina y ácido hialurónico a partir de conjugados tiramina de los mismos. Los resultados de mi TFG han sido recientemente aceptados como publicación científica indexada en *Journal Citation Reports*: E. Sanmartín-Masiá, S. Poveda-Reyes, G. Gallego Ferrer. Extracellular matrix-inspired gelatin/hyaluronic acid injectable hydrogels. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, (2016). DOI: 10.1080/00914037.2016.1201828.

Con objeto de mejorar estas matrices y evaluar su viabilidad celular y capacidad de estimular la diferenciación de diferentes fenotipos, nos propusimos un nuevo proyecto. La hipótesis que formulamos fue la siguiente, si conseguimos disminuir la viscosidad de la disolución precursora del hidrogel inyectable de ácido hialurónico, podremos mejorar la difusión de los agentes catalizadores del entrecruzamiento, e

igualar los tiempos de gelificación de la gelatina y el hialurónico, lo que mejorará la miscibilidad de los componentes del hidrogel. Para reducir la viscosidad se empleó ácido hialurónico de bajo peso molecular, sintetizado por mí misma en el laboratorio a partir del comercial de alto peso molecular, por cuestiones económicas. Este entorno más homogéneo es más similar a la matriz extracelular natural, y favorecerá la diferenciación celular de forma más efectiva que en los sistemas heterogéneos, separados en fases. Mi Trabajo Final de Máster, pretende comprobar esta hipótesis, y ha abordado las tareas de adecuar las características y las propiedades de partida de ambos componentes (gelatina y ácido hialurónico) con el objetivo de asegurar la obtención de hidrogeles biodegradables mezcla proteína-polisacárido homogéneos, estudiar las propiedades del nuevo sistema y realizar ensayos de degradabilidad y de viabilidad celular con el objetivo de demostrar su potencial para la regeneración de tejidos blandos. Desde mis inicios de los estudios de Máster he trabajado en el laboratorio para explorar estos nuevos sistemas, y por ello han podido ya formar parte de otra publicación indexada en JCR [65] y un congreso internacional [66]. Los hallazgos encontrados forman parte del Trabajo Final de Máster que aquí presento.

4. Justificación

En este proyecto se plantea abordar la regeneración de tejidos blandos a partir de hidrogeles mezcla proteína-polisacárido. La matriz extracelular de estos tejidos presenta un gran contenido en agua, ofreciendo un entorno hidratado a las células por lo que, dada su similitud en cuanto a composición y propiedades, los hidrogeles se postulan como materiales adecuados para la regeneración de tejidos blandos.

Por otro lado, se propone trabajar con hidrogeles inyectables que permiten mayor adecuación a la forma del defecto y una encapsulación de las células en su interior más sencilla, garantizando además que la reacción de reticulación de los hidrogeles sea citotóxica.

Los problemas de miscibilidad y homogeneidad de los componentes empleados limitaban su aplicabilidad por lo que la novedad que se introduce es la optimización de las condiciones de partida de ambos reactivos para la obtención de hidrogeles proteína-polisacárido homogéneos y con buenas propiedades físico-químicas. Además, se incluye un estudio de la degradabilidad de dicho sistema de hidrogeles, así como ensayos biológicos que garantizan su viabilidad en el campo de la ingeniería tisular para tejidos blandos.

Por último, se propone la introducción de estos hidrogeles como relleno de scaffolds de ácido poliláctico (PLLA) que permitan mejorar las propiedades mecánicas que presentan, haciendo adecuados estos materiales para su uso en tejidos de mayores o menores exigencias mecánicas en función de si se usan junto con un soporte de PLLA o sin necesidad de ningún refuerzo.

5. Normativa

Todos los trabajos desarrollados en este proyecto deben cumplir la legislación vigente. Puesto que el trabajo desarrollado se centra en tareas de laboratorio, la normativa a considerar se basa principalmente en la clasificación y tratamiento de sustancias peligrosas y etiquetado y gestión de residuos, así como la normativa de seguridad e higiene en el trabajo.

En concreto, la legislación aplicable a los trabajos desarrollados durante la consecución de este proyecto es la siguiente:

- Ley 21/2015, de 20 de julio, por la que se modifica la Ley 43/2003 sobre *Prevención y Control Integrados de la Contaminación y Residuos y suelos contaminados*.
- Ley 31/1995. *Prevención de riesgos laborales*.
- Real Decreto 952/1997. *Normativa básica de residuos tóxicos y peligrosos*.
- Real Decreto 374/2001. *Protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo*.
- Real Decreto 664/1997. *Protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agente biológicos durante el trabajo*.
- Directiva Europea CE 1272/2008. *Clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas*.
- ISO 10993-5 (2009). "Tests for *in vitro* cytotoxicity".

Por otra parte, y aunque no se trata de normativa de obligado cumplimiento, deben considerarse las siguientes normas técnicas preventivas (NTP) que sirven como recomendación de buenas prácticas en el desarrollo del trabajo:

- NTP 635. *Clasificación, envasado y etiquetado de las sustancias peligrosas*.
- NTP 663. *Propiedades fisicoquímicas relevantes en la prevención del riesgo químico*.
- NTP 902. *Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares*.

6. Materiales y métodos

6.1. Materiales

Para los ensayos realizados se ha empleado cloruro sódico (grado de síntesis) y dihidrógenofosfato de potasio (extrapuro) de Scharlab, Barcelona, España.

Por otra parte, se emplea gelatina porcina (gel strength 300, Tipo A), ácido hialurónico (sal sódica) de *Streptococcusequi*, peróxido de hidrógeno (30 % w/w en H₂O, con estabilizador), horseradishperoxidase (HRP) de tipo VI, hidrocloreto de tiramina (98%), colagenasa de *Clostridium histolyticum* Tipo IA, hialuronidasa bovina, ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico (>99%, MES), N-Hidroxisuccinimida (98%, NHS), tubos de diálisis (3500 y 12400 MWCO), azida de sodio (99.5%, ReagentPlus®), cloruro potásico (para biología molecular), ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES), Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) suministrados por Sigma-Aldrich, Alemania.

Hidrocloreto N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) de Iris Biotech GmbH, Marktrechwitz, Alemania. La disolución de Calcium Free Krebs Ringer Buffer (CF-KRB) ha sido preparada con 115 mM de cloruro sódico, 5 mM de cloruro potásico, 1 mM de dihidrógenofosfato de potasio y 25 mM de HEPES de Sigma-Aldrich, Alemania.

Para la síntesis de los scaffolds de ácido poliláctico (PLLA) se ha empleado ácido poli(L-láctico) de grado médico (PURASORB PL 18) de Corbion (Purac), 1,4-dioxano (99.8%) de Sigma-Aldrich y Elvacite® 2043 (polietilmetacrilato de bajo peso molecular) como porógeno de Lucite Internacional.

Para los cultivos celulares se ha empleado medio DMEM bajo en glucosa de Biowest suplementado con 1% de penicilina/streptomina de Gibco y FBS (suero fetal bovino) de Fisher. Se ha empleado también tripsina-EDTA (0.25% tripsina y 1:5000 EDTA) de Invitrogen. Para el ensayo de viabilidad celular se ha utilizado el kit Live/Dead cell Viability/Citotoxicity kit de Invitrogen y en los ensayos para evaluar la morfología celular los reactivos DAPI (4'-6-diamidino-2-fenylindole, dilactate) de Sigma-Aldrich y Bodipy FL Phalloidin de Invitrogen.

Por último, también se ha empleado metanol (Panreac), paraformaldehído (Formalin solution, neutral buffered 10%) (Sigma-Aldrich), Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) y OCT (WWR Chemicals) como medio sintético de montaje.

6.2. Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular (HA-LMW)

La obtención de ácido hialurónico de bajo peso molecular se puede realizar a partir de la degradación ácida del ácido hialurónico de alto peso molecular comercial [67]. Para su obtención, se preparó una disolución de 500 mL al 0.1% (w/v) de HA de alto peso molecular en HCl a pH 0.5. Esta disolución se mantuvo en agitación a 37°C durante 24 h para producir la degradación del HA. A continuación, se ajustó el pH a 7 y se llevó a cabo la diálisis de la disolución con el objetivo de purificar el producto. La diálisis se realizó durante 2 días, empleando una membrana de diálisis de 3500 MWCO, en agua destilada. Finalmente, se liofilizó el producto obtenido durante 4 días.

La determinación de los pesos moleculares conseguidos se realizó mediante un análisis de cromatografía de permeación en gel (GPC) empleando el equipo GPC WATERS BREEZE.

6.3. Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular con injerto de tiramina (HA-Tyr)

El injerto de tiramina en las cadenas de ácido hialurónico tiene por objetivo la obtención de cadenas con grupos fenol capaces de reticular *in situ* para la formación de los hidrogeles inyectables. En la reacción de injerto, se produce la reacción de los grupos amina de la tiramina con los grupos carboxílicos que presenta la cadena de ácido hialurónico, formándose un enlace amida y dejando los grupos fenol de la tiramina expuestos como grupo terminal capaz de reacción. En la Figura 9 se muestra la reacción que se produce.

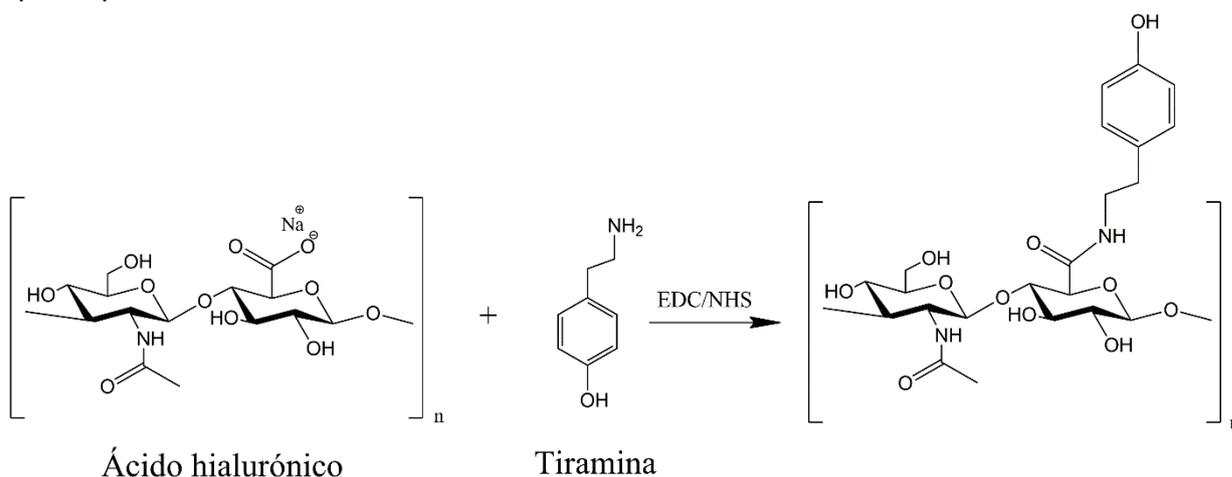


Figura 9. Reacción de injerto de tiramina en las cadenas de ácido hialurónico, empleando EDC y NHS como catalizadores y activadores de la reacción

La síntesis del compuesto HA-Tyr se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Darr y Calabro [63], empleando los ratios molares de síntesis que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ratios molares empleados para la síntesis de HA-Tyr

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

En primer lugar, se preparó 20 mL de disolución 150 mM de cloruro sódico (NaCl) a la que se añadió 1.08 g de MES (0.276 M en la disolución final) y 0,3 mL de NaOH 5 M (75 mM en la disolución final).

Tras ajustar el pH de la disolución a 5.75, se añadió 100 mg de ácido hialurónico de bajo peso molecular (0.5% w/v), obtenido previamente mediante degradación ácida (apartado 6.2.). Para garantizar una correcta disolución del HA, se mantuvo la disolución durante 2 h en agitación a 500 rpm a temperatura ambiente. Como el HA es fotosensible, todo el proceso de síntesis se llevó a cabo cubriendo los frascos que contienen la disolución con papel de aluminio.

Una vez disuelto el HA en la disolución, se adicionó el hidrocloreto de tiramina (Tyr·HCl) y posteriormente, se ajustó de nuevo el pH a 5.75. A continuación, se agregó el EDC y el NHS, que actúan como activadores y catalizadores de la reacción, y se dejaron reaccionar durante 24 h en agitación a temperatura ambiente.

Finalizado el tiempo de reacción, la disolución se dializó empleando la membrana de diálisis durante 2 días (realizando 3 cambios al día). El primer día se realizó los lavados empleando una disolución 150 mM de NaCl, mientras que los lavados del segundo día se realizaron con agua desionizada. Por último, el producto se liofilizó durante 4 días.

6.4. Síntesis de gelatina con injerto de tiramina (Gel-Tyr)

La síntesis de gelatina modificada con tiramina persigue el mismo objetivo que el explicado en el caso del ácido hialurónico y siguiendo la misma química de reacción. De este modo, se produce la reacción entre grupos carboxilo de la gelatina y grupos amina de la tiramina, formándose un enlace amina y dando como resultado cadenas de gelatina con grupos fenol injertados. En la Figura 10 se muestra el esquema de reacción.

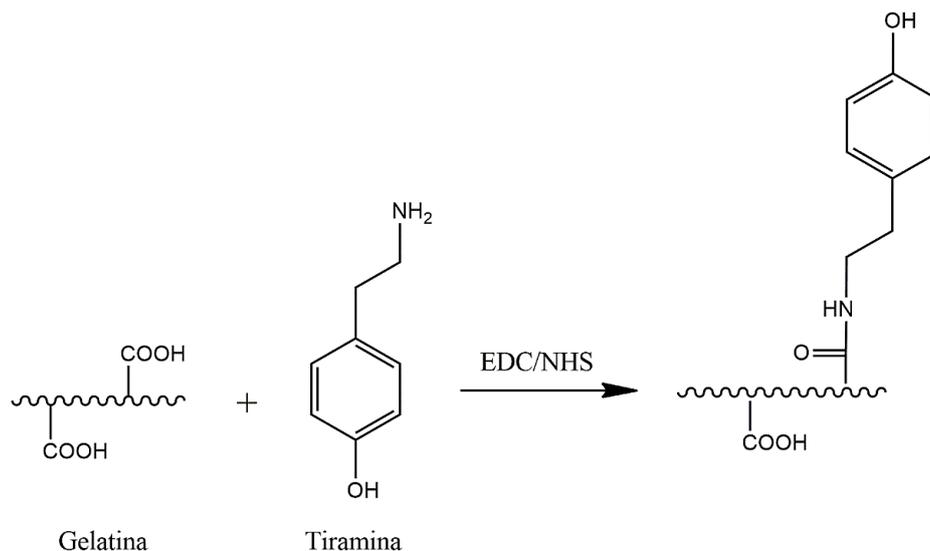


Figura 10. Reacción de injerto de tiramina en las cadenas de gelatina, empleando EDC y NHS como catalizadores y activadores de la reacción

La síntesis del compuesto Gel-Tyr se ha llevado a cabo de acuerdo con lo descrito por Sakai *et al.* [61], con algunas modificaciones. Los ratios molares de síntesis empleados se muestran la Tabla 2.

Tabla 2. Ratios molares empleados para la síntesis de Gel-Tyr

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

Para la obtención del compuesto Gel-Tyr, se disolvió 0.4 g (2% w/v) de gelatina en 20 mL de una disolución 50 mM de MES en agitación a 60 °C durante 30 min. Una vez disuelto, se dejó enfriar la disolución, se añadió el hidrocloreto de tiramina y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 20 min para garantizar su completa disolución. Posteriormente, se ajustó el pH de la disolución a 6, se adicionó el NHS y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante otros 30 min. Finalmente, se añadió el EDC a la disolución y se dejó reaccionar durante 24 h en agitación a 37 °C.

Finalizado el tiempo de reacción, se dializó la disolución obtenida con el objetivo de purificar el producto obtenido. En este caso, el proceso de diálisis se realizó íntegramente con agua desionizada, realizando 3 cambios al día durante 2 días. Por último, se liofilizó el producto obtenido.

6.5. Determinación del grado de injerto

La cuantificación del grado de injerto sobre las cadenas de gelatina y ácido hialurónico se realizó de forma cualitativa mediante un análisis de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$) con ayuda del equipo Bruker Advance III. Para ello, se prepararon disoluciones de los productos a analizar al 5% w/v en agua deuterada como solvente (D_2O).

Por otro lado, se empleó el espectrofotómetro UV para la cuantificación de dicho injerto. Se realizaron medidas de absorbancia a 275 nm (longitud de onda característica de los grupos fenol) sobre disoluciones de los productos al 0.1% w/v en agua mQ.

6.6. Formación de hidrogeles Gel/HA

Para la obtención de los hidrogeles, se preparó una disolución al 2% w/v de HA-Tyr en CF-KRB y se mantuvo a 4 °C durante 24 h para asegurar una completa disolución del ácido hialurónico en el medio. Por otra parte, se preparó una disolución al 2% w/v de Gel-Tyr en CF-KRB y se introdujo en la estufa a 37 °C para garantizar su disolución durante 30 min.

Los hidrogeles preparados presentan la siguiente composición:

- 80% v/v de las disoluciones preparadas HA-Tyr y/o Gel/Tyr
- 10% v/v de disolución de peroxidasa (HRP) 12.5 U/mL, lo que supone una concentración final de 1.25 U/mL en el hidrogel.
- 10% v/v de una disolución 20 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo que supone una concentración final de 2 mM de H_2O_2 en el hidrogel

Se preparó hidrogeles al 2% puros de gelatina (Gel) y de ácido hialurónico (HA), así como hidrogeles mezcla Gel/HA con diferentes proporciones de ambos componentes en todo el rango de composición, con los siguientes porcentajes volumétricos Gel/HA: 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 y 0/100.

Los hidrogeles preparados fueron de un volumen total de 300 μL . Para la formación de los hidrogeles se empleó una placa de pocillos para cultivos celulares p48, como molde. En ella, se introdujo, en primer lugar, la disolución Gel-Tyr o HA-Tyr o bien la mezcla de ambos en la proporción correspondiente. A continuación, se añadió la disolución de HRP y finalmente el H_2O_2 , produciéndose la reacción de entrecruzamiento y la formación de los hidrogeles.

Una vez formados, los hidrogeles se conservaron en nevera inmersos en DPBS con 0.02% w/v de azida de sodio para evitar el crecimiento de bacterias y microorganismos.

6.7. Determinación del tiempo de gelificación

La determinación del tiempo de gelificación de los hidrogeles se llevó a cabo en un reómetro AR-200ex (TA Instruments), empleando un vástago de 20 mm de diámetro de acero inoxidable y una distancia entre plato y vástago de 1200 μm .

El ensayo se realizó a una temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$, controlado por la deformación a cizalla. Se siguió la cinética de gelificación con el objetivo de determinar de forma precisa el tiempo necesario para la reticulación de los hidrogeles por lo que la gelificación de las muestras se llevó a cabo *in situ* sobre el propio plato del reómetro. Se programó un barrido oscilatorio para seguir el proceso de gelificación, fijando la deformación al 1% y la frecuencia a 1 Hz. El ensayo se inició tras añadir el H_2O_2 que inicia la reticulación de los hidrogeles y se registró la evolución del módulo de almacenamiento de los hidrogeles durante 20 min.

6.8. Morfología

La morfología y estructura interna de los hidrogeles sintetizados se observó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy). Para ello, se liofilizaron los hidrogeles y se cortaron con ayuda de una cuchilla para poder observar su estructura interna.

Las secciones obtenidas de los hidrogeles fueron recubiertas con oro a 40 mA durante 90 seg y se observaron empleando un microscopio JSM-6300 (JEOL Ltd., Japón) con un voltaje de trabajo de 10 kV.

Por otra parte, la microestructura de los scaffolds se observó mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM, Field Emission Scanning Electron Microscopy). Del mismo modo que con los hidrogeles, se cortaron los scaffolds previamente secados a vacío con una cuchilla para observar su estructura interna y se recubrieron con platino. Tras realizar el recubrimiento se observaron en un microscopio JEM 2100F (JEOL Ltd., Japón) con un voltaje de trabajo de 2 kV.

6.9. Grado de hinchado

Para la determinación del grado de hinchado de los hidrogeles, se introdujo los hidrogeles preparados en DPBS + 0.02% de azida de sodio durante un día para que alcanzaran su estado hinchado de equilibrio. Transcurrido este tiempo, y secando superficialmente los hidrogeles para retirar el exceso de agua, se pesaron para obtener su peso en estado hinchado (m_w). A continuación, se liofilizaron las muestras y se pesaron para obtener su peso seco (m_d). El grado de hinchado o EWC (Equilibrium Water Content) para los hidrogeles puede obtenerse a partir de la siguiente expresión:

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

6.10. Ensayo de degradación enzimática

La biodegradabilidad de los hidrogeles preparados se estudió mediante la realización de un ensayo de degradación enzimática. Para ello, se registró la masa inicial de los geles y se introdujeron en el medio de degradación enzimática, preparado con una concentración de 3 U/mL de colagenasa y 10 U/mL de hialuronidasa en DPBS.

La evolución de la degradación de los geles se llevó a cabo mediante el pesado de los mismos a diferentes tiempos, comprobándose la masa perdida por cada uno debido a la degradación enzimática sufrida.

6.11. Ensayo de compresión

Se ensayaron cinco réplicas de cada una de las composiciones de hidrogeles preparados para determinar su módulo de Young a compresión. Los hidrogeles se ensayaron en inmersión (DPBS + 0.02% azida de sodio). El ensayo de compresión fue no confinado y se realizó con el equipo EXSTAR TMA/ss6000.

En primer lugar, se aplicó una predeformación del 2% a los hidrogeles seguida de una etapa de compresión a 50 $\mu\text{m}/\text{min}$ hasta alcanzar el 90% de deformación de los mismos. El módulo de Young para cada uno de los hidrogeles ensayados se obtuvo a partir de la pendiente en la región lineal de las curvas tensión-deformación.

6.12. Preparación de scaffolds de ácido poliláctico (PLLA)

La fabricación de los scaffolds de PLLA se realizó empleando el método de “freeze extraction” junto con la técnica de “particle leaching” [68]. En primer lugar, se preparó una disolución de PLLA en 1,4-dioxano al 10% w/v en la que se incorporó el porógeno Elvacite en una proporción 1:1 w/w. La mezcla se introdujo en moldes de teflón y se congeló con nitrógeno líquido. A continuación, se vertió etanol frío (-20 °C) sobre la muestra congelada para disolver el dioxano cristalizado, produciéndose la extracción del mismo al someter la muestra congelada a repetidos baños de etanol frío. Una vez retirado el dioxano, se introdujo la muestra en etanol a 40 °C en agitación, forzando la extracción del porógeno Elvacite.

Tras eliminar el porógeno y el dioxano, se secó la muestra 24 h bajo campana y posteriormente a vacío y 40 °C hasta peso constante. Finalmente, se troqueló la muestra para obtener scaffolds de 4 mm de diámetro y una altura de 2 mm.

El scaffold resultante presenta una estructura de poros interconectados y una doble porosidad. Por un lado, la incorporación del porógeno permite la obtención de macroporosidad mientras que la extracción del disolvente empleado genera una microporosidad interna en los scaffolds [68], [69].

6.13. Introducción de hidrogeles de gelatina como relleno en scaffolds de PLLA

Los scaffolds de PLLA sintetizados se rellenaron con hidrogeles de gelatina inyectables. Para ello, se preparó previamente la disolución de gelatina al 2% w/v como se explica en el apartado 6.6, así como las alícuotas de HRP y H₂O₂ necesarias para la gelificación del hidrogel en el interior de los poros del scaffold de PLLA.

Tras preparar la disolución de gelatina, se introdujo dicha disolución junto con la alícuota correspondiente de HRP y los scaffolds a rellenar en el interior de un sistema cerrado (Vacutainer®) sobre el que se hizo vacío durante 5 minutos con el objetivo de forzar la entrada de la disolución de gelatina en los poros de los scaffolds. Transcurrido ese tiempo, se añadió la cantidad necesaria de H₂O₂ de acuerdo a las proporciones mostradas en el apartado 6.6. Una vez gelificado, los scaffold con gelatina se conservaron en DPBS con azida de sodio para su uso posterior.

Finalmente, los scaffolds se observaron en una lupa binocular electrónica para comprobar que el relleno de sus poros con gelatina había sido efectivo. Para observar

los scaffolds, se liofilizaron previamente para mejorar la visualización de la gelatina en el interior de los poros pues la presencia de agua no permite diferenciar de forma clara la gelatina del agua que contiene la muestra.

6.14. Ensayo mecánico a compresión de los scaffolds

Se realizó un ensayo mecánico de compresión no confinada sobre scaffolds con hidrogel de gelatina en su interior y scaffolds sin gelatina (5 réplicas para cada condición). Los scaffolds con gelatina se rellenaron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.13 y se mantuvieron en inmersión en DPBS con azida de sodio durante 24 h a 4 °C para que el hidrogel alcanzara el equilibrio en su estado hinchado. Las muestras que no contenían gelatina se les realizó el mismo tratamiento, haciendo vacío en inmersión en DPBS y se mantuvieron en esta disolución durante 24 h en DPBS a 4 °C para garantizar en ambos casos las mismas condiciones de ensayo.

Los ensayos se llevaron a cabo en el equipo mecánico MICROTTEST SCM3000 95, a una velocidad de 0.2 mm/min hasta alcanzar un 60% de deformación. El módulo de aparente de compresión para cada uno de los scaffolds ensayados se obtuvo a partir de la pendiente en la región lineal inicial de las curvas tensión-deformación.

6.15. Cultivos celulares sobre los compuestos scaffold+hidrogel

El cultivo celular sobre los scaffolds de PLLA rellenos con hidrogel de gelatina se realizó empleando fibroblastos de la línea celular L929 que fueron cultivados en medio DMEM de baja glucosa suplementado con 1% de penicilina/streptomicina y 10% de FBS a 37 °C y 5% de CO₂.

Tras su expansión en flascos T75, se retiró el medio y se realizó un lavado con DPBS⁻, añadiendo 5 mL de tripsina/EDTA. Se incuban los flascos con tripsina/EDTA durante 5 min a 37 °C para forzar el despegado de las células. Tras neutralizar la tripsina con medio fresco y contar las células empleando una cámara Neubauer, se centrifugó la suspensión celular para recuperar el pellet de células.

Tanto los scaffolds como la gelatina se esterilizó de forma previa a su uso en cultivos. Por un lado, los scaffolds se esterilizaron mediante radiación gamma con una dosis de 25 kGys (en la empresa Aragogamma S.L.) mientras que la gelatina se filtró bajo cabina de cultivos con un filtro de 0.22 µm para asegurar su esterilidad.

En el cultivo celular se empleó una concentración celular de 10^5 células/scaffold, lo que supone 4×10^6 células/mL, pues el volumen de hidrogel es de 25 μ L/scaffold. La incorporación de las células necesarias se realizó de forma previa a la gelificación de los hidrogeles. Así, las células necesarias se introdujeron en el Vacutainer junto con la disolución de gelatina y la alícuota de HRP forzando, mediante vacío (apartado 6.13), su entrada en los poros del scaffold. Una vez gelificados, los scaffolds con hidrogel de gelatina y fibroblastos sembrados, se cultivaron inmersos en el medio de cultivo preparado, siguiendo su evolución durante 7 días y cambiando el medio de cultivo por medio fresco cada 3 días.

6.15.1. Ensayo de citotoxicidad (Live/Dead)

El ensayo Live/Dead es una tinción empleada como método colorimétrico para la evaluación de la viabilidad celular. En este caso, se empleó para evaluar la viabilidad de las células en el interior del scaffold y del hidrogel de gelatina y comprobar que el proceso de gelificación no resultó citotóxico. Para llevar a cabo el ensayo se empleó el kit Live/Dead de Invitrogen sobre muestras cultivadas durante 3 h tras la gelificación. Asimismo, se incluyó células sembradas sobre vidrio como control negativo y células cultivadas en presencia de metanol (citotóxico) como control positivo.

El procedimiento para la realización del ensayo fue el siguiente. En primer lugar, se extrajeron los scaffolds del medio de cultivo y se lavaron dos veces en DPBS⁻. A continuación, se añadió la disolución preparada con el kit que incluye los fluoróforos (1:4 calceína/etidio) sobre los scaffolds y se introdujeron en el incubador durante 30 min a 37 °C. Por último, se lavaron de nuevo los scaffolds en DPBS⁻ y se observaron empleando el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TS100.

6.15.2. Morfología celular. Tinción Actina/DAPI

La tinción Actina/DAPI permite observar la morfología celular mediante dos marcadores fluorescentes. Por un lado, el DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) tiñe de color azul las secuencias de ADN nuclear mediante la unión a los pares de bases adenina y timina, mientras que el marcador faloidina se emplea para marcar la proteína estructural actina de forma que se produce la tinción en color verde del citoesqueleto celular.

Este ensayo se realizó sobre los scaffolds con gelatina sembrados con fibroblastos a dos tiempos de cultivo, 1 día y 7 días, con el objetivo de apreciar la evolución y los cambios en la morfología celular. Con el objetivo de comparar la evolución morfológica de las células al sembrarse sobre los hidrogeles de gelatina en el

interior de los scaffolds, también se realizó este ensayo sobre células sembradas directamente en el interior de los constructos sin incluir un hidrogel de gelatina en su interior.

Para realizar la tinción, pasado el tiempo de cultivo se lavaron los scaffolds sembrados con fibroblastos (con y sin gelatina) y se fijaron empleando 200 μ L de paraformaldehído. Tras la fijación, se lavaron de nuevo con DPBS⁻ y se añadió el tampón de permeabilización (0.1% de Tritón 100x en DPBS⁻), incubándose durante 5 minutos. Tras realizar un nuevo lavado con DPBS⁻, se incubaron las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente con 150 μ L de la disolución faloidina/DAPI (para un 1 mL de disolución: 10 μ L faloidina + 2 μ L DAPI + 988 μ L DPBS⁻), protegiendo la disolución de la luz en todo momento.

Finalmente, se realizó un nuevo lavado de los scaffolds con DPBS⁻, se incubaron durante 24 h en sacarosa al 30% a 4 °C, se incluyeron en OCT y se congelaron a -80 °C para posteriormente realizar cortes y observarlos en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TS100 empleando dos canales de fluorescencia (azul y verde) que permiten visualizar el núcleo y el citoesqueleto celular. Los cortes se realizaron con un espesor de 20 μ m con ayuda de un criotomo criostato LEICA CM1520 a -20 °C. Las muestras cortadas a -20 °C y embutidas en OCT se adhieren a portaobjetos de vidrio al entrar en contacto con éstos. El cambio de temperatura entre ambos materiales (muestra cortada y portaobjetos) provoca que el OCT se funda y la muestra quede adherida al portaobjetos.

6.16. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se ha realizado con el software Statgraphics, empleándose análisis de la varianza y pruebas de múltiples rangos con un p-value < 0,05 para determinar la significancia de las diferencias observadas en los resultados de los diferentes ensayos.

7. Resultados y discusión

7.1. Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular

El primer objetivo de este proyecto consiste en la adecuación de las propiedades del ácido hialurónico de partida para mejorar su mezcla con la gelatina. Nos centraremos en la disminución de su peso molecular para obtener disoluciones de menor viscosidad que no presenten problemas de difusión de reactivos durante la gelificación de los hidrogeles y aseguren una buena miscibilidad de los componentes para obtener hidrogeles híbridos de gelatina/ácido hialurónico (Gel/HA) homogéneos.

En primer lugar, se determinaron los pesos moleculares de los materiales de partida, gelatina y ácido hialurónico comercial, empleando la técnica de cromatografía de permeación en gel (GPC). El procedimiento de cálculo seguido para la obtención de los pesos moleculares se muestra en el Anexo I. Los pesos moleculares obtenidos para los dos reactivos se muestran en la Figura 11.

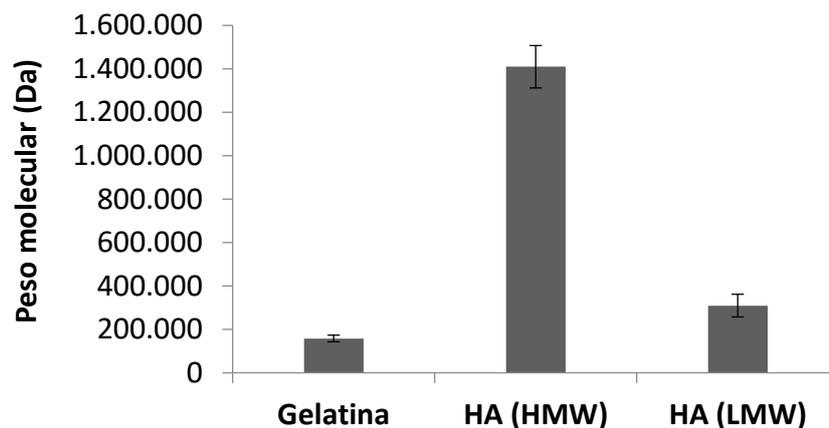


Figura 11. Pesos moleculares iniciales de los reactivos (gelatina y ácido hialurónico HA (HMW) y peso molecular del ácido hialurónico de bajo peso molecular (HA (LMW)) sintetizado por degradación ácida obtenidos mediante GPC. Para cada uno de los compuestos se analizaron 4 disoluciones (n=4)

Se comprueba que el ácido hialurónico de partida presenta un peso molecular muy superior al de la gelatina (1.4×10^6 Da frente a 1.6×10^5 Da). Con el objetivo de disminuir el peso molecular del ácido hialurónico se realizó el procedimiento de degradación ácida descrito en el apartado 6.2, para la obtención de ácido hialurónico de bajo peso molecular. El peso molecular del ácido hialurónico tras la degradación ácida también se analizó empleando el GPC y el resultado se muestran en la Figura 11 junto con el de los materiales de partida.

Se confirma que el tratamiento previo del ácido hialurónico permite disminuir su peso molecular hasta 3×10^5 Da, siendo mucho más semejante al peso molecular que presenta la gelatina [70]. Además, tras la obtención de ácido hialurónico de bajo peso molecular se comprobó que las disoluciones preparadas empleando el nuevo ácido hialurónico presentaban una viscosidad muy baja y un aspecto muy similar a las disoluciones de gelatina.

7.2. Cuantificación del injerto de tiramina en las cadenas de Gel y HA

La modificación de las cadenas de ácido hialurónico de bajo peso molecular y de la gelatina se realizó siguiendo el procedimiento descrito en los apartados 6.3 y 6.4. La caracterización de los materiales obtenidos tras el proceso de síntesis se basó en tres aspectos fundamentales:

- En primer lugar, la comprobación del injerto de forma cualitativa con el objetivo de determinar si el proceso seguido había resultado exitoso.
- En segundo lugar, la cuantificación del injerto de tiramina, es decir, la cantidad de tiramina injertada en las cadenas de gelatina y HA de bajo peso molecular.
- Por último, la determinación de los pesos moleculares de los materiales sintetizados (Gel-Tyr y HA-Tyr).

Para la comprobación de que el injerto de tiramina sobre la gelatina y el ácido hialurónico se había producido de forma exitosa, se analizaron los materiales de partida y los modificados con tiramina por ^1H -RMN con el objetivo de estudiar sus espectros. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

Los espectros obtenidos muestran la aparición de señales a un desplazamiento de 6.9 y 7.2 ppm en las muestras sobre las que se ha realizado el injerto de tiramina, tanto para gelatina como para HA. Estas señales confirman que el injerto se ha producido de forma exitosa puesto que se trata del desplazamiento químico característico de los grupos aromáticos [63]. Así, los materiales de partida no presentan grupos aromáticos en su estructura y la aparición de estas señales tras la síntesis de los reactivos modificados Gel-Tyr y HA-Tyr se debe a la incorporación de los grupos fenol de la tiramina a las cadenas de ambos compuestos.

Por otro lado, la comprobación del injerto permite demostrar que el tratamiento previo de degradación al que ha sido sometido el ácido hialurónico no produce una

degradación total de sus cadenas poliméricas que afecte a los grupos funcionales que incorpora, fundamentalmente grupos carboxilos, impidiendo que pueda ser modificado químicamente.

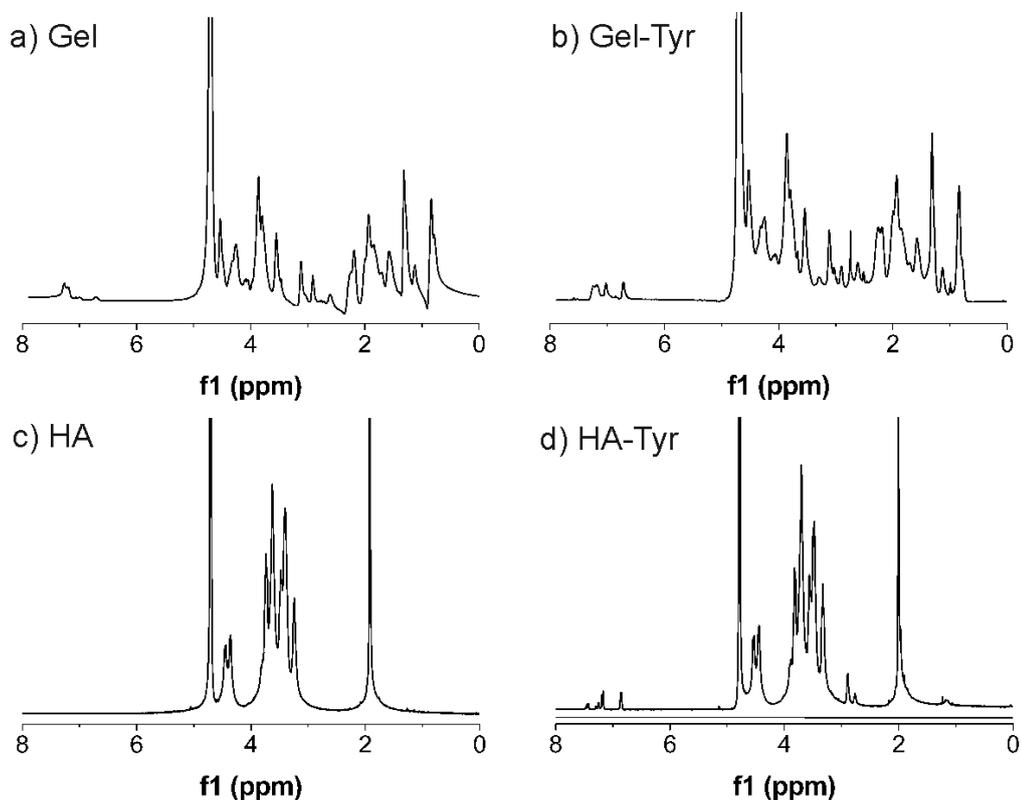


Figura 12. Espectros ¹H-RMN de la gelatina (a), la gelatina con injerto de tiramina (b), el ácido hialurónico (c) y el ácido hialurónico con tiramina (d)

Por otra parte, la cuantificación del grado de injerto de grupos tiramina (tyr) en ambos compuestos se realizó con ayuda del espectrofotómetro [71]. A partir de las medidas de absorbancia a una longitud de onda de 275 nm, característica de los grupos fenol, se determinó la concentración de tiramina injertada en la gelatina y el ácido hialurónico [63]. El procedimiento de cálculo se detalla en el Anexo II, obteniéndose un grado de sustitución de 1.9×10^{-7} mol tyr/mg Gel en el caso de la gelatina y 9.69×10^{-8} mol tyr/mg HA en el caso del ácido hialurónico; lo que supone una sustitución del 23.75% de los grupos carboxilo para la gelatina y un 3.65% de sustitución de los grupos carboxilo para el HA. El grado de sustitución conseguido para el HA es similar al que presentan Darr *et al.* en su trabajo donde alcanzan grados de sustitución del 4.7% de tiramina [63].

Finalmente, los productos obtenidos de la síntesis fueron analizados con ayuda del GPC para determinar sus pesos moleculares tras el injerto de tiramina. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13.

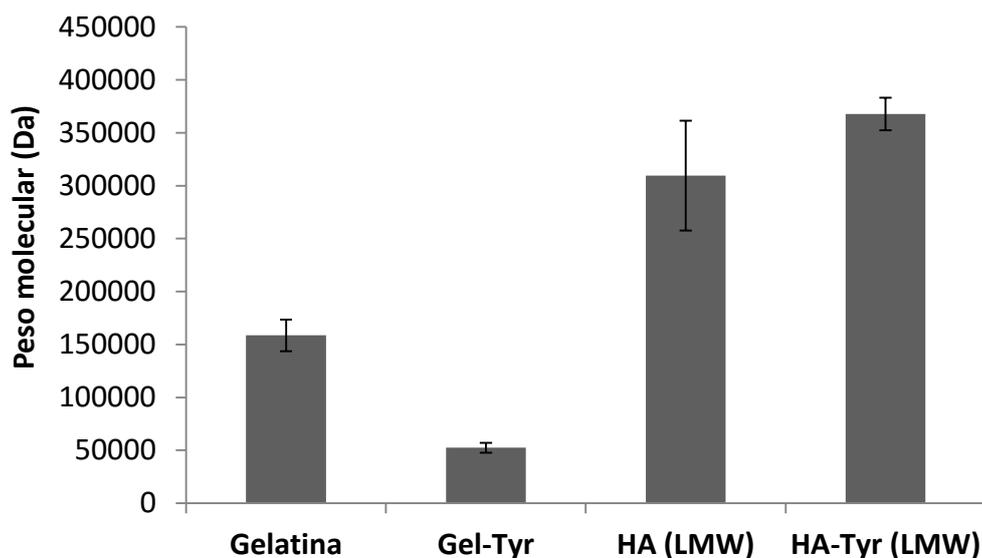


Figura 13. Comparación de pesos moleculares obtenidos previos al injerto de tiramina (Gel y HA) y con tiramina injertada (Gel-Tyr y HA-Tyr) (n=4)

Tras realizar el injerto de tiramina sobre las cadenas de gelatina se produce una disminución del peso molecular del compuesto. A pesar de que la reacción de injerto incorpora nuevas moléculas a las cadenas de gelatina que podría aumentar su peso molecular, se observa un descenso debido a la hidrólisis y la posible degradación de las cadenas de gelatina al ser sometidas a una segunda etapa de síntesis para la incorporación de las moléculas de tiramina. Por su parte, en el caso del ácido hialurónico no existe una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al peso molecular tras la adición de tiramina a las cadenas de ácido hialurónico. Esto puede deberse a que, por un lado, como consecuencia del mayor peso molecular del ácido hialurónico, la incorporación de tiramina, que tan solo supone un 3.65%, no sea significativa para aumentar el peso molecular y, por otra parte, no se produzca durante la síntesis del injerto la hidrólisis de las cadenas, como sucede en el caso de la gelatina.

7.3. Obtención de hidrogeles inyectables Gel/HA

La síntesis de hidrogeles se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.6. Se sintetizaron hidrogeles en todo el rango de composiciones Gel/HA desde un hidrogel puro de gelatina (100/0) hasta un hidrogel puro de ácido hialurónico (0/100). El aspecto macroscópico y microscópico (SEM) de los hidrogeles obtenidos puede verse en la Figura 14.

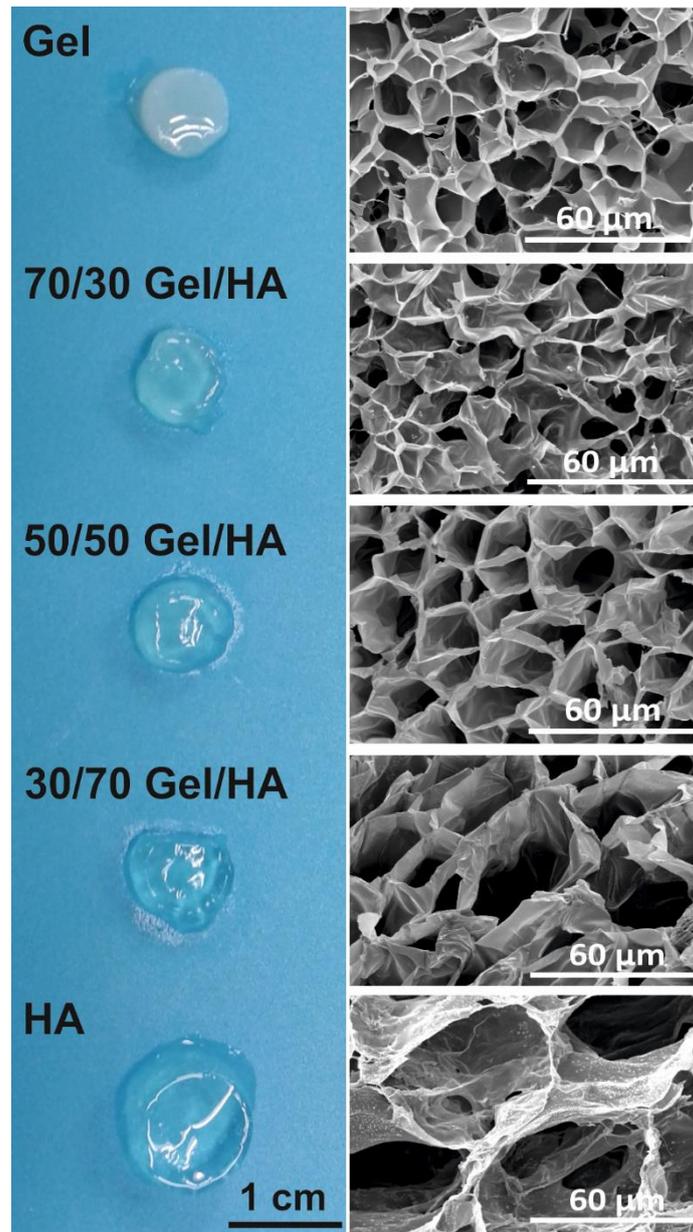


Figura 14. Serie de hidrogeles Gel/HA. Aspecto macroscópico tras 24 h de hinchado en agua y microestructura (observada mediante el SEM tras 24 h de hinchado en agua y liofilización) de los hidrogeles obtenidos

En cuanto a su aspecto macroscópico se observa que, tras la gelificación los hidrogeles de gelatina presentan una coloración más blanquecina y opaca mientras que los hidrogeles puros de ácido hialurónico son transparentes. Los hidrogeles que contienen ambos componentes (70/30, 50/50 y 30/70) presentan una coloración intermedia mezcla Gel/HA, con mayor o menor grado de opacidad en función de su contenido en gelatina.

Por otra parte, cabe destacar las diferencias de tamaño que presentan los hidrogeles sintetizados. Como se ha expuesto en el procedimiento, todos los hidrogeles sintetizados tienen un volumen de 300 μL si bien tras 24 h de hinchado en agua, el

tamaño de los hidrogeles que contienen una mayor proporción de ácido hialurónico sea sensiblemente superior a los hidrogeles que poseen un contenido mayoritario en gelatina. Este hecho se debe a la gran capacidad de absorción de agua que presenta el ácido hialurónico si se compara con la gelatina, que se estudiará más adelante.

En todos los casos, el aspecto macroscópico de los hidrogeles es homogéneo sin observarse separación de fases de los componentes, lo que confirmaría a nivel macroscópico la hipótesis de que el descenso de la viscosidad de la disolución permite una mejor homogeneidad de la disolución precursora del hidrogel y evita la formación de dominios separados de gelatina y ácido hialurónico.

Esta hipótesis también puede ser comprobada con mayor certeza a partir de las imágenes de la microestructura de los hidrogeles obtenidas mediante microscopía diferencial de barrido (SEM) de la Figura 14. Así, las imágenes muestran una microestructura de poros interconectados de panal de abeja con una distribución de tamaños homogénea para cada una de las muestras. El tamaño de poro obtenido para cada uno de los hidrogeles sintetizados, analizado a partir de las imágenes SEM mediante el programa ImageJ, puede verse en la Tabla 3, donde se comprueba que la adición de ácido hialurónico a los hidrogeles puros de gelatina provoca un aumento en el tamaño de los poros internos de su microestructura. De nuevo, este hecho puede estar relacionado con la mayor capacidad de retención de agua del ácido hialurónico. Como la sección de los hidrogeles observada ha sido liofilizada previamente, el tamaño de los poros y las cavidades internas de los hidrogeles pueden deberse a la eliminación de los cristales de agua previamente formados al congelar las muestras. De este modo, puesto que el ácido hialurónico es capaz de retener una mayor cantidad de agua, los dominios de agua y cristales de agua en su interior son mayores, generando mayores cavidades y poros cuando el agua es liofilizada.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos muestra dos grupos diferenciados. Por un lado, los hidrogeles 100/0, 70/30 y 50/50 no presentan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a tamaño medio de poro, obteniéndose un tamaño medio de 17 μm . Por otro lado, los hidrogeles 30/70 y 0/100, cuyo componente mayoritario es el ácido hialurónico, presentan un tamaño medio de 26 μm y 37 μm , respectivamente. La diferencia en el tamaño medio de poro de ambos grupos es estadísticamente significativa.

El tamaño de poro obtenido para los hidrogeles es consistente con los resultados que se presentan en la literatura para otros sistemas de hidrogeles similares. Así, Young *et al.* [72] describen la tendencia que se muestra en este proyecto donde la gelatina tiende a formar retículos con un menor tamaño de poro mientras que el ácido hialurónico presenta poros de mayor tamaño medio. Por su parte, Xu *et al.* sintetizan

hidrogeles de ácido hialurónico con tiramina con un tamaño de poro de 25 μm [73], algo inferior al valor obtenido para nuestro sistema. La diferencia se debe fundamentalmente a que en su estudio se emplea una mayor concentración de HRP y H_2O_2 , aumentando el grado de reticulación de los hidrogeles y los puntos de entrecruzamiento del mismo por lo que el tamaño del retículo disminuye.

Tabla 3. Tamaño de poro medio obtenido para la serie de hidrogeles Gel/HA a partir de imágenes de SEM de los hidrogeles empleando el software ImageJ. Se han analizado 3 réplicas de cada composición, contabilizándose los poros de 3 imágenes de cada réplica (aprox. 150 poros por composición).

Gel/HA	Tamaño (μm)
100/0	18.2 \pm 2.9
70/30	16.2 \pm 3.6
50/50	17.4 \pm 5.6
30/70	25.9 \pm 12.5
0/100	37.2 \pm 8.9

En cualquier caso, la estructura de poros interconectados que presentan los hidrogeles sintetizados permite la difusión a través del material por lo que se facilita el transporte de nutrientes, necesario para la viabilidad celular.

Finalmente, se realizó la síntesis de hidrogeles *in situ* en el reómetro con el objetivo de cuantificar de forma precisa el tiempo necesario para la gelificación de los hidrogeles [74]. Puesto que se trata de hidrogeles inyectables, interesa que la gelificación se produzca en unos pocos minutos para evitar el desplazamiento de la disolución precursora fuera de los límites del defecto donde es inyectada hasta que la gelificación tiene lugar.

El proceso de gelificación se siguió midiendo la evolución del módulo de almacenamiento (G') de los hidrogeles con el tiempo tras haber añadido el HRP y el H_2O_2 . Puesto que se parte de una disolución en estado líquido que gelifica hasta alcanzar un estado sólido estable, el aumento progresivo de G' indicará que se está produciendo el proceso de gelificación hasta alcanzarse un módulo estable, donde el hidrogel se encontrará totalmente reticulado [74]. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15.

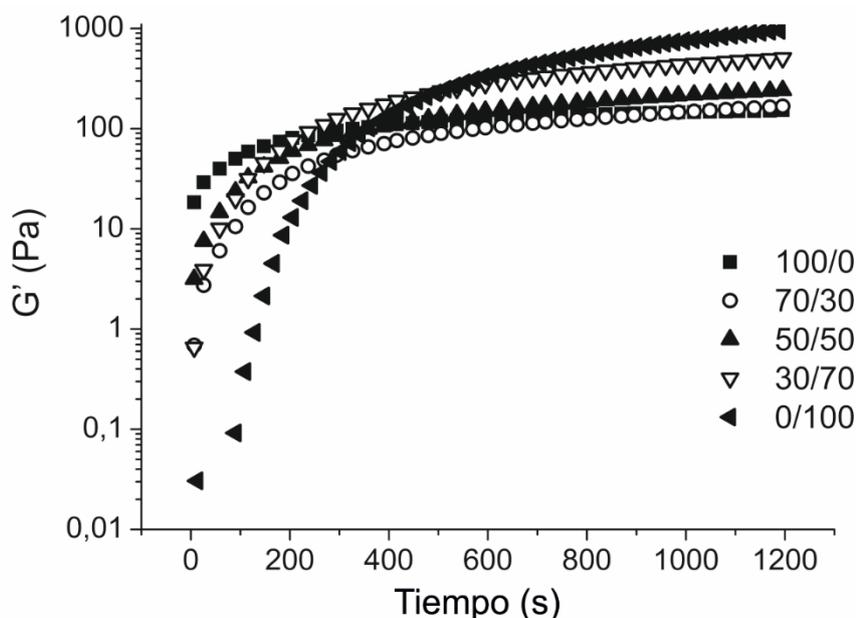


Figura 15. Cinética de entrecruzamiento de los hidrogeles Gel/HA a 37 °C seguida mediante la evolución del módulo de almacenamiento (G') de una medida de deformación en cizalla a 1 Hz y 1% de *strain* en el reómetro en función del tiempo de reacción. Las curvas presentadas muestran la media de las medidas para 3 muestras.

A partir de la gráfica se comprueba que el módulo de almacenamiento se estabiliza más rápidamente para los hidrogeles puros de gelatina (100/0) mientras que el tiempo necesario para la estabilización del módulo para el hidrogel puro de ácido hialurónico (0/100) es superior, lo que indica que la cinética de gelificación de los hidrogeles es más rápida para los hidrogeles con alto contenido en gelatina. Como ya se ha comentado, el tiempo necesario para la estabilización del módulo se corresponde con el tiempo de gelificación de los hidrogeles. A partir de las cinéticas mostradas en la Figura 15, el tiempo de gelificación se ha calculado como el punto de corte entre la pendiente inicial y final de las curvas [75].

Tabla 4. Tiempos de gelificación para la serie de hidrogeles Gel/HA obtenidos mediante las medidas de la evolución del módulo de almacenamiento con el tiempo en el reómetro ($n=3$)

Gel/HA	Tiempo gelificación (min)
100/0	1.87 ± 0.23
70/30	2.25 ± 0.15
50/50	2.19 ± 0.23
30/70	2.41 ± 0.07
0/100	4.54 ± 0.08

En la Tabla 4, se observan los resultados obtenidos para el tiempo de gelificación de los hidrogeles. A la vista de los resultados se puede concluir que el tiempo necesario para la gelificación de los hidrogeles aumenta con el contenido en ácido hialurónico, aunque en cualquier caso no supera los 5 min. Así, este sistema ofrece la posibilidad de modular el tiempo de gelificación necesario en función de la composición que presente el hidrogel, adaptándolo a las necesidades particulares de cada aplicación. Además, el sistema presentado permite regular el tiempo de gelificación variando los ratios de síntesis como el grado de sustitución de tiramina, la cantidad de peroxidasa o la concentración de H₂O₂ empleada para su reticulación [76]. Así, Sun *et al.* [60] muestran la influencia de dichos parámetros sobre el tiempo de gelificación realizando un estudio donde varían la proporción de tiramina, las concentraciones de HRP y H₂O₂ (siempre dentro de límites no citotóxicos) y la concentración de polímero empleada. Las conclusiones que se extraen de su estudio revelan que el aumento de tiramina y HRP provocan una disminución en el tiempo de gelificación mientras que si aumenta la concentración de H₂O₂ por encima de los 16 mM se necesita mayor tiempo para que la reticulación tenga lugar, mientras que la concentración de polímero empleada apenas afecta al tiempo de gelificación.

7.4. Grado de hinchado de los hidrogeles Gel/HA

La determinación de la cantidad de agua que pueden absorber los hidrogeles sintetizados se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.9. Se ensayaron 5 muestras de cada composición para la determinación de su contenido de agua en equilibrio (EWC).

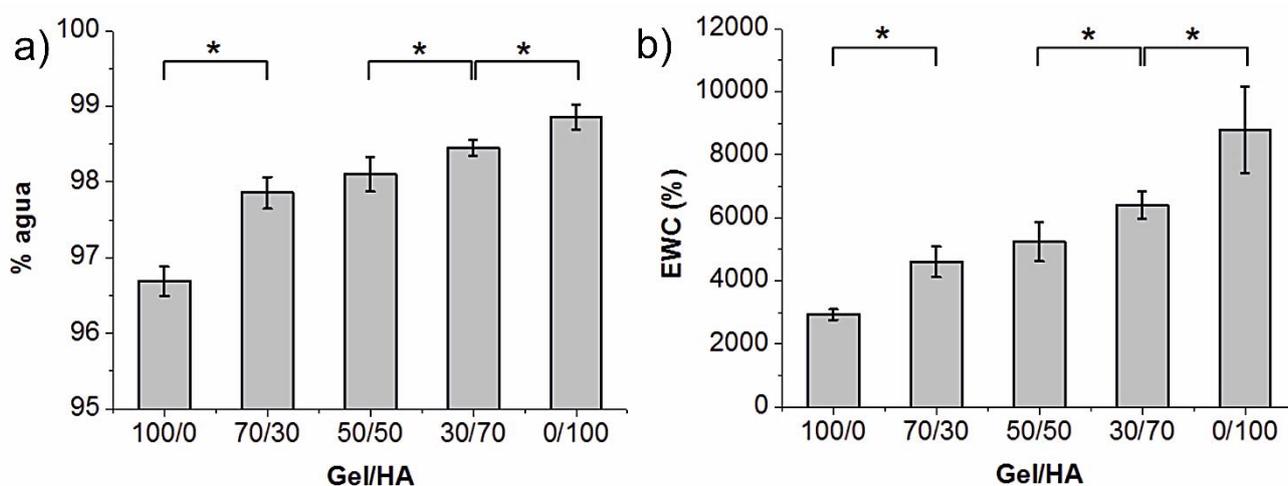


Figura 16. Fracción másica de agua presente en los hidrogeles (a) y contenido de agua en equilibrio (EWC) referido a la masa seca de material para la serie de hidrogeles Gel/HA (b). Las parejas de valores marcadas con (*) indican que la diferencia entre ambas es estadísticamente significativa.

Como se observa en la Figura 16a la cantidad de agua absorbida por los hidrogeles aumenta con el contenido de ácido hialurónico presente en su composición. Toda la serie de hidrogeles sintetizados exhibe una gran hidratación presentando, en su estado hinchado, una fracción másica de agua que oscila entre el 96% de agua (hidrogel puro de gelatina) y el 99% de agua (hidrogel puro de ácido hialurónico), obteniéndose materiales donde más de un 90% de su masa se corresponde con el agua albergada en su interior.

Por otro lado, la Figura 16b muestra el contenido de agua en equilibrio de los hidrogeles en relación con su masa seca. Así, mientras que el grado de hinchado para los hidrogeles puros de gelatina es de 2924%, los hidrogeles puros de ácido hialurónico presentan un valor de 8790%, siendo el comportamiento de las mezclas intermedio entre estos dos valores (Tabla 5). De este modo, el ácido hialurónico se presenta como un material más higroscópico por lo que los hidrogeles con mayor contenido en HA son capaces de retener una mayor cantidad de agua en equilibrio lo que se relaciona con el mayor tamaño de poro observado para estos hidrogeles. Estos resultados son consistentes con otros estudios que aparecen en la literatura [26], [28], [72]. Así, Wang *et al.* obtienen hidrogeles de gelatina entrecruzados con HRP con un grado de hinchado de 3000% [77] y Lee *et al.* presentan hidrogeles HA-Tyr con grado de hinchado variable entre 3000% y 6000% si se varía la concentración de H₂O₂ entre 728 μ M y 160 μ M, puesto que la capacidad de absorción de agua se reduce si existe una mayor densidad de entrecruzamiento [48].

Tabla 5. Contenido de agua de equilibrio (EWC) de los hidrogeles (n=5)

Gel/HA	EWC (%)
100/0	2924 \pm 169
70/30	4597 \pm 489
50/50	5232 \pm 620
30/70	6390 \pm 440
0/100	8790 \pm 1363

A partir del cálculo del contenido de agua de equilibrio de los hidrogeles pueden estimarse otros parámetros relacionados con la estructura de la red característica de los hidrogeles, de forma muy simplificada y con ayuda de una versión muy simple de la ecuación de Flory-Rehner [78], [79]: densidad de entrecruzamiento y peso molecular de cadena. Como nuestros hidrogeles (redes poliméricas) han sido preparados en presencia de grandes cantidades de agua (a partir de disoluciones al 2% w/v), estos cálculos son muy básicos (pues no se ha corregido las ecuaciones) y sólo se han calculado para poder

comparar las muestras. El proceso de cálculo para cada uno de los parámetros estimados y su definición se detalla en el Anexo III.

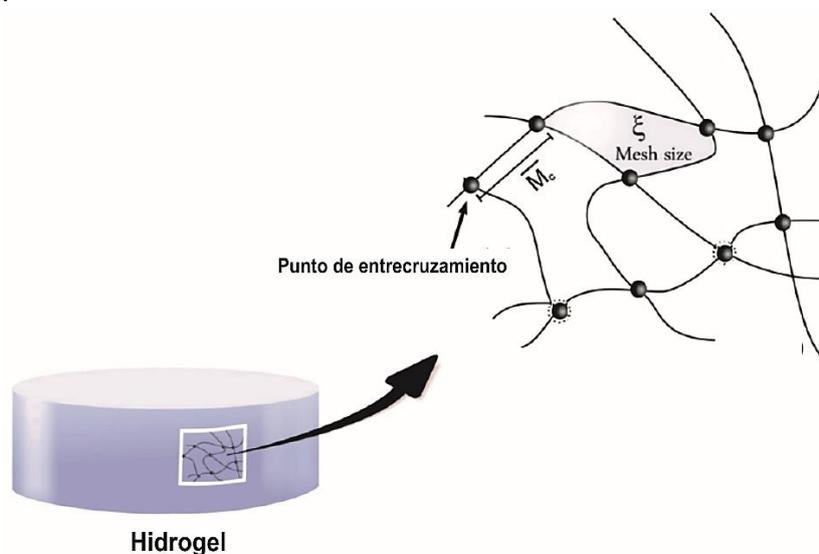


Figura 17. Esquema de la estructura de retículo de un hidrogel donde se incluye el tamaño de malla (mesh size) y el peso molecular medio de cadena (M_c). Adaptado de [80]

Así, con ayuda de los datos del ensayo de hinchado, se puede estimar el ratio volumétrico (Q_v) (es decir, el volumen que ocupa el hidrogel hinchado referido al volumen ocupado por el polímero seco), la densidad de entrecruzamiento (n_c/V_{pol}) (caracterizada por el número de moles de cadenas en el retículo por unidad de volumen del polímero) y el peso molecular medio de cadena (M_c) (es decir, el peso molecular entre nudos del retículo) (Figura 17). Estos parámetros pueden servir de aproximación para la determinación de la estructura de red que presentan los hidrogeles sintetizados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Ratio volumétrico (Q_v), densidad de entrecruzamiento (n_c/V_{pol}) y peso molecular medio de cadena (M_c) de los hidrogeles Gel/HA

Gel/HA	Q_v	n_c/V_{pol} (mol/cm ³)	M_c (g/mol)
100/0	43.1 ± 3.4	1.95	737648
70/30	64.0 ± 7.7	1.14	1199010
50/50	70.4 ± 9.2	1.11	1193743
30/70	83.1 ± 6.6	0.93	1375407
0/100	109.0 ± 17.7	0.69	1790180

En cuanto al ratio volumétrico (Q_v) se puede decir que mientras la gelatina hinchada ocupa un volumen 43 veces superior al que ocupa la gelatina seca, el ácido hialurónico ocupa 109 veces su volumen seco. Este resultado es consistente con el mayor grado de sustitución de tiramina medido en la gelatina (Gel-tyr) respecto al ácido

hialurónico (HA-try), que ha resultado menor, y que conduce a obtener hidrogeles más entrecruzados (mayor densidad de entrecruzamiento) en el caso de la gelatina y menos entrecruzados en el caso del hialurónico [26]. La menor densidad de reticulación del HA permite que los puntos de entrecruzamiento se encuentren más alejados y exista más espacio para albergar agua en el interior de la estructura de red polimérica [28].

En cuanto a los hidrogeles mezcla Gel/HA, tanto el grado de reticulación como el peso molecular medio entre cadenas se mantiene en valores intermedios a los polímeros puros. En cualquier caso, el aumento en la proporción de ácido hialurónico en los hidrogeles provoca un descenso en el grado de entrecruzamiento y, por tanto, un aumento del peso molecular medio de cadena entre puntos de entrecruzamiento y de la cantidad de agua absorbida.

7.5. Degradación enzimática de los hidrogeles Gel/HA

El estudio de la degradación enzimática de los hidrogeles se llevó a cabo como se indica en el apartado 6.10, empleando una concentración de enzimas de 10 U/mL de hialuronidasa y 3 U/mL de colagenasa en DPBS. Se ha decidido emplear una mezcla de ambas enzimas porque está demostrado que una combinación de ambas produce mayores velocidades de degradación que el empleo de una sola [26] y puede mimetizar mejor lo que ocurre en el organismo donde están presentes ambas enzimas. Las concentraciones empleadas se encuentran en el rango de concentraciones que se emplean en otros estudios de degradación similares [72], [81], sin pretender ser cantidades similares a las del organismo, de las que no existe literatura.

La degradación de los hidrogeles se siguió mediante el cálculo de la masa perdida a diferentes tiempos de inmersión en la disolución de enzimas. El cálculo se realiza de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ pérdida masa} = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \cdot 100 \quad (II)$$

Donde m_0 es la masa inicial de los hidrogeles en estado hinchado y m_t es la masa de los hidrogeles a los diferentes tiempos de degradación.

Para la realización del estudio de degradación se ensayaron 5 réplicas de cada una de las composiciones de hidrogeles sintetizados. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18.

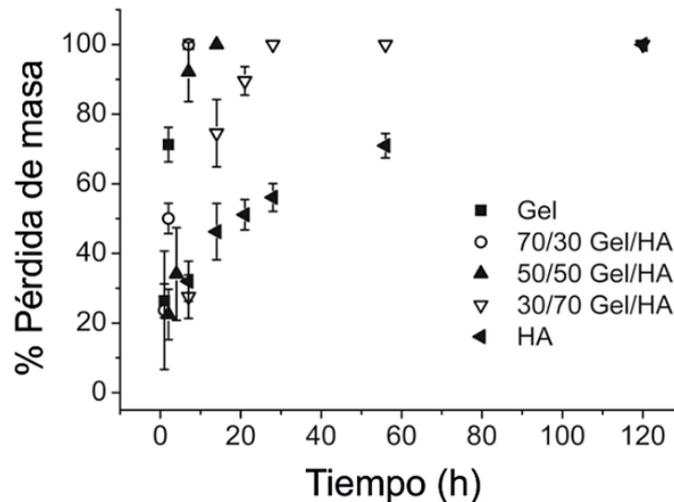


Figura 18. Estudio de degradación enzimática (n=5). Representación de la pérdida de peso de los hidrogeles con el tiempo

Como muestran los resultados, la degradación de los hidrogeles de gelatina se produce de forma muy rápida, alcanzándose su degradación completa en 7 h mientras que los hidrogeles de ácido hialurónico presentan una velocidad de degradación menor, alcanzándose su degradación completa en 5 días (120 h). Las velocidades de degradación que presenta el sistema de hidrogeles propuesto en este proyecto son similares a lo descrito en otros estudios. Así, Wang *et al.* [64] y Li *et al.* [76] presentan hidrogeles de gelatina que en presencia de 6.7 U/mL y 10 U/mL de colagenasa se degradan completamente en menos de 7 h. Por su parte, Lee *et al.* presentan un sistema de hidrogeles inyectables de ácido hialurónico donde en presencia de 2.5 U/mL de hialuronidasa, la degradación completa se produce en 50 h para hidrogeles con menor densidad de entrecruzamiento, pues se ha empleado una concentración menor de HRP [48].

Los hidrogeles mezcla de ambos componentes presentan perfiles de degradación intermedios, si bien se observa que aunque el contenido de gelatina en el hidrogel sea minoritaria (30% en los hidrogeles 30/70), la presencia de gelatina acelera considerablemente el proceso de degradación reduciéndose el tiempo de degradación completa de 120 h para el hidrogel 0/100 (sin gelatina) a 28 h para el hidrogel 30/70. Por su parte, los hidrogeles 50/50 y 70/30 cuyo contenido en gelatina es superior, presentan un perfil de degradación muy similar al de la gelatina, alcanzándose la degradación completa en 7 h como en el caso de los hidrogeles puros de gelatina.

Así, en las mezclas, se produce en primer lugar la degradación de la gelatina por medio de la colagenasa, dejando espacios libres entre las cadenas de ácido hialurónico lo que mejora la accesibilidad de la hialuronidasa para degradar el ácido hialurónico más fácilmente, lo que disminuye los tiempos necesarios para la degradación total de estos hidrogeles en comparación con los hidrogeles puros de ácido hialurónico.

Además del estudio de la pérdida de masa de los hidrogeles, se realizó un ensayo de hinchado para la serie de hidrogeles Gel/HA cuando se había alcanzado un 20-30% de la degradación de los mismos. El objetivo de este estudio es comparar el comportamiento en cuanto a hinchado de los hidrogeles sin degradación y de los hidrogeles en proceso de degradación y relacionarlo con la influencia de la degradación sobre la estructura interna de los hidrogeles [48].

La cantidad de agua de equilibrio (EWC) para los hidrogeles degradados un 20-30% se calculó siguiendo el mismo procedimiento descrito para los hidrogeles originales en el apartado 6.9. En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos en comparación con los valores de EWC que presentan los hidrogeles sin degradar.

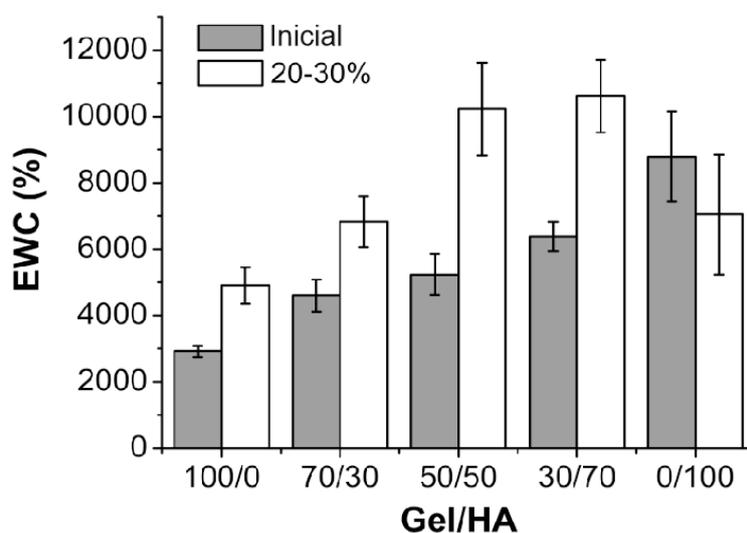


Figura 19. Comparación del grado de hinchado de los hidrogeles (EWC) inicialmente (Inicial) y tras haber sido degradados un 20-30%

De forma general, el grado de hinchado de los hidrogeles aumenta para todas las composiciones cuando se somete a los hidrogeles a un proceso de degradación enzimática. Este hecho indica que la degradación que tiene lugar es una degradación homogénea (tipo bulk) en todo el hidrogel [48]. La degradación interna de los hidrogeles provoca la ruptura de los enlaces peptídicos para la gelatina y de los enlaces β -1,3-glicosídicos para el ácido hialurónico provocando la disminución de entrecruzamientos. Además, la ruptura de enlaces genera la aparición de grupos hidroxilo capaces de absorber más agua. Por otra parte, como la gelatina degrada primero, los espacios creados en los hidrogeles mezcla por dicha degradación mejoran la difusión de la enzima, aumentando la velocidad de degradación. En el caso de los hidrogeles puros de ácido hialurónico, no se produce un cambio significativo en el EWC debido a que la difusión de la enzima hacia el interior de estos hidrogeles es más complicada.

7.6. Ensayo de compresión de hidrogeles Gel/HA

El ensayo de compresión se llevó a cabo como se expone en el apartado 6.11 sobre 5 réplicas de cada una de las composiciones sintetizadas. A partir de las curvas tensión-deformación obtenidas, se calculó el módulo de Young de los hidrogeles. Los resultados se muestran en la Figura 20.

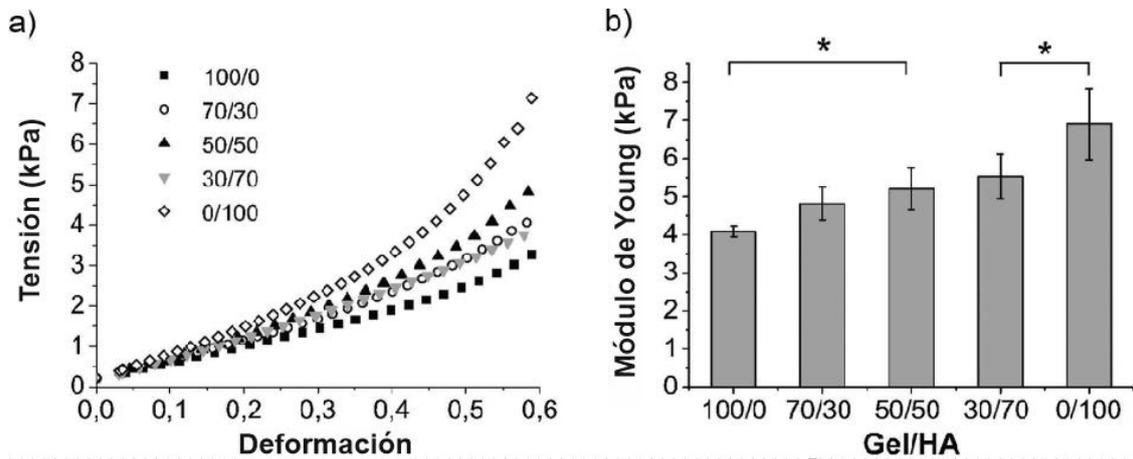


Figura 20. Ensayo de compresión no confinada: a) curvas tensión-deformación obtenidas para los hidrogeles, b) módulo de Young para los hidrogeles Gel/HA calculado a partir de la pendiente de las curvas de a) en su tramo lineal (hasta un 20% de deformación). * indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos marcados

Las curvas tensión-deformación obtenidas (Figura 20a) muestran un comportamiento lineal para todas las muestras hasta un 30% de deformación, lo que se corresponde con la zona de comportamiento elástico de los hidrogeles. Por otro lado, las curvas muestran que para los hidrogeles con mayor proporción de ácido hialurónico se necesita aplicar más tensión para deformar el material.

A partir de las curvas tensión-deformación puede determinarse el módulo de Young de los hidrogeles como la pendiente de la curva en el tramo lineal. En este caso, se calculó el módulo de Young de los hidrogeles considerando como tramo lineal el comprendido hasta un 20% de deformación en todos los casos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20b y en la Tabla 7.

Tabla 7. Módulo de Young obtenido a partir de los ensayos de compresión no confinada

Gel/HA	E (kPa)
100/0	4.1 ± 0.1
70/30	4.9 ± 0.4
50/50	5.3 ± 0.6
30/70	5.5 ± 0.6
0/100	6.9 ± 0.9

A partir de los resultados obtenidos se puede comprobar que un aumento en la proporción de ácido hialurónico presente en los hidrogeles mejora sus propiedades mecánicas, aumentando el módulo de Young desde los 4.1 kPa (hidrogel 100/0) hasta 6.9 kPa (hidrogel 0/100) lo que se traduce en una mejora del módulo de Young de más del 68%.

Para entender cómo el ácido hialurónico refuerza los hidrogeles de gelatina hay que determinar qué factores contribuyen a la resistencia mecánica de los hidrogeles. Estos factores son el peso molecular de cadena entre puntos de entrecruzamiento, el contenido de agua del hidrogel, su composición química, la rigidez de las cadenas poliméricas y su coeficiente de permeabilidad [7], [82].

La gelatina presenta mayor grado de entrecruzamiento y un menor peso molecular de cadena entre puntos de entrecruzamiento que el ácido hialurónico como consecuencia de su mayor grado de sustitución de moléculas de tiramina. De acuerdo con estas características, debería presentar mejores propiedades mecánicas que el HA. Sin embargo, el ácido hialurónico es quien presenta un mayor módulo de Young debido a que la resistencia mecánica viene determinada, en este caso, por el agua retenida en el interior de la estructura cuando se somete al hidrogel a una deformación. De este modo, el agua actúa como un fluido incompresible que se opone a las fuerzas de compresión, mejorando la resistencia mecánica [83].

Por otro lado, la menor permeabilidad que presenta el HA ($1.8 \times 10^{-12} \text{ m}^4/\text{N}\cdot\text{s}$ [84]) respecto a la gelatina ($0.758 \times 10^{-10} \text{ m}^4/\text{N}\cdot\text{s}$ [85]) junto con una mayor rigidez de las cadenas de ácido hialurónico [53] contribuyen también a mejorar sus propiedades mecánicas y a lograr que el empleo del HA sirva como refuerzo mecánico para los hidrogeles de gelatina.

Los valores de módulo obtenidos con este sistema de hidrogeles Gel/HA no superan los 7 kPa. Los valores de módulo de Young para los tejidos blandos varían en

función de las características que presenta el tejido. En el caso del músculo, se encuentran en el rango de 2-12 kPa, mientras que para la córnea oscilan entre 7.5-50 kPa [86], siendo necesario para algunas aplicaciones un refuerzo de los hidrogeles con el objetivo de alcanzar estos requisitos mecánicos.

7.7. Fabricación de scaffolds de PLLA y empleo de hidrogeles de gelatina como relleno

Como hemos visto, las propiedades mecánicas de estos hidrogeles son algo bajas para su aplicación en algunos tejidos que requieren de mayor resistencia. Por ello, se propone el empleo de hidrogeles de gelatina inyectable como relleno de los poros de un scaffold de PLLA. El papel del scaffold es actuar como soporte para cumplir con los requisitos mecánicos exigidos por la aplicación, el papel de la gelatina es servir de matriz encapsuladora de células. Así, en este caso, hemos sustituido la adición de ácido hialurónico a los hidrogeles por su inclusión en una matriz tridimensional de PLLA más rígida. Puesto que se va a incluir en el interior de esta matriz un hidrogel de gelatina, el material sintetizado mantendrá unas buenas características de adhesión y proliferación celular.

La fabricación de los scaffolds de PLLA se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 6.12. Una vez preparados los scaffolds se comprobó la estructura porosa obtenida y la ausencia de restos de porógeno en el interior del scaffold por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

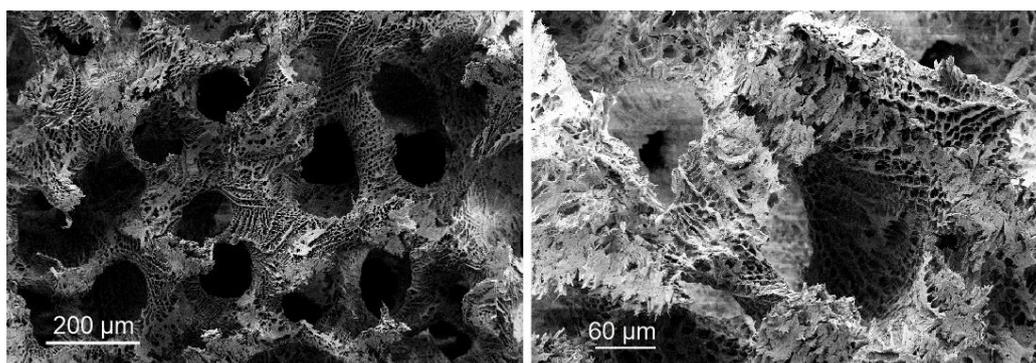


Figura 21. Microestructura de los scaffolds de PLLA (imágenes de FESEM)

En la Figura 21 se muestra la microestructura de los scaffolds de PLLA. La estructura compuesta por macroporos generados por el porógeno empleado durante la síntesis y por microporos producidos por la eliminación del disolvente se aprecia de forma clara [69]. Además, no se observa la presencia de porógeno en el interior de los

poros, por lo que el procedimiento seguido para la fabricación y el lavado de los scaffolds es adecuado.

Una vez preparados los scaffolds se procedió a rellenar sus poros con hidrogeles inyectables de gelatina, siguiendo el procedimiento expuesto en el apartado 6.13. El cálculo del volumen de hidrogel necesario para cubrir completamente los poros del scaffold se realizó teniendo en cuenta la porosidad de los scaffolds. Así, considerando un 90% de porosidad [69] y unas dimensiones de scaffold de 4 mm de diámetro y 2 mm de altura, el volumen de hidrogel necesario es de 25 μ L por scaffold.

Tras la gelificación de los hidrogeles en el interior de los scaffolds de PLLA, se observaron las muestras con ayuda de una lupa electrónica binocular (LEICA MZ APO).

Para su visualización, las muestras se liofilizaron con el objetivo de apreciar de forma clara la presencia de gelatina en el interior de los poros. De este modo, se evitaban las dificultades para la visualización de la gelatina por la presencia de agua ocluida también en el interior del scaffold.

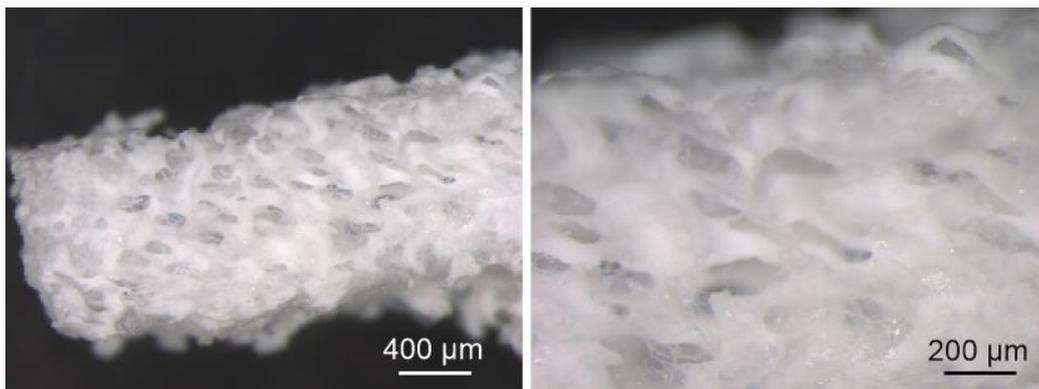


Figura 22. Sección de scaffolds de PLLA con relleno de hidrogel de gelatina en sus poros

La Figura 22 muestra las imágenes obtenidas de la sección de los scaffolds tras rellenar sus poros con un hidrogel inyectable de gelatina. En toda la sección del scaffold se puede observar la presencia de gelatina, identificable porque cubre y tapa en su totalidad gran parte de la porosidad del scaffold y se identifica una película que recubre la estructura porosa. Así, los poros están ocluidos con gelatina y el aspecto brillante que se observa en algunas zonas del scaffold es característico de la gelatina liofilizada.

7.8. Ensayo de compresión sobre los scaffolds

El ensayo de compresión sobre los scaffolds se realizó siguiendo el procedimiento expuesto en el apartado 6.14. Se ensayaron scaffolds con y sin hidrogel de gelatina en sus poros.

Tras la realización del ensayo se obtuvieron las curvas tensión-deformación para los dos tipos de materiales ensayados. Los resultados se muestran en la Figura 23.

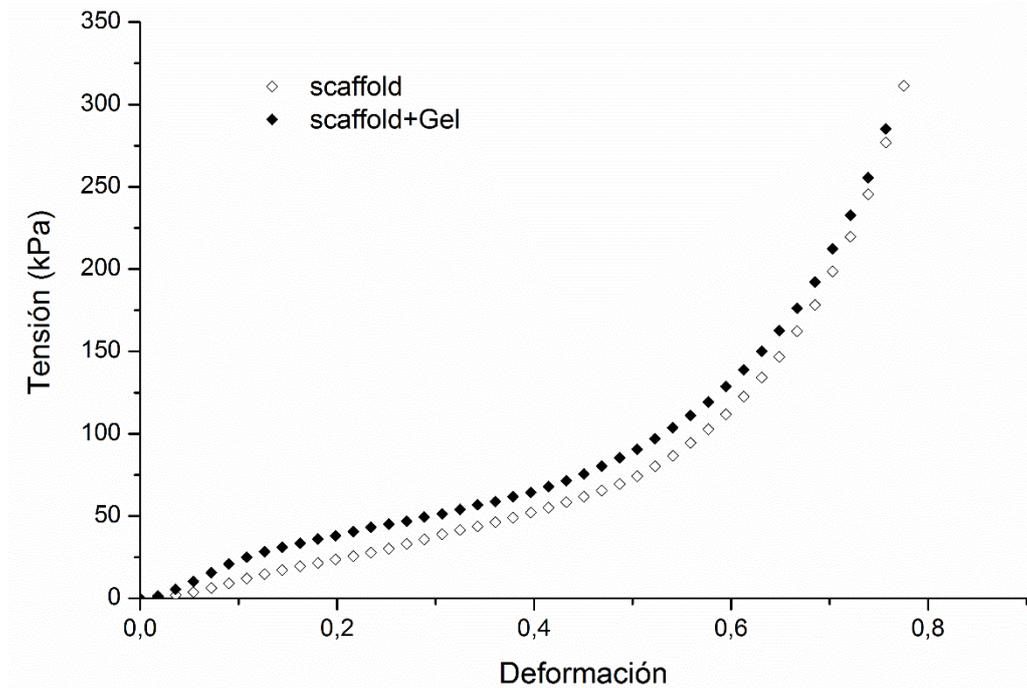


Figura 23. Curvas tensión-deformación promedio obtenidas para los scaffolds de PLLA y los scaffolds rellenos de gelatina medidos en inmersión en agua y tras haber alcanzado el equilibrio en agua. Se ensayaron 5 réplicas de cada material.

A partir de las curvas obtenidas, se pueden diferenciar las tres zonas características del ensayo de compresión de scaffolds [68], [87]. Para deformaciones bajas (hasta un 10%), se observa el tramo lineal correspondiente a la deformación elástica de las trabéculas de los poros. El tramo de deformaciones medias correspondiente entre el 10% y el 40% se corresponde con la zona de plateau donde se produce el pandeo de las trabéculas del scaffold, ocasionando una deformación brusca de la muestra sin apenas incremento de la carga. Finalmente, la parte final de la curva (para deformaciones superiores al 40%) se corresponde con la zona de densificación donde se produce el colapso de los poros del scaffold, la deformación es permanente y se produce un incremento considerable de la carga.

Por otro lado, se comprueba que la tensión necesaria para alcanzar un determinado valor de deformación de los scaffolds es mayor en el caso de los scaffolds

que contienen gelatina en sus poros, ejerciendo este relleno de refuerzo estructural. El efecto de la gelatina en el interior de los poros del scaffold puede analizarse a partir del módulo elástico aparente obtenido para ambos materiales (con y sin gelatina) a partir del ajuste lineal en la primera zona de las curvas tensión-deformación.

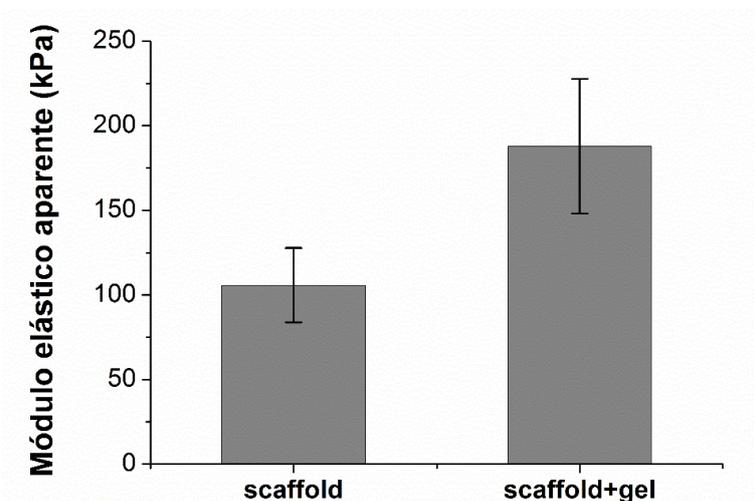


Figura 24. Módulo elástico aparente obtenido a partir de las curvas tensión-deformación del ensayo de compresión en inmersión para scaffolds sin gelatina y con relleno de gelatina en sus poros (n=5)

La Figura 24 muestra el valor de módulo elástico aparente obtenido para los scaffolds ensayados. Se comprueba que la introducción de gelatina en los poros del scaffold mejora sus propiedades mecánicas significativamente, alcanzándose un valor medio de módulo de 187.85 kPa frente a 105.76 kPa en el caso de los scaffolds sin relleno de gelatina. Como ya se ha comentado, el agua retenida en el interior del hidrogel actúa como un fluido incompresible que se opone a las fuerzas de compresión, mejorando la resistencia mecánica. Además, cabe destacar que los resultados obtenidos resultan consistentes con los que se muestran en la literatura, donde se presentan resultados de módulo elástico aparente para scaffolds de PLLA que oscilan entre 200 kPa y 500 kPa [69], [88], en función de la concentración de la disolución de PLLA empleada para la síntesis, la cantidad de porógeno utilizada y el método de realización del ensayo (sobre scaffolds secos o en inmersión). Así, los scaffolds ensayados en inmersión y que presentan una menor concentración de PLLA, similar a la empleada en este proyecto son los que tienen un módulo aparente más bajo y similar al obtenido en este estudio.

Así, el sistema formado por scaffold e hidrogel de gelatina permite obtener un biomaterial con las propiedades mecánicas adecuadas para algunas de las aplicaciones donde el uso del hidrogel solo no era posible por este motivo. Además, como ya se ha comentado estos materiales mantienen las secuencias de adhesión celular necesarias gracias a la presencia de gelatina en los mismos.

7.9. Cultivos celulares sobre los compuestos scaffold+hidrogel

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.15, se realizó el cultivo de fibroblastos de la línea celular L929 sobre los materiales sintetizados. Para comprobar el efecto de la presencia de hidrogeles de gelatina en el interior del scaffold, todos los ensayos realizados se llevaron a cabo en scaffolds con y sin gelatina.

En primer lugar, se realizó un ensayo Live/Dead para determinar la viabilidad celular del sistema compuesto por hidrogeles inyectables de gelatina en el interior de un scaffold de PLLA. Las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia se muestran en la Figura 25.

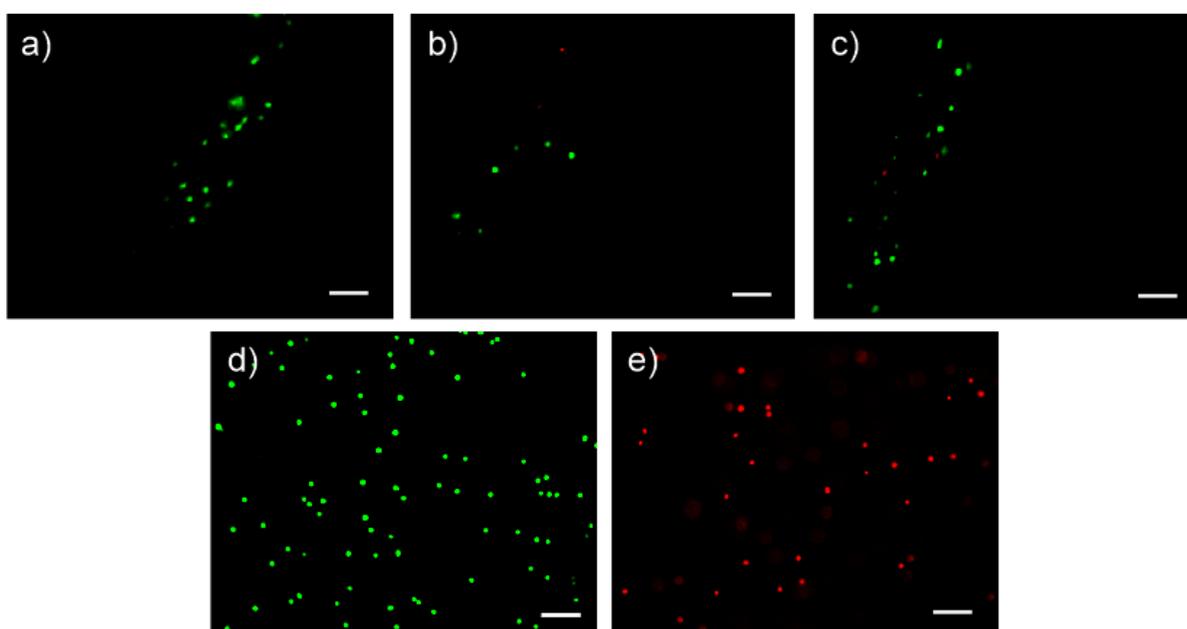


Figura 25. Imágenes del ensayo de viabilidad celular Live/Dead (las células vivas se marcan en verde y las muertas en rojo) tras 3 h de siembra celular (fibroblastos L929) y gelificación correspondiente a la parte superficial de un scaffold+gel (a), el centro del scaffold (b) y la parte inferior del mismo (c). Las imágenes d) y e) se corresponden con el control negativo y positivo respectivamente. La barra de escala es de 100 μm para todas las imágenes

A la vista de las imágenes se puede concluir que los materiales empleados no son citotóxicos y, por otro lado, que la viabilidad celular no se ve comprometida por el proceso de encapsulación de las células ni el uso de peróxido en una concentración tan baja resulta citotóxica.

Las imágenes correspondientes al scaffold con gelatina muestran la supervivencia casi total de las células cultivadas a las 3 h de producirse la reacción de gelificación de los hidrogeles. Además, se observa la distribución de las células a través

de todas las capas del scaffold, si bien la parte central del scaffold (Figura 25b) presenta menor concentración celular que los extremos del scaffold (Figura 25a y Figura 25c) por la dificultad de conseguir rellenar perfectamente el centro del scaffold, siendo más fácil rellenar las zonas próximas a la superficie.

Los controles que se presentan, control negativo (Figura 25d) y control positivo (Figura 25e), se corresponde con células cultivadas sobre vidrio (viabilidad celular del 100%) y células cultivadas en presencia de metanol (viabilidad celular del 0%) y permiten comprobar que ambos fluoróforos tiñen adecuadamente, aportando validez a los resultados obtenidos para las muestras analizadas.

En términos generales se puede decir que el sistema de scaffold de PLLA con hidrogel inyectable de gelatina en su interior es viable a nivel celular, obteniéndose una viabilidad celular promedio del 88%. El cálculo de la viabilidad celular se ha realizado a partir de las imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia, empleando el programa ImageJ que permite el recuento celular. De este modo, se han contabilizado el número de células totales (vivas y muertas) en 5 muestras (3 imágenes por muestra), así como las células vivas presentes en las mismas, calculando el porcentaje de viabilidad para cada una de las muestras como el cociente entre las células vivas y el total de células contabilizadas.

En este caso, el valor de viabilidad promedio es de 88% asegurando que el sistema presentado es biocompatible puesto que se encuentra por encima de los límites marcados por la ISO 10993-5 de 2009 donde se señala que por debajo de un 70% de viabilidad se considera no biocompatible. Con todo esto, se demuestra que la reticulación de los hidrogeles no limita la viabilidad celular y que la introducción de la disolución de gelatina y las células en el interior del scaffold a vacío tampoco afecta negativamente a la supervivencia de las células.

La evolución de la morfología celular se realizó a partir del ensayo Actina/DAPI a dos tiempos de cultivos diferentes: 1 día y 7 días. Del mismo modo que para el ensayo de citotoxicidad, se cultivaron células en los dos tipos de materiales (scaffolds con y sin gelatina) para determinar la influencia de los hidrogeles en el desarrollo celular.

Las imágenes obtenidas tras un tiempo de incubación de 1 día se muestran en la Figura 26. Tras un 1 día de cultivo se observan las células con una morfología redondeada y con muy poco desarrollo de su citoesqueleto celular. En cuanto a las células sembradas en ausencia de gelatina se observa que tienden a formar agregados celulares y se aglomeran (Figura 26a) y además, puesto que el poro del scaffold está vacío, las células crecen adheridas a las paredes del scaffold (apreciable en las células de la parte inferior de la imagen Figura 26e) por lo que la distribución celular que se

consigue es mucho menos uniforme, habiendo presencia de grandes agregados y zonas con muy baja densidad celular (Figura 26c).

Por su parte, las células sembradas en el sistema scaffold+Gel muestran una mejor distribución celular (Figura 26b en comparación con Figura 26a), un citoesqueleto algo más desarrollado (Figura 26f).

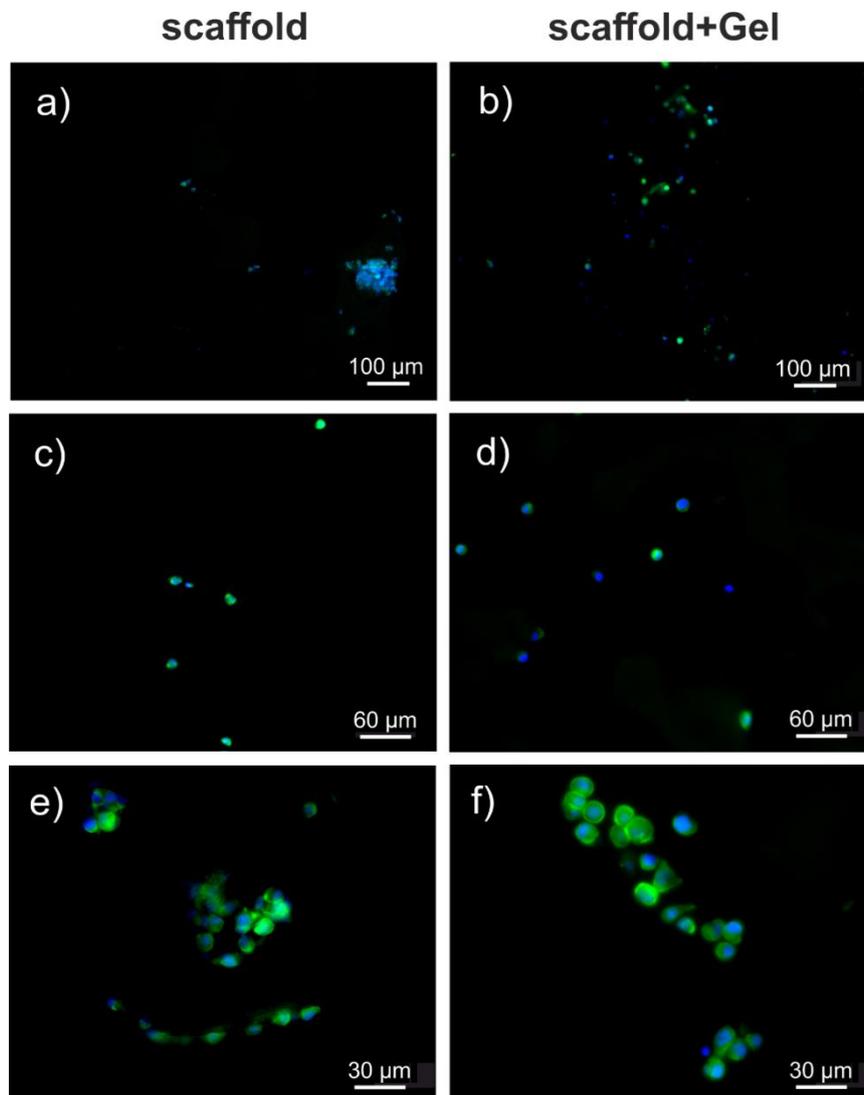


Figura 26. Morfología celular de fibroblastos L929 tras 24 h de cultivo. Imágenes correspondientes al cultivo de células sobre scaffolds de PLLA sin gelatina (a, c y e) y sobre scaffolds con relleno de gelatina en sus poros (imágenes b, d y f)

Los indicios observados en las imágenes tomadas tras un día de incubación se confirman en las muestras observadas tras 7 días de cultivo celular, Figura 27. De forma general, se observa un mayor desarrollo de citoesqueleto celular cuando el material contiene gelatina (imágenes b, d y e). Además, la evolución de la morfología celular hacia la morfología fusiforme típica de los fibroblastos es más apreciable en este caso (Figura 27e), garantizándose que la presencia de gelatina mejora la adhesión celular y también su desarrollo y proliferación. En el caso de los scaffolds sin gelatina el proceso de

desarrollo del citoesqueleto es más lento y apenas apreciable en algunas zonas del scaffold (Figura 27a y Figura 27c).

Además, si se comparan los resultados obtenidos para los dos tiempos de cultivo celular sí que es apreciable un aumento notable en la densidad celular obtenida, por lo que el sistema de materiales empleados permite la proliferación celular, es viable y presenta por ello ventajas a nivel biológico.

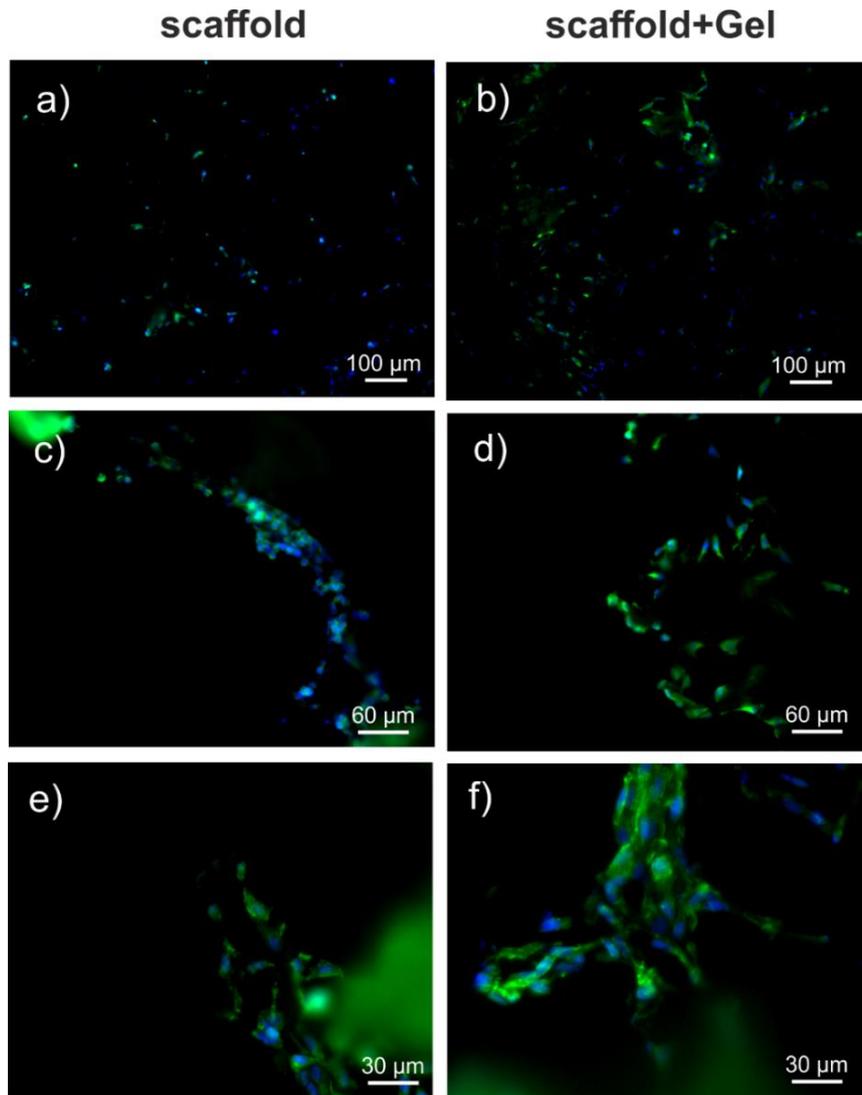


Figura 27. Morfología celular de fibroblastos L929 tras 7 días de cultivo. Imágenes correspondientes al cultivo de células sobre scaffolds de PLLA sin gelatina (a, c y e) y sobre scaffolds con relleno de gelatina en sus poros (imágenes b, d y f)

El aumento de la densidad celular con el tiempo puede observarse de forma más clara si se comparan imágenes de ambos tiempos donde solo se incluyen los núcleos celulares (Figura 28).

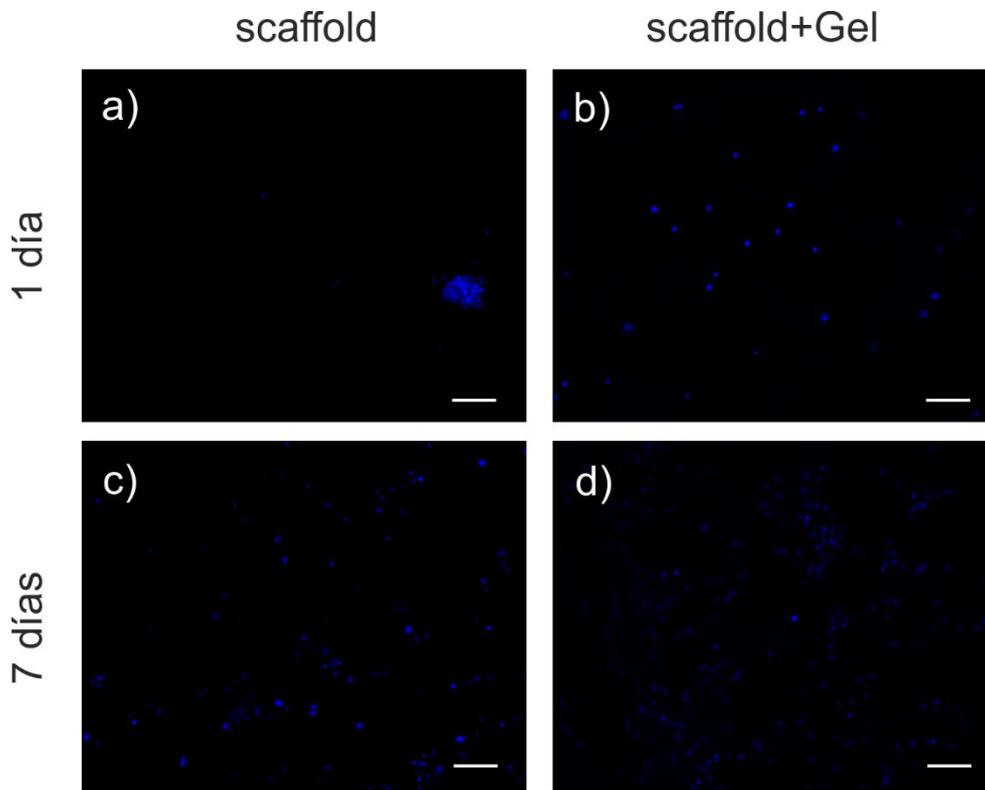


Figura 28. Núcleos celulares de fibroblastos L929 tras 1 día de cultivo (a y b) y 7 días de cultivo (c y d). La barra de escala es de 100 μm para todas las imágenes

A la vista de las imágenes obtenidas, se observa un aumento notable en el número de células con el paso del tiempo por lo que el material (con y sin gelatina) permite la proliferación celular. Sin embargo, la Figura 28d presenta una mayor densidad de núcleos si se compara con la imagen correspondiente de los scaffolds sin gelatina para el mismo tiempo (Figura 28c) por lo que se confirma que el desarrollo celular en presencia de gelatina mejora la proliferación celular. Además, la presencia del hidrogel permite un cultivo tridimensional de las células que no crecen adheridas a las paredes del scaffold, mejorando su estimulación y asegurando una distribución celular más homogénea como se observa en la imagen.

8. Conclusiones

En este proyecto se ha abordado la síntesis y caracterización de hidrogeles inyectables de gelatina y ácido hialurónico para su aplicación como biomateriales en el campo de la regeneración de tejidos blandos.

En primer lugar, la adecuación de los pesos moleculares de los componentes de partida mediante la degradación ácida de los mismos ha permitido obtener hidrogeles mezcla Gel/HA con buenas propiedades macroscópicas y microscópicas, una estructura homogénea y la ausencia de separación de fases en los mismos.

Además, el sistema de hidrogeles Gel/HA ofrece la posibilidad de ajustar muchas de sus propiedades en función de la aplicación requerida. De este modo, se ha demostrado que variando la proporción de cada uno de sus componentes se puede regular el tiempo de gelificación de los mismos, su capacidad de absorción de agua, sus propiedades mecánicas y la velocidad de degradación del sistema.

En cuanto a sus propiedades de absorción de agua, toda la serie de hidrogeles sintetizada presenta un grado de hinchado suficiente para garantizar la correcta hidratación del material y mimetizar esta característica fundamental que presenta la matriz extracelular de los tejidos blandos, haciéndolos adecuados para su uso por garantizar una correcta difusión de nutrientes a las células encapsuladas en su interior.

Por otra parte, en cuanto a sus propiedades mecánicas, la incorporación de ácido hialurónico permite mejorar en más de un 68% el módulo de Young de este sistema de hidrogeles, adecuándolo a las exigencias de algunas aplicaciones. Sin embargo, los requerimientos mecánicos en algunos tejidos blandos exigen un refuerzo para que estos hidrogeles puedan emplearse. Como solución, se ha propuesto el uso de scaffolds de PLLA como soporte que garantice el refuerzo estructural, incorporando los hidrogeles en el interior de sus poros.

El nuevo sistema reforzado (scaffold+gel) se ha probado con el objetivo de analizar sus propiedades mecánicas, comprobándose un aumento sustancial que permite el uso de estos materiales cuando se requiere una mayor resistencia mecánica. Además, se ha demostrado que la introducción de hidrogeles en el interior del scaffold también consigue reforzar mecánicamente el sistema.

Finalmente, se ha comprobado la viabilidad celular de estos sistemas. El proceso de reticulación de los hidrogeles no resulta citotóxico a nivel celular ni la introducción de las células encapsuladas en el hidrogel dentro de los poros del scaffold empleando vacío limita la supervivencia celular, siendo el sistema biocompatible. Además, la

incorporación de hidrogeles inyectables de gelatina en el interior de los poros del scaffolds mejora, no solo la adhesión celular, sino la proliferación y el desarrollo de las células.

En resumen, se ha conseguido obtener una serie de hidrogeles de naturaleza proteína-polisacárido, capaces de imitar la matriz extracelular de los tejidos blandos con propiedades variables y que puede ser reforzada empleándose scaffolds de PLLA para aquellas aplicaciones donde se vaya a someter al biomaterial a mayores esfuerzos mecánicos.

9. Referencias

- [1] R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue engineering.," *Science*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, May 1993.
- [2] B. I. Jugdutt, "Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways.," *Curr. Drug Targets. Cardiovasc. Haematol. Disord.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–30, Mar. 2003.
- [3] N. P. Cohen, R. J. Foster, and V. C. Mow, "Composition and dynamics of articular cartilage: Structure, function, and maintaining healthy state," *J. Orthop. Sport. Phys. Ther.*, vol. 28, no. 4, pp. 203–215, 1998.
- [4] P. a. Levett, F. P. W. Melchels, K. Schrobback, D. W. Hutmacher, J. Malda, and T. J. Klein, "Chondrocyte redifferentiation and construct mechanical property development in single-component photocrosslinkable hydrogels," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 102, no. 8, pp. 2544–2553, 2014.
- [5] A. Chopra, V. Lin, A. McCollough, S. Atzet, G. D. Prestwich, A. S. Wechsler, M. E. Murray, S. a. Oake, J. Yasha Kresh, and P. a. Janmey, "Reprogramming cardiomyocyte mechanosensing by crosstalk between integrins and hyaluronic acid receptors," *J. Biomech.*, vol. 45, no. 5, pp. 824–831, 2012.
- [6] W. S. Turner, E. Schmelzer, R. McClelland, E. Wauthier, W. Chen, and L. M. Reid, "Human hepatoblast phenotype maintained by hyaluronan hydrogels," *J. Biomed. Mater. Res. Part B-Applied Biomater.*, vol. 82B, no. 1, pp. 156–168, 2007.
- [7] A. S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, pp. 18–23, 2012.
- [8] J. Kopecek and J. Yang, "Review - Hydrogels as smart biomaterials," *Polym. Int.*, vol. 56, no. 9, pp. 1078–1098, 2007.
- [9] S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, and E. Schacht, "Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review.," *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 5, pp. 1387–1408, May 2011.
- [10] K. L. Spiller, S. A. Maher, and A. M. Lowman, "Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects," *Tissue Eng.*, vol. 17, no. 4, pp. 281–299, 2011.
- [11] S. J. Bryant and K. S. Anseth, "Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 59, no. 1, pp. 63–72, Jan. 2002.
- [12] O. Wichterle and D. Lim, "Hydrophilic Gels for Biological Use," *Nature*, vol. 185, no. 4706, pp. 117–118, Jan. 1960.
- [13] L. Ferreira, M. M. Vidal, and M. H. Gil, "Evaluation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) gels as drug delivery systems at different pH values," *Int. J. Pharm.*, vol. 194, no. 2, pp. 169–180, 2000.
- [14] C. M. Nolan, C. D. Reyes, J. D. Debord, A. J. Garcia, and L. A. Lyon, "Phase transition behavior, protein adsorption, and cell adhesion resistance of poly(ethylene glycol) cross-linked microgel particles.," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 4, pp.

2032–2039, 2005.

- [15] U. Noth, L. Rackwitz, A. Heymer, M. Weber, B. Baumann, A. Steinert, N. Schutze, F. Jakob, and J. Eulert, "Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 83, no. 3, pp. 626–635, Dec. 2007.
- [16] M. Du, H. Liang, C. Mou, X. Li, J. Sun, Y. Zhuang, Z. Xiao, B. Chen, and J. Dai, "Regulation of human mesenchymal stem cells differentiation into chondrocytes in extracellular matrix-based hydrogel scaffolds.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 114, pp. 316–323, Feb. 2014.
- [17] Y. Cheng, J. Lu, S. Liu, P. Zhao, G. Lu, and J. Chen, "The preparation, characterization and evaluation of regenerated cellulose/collagen composite hydrogel films.," *Carbohydr. Polym.*, vol. 107, pp. 57–64, Jul. 2014.
- [18] C. Zhu, D. Fan, Z. Duan, W. Xue, L. Shang, F. Chen, and Y. Luo, "Initial investigation of novel human-like collagen/chitosan scaffold for vascular tissue engineering.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 89, no. 3, pp. 829–840, Jun. 2009.
- [19] S. Tang, S. M. Vickers, H.-P. Hsu, and M. Spector, "Fabrication and characterization of porous hyaluronic acid-collagen composite scaffolds.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 82, no. 2, pp. 323–335, Aug. 2007.
- [20] S. Suri and C. E. Schmidt, "Photopatterned collagen–hyaluronic acid interpenetrating polymer network hydrogels," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 7, pp. 2385–2397, 2009.
- [21] Y. Li, H. Jia, Q. Cheng, F. Pan, and Z. Jiang, "Sodium alginate–gelatin polyelectrolyte complex membranes with both high water vapor permeance and high permselectivity," *J. Memb. Sci.*, vol. 375, no. 1, pp. 304–312, 2011.
- [22] X. Huang, Y. Zhang, X. Zhang, L. Xu, X. Chen, and S. Wei, "Influence of radiation crosslinked carboxymethyl-chitosan/gelatin hydrogel on cutaneous wound healing.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 33, no. 8, pp. 4816–4824, Dec. 2013.
- [23] H. Jiankang, L. Dichen, L. Yaxiong, Y. Bo, Z. Hanxiang, L. Qin, L. Bingheng, and L. Yi, "Preparation of chitosan-gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering.," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 1, pp. 453–461, Jan. 2009.
- [24] S.-H. Yang, P.-Q. Chen, Y.-F. Chen, and F.-H. Lin, "An in-vitro study on regeneration of human nucleus pulposus by using gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan tri-copolymer scaffold.," *Artif. Organs*, vol. 29, no. 10, pp. 806–814, Oct. 2005.
- [25] H. Tan, C. R. Chu, K. A. Payne, and K. G. Marra, "Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering.," *Biomaterials*, vol. 30, no. 13, pp. 2499–506, May 2009.
- [26] X. Z. Shu, Y. Liu, F. Palumbo, and G. D. Prestwich, "Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth," *Biomaterials*, vol. 24, no. 21, pp. 3825–3834, 2003.
- [27] W. Zhao, X. Jin, Y. Cong, Y. Liu, and J. Fu, "Degradable natural polymer hydrogels

- for articular cartilage tissue engineering," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 88, no. 3, pp. 327–339, 2013.
- [28] Z. Zhou, Z. Yang, L. Kong, L. Liu, Q. Liu, Y. Zhao, W. Zeng, Q. Yi, and D. Cao, "Preparation and Characterization of Hyaluronic Acid Hydrogel Blends with Gelatin," *J. Macromol. Sci. Part B-Physics*, vol. 51, no. 12, pp. 2392–2400, 2012.
- [29] S. Reinhard and G. Herbert, *Gelatine Handbook*. 2007.
- [30] M. a. da Silva, F. Bode, I. Grillo, and C. a. Dreiss, "Exploring the Kinetics of Gelation and Final Architecture of Enzymatically Cross-Linked Chitosan/Gelatin Gels," *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 4, pp. 1401–1409, 2015.
- [31] Z. Zhou, J. Chen, C. Peng, T. Huang, and H. Zhou, "Fabrication and Physical Properties of Gelatin/Sodium Alginate/Hyaluronic Acid Composite Wound Dressing Hydrogel," *J. Macromol. Sci. Part A-Pure Appl. Chem.*, vol. 51, no. 4, pp. 318–325, 2014.
- [32] Y. Lee, J. W. Bae, Y. W. Chun, H.-J. J. Sung, and K. D. Park, "In situ forming gelatin-based tissue adhesives and their phenolic content-driven properties," *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 18, pp. 2407–2414, 2013.
- [33] Y. Liu, L. Ren, and Y. Wang, "Crosslinked collagen-gelatin-hyaluronic acid biomimetic film for cornea tissue engineering applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 1, pp. 196–201, 2013.
- [34] S. Young, M. Wong, Y. Tabata, and A. G. Mikos, "Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules," *Proc. Twelfth Int. Symp. Recent Adv. Drug Deliv. Syst.*, vol. 109, no. 1–3, pp. 256–274, May 2005.
- [35] M. Wang, Y. Xia, and S. Wang, "Experimental study on repair of articular cartilage defects with homograft of marrow mesenchymal stem cells seeded onto poly-L-lactic acid/gelatin," *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, vol. 21, no. 7, pp. 753–758, 2007.
- [36] Y. Kimura, M. Ozeki, T. Inamoto, and Y. Tabata, "Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor," *Biomaterials*, vol. 24, no. 14, pp. 2513–2521, 2003.
- [37] X. Wu, Y. Liu, X. Li, P. Wen, Y. Zhang, Y. Long, X. Wang, Y. Guo, F. Xing, and J. Gao, "Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 1167–1177, 2010.
- [38] A. J. Kuijpers, P. B. van Wachem, M. J. a van Luyn, G. H. M. Engbers, J. Krijgsveld, S. A. J. Zaat, J. Dankert, and J. Feijen, "In vivo and in vitro release of lysozyme from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves," *J. Control. Release*, vol. 67, no. 2–3, pp. 323–336, 2000.
- [39] Y. Tabata, S. Hijikata, and Y. Ikada, "Enhanced Vascularization and Tissue Granulation by Basic Fibroblast Growth-Factor Impregnated in Gelatin Hydrogels," *J. Control. Release*, vol. 31, no. 2, pp. 189–199, 1994.
- [40] A. Hosaka, H. Koyama, T. Kushibiki, Y. Tabata, N. Nishiyama, T. Miyata, H. Shigematsu, T. Takato, and H. Nagawa, "Gelatin hydrogel microspheres enable

- pinpoint delivery of basic fibroblast growth factor for the development of functional collateral vessels," *Circulation*, vol. 110, no. 21, pp. 3322–3328, 2004.
- [41] E. Ruoslahti and M. D. Pierschbacher, "Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal.," *Cell*, vol. 44, no. 4, pp. 517–518, Feb. 1986.
- [42] B. Sarker, R. Singh, R. Silva, J. A. Roether, J. Kaschta, R. Detsch, D. W. Schubert, I. Cicha, and A. R. Boccaccini, "Evaluation of fibroblasts adhesion and proliferation on alginate-gelatin crosslinked hydrogel.," *PLoS One*, vol. 9, no. 9, p. e107952, 2014.
- [43] R. O. Hynes, "Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines," *Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 673–687, 2002.
- [44] R. O. Hynes, "Integrins: A family of cell surface receptors," *Cell*, vol. 48, no. 4, pp. 549–554, 1987.
- [45] A. V. Taubenberger, M. a. Woodruff, H. Bai, D. J. Muller, and D. W. Hutmacher, "The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation," *Biomaterials*, vol. 31, no. 10, pp. 2827–2835, 2010.
- [46] T. C. Laurent and J. R. Fraser, "The structure and function of hyaluronan: An overview," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 74, no. 2, pp. A1–7, 1996.
- [47] J. R. E. Fraser and T. C. Laurent, "Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover," *J. Intern. Med.*, vol. 242, no. 1, pp. 27–33, 1997.
- [48] F. Lee, J. E. Chung, and M. Kurisawa, "An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid-tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate," *Soft Matter*, vol. 4, no. 4, pp. 880–887, 2008.
- [49] K. S. Girish and K. Kemparaju, "The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview.," *Life Sci.*, vol. 80, no. 21, pp. 1921–1943, May 2007.
- [50] O. Ishida, Y. Tanaka, I. Morimoto, M. Takigawa, and S. Eto, "Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 12, no. 10, pp. 1657–1663, Oct. 1997.
- [51] W. Knudson and R. S. Peterson, "The hyaluronan receptor: CD44," in *Chemistry and biology of hyaluronan*, Elsevier, Ed. 2004.
- [52] G. D. Mogoşanu and A. M. Grumezescu, "Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing," *Int. J. Pharm.*, vol. 463, no. 2, pp. 127–136, 2014.
- [53] T. Hardingham, "Solution properties of hyaluronan," in *Chemistry and biology of hyaluronan*, Elsevier, Ed. 2004.
- [54] L. Weng, H. Pan, and W. Chen, "Self-crosslinkable hydrogels composed of partially oxidized hyaluronan and gelatin: in vitro and in vivo responses.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 85, no. 2, pp. 352–365, May 2008.
- [55] Y. C. Chen, W. Y. Su, S. H. Yang, A. Gefen, and F. H. Lin, "In situ forming hydrogels composed of oxidized high molecular weight hyaluronic acid and gelatin for nucleus pulposus regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 2, pp. 5181–5193, 2013.

- [56] M. G. Ondeck and A. J. Engler, "Mechanical Characterization of a Dynamic and Tunable Methacrylated Hyaluronic Acid Hydrogel," *J. Biomech. Eng.*, vol. 138, no. 2, p. 21003, Feb. 2016.
- [57] L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. Van Luyn, P. B. Van Wachem, P. Nieuwenhuis, and J. Feijen, "Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 6, no. 8, pp. 460–472, Aug. 1995.
- [58] J.-Y. Lai, "Biocompatibility of chemically cross-linked gelatin hydrogels for ophthalmic use," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 6, pp. 1899–1911, Jun. 2010.
- [59] L. S. Moreira Teixeira, J. Feijen, C. A. van Blitterswijk, P. J. Dijkstra, and M. Karperien, "Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 33, no. 5, pp. 1281–1290, 2012.
- [60] Y. Sun, Z. Deng, Y. Tian, and C. Lin, "Horseradish peroxidase-mediated in situ forming hydrogels from degradable tyramine-based poly(amido amine)s," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 127, no. 1, pp. 40–48, 2013.
- [61] S. Sakai, K. Hirose, K. Taguchi, Y. Ogushi, and K. Kawakami, "An injectable, in situ enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 30, no. 20, pp. 3371–3377, 2009.
- [62] R. Jin, "InTech," *In-situ forming biomimetic hydrogels for tissue regeneration*, 2012. [Online]. Available: Rong Jin (2012). In-Situ Forming Biomimetic Hydrogels for Tissue Regeneration, Biomedicine, Dr. Chao Lin (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/38852. Available from: <http://www.intechopen.com/books/biomedicine/in-situ-forming-biomimetic-hydrogels-for-tissue-regener>. [Accessed: 20-Jun-2016].
- [63] A. Darr and A. Calabro, "Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels," *J. Mater. Sci. Med.*, vol. 20, no. 1, pp. 33–44, 2009.
- [64] L. S. Wang, C. Du, J. E. Chung, and M. Kurisawa, "Enzymatically cross-linked gelatin-phenol hydrogels with a broader stiffness range for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 5, pp. 1826–1837, 2012.
- [65] S. Poveda-Reyes, V. Moulisova, E. Sanmartín-Masiá, L. Quintanilla-Sierra, M. Salmerón-Sánchez, and G. G. Ferrer, "Gelatin-Hyaluronic Acid Hydrogels with Tuned Stiffness to Counterbalance Cellular Forces and Promote Cell Differentiation," Wiley-VCH Verlag, 2016.
- [66] S. Poveda-Reyes, V. Moulisova, E. Sanmartín-Masiá, M. Salmeron-Sanchez, and G. Gallego Ferrer, "Injectable extracellular matrix-inspired gelatin/hyaluronic acid hydrogels for tissue engineering." 5th International Symposium Interface Biology of Implants, Rostock/Warnemünde (Deutschland), 2015.
- [67] X. Z. Shu, Y. Liu, Y. Luo, M. C. Roberts, and G. D. Prestwich, "Disulfide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels," *Biomacromolecules*, vol. 3, no. 6, pp. 1304–1311, 2002.
- [68] H. Deplaine, V. A. Acosta-Santamaría, A. Vidaurre, J. L. Gómez Ribelles, M.

- Doblaré, I. Ochoa, and G. Gallego Ferrer, "Evolution of the properties of a poly(l-lactic acid) scaffold with double porosity during in vitro degradation in a phosphate-buffered saline solution," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 131, no. 20, pp. 1–10, Oct. 2014.
- [69] V. A. Santamaría, H. Deplaine, D. Mariggió, A. R. Villanueva-Molines, J. M. García-Aznar, J. L. G. Ribelles, G. G. Ferrer, and I. Ochoa, "Influence of the macro and micro-porous structure on the mechanical behavior of poly(l-lactic acid) scaffolds," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 358, no. 23, pp. 3141–3149, 2012.
- [70] J. E. Mark, *Polymer data handbook*. Oxford University Press, 1999.
- [71] L.-S. Wang, F. Lee, J. Lim, C. Du, A. C. A. Wan, S. S. Lee, and M. Kurisawa, "Enzymatic conjugation of a bioactive peptide into an injectable hyaluronic acid–tyramine hydrogel system to promote the formation of functional vasculature," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 6, pp. 2539–2550, 2014.
- [72] S. C. Young, R. H. Sung, M. L. Young, W. S. Kang, H. P. Moon, and S. N. Young, "Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge," *Biomed. Mater. Res.*, vol. 48, no. 5, pp. 631–639, 1999.
- [73] K. Xu, K. Narayanan, F. Lee, K. H. Bae, S. Gao, and M. Kurisawa, "Enzyme-mediated hyaluronic acid–tyramine hydrogels for the propagation of human embryonic stem cells in 3D," *Acta Biomater.*, vol. 24, pp. 159–171, 2015.
- [74] K. Ghosh, X. Z. Shu, R. Mou, J. Lombardi, G. D. Prestwich, M. H. Rafailovich, and R. A. F. Clark, "Rheological characterization of in situ cross-linkable hyaluronan hydrogels," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 5, pp. 2857–2865, 2005.
- [75] G. M. Kavanagh and S. B. Ross-Murphy, "Rheological characterisation of polymer gels," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 23, no. 3, pp. 533–562, Jan. 1998.
- [76] Z. Li, T. Qu, C. Ding, C. Ma, H. Sun, S. Li, and X. Liu, "Injectable gelatin derivative hydrogels with sustained vascular endothelial growth factor release for induced angiogenesis," *Acta Biomater.*, vol. 13, pp. 88–100, Feb. 2015.
- [77] L.-S. Wang, J. E. Chung, P. P.-Y. Chan, and M. Kurisawa, "Injectable biodegradable hydrogels with tunable mechanical properties for the stimulation of neurogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in 3D culture.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 6, pp. 1148–57, 2010.
- [78] P. J. Flory and J. Rehner, "Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling," *J. Chem. Phys.*, vol. 11, no. 11, 1943.
- [79] P. J. Flory, "Statistical Mechanics of Swelling of Network Structures," *J. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 1, 1950.
- [80] D. Buenger, F. Topuz, and J. Groll, "Hydrogels in sensing applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 12, pp. 1678–1719, 2012.
- [81] G. Camci-Unal, D. Cuttica, N. Annabi, D. Demarchi, and A. Khademhosseini, "Synthesis and Characterization of Hybrid Hyaluronic Acid-Gelatin Hydrogels," *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 4, pp. 1085–1092, 2013.
- [82] B. V Slaughter, S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini, and N. A. Peppas,

- “Hydrogels in regenerative medicine.,” *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 32–33, pp. 3307–3329, Sep. 2009.
- [83] S. Kalyanam, R. D. Yapp, and M. F. Insana, “Poro-viscoelastic behavior of gelatin hydrogels under compression-implications for bioelasticity imaging.,” *J. Biomech. Eng.*, vol. 131, no. 8, p. 81005, Aug. 2009.
- [84] I. E. Erickson, a. H. Huang, S. Sengupta, S. Kestle, J. a. Burdick, and R. L. Mauck, “Macromer density influences mesenchymal stem cell chondrogenesis and maturation in photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 17, no. 12, pp. 1639–1648, 2009.
- [85] C. M. Tierney, M. G. Haugh, J. Liedl, F. Mulcahy, B. Hayes, and F. J. O’Brien, “The effects of collagen concentration and crosslink density on the biological, structural and mechanical properties of collagen-GAG scaffolds for bone tissue engineering,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 2, no. 2, pp. 202–209, 2009.
- [86] C. T. McKee, J. A. Last, P. Russell, and C. J. Murphy, “Indentation Versus Tensile Measurements of Young’s Modulus for Soft Biological Tissues,” *Tissue Eng. Part B. Rev.*, vol. 17, no. 3, pp. 155–164, Jun. 2011.
- [87] B. A. Harley, J. H. Leung, E. C. C. M. Silva, and L. J. Gibson, “Mechanical characterization of collagen–glycosaminoglycan scaffolds,” *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 4, pp. 463–474, 2007.
- [88] T. C. Gamboa-Martínez, J. L. Gómez Ribelles, and G. Gallego Ferrer, “Fibrin coating on poly (L-lactide) scaffolds for tissue engineering,” vol. 26, no. 5, pp. 464–477, 2011.
- [89] R. Mendichi, L. Šoltés, and A. Giacometti Schieron, “Evaluation of radius of gyration and intrinsic viscosity molar mass dependence and stiffness of hyaluronan,” *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 6, pp. 1805–1810, 2003.
- [90] H. B. Bohidar, “Hydrodynamic properties of gelatin in dilute solutions.,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–6, Jul. 1998.
- [91] J. Baier Leach, K. A. Bivens, C. W. J. Patrick, and C. E. Schmidt, “Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds.,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 82, no. 5, pp. 578–589, Jun. 2003.
- [92] M. M. Pradas, G. J. L. Ribelles, S. A. Aroca, G. G. Ferrer, S. J. Antón, and P. Pissis, “Interaction between water and polymer chains in poly(hydroxyethyl acrylate) hydrogels,” *Colloid Polym. Sci.*, vol. 279, no. 4, pp. 323–330, 2001.

ANEXOS

ANEXO I: Determinación de pesos moleculares con GPC

Para la obtención de los pesos moleculares a partir del ensayo de GPC es necesario construir una curva de calibrado del equipo a partir de disoluciones de polietilen glicol de peso molecular conocido que se empleará para obtener el peso molecular del compuesto sintetizado a partir de su tiempo de retención en las columnas del equipo GPC.

De forma general, el GPC está constituido por unas columnas de relleno sobre las que se inyecta el compuesto que se desea caracterizar. La velocidad de paso de dicho compuesto por las columnas viene determinada por el tamaño molecular que presente, es decir, por su peso molecular. De esta forma, cuando el peso molecular es bajo y las moléculas son pequeñas, éstas pueden quedar más tiempo retenidas en la microporosidad de las esferas que componen el relleno de la columna, tardando más en recorrerlas y presentando un tiempo de retención mayor. Por el contrario, si el compuesto presenta un peso molecular mayor no es capaz de penetrar a través de la microporosidad y recorre la columna únicamente por los intersticios entre las esferas del relleno sin quedar atrapado en el interior de las mismas por lo que su velocidad de paso por las columnas es mayor y el tiempo de retención que presentan es más bajo.

A continuación, se va a presentar un ejemplo del cálculo realizado para la obtención del peso molecular de uno de los compuestos a partir de una inyección de dicho compuesto en la columna del equipo.

Obtención de la curva de calibrado

Como ya se ha comentado, la curva de calibrado se realiza a partir de disoluciones de polietilen glicol (PEG) de peso molecular conocido que se hacen pasar a través de las columnas del equipo. Conociendo el peso molecular del PEG en los diferentes patrones empleados y el tiempo de retención de cada uno de esos patrones en las columnas del equipo (Tabla 8), se construye la curva de calibrado (Figura 29).

Tabla 8. Patrones de PEG de peso molecular conocido para la obtención de la curva de calibrado

Peso molecular PEG (Da)	Tiempo retención (min)
202	48.03
1400	44.42
4290	41.43
12600	38.45
20600	36.55
44000	35.05
82500	33.06
176000	30.92
310000	29.24
558000	28.14
810000	27.22

Puesto que la curva de calibrado se realiza con PEG y no con patrones de peso molecular conocidos del compuesto que se va a medir, una vez obtenido el tiempo de retención y el peso molecular correspondiente a partir de la curva de calibrado, se emplea la ecuación de Mark-Houwink (ecuación III) para el cálculo del peso molecular del compuesto de interés (M_2).

$$K_1 \cdot M_1^{1+\alpha_1} = K_2 \cdot M_2^{1+\alpha_2} \quad (III)$$

Donde K_1 y α_1 son los parámetros de Mark-Houwink para el PEG, K_2 y α_2 son los parámetros de Mark-Houwink para el compuesto de interés (en este caso Gel o HA) y M_1 es el peso molecular obtenido a partir de la curva de calibrado.

Los parámetros de Mark-Houwink empleados se han obtenido de la literatura tanto para el PEG ($K = 6.4 \times 10^{-3}$ mL/g; $\alpha = 0.82$) [70], como para la gelatina ($K = 1.1 \times 10^{-4}$ mL/g; $\alpha = 0.74$) [70] y el ácido hialurónico ($K = 3.39 \times 10^{-2}$ mL/g; $\alpha = 0.778$) [89].

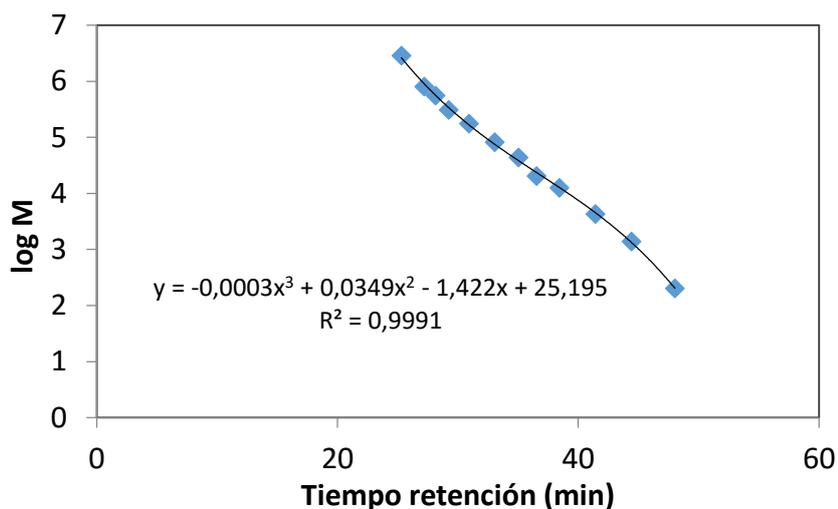


Figura 29. Curva de calibrado obtenida a partir de los patrones de PEG de peso molecular conocido, en el eje de ordenadas se representa el logaritmo decimal del peso molecular de PEG y en el eje de abscisas el tiempo de retención en el equipo de GPC

Determinación del peso molecular del compuesto

Tras inyectar el compuesto a analizar en el equipo, en este caso HA de alto peso molecular, se obtiene una curva que registra el tiempo de permanencia del compuesto en la columna y la intensidad de la señal de salida (obtenida a partir del detector que convierte la señal en un impulso eléctrico) lo que se relaciona con la fracción de compuesto que sale a un tiempo determinado (Figura 30).

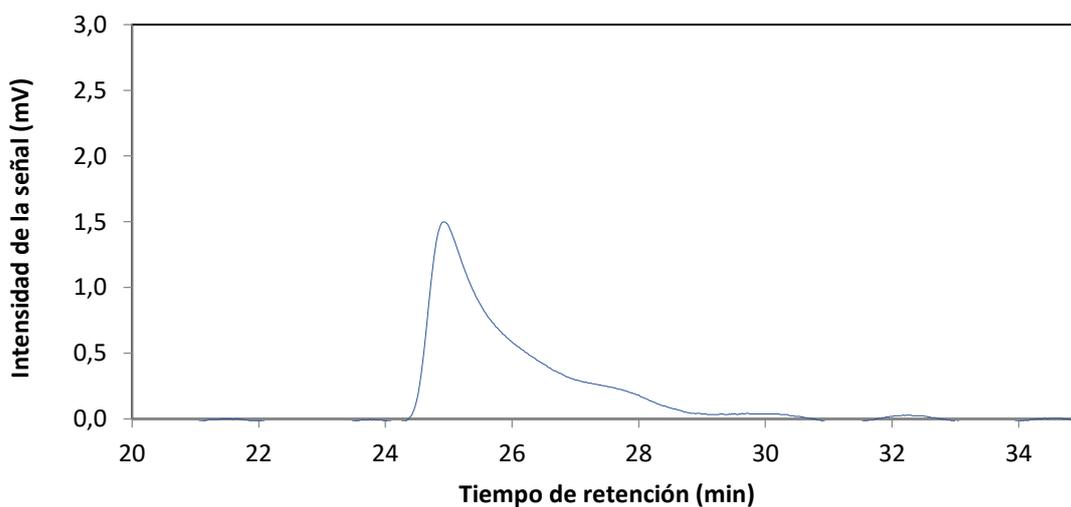


Figura 30. Respuesta obtenida de GPC tras la inyección de ácido hialurónico de alto peso molecular.

Haciendo uso de la curva de calibrado preparada anteriormente y empleando la ecuación (III) para la obtención del peso molecular del HA a partir del peso molecular

del PEG, se obtiene una curva de distribución de pesos moleculares donde se muestra la fracción de compuesto que presenta un determinado peso molecular (Figura 31).

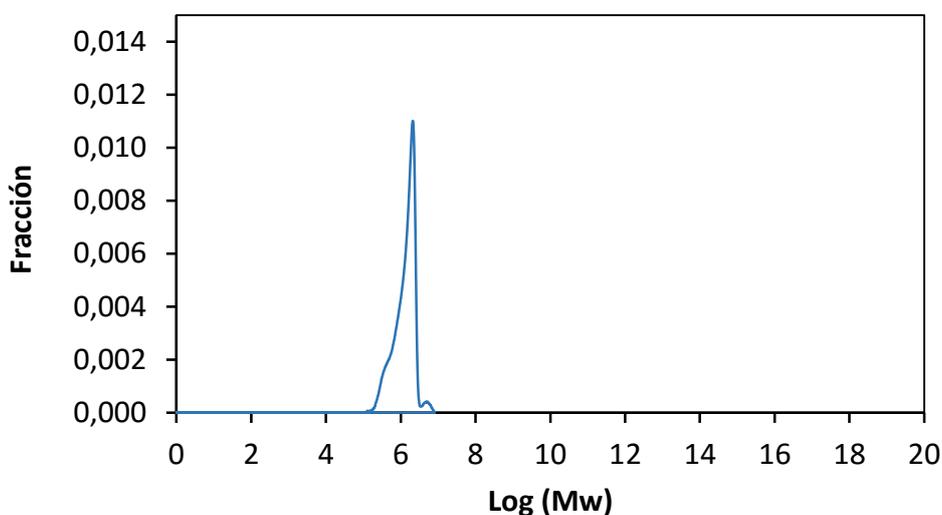


Figura 31. Curva de distribución de pesos moleculares obtenida a partir del GPC

A partir de la curva obtenida, el peso molecular del ácido hialurónico puede calcularse como una suma ponderada de las diferentes fracciones por el peso molecular obtenido para las mismas, empleando la ecuación (IV):

$$PM (HA) = \sum_i x_i \cdot PM_i$$

Realizando estos cálculos se obtiene un peso molecular final para el ácido hialurónico de alto peso molecular de 1.48×10^6 Da.

Del mismo modo, se realizó el proceso para la determinación de los pesos moleculares de los otros compuestos. Para cada uno de los compuestos analizados, se realizaron 4 medidas en GPC para la determinación del peso molecular medio y la desviación típica.

ANEXO II: Cuantificación del grado de injerto de tiramina

Una vez finalizado el proceso de síntesis de gelatina y ácido hialurónico modificado con tiramina, es necesario comprobar la cantidad de tiramina en el producto final. Este dato aporta una idea sobre el número de grupos tiramina injertados por grupo carboxilo.

Para ello, se mide la absorbancia a 275 nm de los productos obtenidos Gel-Tyr y HA-Tyr con ayuda del espectrofotómetro. A partir de dichos valores de absorbancia se calcula la concentración de tiramina presente en el producto haciendo uso de una recta de calibrado.

Obtención de la recta de calibrado

Para la construcción de la recta de calibrado se mide la absorbancia de disoluciones de tiramina de concentración conocida (Tabla 9), obteniéndose la Figura 32, que será empleada como recta de calibrado para el cálculo de la concentración de tiramina en ambos productos.

Tabla 9. Disoluciones patrón de tiramina de concentración conocida para la obtención de la recta de calibrado

[Tyr] (mg/mL)	Absorbancia
0,025	0,103
0,05	0,216
0,1	0,408
0,125	0,536

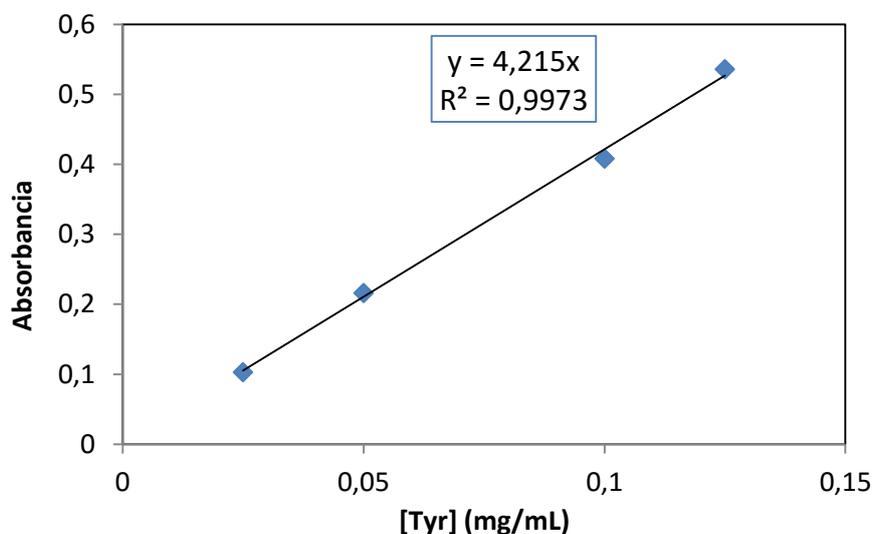


Figura 32. Recta de calibrado para la obtención de la concentración de tiramina injertada

Cálculo de la concentración de tiramina

Para determinar la concentración de tiramina final presente en la gelatina y el ácido hialurónico sintetizado se prepara, en primer lugar, 1.5 mL de disolución del producto liofilizado obtenido al 0.1 % (w/w) en agua miliQ.

A continuación, se mide en el espectrofotómetro la absorbancia para las diferentes disoluciones preparadas. Posteriormente, con ayuda de la recta de calibrado preparada y el peso molecular de la tiramina (137.18 g/mol), se calcula la concentración real de tiramina presente en el producto final. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores de concentración de tiramina injertada (mg Tyr/mL) en los productos sintetizados

Producto	Absorbancia	[Tyr] injertada (mg/mL)	[Tyr] injertada (mol/mL)
Gel-Tyr	0.110	0.0261	1.90×10^{-7}
HA-Tyr	0.056	0.0133	9.69×10^{-8}

ANEXO III: Determinación del grado de hinchado

Para determinar la cantidad de agua que el hidrogel es capaz de absorber es necesario conocer su peso en estado hinchado y su peso seco y, de esta forma, calcular la masa de agua que el hidrogel es capaz de retener.

Así, siguiendo el procedimiento expuesto en el apartado 6.9, se toman valores de masa en estado hinchado y en estado seco para cada uno de los hidrogeles ensayados y mediante la ecuación (I) se determina el porcentaje de agua de equilibrio que el hidrogel es capaz de retener. Para el cálculo del EWC se ensayaron 5 réplicas de cada una de las composiciones de hidrogeles Gel/HA.

A continuación, se presentan las masas obtenidas de los hidrogeles hinchados y secos para cada una de las réplicas ensayadas, así como la cantidad de agua de equilibrio (EWC) característica para cada muestra ensayada.

Hidrogeles 100/0 (Gel/HA)

Tabla 11. EWC para hidrogeles 100/0 (Gel/HA)

nº muestra	m _w (mg)	m _d (mg)	EWC (%)
1	125,19	4,11	2945,99
2	128,85	4,03	3097,27
3	114,52	3,68	3011,96
4	124,13	4,11	2920,19
5	118,67	4,32	2646,99

Hidrogeles 70/30 (Gel/HA)

Tabla 12. EWC para hidrogeles 70/30 (Gel/HA)

nº muestra	m _w (mg)	m _d (mg)	EWC (%)
1	142,41	3,41	4076,25
2	128,33	2,77	4532,85
3	181,16	3,9	4545,13
4	157,64	3,48	4429,89
5	168,4	3,06	5403,27

Hidrogeles 50/50 (Gel/HA)

Tabla 13. EWC para hidrogeles 50/50 (Gel/HA)

nº muestra	m _w (mg)	m _d (mg)	EWC (%)
1	279,44	6,28	4349,68
2	232,66	4,56	5002,19
3	209,52	3,91	5258,57
4	235,51	3,85	6017,14
5	224,11	3,98	5530,90

Hidrogeles 30/70 (Gel/HA)

Tabla 14. EWC para hidrogeles 30/70 (Gel/HA)

nº muestra	m _w (mg)	m _d (mg)	EWC (%)
1	280,09	4,15	6649,16
2	273,51	3,86	6985,75
3	277,04	4,64	5870,69
4	250,3	4,03	6110,92
5	275,32	4,28	6332,71

Hidrogeles 0/100 (Gel/HA)

Tabla 15. EWC para hidrogeles 0/100 (Gel/HA)

nº muestra	m _w (mg)	m _d (mg)	EWC (%)
1	434,35	5,18	8285,14
2	416,72	5,37	7660,15
3	422,8	4,01	10443,64
4	472,72	6,2	7524,52
5	591,11	5,83	10039,11

ANEXO IV: Determinación de los parámetros de red de los hidrogeles

Como se ha comentado, la absorción de agua también se relaciona con el incremento de tamaño que exhiben los hidrogeles con alto contenido en HA frente a los hidrogeles con mayor proporción de gelatina. Esto puede expresarse en términos de ratio volumétrico calculado como el cociente entre el volumen final (tras el hinchado) y el volumen inicial del polímero seco. La expresión para el cálculo del ratio volumétrico puede verse en (IV).

$$Q_v = \frac{V_f}{V_0} = \frac{V_{pol} + V_w}{V_{pol}} = 1 + \frac{V_w}{V_{pol}} = 1 + EWC \cdot \frac{\rho_{pol}}{\rho_w} \quad (IV)$$

Donde EWC es el valor de hinchado obtenido (en tanto por uno), ρ_w es la densidad del agua y ρ_{pol} es la densidad del polímero: 1.44 g/cm³ para la gelatina [90] y 1.23 g/cm³ para el ácido hialurónico [91] en los hidrogeles puros mientras que para los hidrogeles mezcla Gel/HA se ha calculado la densidad del polímero como si se tratara de una mezcla ideal a partir del volumen específico de los componentes puros y la fracción de cada componente en cada una de las mezclas.

Por otra parte, los resultados del ensayo de grado de hinchado también pueden emplearse para estimar la densidad de entrecruzamiento de los hidrogeles sintetizados. Para ello se calcula, en primer lugar, la fracción volumétrica de polímero y de agua presente en los hidrogeles a partir de las expresiones (V) y (VI).

$$\varphi_{pol} = \frac{V_{pol}}{V_T} = \frac{V_{pol}}{V_{pol} + V_w} = \frac{m_{pol}/\rho_{pol}}{m_{pol}/\rho_{pol} + m_w/\rho_w} = \frac{1/\rho_{pol}}{1/\rho_{pol} + EWC/\rho_w} \quad (V)$$

$$\varphi_w = \frac{V_w}{V_T} = \frac{V_w}{V_{pol} + V_w} = 1 - \varphi_{pol} \quad (VI)$$

A partir de las fracciones volumétricas se puede calcular la densidad de entrecruzamiento o concentración de cadenas (n_c/V_{pol}) de los hidrogeles empleando la ecuación simplificada de Flory-Rhener (ecuación VII).

$$0 = \ln \varphi_w + (1 - \varphi_w) + \chi \cdot (1 - \varphi_w)^2 + v_w \cdot \frac{n_c}{V_{pol}} \cdot (1 - \varphi_w)^{1/3} \quad (VII)$$

Donde φ_w es la fracción volumétrica de agua cuando los hidrogeles se encuentran en estado hinchado, χ es el parámetro de interacción entre el polímero y el agua y v_w es el volumen molar del agua (18 cm³/mol). Los parámetros de interacción se

han obtenido de la literatura: $\chi = 0.49$ para la gelatina [90] y $\chi = 0.473$ para el ácido hialurónico [91], considerando un comportamiento ideal para las mezclas.

Finalmente, el peso molecular medio de las cadenas poliméricas entre entrecruzamientos en las redes de los hidrogeles (M_c) puede calcularse a partir de la siguiente expresión [92]:

$$M_c = \frac{\rho_{pol}}{n_c/V_{pol}} = \frac{\rho_{pol} \cdot v_w \cdot (1 - \varphi_w)^{\frac{1}{3}}}{\ln \varphi_w + (1 - \varphi_w) + \chi \cdot (1 - \varphi_w)^2} \quad (VIII)$$

ANEXO V: Ensayo de compresión

Durante el ensayo de compresión se registra tanto la fuerza aplicada como el espesor del hidrogel en cada instante de tiempo, a partir de estos datos es posible obtener los valores de tensión y deformación necesarios para construir las gráficas tensión-deformación y calcular el módulo de Young de los hidrogeles ensayados. De este modo, a partir de los datos de fuerza se calcula la tensión mediante la ecuación (IX):

$$T = \frac{F}{A} \quad (IX)$$

Donde F es la fuerza aplicada y A , el área del hidrogel ensayado.

Por otra parte, la deformación que sufre el hidrogel en cada instante puede calcularse empleando la ecuación (X):

$$\varepsilon = \frac{e}{e_0} \quad (X)$$

Donde e es el espesor de la muestra en cada instante y e_0 es el espesor inicial del hidrogel.

Se ensayaron 4 hidrogeles de cada una de las proporciones Gel/HA preparadas: 100/0, 70/30, 50/50, 30/70, y 0/100. Las gráficas tensión-deformación obtenidas se presentan a continuación:

Hidrogeles 100/0 (Gel/HA)

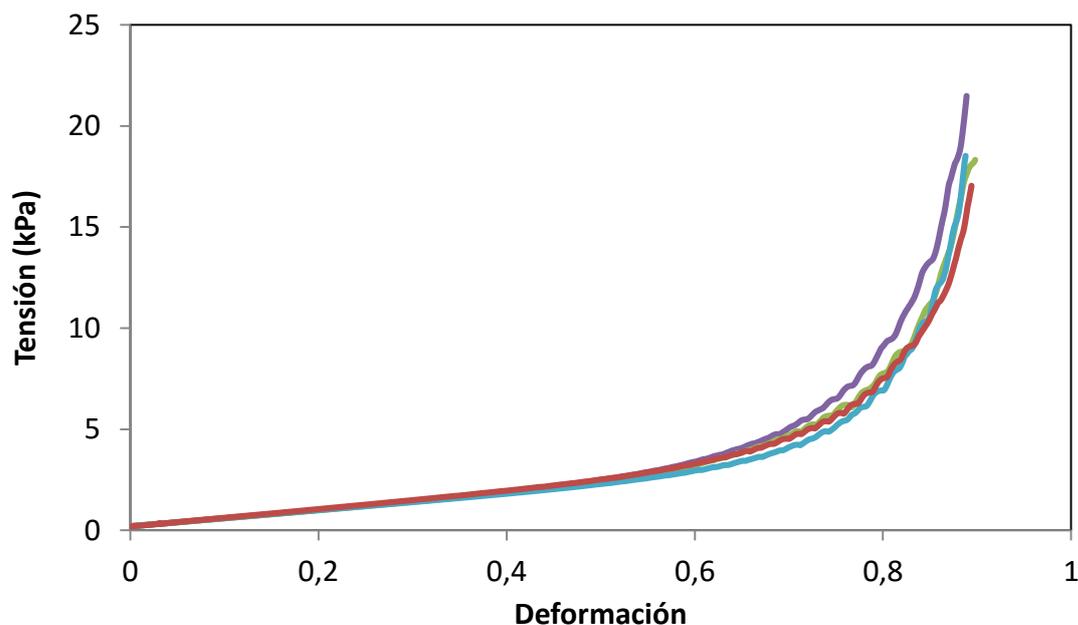


Figura 33. Gráfico tensión-deformación para hidrogeles 100/0 (Gel/HA)

Hidrogeles 70/30 (Gel/HA)

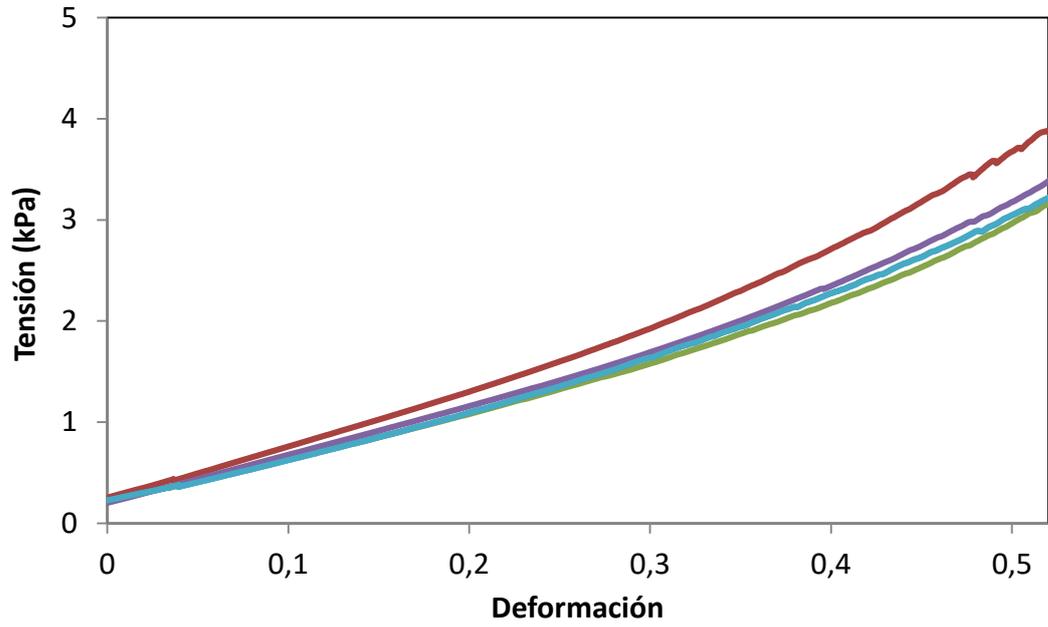


Figura 34. Gráfico tensión-deformación para hidrogeles 70/30 (Gel/HA)

Hidrogeles 50/50 (Gel/HA)

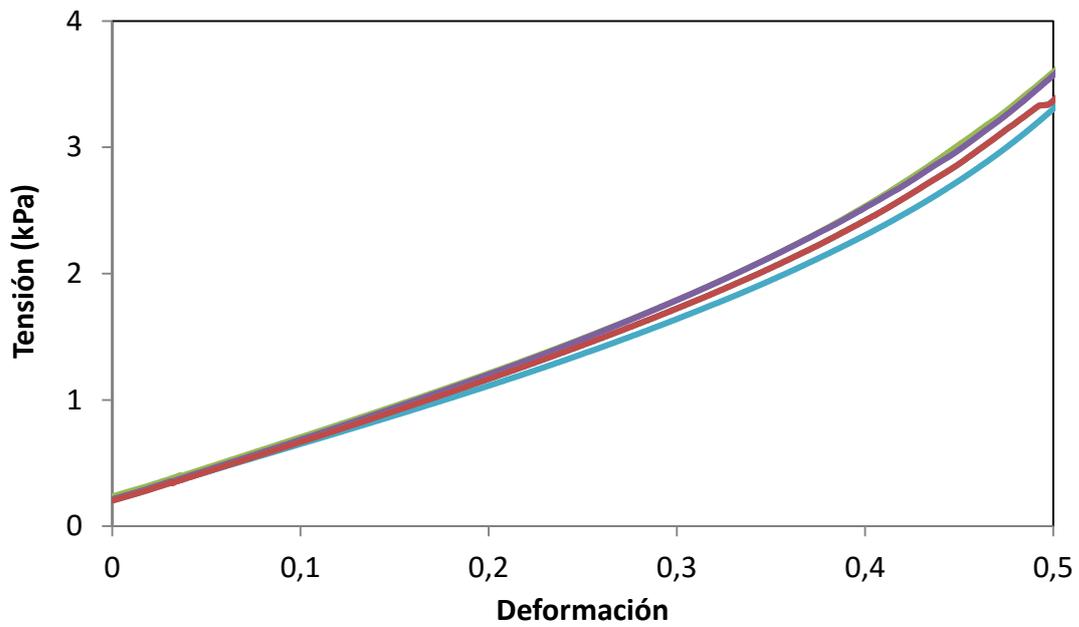


Figura 35. Gráfico tensión-deformación para hidrogeles 50/50 (Gel/HA)

Hidrogeles 30/70 (Gel/HA)

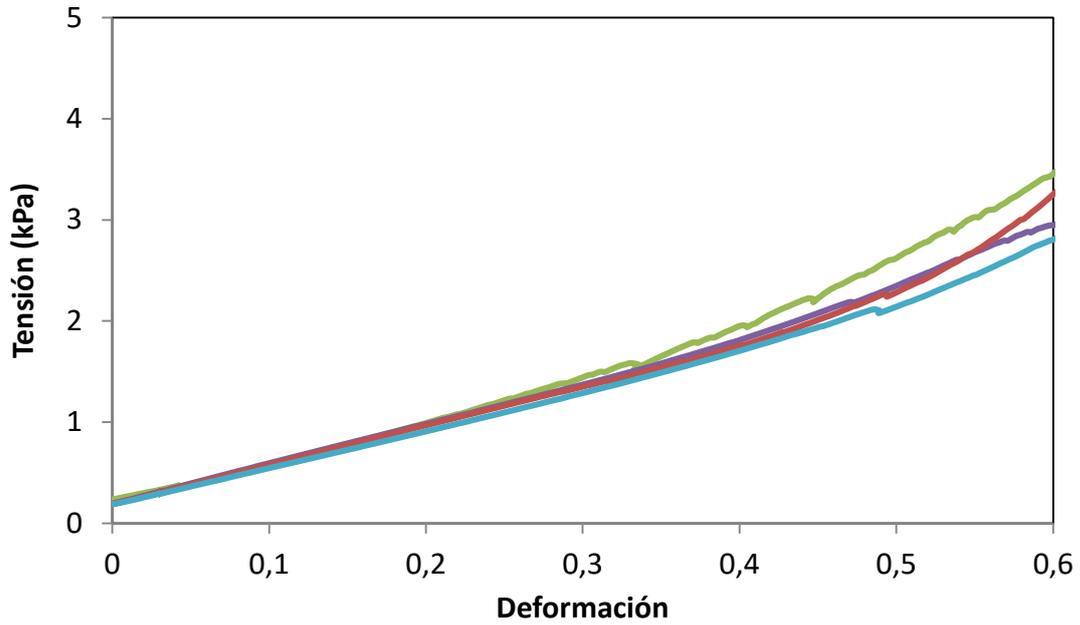


Figura 36. Gráfico tensión-deformación para hidrogeles 30/70 (Gel/HA)

Hidrogeles 0/100 (Gel/HA)

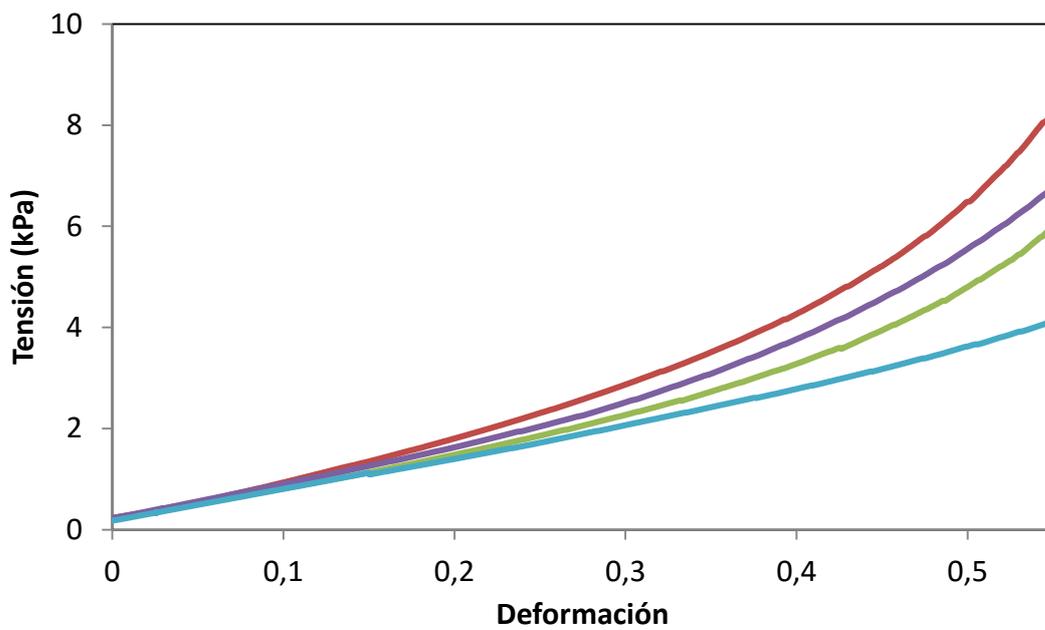


Figura 37. Gráfico tensión-deformación para hidrogeles 0/100 (Gel/HA)

En las gráficas tensión deformación se muestra el comportamiento de cada uno de los hidrogeles ensayados hasta un 50 – 60 % de deformación puesto que a mayores porcentajes de deformación se producía ya la rotura de los hidrogeles.

El valor de módulo mecánico para cada uno de los hidrogeles ensayados es el valor de la pendiente de la recta correspondiente al tramo que presenta un comportamiento lineal. De forma general, se ha tomado el valor de la pendiente correspondiente con el tramo de 0 – 20 % de deformación.

Así, para obtener el valor del módulo mecánico se ha realizado para cada muestra ensayada el siguiente procedimiento:

1. Representación de la curva tensión-deformación en el tramo de 0 – 20 %.
2. Ajuste lineal de la recta obtenida.

Los resultados obtenidos para cada uno de los hidrogeles ensayados, así como el valor medio de módulo mecánico para cada proporción Gel/HA y la desviación típica, se recogen en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de módulo de Young (E) y desviación estándar (SD) para los hidrogeles Gel/HA

	Módulo mecánico (kPa)				
	100/0	70/30	50/50	30/70	0/100
1	4,042	5,320	5,771	6,295	8,180
2	3,969	4,347	4,489	5,028	6,320
3	4,037	5,176	5,098	5,700	7,030
4	4,296	4,786	5,739	5,118	6,100
E (kPa)	4,086	4,907	5,274	5,535	6,907
SD (±)	0,144	0,436	0,609	0,587	0,937

DOCUMENTO II:
PRESUPUESTO

Índice del presupuesto

1.	Financiación	91
2.	Presupuesto	91
2.1.	Cuadro de precios nº 1: Mano de obra	92
2.2.	Cuadro de precios nº 2: Material.....	92
2.3.	Cuadro de precios nº 3: Equipos y maquinaria	96
2.4.	Cuadro de precios descompuestos.....	96
2.5.	Presupuesto de ejecución material por capítulos	106
2.6.	Presupuesto general	109

1. Financiación

El Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad Politécnica de Valencia ha sido el responsable de la financiación del proyecto.

2. Presupuesto

El cálculo del presupuesto pretende establecer el coste necesario para la consecución de este proyecto, así como servir de estimación de cara a afrontar proyectos de características similares.

El presupuesto que se presenta ha considerado tanto el coste económico de material, equipos y reactivos necesarios como la mano de obra necesaria para su ejecución. De este modo, el contenido del presupuesto se ha dividido en tres categorías: mano de obra, materiales y maquinaria.

Por otro lado, se ha elaborado el cuadro de precios descompuesto por capítulos agrupando los recursos empleados para la realización de las distintas tareas desempeñadas en el proyecto. Finalmente, se ha elaborado un presupuesto de ejecución de material y se ha calculado el presupuesto de ejecución por contrata del mismo.

Para el cálculo del coste de la maquinaria empleada se ha calculado la amortización que se ha realizado de dichos equipos a lo largo del desarrollo del proyecto. Considerando un periodo de amortización de 10 años y contabilizando el periodo de tiempo que han sido empleados, la amortización puede calcularse empleando la ecuación XI.

$$A = \frac{t \cdot C}{T} \quad (XI)$$

Donde t es el periodo de tiempo en el que ha sido empleado el equipo, C es el coste total del mismo y T es el periodo de amortización (10 años).

De este modo, para la maquinaria y equipos empleados se ha calculado como coste unitario el correspondiente al coste total del equipo entre el periodo de amortización de 10 años por lo que tan solo es necesario multiplicar, posteriormente, por el número de horas de uso para obtener el coste total de dicho equipo.

2.1. Cuadro de precios nº 1: Mano de obra

A continuación, se detalla la parte del proyecto correspondiente a los jornales de la mano de obra necesaria, indicándose tanto el precio unitario de la misma como el coste total en función del número de horas dedicadas al proyecto.

Nº	Designación	Precio (€)	Cantidad (h)	Total (€)
1.1	Director de proyecto	50	20	1000,00
1.2	Codirector de proyecto	50	50	2500,00
1.3	Investigador	30	70	2100,00
1.4	Ingeniero químico	30	239,5	7185,00
1.5	Ayudante de laboratorio	15	88,1	1321,50
Total mano de obra				14106,50

2.2. Cuadro de precios nº 2: Material

En este apartado se ha incluido todo el material necesario para la realización del proyecto, incluyéndose tanto los reactivos y el material de laboratorio como los equipos de protección individual empleados como medidas de seguridad. Así, en los cuadros de precios aparece reflejado tanto la cantidad utilizada como el coste de cada uno de los materiales empleados.

El material empleado se ha dividido en tres categorías, presentándose los siguientes cuadros de precios:

- 2.1. Reactivos
- 2.2. Material de laboratorio
- 2.3. Equipos de Protección Individual (EPI)

Finalmente, se recoge el coste total de material de las tres categorías en un último cuadro precios.

1.1. Reactivos

Nº	Ud.	Designación	Precio unitario (€)	Cantidad	Total (€)
2.1.1	g	Cloruro sódico (NaCl)	0,020	266,09	5,32
2.1.2	g	MES	2,440	11,60	28,30
2.1.3	g	Hidróxido sódico (NaOH)	0,040	0,60	0,02
2.1.4	g	Ácido hialurónico (HA) sal sódica de Streptococcus equi.	26,300	1,50	39,45
2.1.5	g	Gelatina porcina (Tipo A)	0,210	1,60	0,34
2.1.6	mg	Tiramina (hidrocloruro)	0,010	1309,22	13,09
2.1.7	mg	EDC	0,010	862,02	8,62
2.1.8	mg	NHS	0,010	51,74	0,52
2.1.9	L	Ácido clorhídrico (HCl)	15,160	0,75	11,37
2.1.10	L	Agua miliQ	3,000	24,08	72,24
2.1.11	L	Agua destilada	2,320	72,00	167,04
2.1.12	U	HRP	0,040	105,00	4,20
2.1.13	mL	H ₂ O ₂	0,370	0,10	0,04
2.1.14	g	KCl	0,050	0,15	0,01
2.1.15	g	KH ₂ PO ₄	0,150	0,07	0,01
2.1.16	g	HEPES	1,110	2,40	2,66
2.1.17	g	Azida de sodio	0,360	0,06	0,02
2.1.18	mg	Colagenasa	1,470	1,50	2,21
2.1.19	mg	Hialuronidasa	1,670	2,00	3,34
2.1.20	mL	Agua deuterada (D ₂ O)	35,400	5,00	177,00
2.1.21	g	PLLA de grado médico	2,740	10,00	27,40
2.1.22	g	Elvacite® (PMMA)	0,010	100,00	1,00
2.1.23	mL	Dioxano	0,100	90,00	9,00
2.1.24	L	DMEM bajo contenido glucosa	21,200	0,30	6,36
2.1.25	mL	Suero fetal bovino	0,910	30,00	27,30
2.1.26	mL	Penicilina streptomycinica	0,900	3,00	2,70
2.1.27	mL	Tripsina/EDTA	0,080	9,00	0,72
2.1.28	L	DPBS ⁻	35,900	2,00	71,80
2.1.29	u	Kit L/D	0,360	10,00	3,60
2.1.30	mL	Tritón X-100	0,090	5,00	0,45
2.1.31	mL	Sacarosa	0,510	20,00	10,20
2.1.32	u	DAPI	1,000	16,00	16,00
2.1.33	u	Faloidina	1,270	16,00	20,32
2.1.34	mL	OCT	0,530	50,00	26,50
				Total reactivos	759,15

1.2. Material de laboratorio

Nº	Ud.	Designación	Precio unitario (€)	Cantidad	Total (€)
2.2.1	m	Membrana de diálisis (12400 MWCO)	4,580	2,8	12,82
2.2.2	m	Membrana de diálisis (3500 MWCO)	28,000	0,45	12,60
2.2.3	u	Placa de cultivo P96	2,180	3	6,54
2.2.4	u	Placa de cultivo P48	3,180	4	12,72
2.2.5	u	Flascón T75	2,560	3	7,68
2.2.6	u	Micropipeta volumen variable	110,000	3	330,00
2.2.7	u	Puntas micropipeta	0,010	150	1,50
2.2.8	u	Pipeta serológica 5 mL	4,720	5	23,60
2.2.9	u	Pipeta serológica 25 mL	8,480	5	42,40
2.2.10	u	Pipeta serológica 50 mL	14,400	3	43,20
2.2.11	u	Vaso de precipitados 1 L	9,040	3	27,12
2.2.12	u	Frasco de vidrio con rosca 1 L	11,830	3	35,49
2.2.13	u	Frasco de vidrio con rosca 30 mL	4,250	17	72,25
2.2.14	u	Frasco de plástico 100 mL	1,750	1	1,75
2.2.15	u	Eppendorf 1,5 mL	0,010	70	0,69
2.2.16	u	Viales 30 mL	0,600	90	54,00
2.2.17	u	Tubo centrífuga 15 mL	0,440	3	1,32
2.2.18	u	Tubo centrífuga 50 mL	0,230	17	3,91
2.2.19	u	Matraz aforado 1 L	41,460	1	41,46
2.2.20	u	Placa Petri de plástico	0,080	2	0,16
2.2.21	u	Pinzas	1,800	1	1,80
2.2.22	u	Tijeras	2,200	1	2,20
2.2.23	u	Cucharilla	4,000	1	4,00
2.2.24	u	Espátula	2,250	1	2,25
2.2.25	u	Cuchilla	0,040	2	0,08
2.2.26	u	Imán agitador	2,500	6	15,00
2.2.27	u	Vacutainer®	4,000	4	16,00
2.2.28	u	Jeringuilla 20 mL	0,240	2	0,48
2.2.29	u	Portaobjetos	0,070	100	7,00
2.2.30	u	Aguja TERUMO NEOLUS	0,200	4	0,80
				Total material laboratorio	780,82

1.3. Equipos de Protección Individual (EPI)

Nº	Ud.	Designación	Precio unitario (€)	Cantidad	Total (€)
2.3.1	u	Bata de laboratorio	15,00	1	15,00
2.3.2	x100 u	Guantes desechables de nitrilo	27,2	0,5	13,60
2.3.3	x100 u	Guantes desechables de látex	5,2	2	10,40
2.3.4	u	Máscara de gases	29,5	1	29,50
2.3.5	u	Gafas de seguridad	2,4	1	2,40
				Total EPI	70,90

Cuadro de precios de materiales

Nº	Designación	Total (€)
2.1	Reactivos	759,15
2.2	Material de laboratorio	780,82
2.3	Equipos de Protección Individual	70,90
Total material		1610,87

2.3. Cuadro de precios nº 3: Equipos y maquinaria

En este apartado se recogen los equipos y maquinaria empleada durante la realización del proyecto.

Nº	Ud.	Designación	Precio unitario (€)	Cantidad	Total (€)
3.1	h	Agitador magnético	0,010	1284	12,84
3.2	h	Estufa	0,020	6	0,12
3.3	h	pH-metro EUTECH INSTRUMENTS pH 1500	0,010	3,8	0,04
3.4	h	Equipo Seiko TMA/SS6000	0,300	30	9,00
3.5	h	Liofilizadora	0,120	547,2	65,66
3.6	h	Balanza de precisión	0,010	17	0,17
3.7	h	Equipo de resonancia magnética nuclear	30,000	1	30,00
3.8	h	Cromatógrafo de permeación en gel (GPC)	0,610	15	9,15
3.9	h	Reómetro	0,520	3	1,56
3.10	h	Microtest ensayo mecánico	0,100	6	0,60
3.11	h	Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5410	13,000	5	65,00
3.12	h	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo	25,000	2	50,00
3.13	h	Microscopio de fluorescencia	0,120	20	2,40
3.14	h	Espectrofotómetro	0,140	3,3	0,46
3.15	h	Nevera	0,010	1440	14,40
3.16	h	Incubador	0,060	168	10,08
3.17	h	Desecador	0,020	72	1,44
3.18	h	Microtomo criostato	0,200	3	0,60
3.19	h	Centrífuga	0,030	1	0,03
3.20	h	Congelador	0,090	51	4,59
				Total maquinaria	278,14

2.4. Cuadro de precios descompuestos

El cuadro de precios descompuesto muestra los reactivos, materiales, equipos y mano de obra desglosados en función de la etapa del proceso en donde fueron empleados. Además, se detalla la clasificación de los recursos mediante la asignación de un código en función de la naturaleza de los mismos. Los códigos empleados y la categoría a la que hacen referencia se recogen en la Tabla 17.

Tabla 17. Códigos de clasificación empleados atendiendo a las diferentes categorías de recursos

Código	Categoría
R	Reactivo
MT	Material
MQ	Maquinaria
EPI	Equipos de Protección Individual
MO	Mano de Obra

Capítulo 1. Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular (LMW)					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
1.1		u	Proceso de degradación ácida del ácido hialurónico		
R	0,5	g	Ácido hialurónico (HA) sal sódica de Streptococcus equi.	26,300	13,15
R	0,25	L	Ácido clorhídrico (HCl)	15,16	3,79
MT	1	u	Frasco de vidrio con rosca 30 mL	4,250	4,25
MQ	24	h	Agitador magnético	0,010	0,24
MQ	0,1	h	pH-metro EUTECH INSTRUMENTS pH 1500	0,010	0,01
MO	1	h	Ingeniero químico	30	30,00
MO	0,2	h	Ayudante de laboratorio	15	3,00
	0,02		Costes directos complementarios		1,09
				Total partida	55,53

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
1.2		u	Diálisis y liofilización del ácido hialurónico LMW		
R	6	L	Agua destilada	2,320	13,92
MT	0,15	m	Membrana de diálisis (3500 MWCO)	28,000	4,20
MT	1	u	Tubo centrífuga 50 mL	0,230	0,23
MQ	48	h	Agitador magnético	0,010	0,48
MQ	3	h	Congelador	0,090	0,27
MQ	48	h	Liofilizadora	0,120	5,76
MO	1	h	Ingeniero químico	30	30,00
MO	0,5	h	Ayudante de laboratorio	15	7,50
	0,02		Costes directos complementarios		0,93
				Total partida	63,61

Capítulo 2. Síntesis de ácido hialurónico modificado con injertos de tiramina

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
2.1		u	Preparación de disolución de ácido hialurónico para su injerto posterior de grupos tiramina		
R	8,8	g	Cloruro sódico (NaCl)	0,020	0,18
R	3	L	Agua miliQ	3,000	9,00
R	1,08	g	MES	2,440	2,64
R	0,06	g	Hidróxido sódico (NaOH)	0,040	0,01
MT	1	u	Frasco de vidrio con rosca 30 mL	4,250	4,25
MQ	3	h	Agitador magnético	0,010	0,03
MQ	0,1	h	pH-metro EUTECH INSTRUMENTS pH 1500	0,010	0,01
MO	1	h	Ingeniero químico	30	30,00
	0,02		Costes directos complementarios		0,93
				Total partida	47,05

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
2.2		u	Injerto de grupos tiramina en ácido hialurónico		
R	86,47	mg	Tiramina (hidrocloruro)	0,010	0,87
R	37,13	mg	EDC	0,010	0,38
R	2,23	mg	NHS	0,010	0,03
MQ	24	h	Agitador magnético	0,010	0,24
MQ	0,15	h	pH-metro EUTECH INSTRUMENTS pH 1500	0,010	0,01
MO	2	h	Ingeniero químico	30	60,00
MO	0,5	h	Ayudante de laboratorio	15	7,50
	0,02		Costes directos complementarios		1,39
				Total partida	70,42

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
2.3		u	Diálisis y liofilización del ácido hialurónico modificado obtenido		
R	17,54	g	Cloruro sódico (NaCl)	0,020	0,36
R	2	L	Agua miliQ	3,000	6,00
R	3	L	Agua destilada	2,320	6,96
MT	0,2	m	Membrana de diálisis (12400 MWCO)	4,580	0,92
MT	1	u	Tubo centrífuga 50 mL	0,230	0,23
MQ	48	h	Agitador magnético	0,010	0,48
MQ	3	h	Congelador	0,090	0,27
MQ	0,2	h	Espectrofotómetro	0,140	0,03
MQ	24	h	Liofilizadora	0,120	2,88
MO	1	h	Ingeniero químico	30	30,00
MO	0,5	h	Ayudante de laboratorio	15	7,50
	0,02		Costes directos complementarios		1,12
				Total partida	56,75

Capítulo 3. Síntesis de gelatina modificada con injertos de tiramina

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
3.1		u	Preparación de disolución de gelatina para su injerto posterior de grupos tiramina		
R	0,02	L	Agua miliQ	3	0,06
R	0,200	g	MES	2,440	0,49
R	0,4	g	Gelatina porcina (Tipo A)	0,210	0,09
MT	1	u	Frasco de vidrio con rosca 30 mL	4,250	4,25
MQ	0,5	h	Agitador magnético	0,010	0,01
MO	1	h	Ingeniero químico	30,000	30,00
	0,02		Costes directos complementarios		0,70
				Total partida	35,60

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
3.2		u	Injerto de grupos tiramina en gelatina		
R	111,13	mg	Tiramina (hidrocloruro)	0,010	1,12
R	122,68	mg	EDC	0,010	1,23
R	7,36	mg	NHS	0,010	0,08
MQ	25	h	Agitador magnético	0,010	0,25
MQ	0,25	h	pH-metro EUTECH INSTRUMENTS pH 1500	0,010	0,01
MO	2	h	Ingeniero químico	30	60,00
	0,02		Costes directos complementarios		1,26
				Total partida	63,95

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
3.3		u	Diálisis y liofilización de la gelatina modificada obtenida		
R	6	L	Agua destilada	2,320	13,92
MT	0,2	m	Membrana de diálisis (12400 MWCO)	4,580	0,92
MT	1	u	Tubo centrifuga 50 mL	0,230	0,23
MQ	48	h	Agitador magnético	0,010	0,48
MQ	3	h	Congelador	0,090	0,27
MQ	0,2	h	Espectrofotómetro	0,140	0,03
MQ	28,8	h	Liofilizadora	0,120	3,46
MO	1	h	Ingeniero químico	30	30,00
MO	0,5	h	Ayudante de laboratorio	15	7,50
	0,02		Costes directos complementarios		1,14
				Total partida	57,95

Capítulo 4. Síntesis de scaffolds de PLLA con hidrogel de gelatina

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
4.1		u	Síntesis de scaffolds de PLLA		
R	10	g	PLLA de grado médico	2,740	27,40
R	90,000	mL	Dioxano	0,100	9,00
R	100,000	g	Elvacite® (PMMA)	0,010	1,00
MQ	24	h	Agitador magnético	0,010	0,24
MQ	72	h	Desecador	0,020	1,44
MO	4	h	Ingeniero químico	30	120,00
MO	2	h	Ayudante de laboratorio	15	30,00
	0,02		Costes directos complementarios		3,79
				Total partida	192,87

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
4.2		u	Introducción de gelatina en los poros del scaffold		
MT	2	u	Vacutainer®	4,000	8,00
MT	1	u	Jeringuilla 20 mL	0,240	0,24
MT	2	u	Aguja TERUMO NEOLUS	0,200	0,40
MO	0,1	h	Ingeniero químico	30	3,00
	0,02		Costes directos complementarios		0,24
				Total partida	11,88

Capítulo 5. Síntesis de hidrogeles de ácido hialurónico y gelatina

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
5.1		u	Preparación de disoluciones		
R	2,69	g	Cloruro sódico (NaCl)	0,020	0,06
R	0,150	g	KCl	0,050	0,01
R	0,070	g	KH ₂ PO ₄	0,150	0,02
R	2,400	g	HEPES	1,110	2,67
R	0,4	L	Agua miliQ	3,000	1,20
R	105	U	HRP	0,040	4,20
R	0,100	mL	H ₂ O ₂	0,370	0,04
MT	55	u	Eppendorf 1,5 mL	0,010	0,54
MT	3	u	Micropipeta volumen variable	110,000	330,00
MT	50	u	Puntas micropipeta	0,010	0,50
MQ	720	h	Nevera	0,010	7,20
MQ	6	h	Estufa	0,020	0,12
MO	3	h	Ingeniero químico	30	90,00
	0,02		Costes directos complementarios		8,74
				Total partida	445,30

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
5.2		u	Formación de hidrogeles		
R	0,4	L	DPBS ⁻	35,900	14,36
R	0,06	g	Azida de sodio	0,360	0,03
R	3,6	L	Agua miliQ	3,000	10,80
MT	4	u	Placa de cultivo P48	3,180	12,72
MT	5	u	Viales 30 mL	0,600	3,00
MT	100	u	Puntas micropipeta	0,010	1,00
MQ	720	h	Nevera	0,010	7,20
MO	2,5	h	Ingeniero químico	30	75,00
	0,02		Costes directos complementarios		2,49
				Total partida	126,60

Capítulo 6. Caracterización de los hidrogeles obtenidos

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
6.1		u	Determinación de pesos moleculares		
MQ	15	h	Cromatógrafo de permeación en gel (GPC)	0,300	4,50
MO	1	h	Ingeniero químico	30	30,00
MO	1	h	Ayudante de laboratorio	15	15,00
	0,02		Costes directos complementarios		0,99
Total partida					50,49

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
6.2		u	Determinación del grado de injerto		
R	5	mL	Agua deuterada (D ₂ O)	1,750	8,75
MQ	0,5	h	Espectrofotómetro	0,140	0,07
MQ	1	h	Equipo de resonancia magnética nuclear	30,000	30,00
MO	0,8	h	Ingeniero químico	30	24,00
MO	0,5	h	Ayudante de laboratorio	15	7,50
	0,02		Costes directos complementarios		1,41
Total partida					71,73

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
6.3		u	Determinación de tiempos de gelificación		
MQ	3	h	Reómetro	0,520	1,56
MO	3	h	Ingeniero químico	30	90,00
MO	3	h	Ayudante de laboratorio	15	45,00
	0,02		Costes directos complementarios		2,74
Total partida					139,30

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
6.4		u	Ensayo de compresión (hidrogeles)		
MT	1	u	Cuchilla	0,040	0,04
MQ	30	h	Equipo Seiko TMA/SS6000	0,300	9,00
MO	15	h	Ingeniero químico	30	450,00
MO	0,5	h	Ayudante de laboratorio	15	7,50
	0,02		Costes directos complementarios		9,34
Total partida					475,88

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
6.5		u	Grado de hinchado		
MQ	2	h	Balanza de precisión	0,010	0,02
MQ	48	h	Liofilizadora	0,120	5,76
MO	2	h	Ingeniero químico	30	60,00
	0,02		Costes directos complementarios		1,32
Total partida					67,10

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
6.6		u	Morfología		
MT	1	u	Cuchilla	0,04	0,04
MQ	2	h	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo	25	50,00
MQ	5	h	Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5410	13	65,00
MO	7	h	Ingeniero químico	30	210,00
MO	3	h	Ayudante de laboratorio	15	45,00
	0,02		Costes directos complementarios		7,41
Total partida					377,45

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
6.7		u	Ensayo de degradación		
R	1,5	mg	Colagenasa	1,47	2,21
R	2	mg	Hialuronidasa	1,670	3,34
MT	85	u	Viales 30 mL	0,600	51,00
MQ	5	h	Balanza de precisión	0,010	0,05
MO	10	h	Ingeniero químico	30	300,00
MO	10	h	Ayudante de laboratorio	15	150,00
	0,02		Costes directos complementarios		10,14
Total partida					516,74

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
6.8		u	Ensayo compresión (scaffolds)		
MQ	6	h	Microtest ensayo mecánico	0,100	0,60
MO	6	h	Ingeniero químico	30	180,00
MO	1	h	Ayudante de laboratorio	15	15,00
	0,02		Costes directos complementarios		3,92
Total partida					199,52

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
6.9		u	Cultivos celulares		
R	0,3	L	DMEM bajo contenido glucosa	21,20	6,36
R	30	mL	Suero fetal bovino	0,91	27,30
R	3	mL	Penicilina streptomicina	0,90	2,70
R	9	mL	Tripsina/EDTA	0,08	0,72
R	1,6	L	DPBS ⁻	35,90	57,44
R	10	u	Kit L/D	0,36	3,60
R	5	mL	Tritón X-100	0,09	0,45
R	20	mL	Sacarosa	0,51	10,20
R	16	u	DAPI	1,00	16,00
R	16	u	Faloidina	1,27	20,32
R	50	mL	OCT	0,53	26,50
MT	3	u	Flascón T75	2,56	7,68
MT	3	u	Placa de cultivos P96	2,180	6,54
MT	3	u	Tubo centrífuga 15 mL	0,440	1,32
MT	15	u	Eppendorf 1,5 mL	0,010	0,15
MT	100	u	Portaobjetos	0,070	7,00
MQ	1	h	Centrífuga	0,030	0,03
MQ	168	h	Incubador	0,060	10,08
MQ	3	h	Microtomo criostato	0,200	0,60
MQ	20	h	Microscopio de fluorescencia	0,120	2,40
MO	53	h	Ingeniero químico	30	1590,00
MO	53	h	Ayudante de laboratorio	15	795,00
	0,02		Costes directos complementarios		51,85
				Total partida	2644,24

Capítulo 7. Materiales de uso común

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
7.1		u	Materiales de uso común empleados en diversas etapas del proceso o de forma continuada		
MT	3	u	Frasco de vidrio con rosca 1 L	11,83	35,49
MT	1	u	Frasco de plástico 100 mL	1,75	1,75
MT	1	u	Espátula	2,25	2,25
MT	1	u	Cucharilla	4	4,00
MT	3	u	Vaso de precipitados 1 L	9,04	27,12
MT	6	u	Imán agitador	2,5	15,00
MT	1	u	Pinzas	1,8	1,80
MT	1	u	Tijeras	2,2	2,20
MT	5	u	Pipeta serológica 5 mL	4,72	23,60
MT	5	u	Pipeta serológica 25 mL	8,48	42,40
MT	3	u	Pipeta serológica 50 mL	14,4	43,20
MT	1	u	Matraz aforado 1 L	41,46	41,46
MT	2	u	Placa Petri de plástico	0,08	0,16
MQ	10	h	Balanza de precisión	0,01	0,10
EPI	1	u	Bata de laboratorio	15	15,00
EPI	0,5	x100 u	Guantes desechables de nitrilo	27,2	13,60
EPI	2	x100 u	Guantes desechables de látex	5,2	10,40
EPI	1	u	Máscara de gases	29,5	29,50
EPI	1	u	Gafas de seguridad	2,4	2,40
	0,02		Costes directos complementarios		6,23
Total partida					317,66

Capítulo 8. Reuniones de seguimiento del trabajo

Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
8.1		u	Reuniones de seguimiento y programación del proyecto		
MO	20	h	Director del proyecto	50	1000,00
MO	50	h	Codirectora del proyecto	50	2500,00
MO	70	h	Investigador	30	2100,00
MO	70	h	Ingeniero químico	30	2100,00
	0,02		Costes directos complementarios		154,00
Total partida					7854,00

2.5. Presupuesto de ejecución material por capítulos

A continuación, se muestra el presupuesto de ejecución material agrupado por capítulos.

Capítulo 1. Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular (LMW)					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
1.1	3	u	Proceso de degradación ácida del ácido hialurónico	55,53	166,59
1.2	3	u	Diálisis y liofilización del ácido hialurónico LMW	63,61	190,83
Total Capítulo 1					357,42

Capítulo 2. Síntesis de ácido hialurónico modificado con injertos de tiramina					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
2.1	10	u	Preparación de disolución de ácido hialurónico para su injerto posterior de grupos tiramina	47,05	470,50
2.2	10	u	Injerto de grupos tiramina en ácido hialurónico	70,42	704,20
2.3	10	u	Diálisis y liofilización del ácido hialurónico modificado obtenido	56,75	567,50
Total Capítulo 2					1742,20

Capítulo 3. Síntesis de gelatina modificada con injertos de tiramina					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
3.1	4	u	Preparación de disolución de gelatina para su injerto posterior de grupos tiramina	35,60	142,40
3.2	4	u	Injerto de grupos tiramina en gelatina	63,95	255,80
3.3	4	u	Diálisis y liofilización de la gelatina modificada obtenida	57,95	231,80
Total Capítulo 3					630,00

Capítulo 4. Síntesis de scaffolds de PLLA con hidrogel de gelatina					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
4.1	1	u	Síntesis de scaffolds de PLLA	192,87	192,87
4.2	2	u	Introducción de gelatina en los poros del scaffold	11,88	23,76
Total Capítulo 4					216,63

Capítulo 5. Síntesis de hidrogeles de ácido hialurónico y gelatina					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
5.1	1	u	Preparación de disoluciones	445,30	445,30
5.2	1	u	Formación de hidrogeles	126,60	126,60
Total Capítulo 5					571,90

Capítulo 6. Caracterización de los hidrogeles obtenidos					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
6.1	1	u	Determinación de pesos moleculares	50,49	50,49
6.2	1	u	Determinación del grado de injerto	71,73	71,73
6.3	1	u	Determinación de tiempos de gelificación	139,30	139,30
6.4	1	u	Ensayo de compresión (hidrogeles)	475,88	475,88
6.5	1	u	Grado de hinchado	67,10	67,10
6.6	1	u	Morfología	377,45	377,45
6.7	1	u	Ensayo de degradación	516,74	516,74
6.8	1	u	Ensayo de compresión (scaffolds)	199,52	199,52
6.9	1	u	Cultivos celulares	2644,24	2644,24
Total Capítulo 6					4542,45

Capítulo 7. Materiales de uso común					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
7.1	1	u	Materiales de uso común empleados en diversas etapas del proceso o de forma continuada	317,66	317,66
Total Capítulo 7					317,66

Capítulo 8. Reuniones de seguimiento del trabajo					
Código	Cantidad	Ud.	Descripción	Precio unitario (€)	Total (€)
8.1	1	u	Reuniones de seguimiento y programación del proyecto	7854,00	7854,00
Total Capítulo 8					7854,00

2.6. Presupuesto general

Para el cálculo del presupuesto general del proyecto se ha considerado un 10% de gastos generales y un 21% de IVA.

Código	Descripción	Importe (€)
Capítulo 1	Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular	357,42
Capítulo 2	Síntesis de ácido hialurónico modificado con injertos de tiramina	1742,20
Capítulo 3	Síntesis de gelatina modificada con injertos de tiramina	630,00
Capítulo 4	Síntesis de scaffolds de PLLA con hidrogel de gelatina	216,63
Capítulo 5	Síntesis de hidrogeles de ácido hialurónico y gelatina	571,90
Capítulo 6	Caracterización de los hidrogeles obtenidos	4542,45
Capítulo 7	Materiales de uso común	317,66
Capítulo 8	Reuniones de seguimiento del trabajo	7854,00
	Presupuesto Ejecución Material	16232,26
	10 % Gastos Generales	1623,23
	8 % Know-how	1623,23
	Presupuesto de Ejecución por Contrata	19478,72
	21 % IVA	4090,53
	Presupuesto de Inversión	23569,25

El presupuesto de inversión del proyecto asciende a la cantidad de VEINTITRÉS MIL QUINIENTOS SESENTA Y NUEVE EUROS CON VEINTICINCO CÉNTIMOS.