



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Diseño de nuevos biomateriales basados en redes poliméricas interpenetradas de ácido hialurónico y polímeros acrílicos

Tesis Doctoral

Eduard Rodríguez Pérez

Julio de 2017

Directores: Manuel Monleón Pradas
Jorge Luís Escobar Ivirico

Diseño y aplicación de una nueva técnica que permite combinar el ácido hialurónico con un segundo polímero de naturaleza hidrófoba, incluyendo variaciones de dicha técnica y estudios con cultivos celulares para comprobar la viabilidad de los nuevos biomateriales en ingeniería tisular.

A mi familia.

Aprender es descubrir que algo es posible

Fritz Perls

Índice

Agradecimientos	5
Resumen	7
Resum	8
Summary	9
Capítulo 1: Introducción	11
1.1. Ingeniería Tisular	11
1.2. La Ingeniería Tisular desde la perspectiva biotecnológica	15
1.3. Terapia celular.....	17
1.4. Biomateriales.....	26
1.4.1.1 Evolución de los biomateriales enfocados al implante	26
1.4.2. Materiales biomiméticos	28
1.4.3. Tipos de biomateriales	32
1.4.4. Propiedades de los biomateriales	33
1.4.5. Interacción célula-material.....	40
1.4.6. Formación de matriz extracelular sobre los materiales.....	42
1.4.7. Cultivos 2D vs cultivos 3D	44
1.5. El ácido hialurónico (HA)	47
1.5.1. Origen, estructura y propiedades	47
1.5.2. Modificaciones del HA	50
1.5.3. Obtención de scaffolds de HA	51
1.5.4. Degradación	51
1.5.5. Hidrólisis del HA	55
1.5.6. Funciones biológicas.....	56
1.5.7. Aplicaciones clínicas.....	58
1.6. Polímeros acrílicos: polimetacrilatos y poliacrilatos	58

1.6.1.	Reacciones de polimerización.....	58
1.6.1.1	Polimerización por vía radical.....	59
1.6.1.2	Iniciación.....	59
1.6.1.3	Propagación.....	61
1.6.1.4	Terminación.....	61
1.6.2.	Aplicaciones en ingeniería tisular.....	62
1.7.	Técnicas para combinar dos o más materiales.....	63
1.7.1.	Redes poliméricas interpenetradas (IPNs).....	64
1.8.	Hipótesis y objetivos.....	65
Capítulo 2:	Materiales y métodos.....	67
2.1.	Materiales.....	67
2.1.1.	Reactivos de síntesis y otros.....	67
2.1.2.	Células y medios de cultivo.....	70
2.2.	Métodos de síntesis y preparación de materiales.....	72
2.2.1.	Preparación de scaffolds de ácido hialurónico (HA) entrecruzado con DVS72	
2.2.2.	Síntesis de polietil acrilato (PEA) en forma de scaffolds.....	73
2.2.3.	Síntesis de redes poliméricas interpenetradas (IPN) de ácido hialurónico y polietil acrilato (HA-i-PEA) en forma de scaffolds.....	75
2.3.	Métodos de caracterización de los materiales.....	77
2.3.1.	Microscopía Electrónica de Barrido.....	77
2.3.2.	Densidad.....	78
2.3.3.	Porosidad.....	78
2.3.4.	Análisis Termogravimétrico.....	79
2.3.5.	Análisis Elemental.....	79
2.3.6.	Hinchamiento en agua.....	79
2.3.7.	Espectroscopia de Infrarrojos con Transformada de Fourier.....	80
2.3.8.	Análisis mecánico.....	80
2.3.8.1	Respuesta a la tensión.....	80
2.3.8.2	Respuesta a la compresión.....	81

2.3.9.	Degradación	81
2.4.	Ensayos biológicos. Cultivos <i>in vitro</i>	82
2.4.1.	Ensayos de citotoxicidad.....	83
2.4.2.	Ensayos de adhesión y proliferación celular en los scaffolds	83
2.4.2.1	Adhesión celular mediante fluorescencia de la actina	83
2.4.2.2	Viabilidad celular mediante MTS	84
2.4.2.3	Observación de las morfología celular mediante SEM.	84
2.5.	Análisis estadístico	85
Capítulo 3:	Resultados	87
3.1.	Síntesis de <i>scaffolds</i> de PEA, HA y HA-i-PEA	87
3.2.	Caracterización de los <i>scaffolds</i>	93
3.2.1.	Composición de las IPNs	96
3.2.2.	Degradación	101
3.2.3.	Propiedades mecánicas	105
3.3.	Estudios <i>in vitro</i> con fibroblastos L929	108
3.3.1.	Citotoxicidad de los materiales	108
3.3.2.	Adhesión y proliferación celular en los distintos scaffolds	109
Capítulo 4	Discusión	113
4.1.	Síntesis de <i>scaffolds</i> de PEA, HA y HA-i-PEA	113
4.2.	Caracterización de los <i>scaffolds</i>	115
4.2.1.	Composición de las IPNs	118
4.2.2.	Degradación	119
4.2.3.	Propiedades mecánicas	121
4.3.	Estudios <i>in vitro</i> con fibroblastos L929	127
4.3.1.	Citotoxicidad de los materiales	127
4.3.2.	Adhesión y proliferación celular en los distintos scaffolds	127
Capítulo 5:	Conclusiones	131
Referencias	134

Lista de publicaciones realizadas por el autor.....	159
Abreviaturas	163

Agradecimientos

Esta tesis no se habría realizado sin la ayuda de mis directores, a los que quiero agradecer su apoyo y amistad, además de su trabajo. Quiero agradecer especialmente a los doctores Jorge Luis Escobar y Dunia García, que han sido mis padrinos en la investigación científica, por así decirlo. Quiero agradecerles su dedicación y apoyo, que no cesaron ni tras su traslado a EEUU. Les deseo lo mejor para ellos y su familia.

A mis colegas de laboratorio, los que siempre mantenían el buen humor, el compañerismo y la profesionalidad sin importar el qué: al buenazo de Sergiy, a María, a Manu, a Panadero, a Ximo, a Guillermo, a Paloma, a Javi, a Laura, a Ismael, a Álvaro, a Laia, a Sara, a Myriam, a Marco, a Virginia... y tantos que me dejo. He tenido mucha suerte de compartir mi tiempo con todos ellos.

A la doctora Cristina Martínez Ramos, por su inestimable ayuda en mi investigación, tanto en la realización de los ensayos *in vitro* como en la elaboración de varios de los artículos que han sido publicados (y los que quedan por publicar durante la redacción de esta tesis).

A los responsables y profesores miembros del CBIT, por darme la oportunidad de colaborar con ellos, y por su gran paciencia y dedicación con los estudiantes, yo incluido.

A mi familia y amigos por darme ánimos para acabar a pesar de todo. Por su cariño. Espero que si este ladrillo cae en sus manos puedan entender algo, ¡aunque sea la introducción!

Agradecer por último las financiaciones obtenidas a través del proyecto FP7-NMP-2008-SMALL-2 núm 229239 "*Regeneration of Cardiac Tissue Assisted by Bioactive Implants*" de la Unión Europea, que financió mi beca y materiales, así como de los proyectos MAT2011-28791-C03-02 "Materiales de soporte y liberación controlada para la regeneración de estructuras neurales afectadas por ictus", y MAT2015-66666-C3-1-R "Biohíbridos para la promoción del crecimiento axonal y la regeneración en el

sistema nervioso central y periférico” del Ministerio de Economía y Competitividad que financiaron tanto mi contratación como mi investigación.

Resumen

El ácido hialurónico (HA) es una molécula imprescindible en la formación de muchos tejidos del organismo, así como en la regeneración de los mismos. No obstante, sus propiedades físico-químicas limitan enormemente su uso como material para el soporte de células en aplicaciones clínicas si no se modifica su estructura química o se acompaña de otras moléculas. En esta tesis se ha sintetizado un constructo tridimensional de ácido hialurónico acompañado por un segundo material, un polímero acrílico (el poliacrilato de etilo, o PEA) capaz de polimerizar por vía radical en el interior del HA tras liofilizarlo. La red interpenetrada polimérica (IPN) resultante ha sido analizada para medir sus propiedades y compararlas con constructos semejantes realizados a partir de ambos polímeros por separado, con el objetivo de comprobar los efectos de la técnica de síntesis en las propiedades físico-químicas del HA. La viabilidad de estos materiales en aplicaciones con células ha sido comprobada mediante la realización de ensayos *in vitro* con fibroblastos L929. De forma adicional, se han llevado a cabo varias modificaciones de la técnica inicial de síntesis para obtener distintas proporciones de ambos componentes - HA y PEA - en los materiales. Las propiedades de esta serie de IPNs han sido medidas y comparadas con su método de síntesis y composición final con tal de dilucidar el efecto que produce cada paso de la síntesis en las mismas. Los biomateriales producidos mediante las técnicas aquí descritas pueden ofrecer sistemas interesantes para el cultivo y/o trasplante de células en futuras aplicaciones clínicas que deseen incorporar el ácido hialurónico en forma de constructo tridimensional estable.

Resum

L'àcid hialurònic (HA) és una molècula imprescindible en la formació de molts teixits de l'organisme, així com en la regeneració dels mateixos. D'altra banda, les seves propietats físico-químiques limiten enormement el seu ús com a material per al suport de cèl·lules en aplicacions clíniques si no se'n modifica l'estructura química o se l'acompanya d'altres molècules. En aquesta tesi s'ha sintetitzat un constructe tridimensional d'àcid hialurònic acompanyat d'un segon material, un polímer acrílic (el poliacrilat d'etil, o PEA) capaç de polimeritzar per via radical a l'interior del HA després de liofilitzar-lo. La xarxa interpenetrada polimèrica (IPN) resultant ha sigut analitzada per mesurar les seves propietats i comparar-les amb constructes semblants realitzats a partir d'ambdós polímers per separat, amb l'objectiu de comprovar els efectes de la tècnica de síntesi en les propietats físiques y químiques del HA. La viabilitat d'aquests materials en aplicacions amb cèl·lules ha sigut comprovada mitjançant la realització d'assajos in vitro amb fibroblasts L929. Addicionalment, s'han dut a terme varies modificacions en la tècnica inicial de síntesi per tal d'obtenir diferents proporcions d'ambdós components - HA i PEA - als materials. Les propietats d'aquesta sèrie de IPNs han sigut mesurades per tal de revelar l'efecte que produeix cada pas de la síntesi sobre les mateixes. Els biomaterials produïts mitjançant les tècniques aquí exposades poden oferir sistemes interessants pel cultiu y/o trasplantament de cèl·lules en futures aplicacions clíniques que desitgin incorporar l'àcid hialurònic en forma de constructe tridimensional estable.

Summary

Hyaluronic acid (HA) is an essential molecule in the development of many tissues in the organism, as well as in their regeneration. Although, its physicochemical properties greatly limit its use as a cell support material in clinical applications unless its chemical structure is modified or is accompanied by other molecules. In this thesis a tridimensional scaffold has been made consisting of hyaluronic acid and a second material, an acrylic polymer (poly[ethyl acrylate] or PEA) able to be polymerized by free-radical polymerization inside HA after lyophilisation. The resultant interpenetrating polymer network (IPN) has been analyzed in order to measure its properties and compare them to similar scaffolds made from the two separate polymers, with the aim to compare the effects produced by the synthesis technique in the physical and chemical properties of HA. The viability of these materials in cell applications has been tested through *in vitro* assays using L929 fibroblasts. Additionally, several modifications have been made to the initial synthesis technique in order to obtain different proportions from the two components - HA and PEA - in the materials. The properties of these IPNs have been measured to reveal the effects produced by every step along their synthesis. The biomaterials produced through the techniques described here may offer interesting systems for cell culture and/or cell transplants in future clinical applications that wish to incorporate hyaluronic acid in the shape of a stable tridimensional scaffold.

Capítulo 1.

Introducción

1.1. Ingeniería Tisular

La ingeniería tisular es un concepto que no apareció hasta finales del siglo XX, concretamente en un seminario realizado por la *National Science Foundation* (NSF, de EEUU) en 1987, donde se discutió por primera vez la emergencia de esta disciplina. La ingeniería del tejido vivo, que es otro modo de llamarla, puede describirse de forma resumida como un *campo de estudio multidisciplinar e interdisciplinar que aspira a desarrollar terapias para sustituir y/o mejorar los tejidos vivos del paciente mediante el uso de células vivas compatibles.*

Pero para poder describir de un modo más profundo lo que la ingeniería tisular representa, hay que explicar la emergencia de su necesidad desde el punto de vista médico. Durante los últimos siglos la cirugía ha perfeccionado técnicas que permiten aliviar o eliminar completamente diversas dolencias relacionadas con el mal funcionamiento o disfunción total de algunos órganos y tejidos, mediante la eliminación y/o remodelación de dichos tejidos y permitiendo luego la regeneración natural por parte del individuo.

Según los tejidos afectados, dicha regeneración puede ser deficiente, insuficiente o directamente no ocurrir (como en el caso de órganos completos), lo que ocasionará daños adicionales al paciente como morbilidad, o incluso la muerte, dependiendo de la importancia de la parte afectada del organismo. Para evitar tales daños, la inventiva de los médicos dio lugar a la aparición de los **trasplantes** de *tejidos* u *órganos*, así como las *prótesis* e **implantes** de soporte mecánico.

Pese a que se logró en muchos casos que el paciente sobreviviera e incluso mantuviera cierta calidad de vida, el uso de tales técnicas no carece de limitaciones. Los materiales usados para las prótesis internas o implantes pueden dar lugar a artefactos debido a la incompatibilidad con los tejidos vivos del paciente, mientras que el uso de trasplantes conlleva reacciones de rechazo inmunológico que deben ser tratados con medicación inmunosupresora -con todos los problemas que eso conlleva para el paciente-, o bien la aparición de morbilidad adicional en tejidos sanos del paciente en el caso de un autotrasplante de tejidos (como piel y nervios). Aún a pesar de estas limitaciones, estas técnicas permiten salvar la vida a miles de pacientes cada año.

Por otra parte, los inconvenientes surgidos durante la aplicación de las diversas prótesis, junto con la baja disponibilidad de órganos y tejidos para trasplantes motivaron la búsqueda de soluciones alternativas a los mismos. Por un lado se desarrolló la ciencia de los biomateriales; que se centra en la búsqueda, estudio y diseño de materiales compatibles con el soporte y/o la regeneración de los tejidos, como se verá más adelante. Por otro, los avances en las técnicas de cultivos celulares abrían la puerta al uso de células expandidas fuera del organismo como bloques para la construcción de tejidos viables.

No obstante, el descubrimiento de las células madre fue el evento que permitió visualizar la ingeniería tisular como el siguiente paso lógico hacia la obtención de tratamientos avanzados que superaran las limitaciones conocidas hasta entonces.

Y así es como se empezó a desarrollar el nuevo campo de la ingeniería tisular, que combina estrategias y conocimientos provenientes de la medicina clínica, la ingeniería y la ciencia. En un informe de la *National Science Foundation*, elaborado en el año 2000, se mencionan los distintos campos de investigación básica y aplicada de los cuales se ha nutrido la ingeniería tisular:

Tabla 1.1 Lista de campos y subcampos que incluye la Ingeniería Tisular:

Biología celular y del desarrollo	Biomateriales
<i>Diferenciación celular, morfogénesis y formación de tejidos</i>	<i>Polímeros naturales y sintéticos, biodegradables y bioestables</i>
<i>Interacciones célula-célula y célula-matriz</i>	<i>Química de polímeros</i>
<i>Factores de crecimiento</i>	<i>Cerámicas</i>
<i>Aislamiento y selección de tipos celulares</i>	<i>Interacción célula-biomaterial</i>
<i>Cultivo celular</i>	<i>Liberación controlada de moléculas bioactivas</i>
<i>Angiogénesis</i>	<i>Microencapsulación</i>
<i>Células madre (y células madre adultas)</i>	<i>Técnicas de microfabricación</i>
Medicina y veterinaria	<i>Técnicas de fabricación 3D</i>
<i>Anatomía</i>	<i>Química de superficies</i>
<i>Citología</i>	Ingeniería Biomédica
<i>Fisiología y fisiopatología</i>	<i>Bioreactores</i>
Trasplantología	<i>Membranas y filtración</i>
<i>Inmunología aplicada – inmunosupresión, inmunomodulación e inmunoaislamiento</i>	<i>Ingeniería de articulaciones musculoesqueléticas</i>
<i>Preservación de órganos</i>	<i>Sensores biomédicos</i>
Biofísica y biomecánica	<i>Procesado, autoajuste y control de señales biomédicas</i>
<i>Transporte celular y molecular</i>	<i>Ingeniería eléctrica y mecánica de sistemas biohíbridos</i>
<i>Dinámica micro- y macrocirculatoria</i>	<i>Ingeniería de diseño y análisis de sistemas</i>
<i>Mecánica celular y de tejidos</i>	<i>Caracterización cuantitativa de tejidos</i>
	<i>Biosensores y bioelectrónica</i>

Fuente: Research fields and subfields that have contributed to tissue engineering. - The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field. Jessica Viola, Bhavya Lal, Oren Grad. National Science Foundation. October 14, 2003

Como puede verse en la tabla anterior, los conocimientos de los que puede aprovecharse la ingeniería tisular son muy amplios; de ahí que en su desarrollo se haga necesaria la colaboración de científicos, ingenieros y profesionales de la medicina, teniendo siempre éstos últimos la voz cantante a la hora de decidir qué clase de producto o técnica satisface mejor cada demanda terapéutica. De este modo la medicina regenerativa avanza constantemente, abarcando los distintos frentes de interés terapéutico y adaptándose siempre a la práctica clínica.

De cara a esta tesis, es importante tener en cuenta cuáles pueden ser las aportaciones de un profesional de la biotecnología a un equipo que investigue o desarrolle nuevos productos y/o conocimientos en el campo de los biomateriales o la ingeniería tisular. En este sentido puede resultar interesante describir la ingeniería tisular desde el punto de vista de la biotecnología.

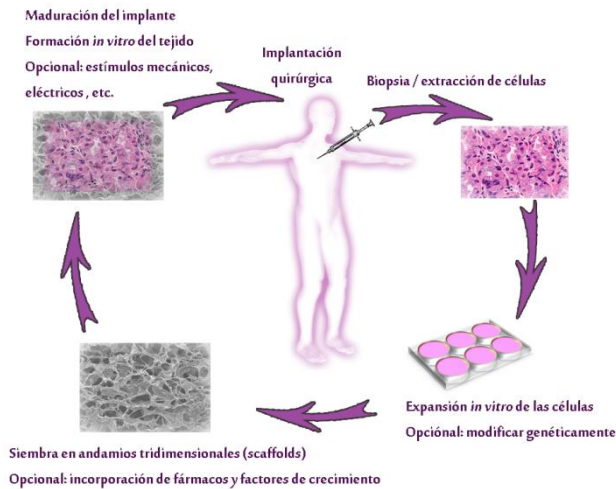


Figura 1.1 Descripción gráfica simplificada del concepto de Ingeniería Tisular

1.2. La Ingeniería Tisular desde la perspectiva biotecnológica

Normalmente se asocia a la biotecnología con las técnicas de ingeniería genética usadas para agricultura o la producción de nuevos fármacos y vacunas. No obstante, la biotecnología es tan antigua como la civilización humana: procesos como la obtención de pan y cerveza pueden considerarse aplicaciones biotecnológicas. ¿Qué es entonces la biotecnología?, ó ¿qué podemos considerar como un proceso biotecnológico?

En pocas palabras, la *biotecnología* es el campo de la ciencia que se centra en *el aprovechamiento de los distintos procesos de la vida en sus distintos niveles (molecular, celular, de organismos y de ecosistemas) para la obtención de bienes y servicios para la sociedad.*

Esta definición puede resultar chocante debido a que permite englobar actividades tales como la producción industrial de insulina en bioreactores, el tratamiento de aguas residuales mediante humedales, la modificación genética de semillas para obtención de biodiesel o la obtención de vino por fermentación alcohólica del mosto. Todas estas actividades son procesos en los que el hombre aprovecha sus conocimientos sobre la biología y los procesos biológicos y elabora a partir de ellos técnicas que le aporten un beneficio.

Entonces, ¿podemos decir que la ingeniería tisular es una aplicación de tipo biotecnológico? Como ya se ha mencionado, en ésta se pretende utilizar el conocimiento sobre el funcionamiento de los tejidos, e incluso manipular células vivas, para tratar dolencias y enfermedades, lo cual coincide con la descripción anterior de biotecnología. Más concretamente, y debido a su enfoque terapéutico, la ingeniería tisular coincidiría con la rama medicinal/farmacológica de la biotecnología, conocida como *biotecnología roja*.

Además de poder definirse como un tipo de aplicación de la biotecnología roja, la ingeniería tisular puede interactuar con ramas específicas de la biotecnología para ampliar su potencial. En primer lugar, el uso de la terapia celular recombinante (que

aplica la tecnología del ADN recombinante) puede permitir que los tejidos a trasplantar suplan al paciente de una función o metabolito de las cuales no disponga de forma normal, al introducir los genes necesarios en las células a trasplantar, como en el caso de las isletas de Langerhans artificiales trasplantadas a pacientes con diabetes[1]; o bien pueden usarse microorganismos modificados genéticamente en la producción de los biomateriales, como ya ocurre con el ácido hialurónico producido por *Streptococcus equi* [2, 3]. Existe además la posibilidad de producir, también mediante microorganismos modificados genéticamente, aquellas proteínas y fármacos que permitan ajustar mejor las condiciones de cultivo de los nuevos tejidos, o mejorar su adaptación tras el trasplante [4-6].

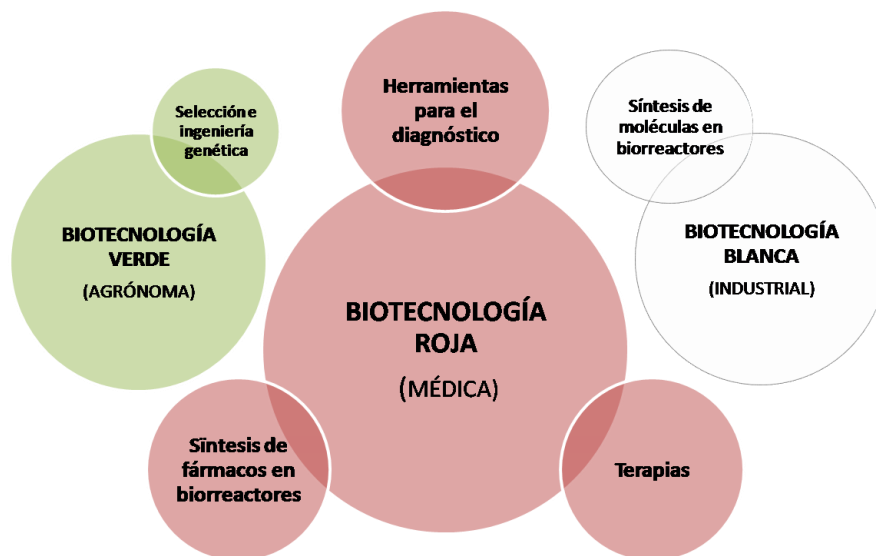


Figura 1.1 Esquema básico de las principales ramas de aplicación de la biotecnología

1.3. Terapia celular

La terapia celular es un pilar fundamental de la ingeniería tisular, y consiste básicamente en la trasplatación o inyección de células vivas para tratar distintas dolencias y enfermedades. Si bien las transfusiones sanguíneas podrían considerarse como terapia celular, eso no suele ser así ya que las células del donante solamente tendrían una función de reemplazo temporal en el transporte de oxígeno, siendo desplazadas otra vez por las células del paciente en pocos días, sin efectos terapéuticos a largo plazo (excepto por la presencia de células madre adultas que puedan haber sido transferidas) [7].

Históricamente, la terapia celular tiene sus raíces en el trasplante de órganos, que en su desarrollo supuso el auge de la inmunología clínica y la inmunología aplicada. El sistema inmune es un factor de gran importancia en la transferencia de órganos, tejidos o células de un organismo a otro, e incluso entre distintas partes de un mismo organismo según los tipos celulares involucrados. Los principales problemas que pueden aparecer son dos: el rechazo del órgano o tejido por parte del receptor y la reacción de las células del injerto contra el huésped. Este segundo tipo de rechazo apareció principalmente en los trasplantes de médula (o trasplante de precursores hematopoyéticos), que puede considerarse como uno de los primeros ejemplos históricos de terapia celular [8], antes incluso de que la existencia de las células madre fuera un hecho reconocido por la comunidad científica.

Sin embargo fue cuando se descubrieron las células madre provenientes de la sangre de cordón umbilical junto con las células madre embrionarias [9] que la terapia celular fue considerada capaz de regenerar tejidos más allá de las células hematopoyéticas: desde neuronas hasta células endoteliales, pasando por mioblastos o condrocitos; todos los tipos celulares podrían llegar a ser potencialmente producidos.

Hay otros dos hitos que han permitido ampliar aún más las posibilidades dentro de la terapia celular: el descubrimiento de los distintos tipos de células madre adultas (o

células madre somáticas) [10-16], y la obtención de células madre pluripotentes inducidas [17, 18]. El primero de ellos implica que casi todos los tipos celulares en un individuo adulto pueden ser regenerados por distintas poblaciones de células indiferenciadas, presentes en su propio organismo, que poseen una capacidad ilimitada de replicación y el potencial para dar lugar a un número limitado de tipos celulares; mientras que el segundo implica la capacidad de obtener células madre pluripotentes a partir de células ya diferenciadas mediante la activación de ciertas rutas de señalización nuclear, normalmente inactivas, que las hacen regresar a un estado parecido al de las células embrionarias.

A la hora de discutir sobre las limitaciones inmunológicas en la terapia celular, los trasplantes se clasifican según su origen, como se puede ver en la siguiente tabla:



Figura 1.2 Trasplantes según la fuente de obtención, de menor a mayor compatibilidad

Esta clasificación es de gran importancia, pues la respuesta inmune entre trasplante y receptor puede comprometer el éxito de la terapia. La mayoría de trasplantes en la actualidad son de tipo alogénico (de un individuo a otro de la misma especie), con lo cual la aparición de respuesta inmune depende de las coincidencias en el complejo

mayor de histocompatibilidad (MHC, en inglés), que en los humanos se corresponde al conjunto de antígenos leucocitarios humanos (HLA, en inglés) [19]. Las coincidencias fenotípicas de dichos antígenos reducirán la posibilidad de respuesta inmune tras el trasplante, con lo cual es interesante conocer el perfil genético de donante y receptor. Normalmente el parentesco es un factor positivo, pero no garantiza la compatibilidad donante-receptor. Los trasplantes de tejido extraído del propio paciente, de ser posibles, son los más deseables si se desea evitar cualquier complicación debida a reacciones inmunológicas. Del mismo modo, los trasplantes singénicos son también ideales, pero solo pueden producirse si se dispone de un individuo donante genéticamente idéntico al receptor (es decir, un gemelo univitelino).

Los trasplantes xenogénicos pueden resultar interesantes debido a que resulta menos complicado disponer de donantes, pero la alta incompatibilidad entre el animal donante y el humano receptor obliga a usar tratamientos inmunosupresores intensos [20]. No obstante, se han estudiado alternativas al uso convencional de material xenogénico, como la modificación genética de animales para “humanizar” sus antígenos y hacerlos así compatibles para el trasplante [21]. Otra alternativa, en el caso de órganos completos, ha sido *descelularizar* (eliminar el componente celular) de dichos órganos y sembrarlos con células madre provenientes del mismo paciente, de modo que la matriz extracelular sirva de soporte y estimule la diferenciación a los tipos celulares nativos del tejido [22-25].

Por otro lado, se indican aquí los tipos de células disponibles para terapia celular según su potencialidad para diferenciarse en los distintos tipos celulares.

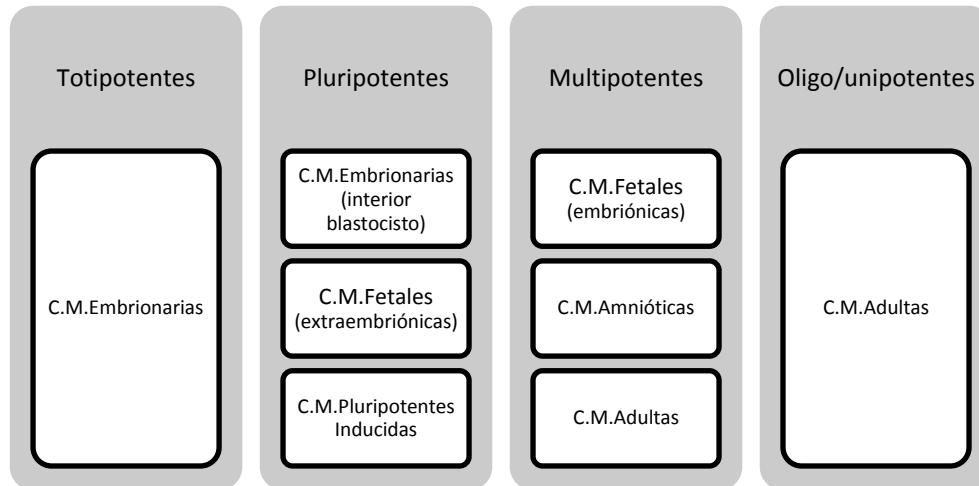


Figura 1.3 Fuentes/tipos de células madre (C.M.) según su nivel de potencialidad

En general, las células madre se caracterizan por su *potencialidad* o capacidad de dar lugar a los distintos tipos celulares diferenciados que conforman el organismo, así como por su capacidad prácticamente ilimitada de replicación, o *inmortalidad*. Este último rasgo es el que las diferencia de las células progenitoras [26, 27], que son capaces de dar lugar a células especializadas pero poseen una capacidad de replicación limitada, y son normalmente producidas mediante la división asimétrica de las células madre (obteniéndose una progenitora y una célula madre y conservándose así su población indefinidamente). Las células madre fetales son un caso especial, ya que la mayoría de células se encuentra en un estado intermedio de diferenciación, pudiendo considerarse como células progenitoras.

La potencialidad celular está relacionada con la activación o silenciamiento de genes o zonas del genoma requeridos para la formación de los distintos tipos celulares (en forma retórica, podría definirse como el “destino funcional” de las células), y está directamente condicionado por la epigenética de su ADN [28, 29]. Conforme el entorno celular cambia –como puede ocurrir durante la gestación de un embrión, o en la pubertad con la producción de hormonas sexuales–, las células pueden pasar a definir

su “destino” celular silenciando o activando ciertas partes de su genoma. De ese modo, pueden reducir su potencialidad a cambio de especializarse en la producción de ciertos tipos celulares específicos con el fin de generar nuevos tejidos, o bien pueden detenerse en una fase intermedia indiferenciada para servir de reservorio en los procesos naturales de regeneración y/o renovación de los tejidos (como es el caso de las células madre adultas [16, 27, 30]).

Los distintos rangos de potencialidad que puede asumir una célula son: *totipotencialidad*, *pluripotencialidad*, *multipotencialidad*, *oligopotencialidad* y *unipotencialidad* [31].

Las células *totipotentes* son aquellas capaces de dar lugar a todos los tejidos del organismo, además de los tejidos propios de la gestación, como la placenta o el saco vitelino. Es el caso de las células embrionarias obtenidas de embriones viables de hasta 5 días post-fecundación, así como de las embrionarias obtenidas por sustitución del núcleo del óvulo por un núcleo diploide de célula somática, o mediante la generación de óvulos partenogénicos (diploides).

Las células *pluripotentes* pueden dar lugar a casi todos los tipos de células, incluyendo las correspondientes a las tres líneas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Es el caso de las células somáticas tratadas para desdiferenciarse mediante la activación de ciertos genes (modificando su epigenética), y que son conocidas como células madre pluripotentes inducidas (IPSCs, del inglés *induced pluripotent stem cells*) [17, 18]. Su descubrimiento ha supuesto una revolución en el campo de la terapia tisular por poderse obtener de un paciente adulto siendo genéticamente compatibles.

Las células *multipotentes* pueden diferenciarse a muchos tipos celulares, pero no cumplen la capacidad de las pluripotentes de dar lugar a cualquiera de las tres líneas germinales. El individuo adulto posee grandes reservorios de estas células para poder regenerar o renovar aquellos tejidos que sufren mayor desgaste: es el caso de la médula ósea, donde residen las células hematopoyéticas (que producen y regeneran las células

sanguíneas, a razón de quinientos mil millones al día), así como las células mesenquimales (capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos, condrocitos y potencialmente miocitos o incluso neuronas).

Las células *oligopotentes* pueden dar lugar a unos pocos tipos celulares. Aunque es una propiedad normalmente asociada a las células progenitoras, existen diversas células madre adultas de este tipo que se han ido descubriendo estas últimas dos décadas [27, 32]. En el organismo, estas células se encuentran en reservorios ubicados en el propio tejido a regenerar (puede que incluso en pequeñas poblaciones dentro de los reservorios principales como la médula ósea) y se encargan de producir los tipos celulares específicos de dicho tejido, o al menos una parte. Es el caso de las células madre cardíacas o las células madre endoteliales.

Las células *unipotentes* se diferencian a un solo tipo celular. Por lo que sabemos, esto se da en las células progenitoras y en las células madre adultas, si bien no hay consenso sobre si este segundo tipo de células mantiene siempre un nivel de potencialidad mayor y por tanto la unipotencialidad se da en las células progenitoras derivadas de éstas.

A la hora de decidir qué células pueden ser las más aptas para la terapia celular, el grado de potencialidad es un factor decisivo pero no el único, si bien condiciona la efectividad y efectos secundarios que pueda tener el trasplante.

Las *células madre embrionarias* [33, 34] se obtienen principalmente de embriones viables de hasta 5 días post-fecundación; si bien pueden obtenerse a través de la transferencia nuclear o introducción de un núcleo somático a un óvulo tras eliminar su núcleo haploide (técnica que forma parte de la clonación somática), o bien por la obtención de óvulos partenogénicos diploides (es decir, un cigoto producido mediante reproducción asexual). Es precisamente por tratarse de embriones humanos potencialmente viables que el uso de estas células implica objeciones éticas, limitándose en la práctica cualquier experimentación o desarrollo técnico relacionado con las mismas.

Su principal característica es que son totipotentes, o pluripotentes si se aíslan de las capas internas del blastocisto, además de que se expanden fácilmente y prácticamente de forma indefinida en cultivo. No obstante, su uso práctico en terapia celular está lejos de ser viable, por diversas razones más allá de la ética. En primer lugar, la expresión de genes embrionarios en estas células activa la respuesta inmune del receptor, aunque se trate de células autólogas o singénicas, con lo cual se requiere la administración de terapia inmunosupresora. En segundo lugar, y quizás más importante, es que la trasplatación de estas células suele producir teratocarcinomas; es decir, el crecimiento descontrolado de tejidos indiferenciados o diferenciados y de tipo diferente al tejido huésped, que pueden incluso metastatizar a otros tejidos [35-37]. Ello se debe mayormente a que los mecanismos de diferenciación de las células madre embrionarias utilizan señales de activación diferentes a las que encuentran al injertarse en un tejido adulto, y poseen además la capacidad de estimular su propio crecimiento sin necesidad de señales externas.

Otro tipo de células madre pluripotentes son las obtenidas en laboratorio a partir de células somáticas adultas a las cuales se les activan ciertos genes relacionados con la pluripotencia celular (o se les introducen copias de dichos genes para obtener el mismo resultado). Estas células se conocen como *células madre pluripotentes inducidas* (iPSCs) [17, 18]. Si bien se evitan los problemas éticos relacionados con las células madre embrionarias, además de permitir la obtención de células madre autólogas pluripotentes, siguen acarreado otros mismos problemas en su aplicación como la formación de teratocarcinomas o la activación de respuesta inmune. Además, las técnicas usadas en su obtención (p.ej. recombinación genética usando retrovirus) pueden dar lugar a mayor riesgo de tumores por la activación de oncogenes o silenciamiento de genes supresores durante la integración genómica del virus.

Las *células madre adultas* (o células madre de adulto), pese a carecer del nivel de potencialidad y de expansión de las células madre embrionarias o de las iPSCs, suponen la fuente de células madre más seguras y por tanto con una aplicación práctica

viable a corto plazo en la terapia clínica: de hecho, ya existen ejemplos de aplicaciones con resultados positivos.

Esta última categoría incluye un gran rango de tipos celulares que, pese a mantenerse indiferenciados, poseen potencialidades limitadas a ciertos rangos de tipos celulares y actúan como los reservorios naturales para la regeneración de tejidos específicos del organismo [10, 38]. Entre muchos otros tipos de células madre adultas descubiertos (y por descubrir), existen las células madre epiteliales, encargadas de regenerar y renovar la piel, y las células mesenquimales y hematopoyéticas albergadas en la médula ósea, que pueden generar nuevos vasos sanguíneos, tejido óseo o cartilaginoso, o bien renovar las células sanguíneas. Hasta los últimos años se han ido identificado nuevos tipos de células madre adultas, ya que en condiciones normales suelen permanecer inactivas o quiescentes, pero pueden activarse en determinadas circunstancias: es el caso de las células madre del músculo, las células madre cardíacas, o las células madre neurales.

Entre sus ventajas destaca el hecho de que al poderse obtener del mismo paciente, su uso evita cualquier rechazo inmunológico; y a pesar de que carecen de marcadores específicos para su identificación fenotípica en cultivo –al igual que los otros tipos de células madre–, el hecho de poder extraerse de sus reservorios específicos y que además su potencialidad se vea limitada a varios o pocos tipos celulares, hace que la obtención y uso de estas células madre sea mucho menos costoso y laborioso que con los otros tipos. Existe además la posibilidad de usar estas células sin extraerlas de sus reservorios, usando en vez de ello los mecanismos que activen su migración y diferenciación en el tejido diana[39, 40].

Más allá de poder diferenciarse a los distintos tipos de células que conforman el tejido a regenerar, la trasplatación de células madre puede ejercer otros efectos terapéuticos en el organismo. Diversos estudios han demostrado que estas células secretan factores paracrinos –o de señalización intercelular– que estimulan la supervivencia celular

(citoprotección), la formación de nuevos vasos sanguíneos (vascularización), la creación o remodelación de la matriz extracelular e incluso el reclutamiento de células madre dentro de los propios tejidos [41]. Todos estos efectos amplían más aún el abanico de posibilidades de la terapia celular.

Entre las limitaciones técnicas de la terapia celular destacan los bajos rendimientos de retención de las células inyectadas/trasplantadas. Los principales métodos para administrar las células al paciente consisten en inyectarlas en el interior mismo de los vasos sanguíneos que irrigan el tejido; pero estudios de seguimiento de estas células inyectadas demuestran que tan solo unas pocas logran integrarse (a veces fusionándose con otras células) en el tejido de destino [42-44]. En ocasiones estas células se mantienen indiferenciadas, de modo que sus efectos terapéuticos provienen casi en su totalidad de la secreción de factores paracrinos.

Con tal de superar este escollo, se plantea la posibilidad de usar **vehículos celulares**; es decir, *soportes físicos que albergan las células destinadas al trasplante* [45]. Esto permite no solamente una mejor localización física de las mismas, sino que aumenta su supervivencia y abre la puerta a controlar las condiciones presentes en el lugar de trasplante.

1.4. Biomateriales

Los biomateriales son aquellos materiales usados para interactuar con tejidos o fluidos biológicos [46], ya sea en aplicaciones terapéuticas como de diagnóstico. No obstante, este trabajo se centra en el estudio y desarrollo de biomateriales enfocados a la terapia, y más concretamente la terapia para la regeneración de tejidos.

1.4.1.1 Evolución de los biomateriales enfocados al implante

El objetivo original de estos biomateriales vino dado, como ya se ha mencionado anteriormente, por la necesidad médica de restaurar en cierto grado la función de un tejido defectuoso o que ha sido extirpado con anterioridad.

El uso de implantes es aún rutinario en la medicina contemporánea; especialmente cuando los últimos avances en técnicas, fármacos y terapias en general para tratar la gran mayoría de patologías -como infecciones, complicaciones cardiovasculares o el cáncer- ha aumentado la esperanza de vida media de la población. Sin embargo, no existe aún un modo de evitar o invertir el envejecimiento y/o desgaste de los tejidos a lo largo del tiempo, con lo cual se requieren con más frecuencia intervenciones para sustituir dientes, huesos, válvulas cardíacas, córneas e incluso articulaciones u órganos completos para mantener la calidad de vida de los pacientes.

Más allá de la esperanza de vida del receptor, se requiere que la vida media de los implantes sea larga, o que idealmente no necesiten de sustitución ni den lugar a complicaciones a lo largo de la vida del paciente. Las primeras generaciones de implantes pronto revelaron multitud de problemas relacionados con la interacción de un elemento artificial inerte con el organismo vivo, especialmente por diferencias en la respuesta mecánica y la interacción de la superficie del implante con las células circundantes y el sistema inmune. Además, estos primeros biomateriales iban degradándose o perdiendo propiedades con el tiempo. Las principales limitaciones de estos implantes, si los comparamos con el tejido vivo, son la ausencia de

autoregeneración (o autoreparación) y de la capacidad de responder y adaptarse a los estímulos externos o del organismo [47].

La siguiente generación de implantes ha intentado mejorar la integración con el organismo mediante la fijación *bioactiva* de los mismos; es decir, la funcionalización de las superficies de contacto entre el biomaterial y las células, de modo que se creen interacciones biológicamente activas (de ahí el término) entre ambos [48]. Esta funcionalización de los materiales, también llamada *biomimetización* [49], se consigue adsorbiendo o uniendo moléculas bioactivas que el organismo pueda reconocer, bien tras su liberación desde el material (como factores de crecimiento), o bien por tratarse de moléculas bioadhesivas o que forman normalmente parte de la matriz extracelular (como la hidroxiapatita del hueso o el colágeno). Otro modo de conseguir esto es realizando patrones nanométricos (estructuras repetitivas en la escala de los nanómetros) en la superficie del material. Más tarde hablaremos de cómo funcionan todos estos tipos de funcionalización y qué mecanismos intervienen.

Pese al avance que supone esta mejora de las interacciones en la interfaz implante-tejido, siguen existiendo limitaciones prácticas en los implantes, como incompatibilidades en las propiedades biofísicas del material con el entorno vivo, y la incapacidad de las mencionadas interfaces bioactivas para remodelarse o adaptarse adecuadamente ante distintos estímulos como lo harían los tejidos nativos.

Por otra parte, las investigaciones más recientes en ingeniería tisular se centran en el diseño de nuevos biomateriales que no se limiten a reemplazar ciertas funciones de los tejidos, sino que ayuden a la regeneración de los mismos. Esto supone un paso más allá respecto a la funcionalización bioactiva de los implantes: se trata de que el biomaterial actúe como un entorno *biomimético* para el transporte e integración de las células a transplantar, actuando a la vez de nicho donde éstas proliferen y/o se diferencien a los tipos celulares correspondientes [50]. En ocasiones el biomaterial actuará simplemente como un depósito de factores de crecimiento y/o fármacos, liberados desde su

estructura, o por células que pueden haber sido modificadas genéticamente para llevar a cabo la terapia. O dicho en pocas palabras: el biomaterial pasa de ser la base del implante a ser un componente que se integra con el resto de factores (células y/o moléculas bioactivas) para realizar una terapia que restaure el tejido a todos los niveles: estructura, función, metabolismo y propiedades biofísicas.

1.4.2. Materiales biomiméticos

Este último concepto se basa en la dinámica tisular, que engloba la formación y función de los tejidos, pero también la capacidad regenerativa de los mismos, que utiliza mecanismos similares a aquellos que se dan en el desarrollo embrionario. Éstos incluyen la migración, replicación y diferenciación de células que darán lugar al tejido nuevo, incluyendo la formación de la matriz extracelular del mismo. Es precisamente la interacción con la matriz extracelular, además de con las células vecinas y los factores solubles en el medio, que las células reconocen el entorno y activan sus mecanismos de respuesta [51-53]. Es decir, si el entorno contiene las señales adecuadas, las células activarán los mecanismos de regeneración del tejido: esta es la premisa más importante que ha asumido la ciencia de biomateriales junto a la ingeniería tisular durante las dos últimas décadas [54].

Con tal de simular las condiciones necesarias en el entorno celular para obtener un estímulo pro-regenerativo, se han abordado distintas estrategias en el diseño de los biomateriales. Todas ellas se basan en los conocimientos adquiridos a lo largo del tiempo sobre el comportamiento y señalización entre la célula y su entorno, estando este último comprendido por otras células, la matriz extracelular y moléculas solubles encargadas de transmitir señales intercelulares (como hormonas y citoquinas).

El paso más obvio ha sido el de usar directamente la **matriz extracelular** (o ECM, del inglés *extracellular matrix*) de los tejidos, o bien una o varias de las proteínas que las conforman, ya sea como material de base o como complemento en materiales compuestos. En su estado natural, la ECM forma un gel formado por fibras proteínicas

(como el colágeno o la elastina), y una fase hidratada de glicosaminoglicanos (principalmente el ácido hialurónico y los sulfatos de heparina, condroitina y queratina), en el cual las fibras aportan resistencia a la tensión, mientras que el hidrogel aporta resistencia a la compresión. Las células se anclan a las fibras proteínicas mediante receptores de membrana, siendo capaces de reconocer y responder a los estímulos mecánicos. De este modo, las propiedades biofísicas de la matriz influyen directamente en el comportamiento celular [55].

El uso de proteínas de matriz extracelular posee ciertos inconvenientes, como son las respuestas inmunes debido a diferencias con las proteínas del receptor, las dificultades inherentes a la purificación de proteínas, y el riesgo de transmisión de patógenos presentes en el material de origen [56]. No obstante, la tecnología del ADN recombinante permite sobrepasar en parte estas dificultades con la obtención de proteínas recombinantes humanas en bioreactores.

Como ya se ha dicho, las proteínas de ECM pueden usarse como material de base para crear el biomaterial (como pueden ser los geles de colágeno [57]) o bien usarse para funcionalizar la superficie de otros materiales poliméricos y así permitir el anclaje celular de un modo parecido al que se produce *in vivo*. En este último caso se hace relevante la fuerza de las interacciones que se producen entre la proteína y el segundo material en el caso de no estar unidos por enlaces covalentes, ya que -tal y como se ha mencionado- las células pueden detectar la resistencia de la red polimérica a la cual están ancladas [58].

Una segunda aproximación para el diseño de biomateriales biomiméticos consiste en la formación de **estructuras poliméricas nano- y microfibrilares**, que simularían el entorno en forma de red fibrilar de la ECM [59]. Mientras que las fibras de unas pocas micras son reconocidas por las células como superficies bidimensionales perdiendo su comportamiento nativo, las fibras obtenidas en la escala de los nanómetros ofrecen resultados más prometedores. Las técnicas para obtener estas redes son el

electrospinning o electro-hilado a partir de soluciones de cadenas poliméricas, o bien el uso de polímeros autoensamblables capaces de formar geles insolubles que alberguen y retengan las células.

Otro tipo de diseño consiste en el uso de **hidrogeles**, que simularían el entorno hidratado de la ECM. Este tipo de materiales tiene la ventaja de poder ensamblarse en presencia de las células sin causar daños a las mismas (como en el caso de los péptidos o polímeros autoensamblables), además de favorecer la difusión de nutrientes y oxígeno a través de su estructura, un punto clave en la viabilidad de los implantes con componentes celulares [60]. Uno de los inconvenientes es la poca o nula adhesión de las moléculas altamente hidrófilas de estos hidrogeles, algo que se puede soliviantar mediante otras estrategias, como se menciona a continuación.

Un aspecto importante a tener en cuenta de la relación entre la matriz extracelular y las células es la presencia de secuencias moleculares que los receptores de la célula puedan identificar, y que son usados para el anclaje de la misma al entorno. Estas secuencias han sido identificadas, y muchas de ellas han sido usadas como **ligandos** o **motivos de adhesión** para funcionalizar la superficie de distintos biomateriales mediante unión química de las mismas y mejorar así la fijación de las células [61]. Estos ligandos suelen ser secuencias relativamente cortas de aminoácidos muy conservadas entre la mayoría de las proteínas de ECM, como el péptido arginina-glicina-aspartato (RGD) [62]. En ocasiones, el uso de estos ligandos estimula la diferenciación de ciertos tipos celulares al combinarlos con otras estrategias de diseño de biomateriales. Los mecanismos celulares que regulan la unión y respuesta a estos ligandos se describirán más adelante en este trabajo.

Además de ofrecer zonas de anclaje para las células, las proteínas de la ECM son capaces de unirse temporalmente a moléculas solubles del organismo como los factores de crecimiento, sirviendo para su localización y concentración a niveles adecuados para la señalización celular (como en la creación de gradientes para la quimiotaxis o

reclutamiento celular), además de disponer estas moléculas de modo que aumente su actividad y reducir su degradación enzimática [63, 64]. Estos mecanismos se han usado en el diseño de distintos biomateriales, cargando a éstos de **factores de crecimiento** y/o **fármacos** para su **liberación** o **exposición funcional** hacia las células[6]. Existen distintas estrategias a la hora de cargar éstas moléculas funcionales en el biomaterial: en ocasiones la molécula efectora estará unida al material para ser expuesta a los receptores de la célula, mientras en otras se liberará por difusión, o tras degradarse el material o las cadenas que unen el material y la molécula (ver apartado 1.5. Liberación de fármacos y moléculas bioactivas).

Precisamente la capacidad de los biomateriales de ser degradados es un factor a tener en cuenta, ya que en el entorno nativo las células tienen la capacidad de degradar los distintos componentes de la matriz extracelular con tal de migrar a través de ella o bien remodelarla para establecer un tejido funcional. Este concepto ha sido aplicado a distintos biomateriales sintéticos experimentales[65, 66] que incorporan **secuencias peptídicas** capaces de ser **degradadas** por proteasas y metaloproteasas de matriz (MMPs, del inglés *matrix metalloproteases*)[67, 68].

Existen otros factores a tener en cuenta en el desarrollo de biomateriales que van más allá de la estructura o funcionalización química de los mismos. Quizás el más importante que no se ha mencionado - como tal - hasta ahora es el hecho de incorporar, o no, células que aporten capacidad regenerativa o terapéutica a los mismos, aunque se da por explícito por la mención de la terapia celular y las células disponibles para la misma. Lo que no se ha mencionado es la posibilidad de la **terapia celular sin el trasplante de células**, algo que puede ser realizado mediante el **reclutamiento *in vivo*** de las células del propio paciente. Esto último puede producirse con el uso de biomateriales que incorporen en su diseño los efectores biológicos (o bioestímulos) adecuados [40, 69].

Si bien casi todas las estrategias mencionadas hasta el momento son compatibles con el uso de biomateriales proregenerativos que *no* actúen como vehículo celular, su diseño implica obligatoriamente la incorporación de técnicas específicas. La más importante sería la incorporación de señales de migración celular junto con la invasibilidad del implante en sí (en caso de que su estructura o volumen ocupe el tejido a regenerar).

Por último es de relevante importancia para este trabajo el mencionar aquellos biomateriales sintéticos que permiten crear **interacciones bioactivas** entre su superficie, las proteínas adsorbidas a la misma y la célula, simplemente por sus propiedades físico-químicas [70-72]. Este tipo de biomateriales, normalmente polímeros tanto biodegradables como bioestables, favorecen la unión de proteínas de matriz extracelular de un modo que permiten que éstas sean reconocidas la célula, e incluso que en algunos casos se forme una matriz extracelular viable sobre ellos, sobrepasando la necesidad de incorporar motivos de adhesión. Su principal ventaja frente a materiales naturales o biosintéticos es que serían relativamente baratos y fáciles de producir. Entre sus aplicaciones se incluirían los implantes regenerativos con estructuras capaces de guiar la forma del tejido, además de como recubrimientos en implantes no regenerativos con tal de mejorar la integración con el tejido vivo.

1.4.3. Tipos de biomateriales

En cuanto a la naturaleza de los biomateriales, pueden clasificarse según su origen en tres tipos: *naturales*, *sintéticos* y *biosintéticos* (o *bioartificiales*). Los naturales son aquellos obtenidos a partir de seres vivos, incluyendo desde el colágeno humano hasta el esqueleto calcáreo del coral. Por el contrario, los biomateriales sintéticos son aquellos creados por el ser humano, y pueden incluir desde los metales de las primeras generaciones de biomateriales hasta los nanotubos de carbono o los polímeros autoensamblables. Por otro lado, los biomateriales e implantes biosintéticos o bioartificiales son aquellos que, o bien se producen mediante el uso de los seres vivos (y la tecnología del ADN recombinante [73]) o son reconstrucciones artificiales de

tejidos u órganos usando material puramente biológico (como los órganos impresos en 3D) [74-76]. Enumerar todos los biomateriales que son o pueden ser usados resultaría tedioso, pero puede afirmarse que para que cualquier material pueda ser considerado para este uso, se pueden aplicar los mismos principios que para el desarrollo de fármacos: que sean seguros, que aporte un beneficio para la terapia, y que sean por lo menos tan efectivos como otros materiales ya conocidos y probados en terapia. De hecho, todos los biomateriales son susceptibles de regularización por la FDA (*Food and Drug Administration*).

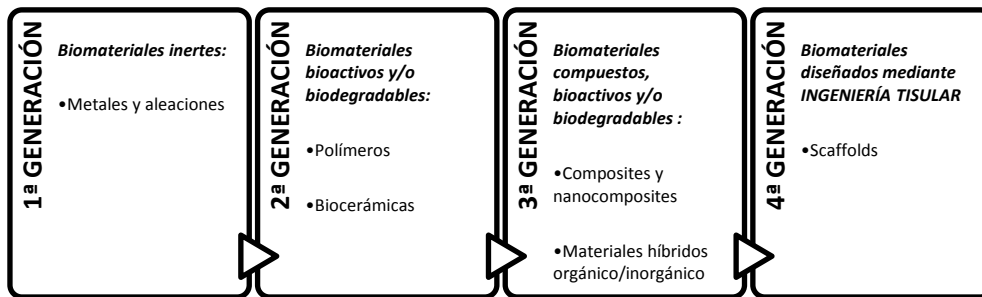


Figura 1.4 Evolución histórica del diseño de los biomateriales

El diseño y desarrollo de los biomateriales también se nutre de la ciencia de materiales, encargada de describir y medir las diferentes propiedades inherentes a los mismos. A continuación se describen aquellas propiedades que son relevantes en un biomaterial.

1.4.4. Propiedades de los biomateriales

Propiedades mecánicas: la *resistencia mecánica* a los distintos esfuerzos que puedan sufrir los materiales (ya sean de tensión, compresión, torsión, doblado, cizalla o desgarro) es una propiedad relevante en los biomateriales diseñados para ser incorporados en tejidos o zonas del organismo que deban soportar cargas de distinto tipo [77, 78]. En ocasiones dicha resistencia es imprescindible para que los biomateriales sean útiles en la práctica clínica: los cirujanos deben ser capaces de manipularlos sin comprometer su estructura [79]. No obstante, deben tenerse también

en cuenta que las propiedades mecánicas del material son importantes a la hora de integrarse con el resto del tejido y transmitir las cargas de forma adecuada hacia el tejido circundante [80, 81]. Esto es especialmente importante desde el punto de vista de los materiales *biomiméticos*: las células adheridas a los mismos deben percibir las fuerzas de tensión y compresión en rangos que coincidan con el entorno nativo, o por lo menos en rangos que permitan su supervivencia, proliferación y/o supervivencia según se requiera [82-84]. Para lograr la transmisión adecuada de cargas es interesante o incluso imprescindible que los materiales posean determinados niveles de *elasticidad* (excepto para los implantes de diente o hueso). En el caso de la mayoría de materiales (como los polímeros o incluso los metales), dicha elasticidad está directamente relacionada con su *crystalinidad* [85, 86]; es decir: la proporción de cristales y fase amorfa, junto con el tamaño de dichos cristales y la cinética de cristalización, que depende de la temperatura y tratamientos térmicos a la que son sometidos los mismos. La *crystalinidad* o *grado de cristalización* no debe considerarse como una propiedad meramente mecánica sino físico-química del material, que influye a otras características del mismo como las propiedades ópticas, morfológicas e incluso eléctricas.

Propiedades ópticas: este tipo de propiedades son prácticamente irrelevantes en la mayoría de biomateriales regenerativos, excepto para implantes relacionados con el ojo (como el de córnea). En este sentido deben tenerse en cuenta la *transparencia/opacidad* - o espectro de absorción en el rango de luz visible - así como el *índice de refracción* de estos materiales [87-89].

Propiedades morfológicas: la forma de los biomateriales a niveles macro-, micro- y nanométrico es relevante en la aplicabilidad de los mismos, así como la capacidad para asumir dichas estructuras en su preparación. Dentro de estas estructuras, suelen medirse valores como la porosidad así como el tamaño medio de los elementos en cada tipo de estructura, ya sean el diámetro de poros, gargantas y trabéculas en materiales

porosos, o la longitud y diámetro de las fibras en el caso de materiales fibrilares [90-92].

Propiedades eléctricas: para ciertas aplicaciones es necesario que los biomateriales interaccionen de forma eléctrica con su entorno. Un claro ejemplo serían los electrodos intracraneales usados en el control de enfermedades como el párkinson o la epilepsia [93], pero pueden aplicarse también cuando las células requieren estímulos eléctricos para su diferenciación (como se ha visto en neuronas y cardiomiocitos) [94, 95]. En estos casos pueden medirse la *conductividad* y la *permitividad* (relacionada con los materiales dieléctricos) de los materiales, según sea necesario. Otra propiedad interesante relativa a ciertos materiales cristalinos es la *piezoelectricidad*, o la propiedad de ciertos materiales cristalinos o semicristalinos de generar cargas eléctricas ante estímulos mecánicos y responder también de forma inversa, generando movimiento a través de cargas eléctricas [96, 97].

Propiedades químicas: o derivadas directamente de la composición química de los materiales. Más allá de dar lugar a sus propiedades físicas, como la *crystalinidad*, la composición y estructura molecular de los materiales es de vital importancia en la creación de un entorno favorable al desarrollo de tejidos viables, o sencillamente para permitir la adhesión y supervivencia celulares. Aunque algunos materiales puedan ser relativamente inertes (como algunos metales y polímeros sintéticos), la química es la escala de la realidad en la cual transcurren los procesos que permiten la vida, y por lo tanto toda composición tendrá una interacción determinada con el organismo. La sola presencia de moléculas semejantes a aquellas que se producen en el entorno tisular puede favorecer el biomimetismo de los implantes y estimular las respuestas adecuadas por parte de las células [50, 98-100].

Una de las principales características derivadas de la estructura y composición química de los materiales es la capacidad de unirse a las moléculas de agua, ya que el agua es un elemento omnipresente en el organismo y por tanto el comportamiento del material

se verá siempre condicionado por el medio acuoso. Puede describirse a los distintos materiales como *hidrófilos*, *hidrófobos* o bien *anfifílicos* (si es que existen partes de su molécula que se unen al agua y otras partes que la repelen) [101, 102]. Normalmente, los materiales muy hidrofílicos (como los que forman hidrogeles) son poco adherentes para las células a no ser que incorporen determinados grupos funcionales o secuencias peptídicas en su estructura [103], mientras que los materiales excesivamente hidrófobos no permiten la correcta difusión de nutrientes y oxígeno por su estructura, o bien alteran el plegamiento natural de las proteínas que se les adhieren, perdiendo éstas su funcionalidad [104, 105]. Los materiales anfifílicos son interesantes para la creación de micro- y nanopartículas capaces de transportar fármacos, entre otras aplicaciones [106, 107]. Los distintos grados de hidrofobicidad/hidrofílicidad pueden manifestarse en distintos niveles de *energía o tensión superficial* de los materiales, que es una magnitud objetiva para medir la interacción de una superficie con distintos solventes, incluyendo el agua, y que puede calcularse mediante la medida del *ángulo de contacto* de pequeñas gotas de los mismos sobre muestras lisas del material.

Otra manera de medir la interacción de los materiales con medios acuosos es el *grado de hinchamiento* o el *ratio de contenido en agua* por inmersión o en ambiente húmedo. Esto puede ser importante ya que la capacidad de absorber y retener agua está directamente relacionada con la capacidad de difusión de nutrientes y oxígeno a través de los materiales [108]. No obstante, los materiales excesivamente *higroscópicos* (como los hidrogeles) pueden ser muy poco manejables, limitando su rango de aplicaciones en la terapia clínica [109].

La interacción del biomaterial con los diferentes grados de pH en el organismo (o en el lugar de implante) puede ser relevante, especialmente si puede alterar sus propiedades [110, 111]. Por otra parte, debe tenerse en cuenta la presencia de grupos funcionales que alteren el pH en el entorno del material, lo cual puede afectar seriamente la viabilidad celular. No obstante, algunos ácidos débiles como el carboxílico (presente de forma natural en la superficie de muchas proteínas), han demostrado tener no tener

efectos tan adversos en este sentido, estimulando incluso respuestas celulares positivas respecto a otros materiales que no los contienen [70, 112].

Otra propiedad química de los materiales relacionada con la creación de entornos más o menos agresivos para las células es la que implica la absorción o bien la producción de radicales libres, u otros agentes que provocan estrés oxidativo en la célula [113]. Obviamente, lo interesante es el uso de aquellos materiales capaces de absorber o reducir la presencia de estos agentes nocivos para el desarrollo sano de los tejidos [114, 115]. Este tipo de propiedad puede encontrarse en determinadas moléculas orgánicas, mayormente en forma de solutos como algunos fármacos, aunque también en algunos polímeros.

La susceptibilidad de degradación no enzimática - como puede ser la hidrólisis - es de la mayor relevancia en ciencia de biomateriales, así como la velocidad a la que se produce ésta, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Esto se puede apreciar en los implantes reabsorbibles en forma de tornillo aplicados en traumatología para fijarse al hueso: deben degradarse a la velocidad adecuada para sostener las distintas cargas en las primeras semanas, y desaparecer gradualmente para dejar que finalmente el hueso recupere su integridad [116, 117]. En estos casos se usan distintos grados de cristalinidad dependiendo de los requerimientos médicos, pues está directamente relacionada con la degradabilidad del polímero (a mayor cristalinidad, menor velocidad de degradación) [117, 118].

Propiedades bioactivas: son aquellas que se aprecian en la interacción de los materiales con las células y los tejidos vivos. Se derivan tanto de las diferentes características del material (mecánicas, eléctricas, químicas, estructurales, etc.), como del tipo de células y tejidos que interactúan con éste. Se miden a través de estudios *in vitro* e *in vivo*.

El primer tipo de propiedad bioactiva a tener en cuenta en un biomaterial es su compatibilidad con el cultivo celular, es decir: la ausencia de *citotoxicidad*. Ésta debe

de medirse antes de realizar cualquier aplicación *in vivo*, si bien existe la posibilidad de que los materiales presenten toxicidad una vez implantados pero no en ensayos *in vitro*, debido a la complejidad intrínseca de los sistemas integrados en un organismo vivo [119, 120]. La citotoxicidad se mide tanto directa como indirectamente; es decir, midiendo la capacidad de proliferación y supervivencia de las células sobre los materiales (directa), o bien en presencia de un extracto del material, normalmente medio de cultivo que ha permanecido en contacto con el mismo durante un período de tiempo (indirecta). Este último tipo de ensayo permite detectar si el material libera moléculas citotóxicas al medio, ya sean fragmentos del mismo tras degradarse o residuos de su síntesis.

Otra propiedad relativa a la interacción de los materiales con los organismos es su *biodegradabilidad*, que se deriva no solamente de su degradación espontánea en medio acuoso y/o en la presencia de agentes oxidantes (como los ácidos o peróxidos liberados por macrófagos en respuesta a elementos foráneos), sino también por la interacción con enzimas en el caso de moléculas orgánicas, como el colágeno o el ácido hialurónico. La capacidad de un biomaterial de ser degradado enzimáticamente puede ser de utilidad, ya que los residuos de este tipo de degradación pueden regular respuestas celulares en el entorno (como la producción de estas mismas enzimas) y dependiendo del material darán lugar a una actividad celular beneficiosa en la terapia [121]. Al mismo tiempo, ésta degradación controlada permitirá la invasión celular del lugar antes ocupado por el implante, completando el proceso regenerativo [65], o la liberación de fármacos desde el material [122]. La degradabilidad enzimática de un material puede además alterarse mediante modificaciones químicas como el entrecruzamiento de sus cadenas poliméricas.

El número de propiedades bioactivas que pueden integrarse en un material es potencialmente tan grande como el número de funciones que se desarrollan a nivel celular en todo el organismo; siempre y cuando el material sea capaz de proveer las señales y estímulos necesarios. Estas señales y estímulos que se producen en la

interacción célula-material pueden suceder a distintos niveles: a través de reconocimiento y adhesión celular en la superficie del material; a través de la liberación de fármacos y moléculas desde el material, o a través otros estímulos (eléctricos, mecánicos, etc.) ejercidos por, o mediante, el biomaterial. Los dos primeros tipos de interacción se describen a continuación.

1.4.5. Interacción célula-material

Una de las propiedades más importantes que determinará el efecto del biomaterial en el organismo es la capacidad de adhesión con respecto a los distintos tipos celulares. La adhesión celular es imprescindible en el establecimiento de colonias y cultivos celulares, especialmente cuando la inmensa mayoría de tipos celulares humanos entran en apoptosis (fase de muerte celular programada) si no logran adherirse a un sustrato estable [123, 124]. Dicha adhesión implica el reconocimiento y anclaje al sustrato mediante *integrinas* (una familia de receptores proteicos que atraviesan la membrana citoplasmática), lo que desencadena una serie de procesos celulares que incluyen la formación y ensamblaje del citoesqueleto. Este último es responsable de la interacción mecánica de la célula con el entorno, tanto a nivel motor como sensorial, y por tanto es decisivo en el comportamiento de la misma [125, 126].

La adhesión y anclaje de las integrinas requiere el reconocimiento del sustrato por parte de éstas. Los ligandos naturales de las integrinas son principalmente las proteínas de la matriz extracelular, o más concretamente las secuencias peptídicas de adhesión – o *motivos de adhesión* - expuestas en el exterior de estas proteínas. Estas secuencias peptídicas, entre ellas el ampliamente estudiado péptido RGD (arginina-glicina-aspartato), están altamente conservadas evolutivamente ya que son imprescindibles en el reconocimiento del entorno tisular por parte de la célula [50]. De este modo, la adhesión de la célula a un biomaterial estará normalmente mediada por las proteínas (o péptidos) que conformen el material o se le adhieran previamente, siempre que éstos contengan secuencias reconocibles por alguno de los tipos de integrina presente en la célula. Además, existen otros péptidos y moléculas que, si bien no son directamente reconocidas por las integrinas, pueden favorecer los mecanismos de reconocimiento integrina-sustrato, o incluso potenciar la respuesta asociada a dicho reconocimiento [127, 128].

Tan importante como la presencia de dichos motivos de adhesión en la superficie del material es el modo en el que se presentan los mismos con tal de que la célula los reconozca e interactúe con ellos. Es imprescindible que permanezcan unidos al material, aunque sea de mediante interacciones no covalentes, ya que la adhesión con estos factores por sí sola no es capaz de estimular la supervivencia celular: en caso de no “sentir” la sujeción a un sustrato estable, la célula normalmente entrará en apoptosis [129]. Debe tenerse en cuenta también que dichos péptidos estén expuestos hacia el exterior del material, su frecuencia y distribución en la superficie del material sea adecuada, e incluso que dispongan de cierta motilidad ya sea mediante las moléculas que los unan al material (que ofrezcan libertad de movimiento) o por otros mecanismos. Respecto a esto último, para ciertas aplicaciones es interesante que la célula pueda reorganizar la distribución de los elementos del sustrato, ya que dicha reorganización puede ser necesaria en la correcta regeneración de determinados tejidos [130, 131].

Como ya se ha mencionado anteriormente, una vez las células se han anclado al sustrato a través de sus integrinas (unidas específicamente e determinados patrones moleculares, normalmente péptidos), se activa la polimerización de los distintos componentes del citoesqueleto que permitirán a la célula interactuar con su entorno [132-134]. Las integrinas pasan a formar parte del sistema motor-sensitivo de la célula, uniéndose a los complejos de adhesión celular y actuando de anclas de las que la célula “estira”, ya sea para desplazarse, reorganizar el sustrato o para reconocer el grado de rigidez/elasticidad de su entorno [58, 84, 135]. Respecto a esto último, es de gran importancia tener en cuenta que la célula no solamente distingue el grado de elasticidad de un sustrato, sino que además su comportamiento depende en gran medida de ello, alterando desde su ciclo celular hasta su capacidad de migración, pasando por su diferenciación o función específica dependiendo del tipo celular, o incluso la rigidez de su citoesqueleto.

Normalmente, un sustrato excesivamente “blando” dará lugar a una adhesión celular deficiente, limitando la formación del citoesqueleto y con ello gran parte de las funciones celulares, mientras que uno rígido reducirá la motilidad celular y será menos beneficioso para la formación de extensiones citoplasmáticas como ocurre con las neuronas, por lo que existen rangos de elasticidad óptimos para determinados tipos y comportamientos celulares.

Entre las funciones que regula directa o indirectamente el citoesqueleto se incluyen el anclaje, distribución y transporte de los orgánulos y componentes celulares, la separación de los cromosomas en la división celular, la movilidad de la célula, la regulación de la apoptosis dependiente de estrés mecánico, la transcripción de genes y la localización de enzimas y moléculas de señalización en zonas específicas del citoplasma para focalizar su actividad. Además, el citoesqueleto celular, al igual que las integrinas, es imprescindible en el ensamblaje de la matriz extracelular y por tanto en la formación de los tejidos.

1.4.6. Formación de matriz extracelular sobre los materiales

La matriz extracelular está formada por proteínas, proteoglicanos y polisacáridos secretados por las células, organizados formando una malla tridimensional compleja alrededor de las mismas. La composición y propiedades de la matriz extracelular son específicas para cada tipo de tejido, y su función es tan importante que cualquier mutación que afecte a su correcta formación y funcionamiento puede ser letal o acarrear una alta morbilidad para el individuo [131, 136-138].

Existen dos tipos de matriz extracelular: la membrana basal y la matriz intersticial. La membrana basal es una estructura laminar visible al microscopio óptico, si bien al microscopio electrónico pueden distinguirse dos estructuras diferenciadas en la misma: la lámina basal y la lámina reticular. Se trata de una red densa de proteínas y proteoglicanos que ofrece resistencia a la tensión, actúa como filtro molecular y de barrera física para las células, siendo intransitable para casi todos los tipos celulares

excepto las del sistema inmune y las células tumorales que adquieren capacidad de metástasis. La **membrana basal** se encuentra en tejidos epiteliales y otros tipos de membrana celular, así como en las células musculares, de Schwann y adipocitos, sirviendo de anclaje para las mismas y uniéndolas a su vez al tejido conectivo adyacente. Sus principales componentes son el colágeno tipo IV y la *laminina* [139-141]. Por otra parte, la **matriz intersticial** forma un hidrogel que contiene distintas fibras de colágeno, polisacáridos, fibronectina y sales, y ofrece protección a las células frente a esfuerzos de compresión. Es producida por las células de mesenquimales: aquellas que se forman hueso, cartílago, tendón, músculo, grasa, médula, y tejidos conectivos, principalmente [142-144].

El ensamblaje de la matriz extracelular es un proceso complejo, que apenas ha podido replicarse *in vitro* sin el uso de uno o más tipos de células, aunque se disponga del resto de componentes. Muchas de sus proteínas, junto con otras moléculas de la matriz extracelular, contienen en su estructura la información suficiente para producir algún tipo de autoensamblaje, si bien es necesaria la interacción con las células para producir las estructuras que encontramos *in vivo* [55, 145, 146]. Es la unión mediante integrinas, y la tensión y movimientos producidos a través del citoesqueleto, que las células pueden desplegar, desplazar y organizar los componentes de la matriz. La estructura molecular de las proteínas de la matriz extracelular les permite unirse entre ellas y con otros componentes además de con las células mediante receptores específicos, creando una malla que integra todos los componentes, celulares y acelulares, del tejido.

Una producción deficiente o alterada de la matriz extracelular tras una lesión está íntimamente relacionada con la mala regeneración de los tejidos en individuos adultos. La cicatriz de tipo fibroso que aparece tras muchas lesiones se caracteriza por un exceso de fibras de colágeno y menor densidad de células [147], lo que se traduce en la pérdida de funcionalidad y alteración de las propiedades mecánicas del tejido (no se deben confundir este tipo de cicatrices con la cicatriz glial que aparece en el sistema nervioso central, que está formada por células gliales [148]). En cualquier caso, la

aparición de cicatrices y deficiencias regenerativas en general puede relacionarse con la ausencia de mecanismos de señalización celular para formar de nuevo el tejido, más que por una incapacidad genética. Esto se confirma por el hecho de que durante la fase fetal y embrionaria (y parte de la infancia), muchos tejidos retienen la capacidad de regenerarse [149-151]. No obstante, es importante recalcar que en esas mismas fases del desarrollo, la composición de la matriz extracelular en esos tejidos difiere de la adulta [121, 152], lo cual pone en evidencia la importancia de ésta en la señalización y comportamiento de las células.

1.4.7. Cultivos 2D vs cultivos 3D

La gran mayoría de estudios realizados con células humanas y de mamífero en general han sido realizados en forma de cultivos en placas de Petri. Es decir, que la mayor parte de lo que se sabe del comportamiento celular proviene de la observación de células adheridas a una superficie bidimensional. Sin embargo, en el contexto de un organismo vivo las células se encuentran inmersas en un entorno tridimensional, generalmente, lo que conlleva que existan diferencias en su comportamiento cuando se cultivan en dos dimensiones, más allá de la rigidez del sustrato [153, 154].

Existen distintas estrategias para lograr el cultivo de células en tres dimensiones, ya sea para el estudio de su comportamiento o para la obtención sintética de tejidos. Entre ellas destacan la deposición capa a capa de films celulares, o *layer-by-layer* [81], como el que se utiliza en la impresión 3D de tejidos y órganos bioartificiales [155, 156]; el entrecruzamiento *in situ* de suspensiones celulares que contienen proteínas o polímeros ensamblables, creando hidrogeles [60], o la siembra en estructuras tridimensionales preformadas, que actúan de andamio celular o *scaffold* [157, 158].

Las principales diferencias entre los cultivos realizados en 2D y los realizados en 3D, usando los mismos sustratos, se dividen en tres tipos: diferencias de *adhesión*, diferencias en la *transmisión de esfuerzos mecánicos* y diferencias en los *gradientes de solutos*.

Con respecto a la adhesión a un mismo tipo de sustrato (siempre que permita la adhesión), la primera diferencia que se observa es la forma que adoptan las células, pues en los sustratos 2D las células se extienden sobre la superficie aumentando su ratio área/volumen mientras que en los 3D se extienden a lo largo adquiriendo un aspecto fusiforme, o estrellado; dependiendo del tipo celular (más cercano a su forma natural) [154, 159]. El ratio área/volumen es de especial relevancia, pues en 2D se traduce literalmente en una mayor proporción de membrana celular con respecto al volumen citoplasmático, alterando la respuesta celular a señales externas, pues éstas se propagan más fácilmente del exterior al interior de la célula.

La morfología celular alterada en 2D, pese a no ser tan pronunciada en células de tipo epitelial y semejantes, provoca cambios importantes en el comportamiento celular que se produciría en una célula cuya morfología se desarrolla en las 3D. Esta morfología puede llegar a obtenerse en sustratos bidimensionales *in vitro* mediante patroneados micro- y nanométricos que presenten las áreas de adhesión de forma que estimulen distintas morfologías, pues las células tienden a extenderse a lo largo de las mismas dependiendo de su tipo [50, 160]. Este fenómeno ha sido usado en estudios de interacción célula-material, donde se demuestra que la conformación alineada en 1D favorece un comportamiento celular más cercano al *in vivo* en el caso de células como los fibroblastos [57, 92, 161, 162].

Otro modo de simular la adhesión 3D en cultivos 2D es el *sandwiching* o “emparedado” de las células, usando un segundo sustrato adherente en la parte superior del cultivo, obteniéndose de este modo una adhesión en ambas caras de la célula, y en todas direcciones una vez alcanzada la confluencia del cultivo [163-165].

Por otra parte, la distribución polarizada de las integrinas en cultivos 2D no solamente altera el aspecto tridimensional de la célula, pues los esfuerzos mecánicos entre la célula y el material también varían. Esta interacción o transducción de señales mecánicas (*mecanotransducción*) es completamente distinta en el 3D, donde los

esfuerzos mecánicos son tanto de tensión como de compresión y pueden darse desde cualquier ángulo [159, 166]. Al transmitirse mediante el citoesqueleto, los diferentes tipos de esfuerzo activarán respuestas (y genes) completamente diferentes por parte de la célula. Por distintas vías, se ha intentado simular esta mecanotransducción de los tejidos naturales para el estudio de su efecto en las células. Algunos de estos métodos consisten en patroneados nanométricos 2D con materiales que poseen distintos grados de rigidez, si bien también se han obtenido distintos grados de rigidez usando hidrogeles y variando su grado de entrecruzamiento [50].

En un cultivo bidimensional típico, el oxígeno, los nutrientes y solutos en general se encuentran a una misma concentración para todas las células. Además, cualquier factor de señalización excretado por las mismas se diluye rápidamente en el medio. Por el contrario, los cultivos en matrices tridimensionales ralentizan la difusión de los distintos solutos, dando lugar a gradientes de los mismos [167-170]. La creación de gradientes es un factor imprescindible en la señalización celular, desde la quimiotaxis (desplazamiento celular orientado mediante la detección de moléculas en el ambiente) hasta la diferenciación de los tejidos: ya en el embrión son necesarios para la compartimentación de los distintos tipos celulares (al responder a las distintas concentraciones de factores solubles) que luego darán lugar a los órganos.

La difusión de factores en matrices tridimensionales favorece también la señalización autocrina (común en los tejidos vivos) en los cultivos *in vitro*, al retener los factores cerca de las células que los secretan [171]. Además, los componentes de la matriz extracelular son capaces de secuestrar factores solubles para retenerlos aún más a lo largo del tiempo para presentarlos a las células y permitiendo la creación de gradientes permanentes [63, 64, 142, 172].

En ocasiones, los estímulos mecánicos pueden liberar estos factores secuestrados por la matriz, creando otro nivel de mecanotransducción a través de la matriz extracelular [173, 174]. Los gradientes pueden simularse en cultivo *in vitro*, de forma permanente o

dinámica al retenerse en sustratos como los hidrogeles [175, 176] o usando dispositivos microfluídicos, que generan resistencia al flujo del medio acuoso, ralentizando la difusión de solutos [177-179].

Los gradientes de oxígeno son imprescindibles para la señalización celular, especialmente en el desarrollo de vasos sanguíneos, pero a su vez también limitan la viabilidad de las células, provocando la apoptosis cuando los niveles de oxígeno disminuyen en exceso, y causando daños mayores tras una anoxia prolongada [180-183]. Esto debe tenerse en cuenta, pues limita el tamaño máximo de los cultivos 3D y los implantes con componente celular, que deberán incorporar en su diseño distintas estrategias para promover y permitir la formación de vasos sanguíneos con tal de irrigar de oxígeno y nutrientes el nuevo tejido, o incluso permitir la migración de células endoteliales desde o hacia el mismo [5, 23, 108, 184-188].

1.5. El ácido hialurónico (HA)

1.5.1. Origen, estructura y propiedades

El ácido hialurónico se encuentra principalmente en los vertebrados, donde es un componente de la matriz extracelular en prácticamente todos los tejidos, principalmente piel, articulaciones (es un componente imprescindible del cartílago) y hueso, aunque también aparecen cantidades relevantes en pulmón, riñón, cerebro y músculo; y algo menos en el hígado [189, 190]. Las mayores concentraciones de HA en el cuerpo aparecen en tejidos conectivos como el cordón umbilical, el líquido sinovial y el humor vítreo, mientras las concentraciones más bajas se dan en el plasma sanguíneo. En un humano adulto podemos encontrar hasta 15 gramos de HA seco, 5 de los cuales se renuevan cada día, procesándose continuamente a través del sistema linfático y la sangre.

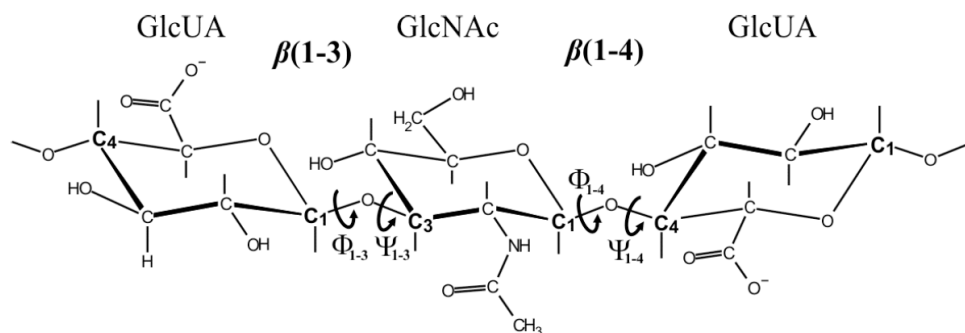


Figura 1.5 Estructura molecular del ácido hialurónico. GlcUA: ácido D-glucurónico. GlcNAc: D-N-acetilglucosamina. Fuente: Ivanov, Daniela, and Andrei Neamtu. "Molecular dynamics evaluation of hyaluronan interactions with dimethylsilnediol in aqueous solution." *Rev. Roum. Chim* 58.2-3 (2013): 229-238 [191].

El ácido hialurónico es un polisacárido (polímero formado por azúcares) que pertenece a los glicosaminoglicanos (GAGs, antes conocidos como mucopolisacáridos) pues contiene un tipo de amino-azúcar, aunque de ellos es el único no sulfatado. La unidad monomérica del HA es un disacárido de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina unidos por enlaces glucosídicos β -1,4 y β -1,3, que en el polímero forman cadenas no ramificadas que pueden extenderse hasta pesos moleculares en la escala de los millones de Daltons.

Se sabe que el HA apareció evolutivamente como una modificación de otro GAG, la condroitina, con la que comparte casi toda la estructura molecular, con una D-N-acetilglucosamina (en el HA) en vez de una D-N-acetilgalactosamina (en la condroitina) [192]. A diferencia de ésta, que aparece en forma de sulfato de condroitina, el HA no se sulfata nunca en el organismo.

La aparición evolutiva del HA coincide con la formación del notocordio en los cordados (predecesor del sistema nervioso central de los vertebrados) [193]. Esto tiene que ver con la función del HA en la morfogénesis del desarrollo embrionario, donde permite la migración celular a la vez que evita el contacto célula-célula durante la misma, y por tanto la respuesta inmune contra la célula migrante. Este efecto se

reproduce en los procesos malignantes del cáncer, como la metástasis [194-197]. En los vertebrados superiores actuales es imprescindible en los procesos de regeneración, donde su mayor presencia y mayor longitud de sus cadenas equivalen a una mejor respuesta regenerativa [198-201].

Las principales propiedades del HA como material derivan de su estructura y plegamiento en solución acuosa. A pH fisiológico se comporta como un polianión al ionizarse el grupo carboxilo del ácido glucurónico, adquiriendo una alta capacidad para atraer y unirse a las moléculas de agua, lo cual le aporta una alta actividad osmótica y lo hace relevante en la homeostasis del agua en los tejidos donde se encuentra [202, 203].

Además, las cadenas de HA poseen la capacidad de crear puentes de hidrógeno internos en medio acuoso, dando lugar a dos fenómenos: la creación de zonas hidrófobas en la cadena que permiten la interacción entre ellas, con determinadas proteínas e incluso con la membrana celular y otras estructuras lipídicas, y la estabilización de las cadenas de HA en estructuras rígidas en forma de hélice lineal; lo cual aumenta su viscosidad en solución y permite cierta especificidad a la hora de interaccionar con receptores y enzimas. A su vez, esta estructura permite que se formen redes estables a partir de ciertos pesos moleculares y concentraciones (0.5-1.0 g/L) [204-206]. No obstante, dichas redes pueden ser revertidas mediante aplicación de movimiento al superar las débiles energías de entrecruzamiento y de estabilización interna de las cadenas, provocando que las propiedades viscoelásticas del HA hidratado sean anómalas: cuanto mayor es la velocidad del movimiento aplicado, menor es la viscosidad del HA y mayor su elasticidad para recuperarse de la deformación, al acumular energía en el proceso.

Estas propiedades como material son muy importantes en el rol del HA como lubricante en articulaciones y tendones, al reducir las cargas durante movimientos rápidos. Lo hace también muy relevante en la piel, donde protege a las células frente a

esfuerzos de compresión, a la vez que permite la recuperación de la forma inicial del tejido tras los mismos [189, 190].

Sin embargo, sus propiedades como biomaterial-vehículo para el trasplante de células en formulaciones terapéuticas son normalmente insuficientes, limitándose a inyecciones conteniendo células en suspensión por tratarse de un fluido viscoso y no un sólido. Aun así, en estas aplicaciones se requiere el uso de reacciones químicas de entrecruzamiento para su reticulación *in situ*, creándose hidrogeles relativamente estables capaces de retener las células [207-209].

1.5.2. Modificaciones del HA

Existen diversos tipos de modificaciones químicas del HA, la mayoría de ellas enfocadas a la formación de hidrogeles con tal de mejorar las propiedades del HA en cuanto a su manejabilidad y sus funciones como biomaterial en general. Otro motivo para entrecruzarlo es su relativamente corto tiempo de residencia en los tejidos.

Existen diversas moléculas y reacciones químicas con capacidad de reticular las cadenas de HA [210], pero la mayoría de ellas hacen uso del grupo carboxilo de su azúcar D-glucurónico por su reactividad y accesibilidad, creando ésteres, o bien mediante los grupos hidroxilo (menos accesibles en solución acuosa), para crear éteres. Otras estrategias incluyen el uso de derivados químicos del HA, que contienen grupos tiol o se encuentran funcionalizados con otros grupos [211, 212]. Pero en este trabajo nos centraremos en el primer tipo de reticulación.

Los entrecruzantes más usados para obtener hidrogeles del HA son el glutaraldehído, la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida o EDC, el polietilenglicol diepoxi y la divinilsulfona o DVS. Si bien estas moléculas pueden ser citotóxicas (especialmente debido a su reactividad), ese problema desaparece una vez reaccionan con el HA y se elimina cualquier residuo de la reacción.

El tipo de molécula usada para el entrecruzamiento no es normalmente tan importante en el producto final como cualquier efecto causado en la molécula de HA durante la reacción. Lo que resulta más determinante para las propiedades finales del hidrogel es la densidad de entrecruzamiento, cuyo valor máximo será en proporciones 1:1 de entrecruzante respecto a unidad de disacárido del HA suponiendo un 100% de efectividad de la reacción [213]. Dicho entrecruzamiento repercutirá en la capacidad de hinchamiento, propiedades mecánicas y degradabilidad de los hidrogeles, principalmente, lo cual a su vez condicionará la liberación de factores desde los mismos, su integridad tras el implante, y la capacidad de migración de las células a través de los mismos, [209, 212, 214, 215].

1.5.3. Obtención de scaffolds de HA

El entrecruzamiento del HA permite no solamente la obtención de hidrogeles estables, sino que además abre la posibilidad de crear estructuras tridimensionales o *scaffolds*. Estas estructuras podrían crearse de forma previa a la siembra con células, facilitando el diseño de implantes aplicables a distintas terapias.

El grupo de investigación del profesor Monleón Pradas en el centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, en el cual colaboró el autor de esta tesis, ha desarrollado distintas estructuras porosas a través de la inyección y entrecruzamiento del HA en moldes. Dicha técnica se describe posteriormente en este trabajo, pues en él se desarrolla y amplía parte de la misma.

1.5.4. Degradación

La degradación del ácido hialurónico merece un apartado en sí misma, ya que es determinante en muchos procesos biológicos, desde el desarrollo embrionario hasta procesos infecciosos bacterianos. No obstante, aquí nos centraremos en aquellos mecanismos de degradación relevantes para la señalización en procesos de daño tisular y regenerativos.

En primer lugar deben tenerse en cuenta los distintos enzimas hialuronidasas (HASas), capaces de fragmentar las cadenas de HA en fragmentos más pequeñas. Esto es importante pues la longitud de estas cadenas, así como la de los fragmentos resultantes de la degradación, tiene un importante papel biológico, como veremos más adelante (ver Funciones biológicas, en el apartado 1.5.5.).

El concepto hialuronidasa es engañoso, puesto que todas estas enzimas poseen la capacidad de degradar la condroitina y el sulfato de condroitina, probablemente por la proximidad evolutiva de estas moléculas. Las HASas se dividen en tres grupos, con distintos mecanismos de acción y distintos residuos de reacción [216]. Los dos primeros grupos, correspondientes a las HASas de vertebrados y bacterias, atacan el enlace glucosídico β 1,4; mientras que el tercero, presente en crustáceos y anélidos (como la sanguijuela), hidrolizan el enlace β 1,3.

La principal diferencia entre las HASas de vertebrados y bacterias es que las primeras actúan por hidrólisis [217] mientras que las segundas introducen un enlace insaturado en β 1,4, con lo que se conocen como HA liasas [218]. Además, mientras que las HASas de vertebrados actúan principalmente escindiendo rápidamente fragmentos de 20 kDA de forma aleatoria de las cadenas grandes de HA, y de forma mucho más lenta degradando estos fragmentos en tetrasacáridos [219]. Por otra parte, las HASas bacterianas también “muerden” de forma aleatoria las cadenas más largas (endolisis), pero a su vez son capaces de acoplarse a los extremos de las cadenas libres de HA (exolisis) y procesarlas linealmente, produciendo en este caso disacáridos insaturados (más fáciles de procesar y absorber por las bacterias). Cabe recalcar que las HASas de las bacterias (que no sintetizan HA, si no es mediante modificación genética) tienen como función ayudar a la invasión de los tejidos.

Se ha detectado experimentalmente cierta actividad transglicosidasa en las HASas de vertebrados, produciéndose el entrecruzamiento de cadenas de HA y de HA con

condroitina. No se sabe a ciencia cierta si se trata de un artefacto, producto de una actividad enzimática alterada por condiciones no fisiológicas [220].

Es importante recalcar que el reconocimiento del HA por parte de las HASas depende de la estructura helicoidal del primero. De ahí que los fragmentos de HA de 20kDa o menos, así como aquellas alteraciones en el HA que modifiquen su estructura helicoidal en solución, alteren su degradabilidad enzimática. Por ejemplo, Ju Oh *et al* experimentaron alterando la degradabilidad del HA mediante el entrecruzamiento del HA a través del grupo carboxilo de la subunidad de ácido D-glucurónico [221].

Aunque la degradación del ácido hialurónico puede producirse por oxidación o β -eliminación, en este trabajo queremos centrarnos en la hidrólisis de su estructura química por HASas u otros mecanismos.

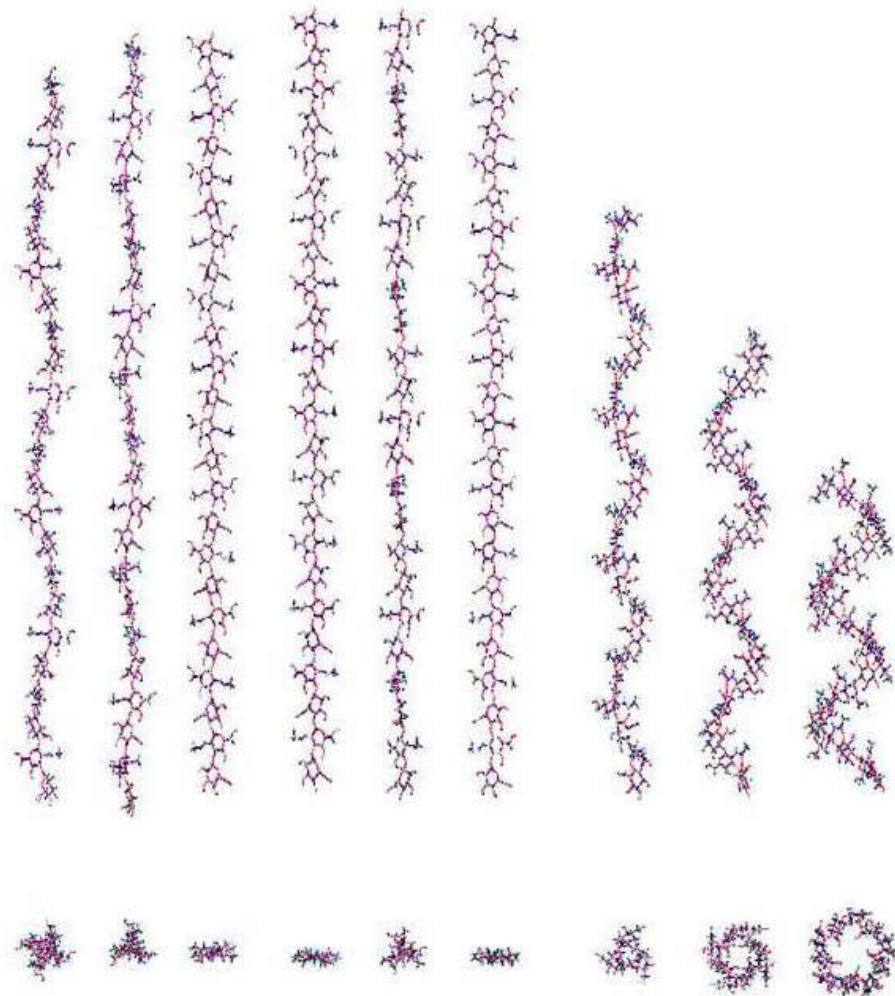


Figura 1.6 Modelado teórico del HA en forma de hélices simples (una sola cadena de HA). Fuente: Haxaire, Katia, et al. "Conformational behavior of hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modeling." *Glycobiology* 10.6 (2000): 587-594 [222].

1.5.5. Hidrólisis del HA

Ya hemos visto la hidrólisis enzimática del HA, sin embargo ésta puede producirse de forma espontánea en medio acuoso, y verse acelerada cuando el pH del medio se aleja de la neutralidad. Tokita y Okamoto estudiaron los mecanismos de degradación del HA en la hidrólisis ácida así como en la hidrólisis básica [223]. En sus experimentos usaron el HA en forma de sal de sodio. Sus resultados demuestran que en ambientes ácidos el HA se degrada a través de la subunidad del ácido D-glucurónico, mientras que en medio básico lo hace a través de reacciones en la subunidad de la N-acetilglucosamina.

En la degradación a pH ácido, el ácido D-glucurónico se puede hidrolizar en las posiciones C1, C4 y en el carbonilo. Tanto la hidrólisis de C1 como la de C4 pueden producir la rotura del polímero HA, pero mientras la de C1 se produce en 2 pasos (rotura del enlace glicosídico β 1,3 y apertura del anillo), la de C4 produce directamente la rotura del enlace β 1,4.

En la degradación a pH básico, la N-acetilglucosamina se hidroliza en las posiciones C1, en el O del anillo i en el N de la amida. Solamente la hidrólisis de C1 da lugar a una pérdida de masa de la cadena de HA. Ésta se produce en dos pasos: la rotura del enlace entre C1 y C2, y la rotura del enlace β 1,4. Ésta reacción produce metileno como subproducto. Por otra parte, en medio básico se produce también acetato de sodio por reacción del grupo carbonilo.

Otro mecanismo de hidrólisis del HA es la radiación ionizante [224]. Se sabe que la luz de espectro UV es capaz de romper el HA en fragmentos más pequeños, disminuyendo rápidamente su viscosidad. Ramamurthi y Vesely demostraron que tras una exposición prolongada de hidrogeles de HA entrecruzados con DVS a luz UV se produce no solamente una pérdida de fragmentos de HA, sino que se produce una posible reticulación adicional entre las cadenas de HA a la vez que se mide un aumento de la hidrofobicidad, efectos que aumentan si la exposición a UV se produce tras secar el HA [225].

Por último cabe mencionar que el liofilizado del HA produce también la rotura de enlaces en el HA, debido a la producción de radicales libres por tensiones y dislocaciones mecánicas durante el mismo [226-228]. Estos radicales libres pueden causar también una reticulación adicional del HA, como ocurre con la exposición a UV; pero además producen grupos OH⁻ que atacarían el enlace glicosídico. Este tipo de degradación es tres veces más efectiva en el HA que en la sal de sodio de HA, y puede evitarse o reducirse con agentes que capturen estos radicales libres.

1.5.6. Funciones biológicas

En los tejidos, el HA se encuentra unido a otras proteínas y proteoglicanos de la matriz intersticial, y en raras ocasiones estará unido directamente a las células. No obstante, durante el desarrollo y regeneración de los tejidos (al igual que en las primeras fases de cultivo celular, antes y algún tiempo después de la adhesión al sustrato), casi todas las células son capaces de producir y unirse a una capa transitoria de HA a modo de glucocálix, que las protege del ataque de virus y células inmunitarias y que a su vez media la unión a otras células y a componentes de la matriz extracelular [229].

Su polimerización, a diferencia del resto de GAGs que se producen en el aparato de Golgi, tiene lugar a nivel de la membrana celular, en complejos proteicos en la cara citoplasmática llamados ácido-hialurónico-sintasas (HAS). Éstos añaden los azúcares, provenientes de precursores de nucleótidos, al extremo reductor (al diferencia también del resto de GAGs) de la cadena de polisacárido mientras ésta es desplazada hacia el exterior de la célula a través de estructuras proteicas transmembrana [230].

Se sabe que el HA se produce siempre a nivel local en cada tejido, donde también se produce gran parte de su degradación, aunque otra parte se elimina al movilizarse (excepto en esqueleto y cartílago) a través del líquido intersticial a la linfa, y de ahí a la sangre donde es rápidamente absorbido y catabolizado por el hígado (de ahí el bajo contenido en plasma). Se sabe que la eliminación de este hialurónico movilizado se produce también en cierto grado en los nódulos linfáticos, los riñones y el bazo [190].

Las proteínas capaces de unirse al ácido hialurónico, o hialadherinas, se dividen entre aquellas encargadas de formar complejos entre el HA y otros componentes de la matriz extracelular, y aquellas que actúan como receptores celulares. Los receptores del HA más conocidos son CD44 y CD168 (comúnmente conocido como RHAMM o receptor de motilidad asociada al ácido hialurónico), aunque al parecer la segunda se asocia con la primera en su interacción con el HA en el exterior de la membrana citoplasmática [231-235].

Se sabe que el HA activa diferentes tipos de señalización celular, principalmente a partir de los mencionados receptores, si bien las células son capaces de responder de forma distinta dependiendo de la longitud (o peso molecular) de las cadenas de HA que detecten, en ocasiones generando respuestas completamente opuestas [121, 236].

Las cadenas de HA de alto peso molecular (entre 1000 y 5000 sacáridos), suprimen la angiogénesis y la respuesta inmune, inhibiendo también la fagocitosis de los macrófagos y deteniendo la producción de HA por parte de las células (excepto en condrocitos, en los cuales estimula la condrogénesis o formación del cartílago).

Los fragmentos de hialurónico, que van desde varios cientos de sacáridos a hexasacáridos, se producen por escisiones del HA mediante degradación o tras lesiones de diverso tipo y estimulan en cambio la angiogénesis y la inflamación al inducir la secreción de citocinas. Se cree que ejercen un tipo de señalización de “alarma” frente a infecciones y varios tipos de lesión. Por otra parte, los fragmentos más pequeños de ácido hialurónico (tetrasacáridos), normalmente producidos por las HASas del cuerpo, estimulan la expresión de proteínas de shock térmico e inhiben la apoptosis. Se cree que su función contrarresta el estrés provocado por los efectos de los fragmentos de mayor tamaño.

En lo que respecta al desarrollo de los tejidos, el ácido hialurónico de alto peso molecular es importante en la diferenciación de los condrocitos y la condrogénesis [237]; sin embargo inhibe la diferenciación de muchos otros tipos celulares y tejidos,

que por el contrario requieren de su degradación y liberación de fragmentos, tal y como puede observarse en la embriogénesis [238, 239]

1.5.7. Aplicaciones clínicas

El uso del HA está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en múltiples aplicaciones y terapias clínicas. Se usa comúnmente como biomaterial en oftalmología, otología, medicina estética y reumatología, entre otros campos, para lubricar y proteger tejidos blandos durante cirugías, como relleno, como separador para evitar adhesiones entre órganos y tejidos, como tratamiento analgésico local en artritis reumatoide, y como recubrimiento en heridas cutáneas y úlceras para evitar la desecación, proteger frente a agentes dañinos y promover la curación [240, 241].

Otros usos más avanzados incluyen su uso como hidrogel (tras reticulación química) para la liberación de fármacos [242], ya sea solo o cargado con micropartículas que porten el fármaco. Se han usado también microesferas de HA entrecruzado para transportar y liberar plásmidos de DNA y anticuerpos [243].

Existen múltiples patentes alrededor del uso del ácido hialurónico en nuevos productos y aplicaciones clínicas [168, 244-248], así como varios productos comercializados y usados actualmente alrededor del mismo.

1.6. Polímeros acrílicos: polimetacrilatos y poliacrilatos

1.6.1. Reacciones de polimerización

Existen multitud de moléculas polimerizables (monómeros); sin embargo, el método adecuado para efectuar esta reacción depende de la naturaleza química de las mismas. De este modo encontramos las técnicas de policondensación, para dioles, diácidos o derivados de ácidos e hidroxiaácidos; la polimerización por apertura de anillo (ROP), para lactonas y diésteres cíclicos (láctidos y glicólidos) y la polimerización por radicales libres, para monómeros de naturaleza vinílica y diénicos. Ésta última es la

que permite obtener polímeros y copolímeros basados en polímeros acrílicos, de interés en esta tesis, y por tanto se detalla a continuación.

1.6.1.1 Polimerización por vía radical

Como ya se ha mencionado, la polimerización radical o por radicales libres es el método usado cuando utilizamos monómeros de naturaleza vinílica y diénicos, y su mecanismo es el más conocido de todos los de adición [249].

1.6.1.2 Iniciación

La iniciación requiere la formación de radicales libres reactivos que puedan adicionarse al monómero en la etapa de propagación. Los radicales libres pueden generarse por la descomposición de un iniciador, pero además pueden generarse directamente en la propia molécula del monómero sin la presencia de iniciador añadido. En éste segundo caso, los agentes formadores de radicales libres pueden ser la radiación electromagnética, o la simple colisión térmica. La existencia de una iniciación térmica pura es difícil de establecer, porque las impurezas pueden participar actuando como iniciador incontrolado. La iniciación fotoquímica puede darse cuando el monómero tiene una banda de absorción suficientemente fuerte. En general, la energía de longitud de onda superior a 200 nm no es suficiente para ionizar el doble enlace, por lo que las fotopolimerizaciones transcurren predominantemente por vía radical. La radiación de alta energía produce especies activas que pueden ser radicales, catiónicas o aniónicas, por lo que la polimerización iniciada por radiación de alta energía puede transcurrir por cualquiera de estos mecanismos. Sin embargo, las formas iónicas generadas son suficientemente estables para iniciar la polimerización sólo a bajas temperaturas, por lo que la polimerización a temperatura ambiente o superior transcurre por vía radical.

De todos los métodos para iniciar la polimerización por radicales libres, el más común es mediante el uso de iniciadores. Estos son sustancias que se descomponen muy fácilmente para dar fragmentos moleculares que tienen el carácter de radicales libres.

La descomposición de un iniciador puede provocarse mediante calor, radiación o luz y reacciones redox. La más común es la descomposición térmica y los iniciadores más comunes dentro de esta categoría son los peróxidos, hidroperóxidos, azocompuestos y en general sustancias con enlaces lábiles, cuya energía de enlace es del orden de 25-40 kcal/mol, y que se rompen homolíticamente. Por otra parte, los iniciadores por luz UV como la benzoína son también comunes.

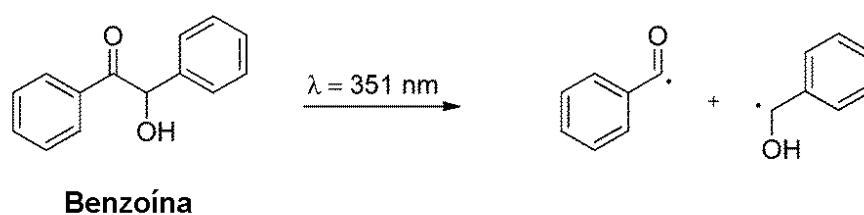


Figura 1.7 Descomposición de la benzoína por radiación UV

La elección del iniciador depende de la temperatura a la cual se desee realizar la polimerización, pues cada compuesto se descompone con una velocidad útil en intervalos de temperatura diferentes. Los iniciadores antes mencionados son solubles en solventes orgánicos. Para polimerizar en solución acuosa son muy utilizados los peróxidos inorgánicos como el persulfato de potasio o el agua oxigenada.

Una vez generados los radicales libres ($R\cdot$) procedentes de la descomposición del iniciador (por cualquiera de los métodos que acabamos de describir), la iniciación de la polimerización consiste en el ataque de $R\cdot$ al monómero. Si se trata de un vinilo la representación es la siguiente:

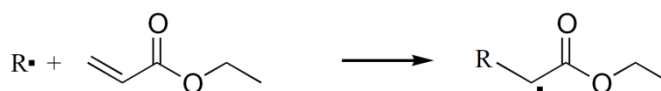


Figura 1.8 Mecanismo de iniciación del acrilato de etilo mediante radicales libres

Lo más importante de la etapa de iniciación es que la actividad radical pasa a estar localizada en el carbono de la unidad monomérica. Este centro activo monomérico es el que ataca de nuevo al monómero en las sucesivas etapas de propagación.

1.6.1.3 Propagación

El primer paso de la propagación o elongación es la reacción entre un centro activo y una nueva molécula de monómero, donde dicho centro activo radical sigue estando localizado en una unidad monomérica. En general, al cabo de $x-1$ adiciones, el mecanismo de propagación será el representado en la figura siguiente. Como consecuencia de las adiciones sucesivas, la cadena polimérica va creciendo, por el extremo en el cual se encuentra situado el centro activo propagador, hasta que dicho centro se desactiva en la etapa final de terminación.

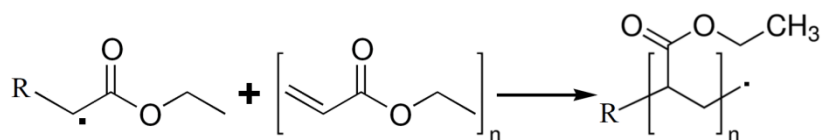


Figura 1.9 Mecanismo del proceso de propagación en la polimerización radical

1.6.1.4 Terminación

Son dos los mecanismos a través de los cuales se pierde la actividad del centro propagador, la dismutación o desproporción y la combinación o apareamiento. Ambos son procesos bimoleculares en los cuales dos centros activos se desactivan mutuamente por colisión. En la siguiente figurase representa esquemáticamente el mecanismo.

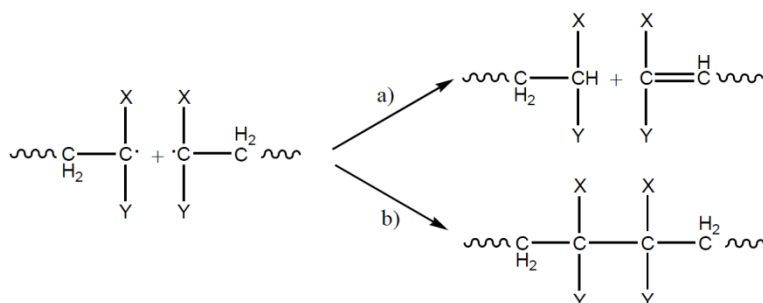


Figura 1.10 Mecanismo de los procesos de terminación en la polimerización radical. a) dismutación o desproporción y b) combinación o apareamiento

En la combinación se unen dos cadenas moleculares para dar una sola de mayor longitud. Es un proceso que ocurre sin energía de activación, ya que se trata del apareamiento de dos electrones. En la dismutación tiene lugar la transferencia de un hidrógeno y es por ello un proceso con energía de activación, cuya velocidad depende de la temperatura. La contribución de éste mecanismo se hace más importante al aumentar la temperatura. La importancia relativa de cada uno de estos dos mecanismos de terminación varía de unos monómeros a otros.

En cada etapa de terminación dos cadenas poliméricas, portadoras de centros activos en sus extremos, pierden dichos centros y se convierten en macromoléculas inactivas, cuyo grado de polimerización queda ya determinado. A medida que se suceden estas etapas de terminación, en el medio reaccionante se va acumulando las moléculas de polímero inactivo ya formado.

1.6.2. Aplicaciones en ingeniería tisular

De entre los distintos tipos de polímeros sintéticos, los ésteres de acrilatos poseen cierto interés por varias razones. La más destacable es la posibilidad de combinar varios monómeros acrílicos en distintas proporciones para obtener copolímeros (ver el siguiente apartado), permitiendo así controlar distintas propiedades del polímero

resultante, como pueden ser sus grupos funcionales o incluso sus propiedades mecánicas.

Varios tipos de acrilatos ya han sido usados en cultivos *in vitro* con distintos tipos celulares, siempre mediante el recubrimiento previo con proteínas de adhesión como la lamina, o la fibronectina soluble presente en el suero del medio de cultivo [70, 89, 250-253]. La capacidad de adherir dichas proteínas y su funcionalidad una vez adheridas depende de las propiedades químicas del polímero acrílico (excepto al usar tratamientos como la activación por plasma) y por lo tanto también puede llegar a controlarse combinando distintos tipos de monómero, lo cual supone una ventaja desde el punto de vista del diseño de biomateriales.

1.7. Técnicas para combinar dos o más materiales

En ocasiones puede ser interesante combinar dos o más materiales con el fin de combinar sus propiedades e incluso obtener otras no presentes inicialmente. En ocasiones dicha combinación puede ayudar a compensar las deficiencias de uno o ambos de cara a su aplicación clínica a la vez que se mantienen características que resultan interesantes y no pueden obtenerse fácilmente por otras vías.

La **copolimerización**, si bien no permite combinar los polímeros de forma literal, permite sintetizar un híbrido de dos o más polímeros a través de sus unidades monoméricas [254]. Ello requiere, por norma general, que todos ellos compartan un mismo mecanismo o tipo de polimerización: un ejemplo sería la polimerización por vía radical, donde cualquiera de los monómeros permite ser activado por radicales libres o los extremos de cadenas en elongación. En ocasiones alguno o varios monómeros difieren en su capacidad o velocidad de polimerización, resultando en copolímeros heterogéneos y en ciertos casos limitando la capacidad de obtener dicho copolímero [255, 256].

Las propiedades de un copolímero respecto a las de los polímeros puros de sus monómeros constituyentes pueden ser tanto directamente/indirectamente proporcionales a la presencia de cada monómero (como puede ser su hidrofobicidad o presencia de grupos funcionales), depender en mayor proporción de alguno de ellos, o darse fenómenos cooperativos o competitivos respecto a otras propiedades (como suele ocurrir con las propiedades mecánicas). Otras propiedades pueden no aparecer o darse solamente en el copolímero (como puede ser la capacidad de cristalizar a cierta temperatura).

En ocasiones donde dos o más polímeros no son copolimerizables, pueden modificarse uno o varios de ellos para añadir grupos funcionales que permitan dicha reacción.

Otro modo de combinar dos o más materiales es el *uso de solventes compatibles*, que permita disolverlos y mezclarlos, y luego permanezcan unidos tras el secado por ser naturalmente insolubles en soluciones acuosas o por realizarse el entrecruzamiento (entre ellos o de forma independiente) tras la mezcla.

1.7.1. Redes poliméricas interpenetradas (IPNs)

Cuando dos o más polímeros se encuentran en un mismo material, sin haber uniones entre ellos pero formando redes tridimensionales entrelazadas, hablamos de *redes interpenetradas de poliméricas*, o IPNs (del inglés *interpenetrating polymer networks*) [257, 258]. Este tipo de material puede obtenerse por distintos métodos, incluyendo el uso de solventes compatibles (donde uno de los monómeros puede incluso actuar de solvente del segundo polímero), pero siempre debe producirse que uno de los polímeros constituyentes se polimerice o entrecruce en presencia directa del resto.

Normalmente, se distingue entre IPNs secuenciales y IPNs simultáneas. Tal y como sus nombres indican, se refiere a si la síntesis y/o entrecruzamiento de las dos redes

poliméricas se ha producido de forma secuencial (primero una, luego la otra) o al mismo tiempo.

Encontramos además otras clasificaciones, como las semi-IPNs, donde uno o varios de los componentes no se encuentran formando una red reticulada; las IPNs en gradiente, o las IPNs con separación de fases.

Las IPNs en general son sistemas complejos que requieren de modelos teóricos específicos para medir el amplio abanico de interacciones que se producen entre sus componentes, así como para determinar las propiedades micro y macroscópicas resultantes de dicha interacción. En este trabajo no se pretende hacer un análisis extenso de este campo, si bien en algún apartado ahondaremos más detalladamente en aspectos concretos del mismo.

1.8. Hipótesis y objetivos

En este trabajo de investigación se parte de la hipótesis de que *es posible combinar el ácido hialurónico con un polímero acrílico, concretamente el polietilacrilato, en un mismo material con aspecto de scaffold; de modo que se puedan mantener las propiedades bioactivas del primero a la vez de que se modifiquen sus propiedades físicas como material y la adhesión celular a través de la incorporación del segundo.*

Esto sería posible combinando ambos materiales de forma que el ácido hialurónico no sufriera modificaciones en su estructura química que afectaran a su reconocimiento por parte de las células y demás componentes del organismo. La estrategia de la investigación se centró en la obtención de *redes poliméricas interpenetradas* a partir de una espuma de ácido hialurónico liofilizado, conteniendo a su vez el molde porogénico, donde se inyectaría el monómero acrílico para su polimerización. Tras retirar el molde mediante lavado con solvente, el polímero acrílico se encontraría contenido en aquellos huecos producidos por la liofilización del ácido hialurónico, quedando igualmente espacios porosos para la siembra e invasión de células para

cultivo y/o implante. Esta técnica permitiría - en teoría - mantener la estructura molecular del ácido hialurónico tras la incorporación del componente acrílico.

De forma adicional, se pretende demostrar que *es posible obtener distintas proporciones de ambos componentes para así controlar las propiedades del biomaterial resultante.*

El mencionado método para la creación de las IPNs no permite controlar de antemano las proporciones de cada polímero en el material final. No obstante, pueden introducirse variaciones en distintos parámetros y técnicas del método de obtención, y medir las proporciones de cada componente de forma posterior. Al medir las propiedades de los distintos materiales así obtenidos, y compararlas entre ellos, pueden interpretarse los efectos que comporta cada variación del método en la estructura y composición de la IPN.

Siguiendo estas hipótesis y razonamientos, se desarrollaron los diferentes objetivos:

1. *Obtener scaffolds compuestos por redes interpenetradas (IPNs) de ácido hialurónico y polietilacrilato, o HA-i-PEA.*
2. *Medir las propiedades de los scaffolds de HA-i-PEA obtenidos y compararlas con las de scaffolds de sus dos componentes por separado, incluyendo su citotoxicidad y adhesión celular en cultivos in vitro de fibroblastos L929.*
3. *Obtener scaffolds de HA-i-PEA con diferentes proporciones de cada componente mediante variaciones en el método de síntesis.*
4. *Medir las propiedades de los distintos scaffolds de HA-i-PEA obtenidos, comparándolas con la proporción de sus componentes.*

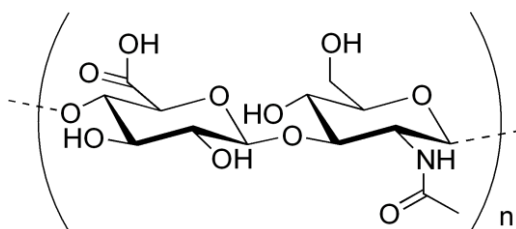
Capítulo 2.

Materiales y métodos

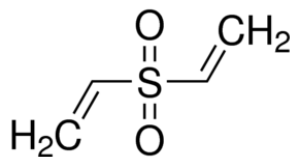
2.1. Materiales

2.1.1. Reactivos de síntesis y otros

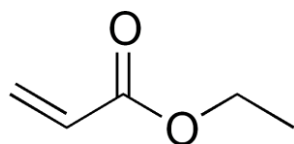
Ácido hialurónico, en forma de sal de sodio con un peso molecular (M) de 1.5-1.8 MDa, (HA, Sigma-Aldrich), fue usado para la obtención de *scaffolds*.



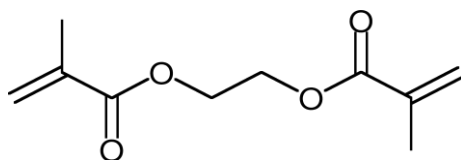
Divinilsulfona, (DVS, Sigma-Aldrich) con $M = 118.5$ g/mol, fue usada para la obtención de hidrogeles de ácido hialurónico.



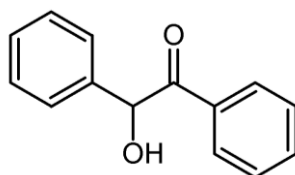
Acrilato de etilo (EA, Sigma-Aldrich), con $M = 100.12$ g/mol, fue usado para la obtención de *scaffolds*.



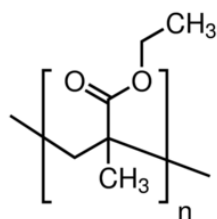
Dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA, Sigma-Aldrich) con $M = 198.22$ g/mol fue utilizado como agente entrecruzante acrílico.



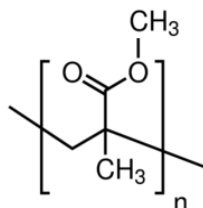
Benzoína (Scharlab), con $M = 212.25$ g/mol, se usó como iniciador por luz UV en la polimerización por vía radical.



Microesferas de polimetacrilato de etilo (PEMA, comercializado como Elvacite® 2043, Lucite International Inc.) de $M \approx 5,000$ g/mol; fueron utilizadas como porógeno en la fabricación de moldes porogénicos.



Microesferas de polimetacrilato de metilo (PMMA, Colacryl DP300U® de alto peso molecular, Lucite International Inc.); fueron también utilizadas como porógeno en la fabricación de moldes porogénicos.



En la preparación de distintas soluciones para síntesis y ensayos de análisis de los materiales, se usaron:

hidróxido de sodio (NaOH, Panreac), con M = 40 g/mol;

tampón fosfato en solución salina (Phosphate Buffer Saline, PBS, Sigma-Aldrich);

tampón fosfato salino (PBS, preparado en polvo, Sigma-Aldrich);

hialuronidasa (extraída de testículo bovino, Sigma-Aldrich) con M = ~55 kDa;

ácido cítrico 300mM (Sigma-Aldrich) con M = 192.12 g/mol;

dihidrogenofosfato de sodio 150mM (Na₂HPO₄, Scharlab) con M = 141.96 g/mol;

cloruro de sodio 150mM (NaCl, Panreac) con M = 58.44 g/mol;

ácido clorhídrico 1.0 N (HCl, BioReagent, Sigma-Aldrich) con M = 36.46 g/mol;

ácido clorhídrico al 37% (HCl, ACS reagent, pH0.1);

carbazol (dibenzopirrol, C₁₂H₉N, Sigma-Aldrich) con M = 167.21 g/mol.

Como solventes en la preparación de soluciones y/o el lavado, acondicionamiento, o análisis de las muestras, se usaron:

agua desionizada (Scharlab) con $M = 18.02$ g/mol;

etanol (Scharlab) con una pureza del 99.9% y $M = 46.07$ g/mol;

acetona (Scharlab) con una pureza del 99.5% y $M = 58.08$ g/mol;

n-octano (Scharlab) con $M = 114.23$ g/mol.

En la fijación química de muestras biológicas para microscopía, se usaron:

formaldehído (Sigma-Aldrich) con $M = 30.03$ g/mol;

glutaraldehído (Sigma-Aldrich) con $M = 100.11$ g/mol;

tetraóxido de osmio al 4% (peso/vol.), (OsO_4 , Sigma-Aldrich) con $M = 254.23$ g/mol.

2.1.2. Células y medios de cultivo

Fibroblastos de la línea L929 obtenidos de tejido adiposo subcutáneo, conectivo y areolar (Sigma-Aldrich) llevados hasta el pase 9, fueron usados en la realización de todos los ensayos biológicos.

El medio de cultivo usado fue el DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), con un contenido de glucosa de 4,5g/L (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), suplementado con suero bovino fetal (FBS, Thermo Fisher Scientific) y una mezcla de penicilina/estreptomicina (Thermo Fisher Scientific).

Para el acondicionamiento y tratamiento de las muestras en los ensayos biológicos, se usaron: Tampón fosfato (PB, Sigma-Aldrich);

Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) con $M = \sim 80$ kDa;

suero de albúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich, 35% de pureza);

agua Milli-Q (Millipore).

Para la realización de ensayos de viabilidad celular, se usaron:

solución MTT de 1 mg/ml (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, Thermo Fisher Scientific), y

reactivo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol, Abcam).

En la tinción de componentes celulares para microscopía de luz fluorescente, se usaron:

heptapéptido bicíclico con capacidad de unión a actina, basado en faloidina (del hongo *Amanita phalloides*), conjugado con fluoróforo (Phalloidin Bodipy FL, Invitrogen), y

solución 4,6-diamidino-2-fenilindona dihidroclorito (DAPI, Sigma-Aldrich) con $M = 277.33$ g/mol.

Todos los medios de cultivo se prepararon en condiciones asépticas, autoclavando líquidos y materiales, excepto en el caso de sueros, mezclas de anticuerpos, antibióticos, reactivos MTT y MTS.

2.2. Métodos de síntesis y preparación de materiales

2.2.1. Preparación de scaffolds de ácido hialurónico (HA) entrecruzado con DVS

Se preparó una disolución de ácido hialurónico al 5% (peso/volumen) utilizando una solución acuosa de hidróxido de sodio 0.2M como disolvente (pH=12). La solución se dejó en agitación continua durante 8 horas con el fin de disolver completamente el polisacárido. Posteriormente, se añadió - bajo agitación continua- 11,2 μ l de DVS por cada ml de solución de HA (1.4% en peso). Seguidamente se inyectó dicha mezcla, a vacío, en moldes previamente sinterizados de microesferas de PEMA. Dichos moldes fueron preparados sinterizando las microesferas de PEMA (de 180-200 μ m de diámetro) en una prensa hidráulica, aplicando presión (100-200 bar) y temperatura (120°C) a diferentes tiempos hasta obtener una compresión del 20%, aproximadamente. Tras inyectar la mezcla mediante un mínimo de 5 procesos de vacío consecutivos en un intervalo de tiempo de 2 minutos, se pusieron los moldes rellenos (con la mezcla de HA y DVS) en placas Petri y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 hora; con el fin de obtener un hidrogel entrecruzado de HA (ver Figura 2.1).

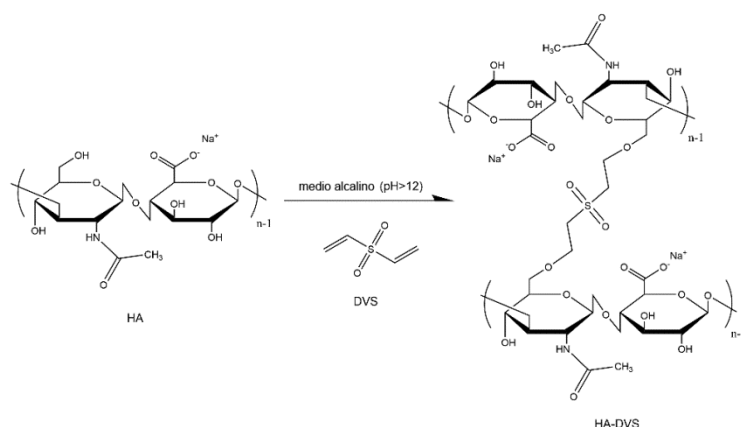


Figura 2.1: Reacción de entrecruzamiento del ácido hialurónico (HA) con divinilsulfona (DVS) para la obtención de hidrogeles.

Posteriormente, los moldes+hidrogel de HA fueron sumergidos en abundante agua desionizada durante 1 hora para eliminar el exceso de DVS y neutralizar el pH. Finalmente, se colocaron los moldes sobre una placa de teflón y se congelaron a -20°C durante 2 horas antes de liofilizarlos. Después del proceso de liofilización, los moldes+hidrogel fueron lavados en un Soxhlet durante 24 horas utilizando etanol como disolvente, para eliminar el molde de microesferas de PEMA y finalmente obtener *scaffolds* porosos de HA entrecruzado con DVS.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, se prepararon muestras variando la concentración inicial de HA (2.5 y 1.5 % peso/volumen respectivamente). Para ello, a una solución de HA en agua se le añadió NaOH hasta una concentración de 0.2M. Esta adición *a posteriori* de NaOH además de ser necesaria para activar los grupos funcionales involucrados en la reacción de entrecruzamiento con DVS, evita el plegamiento y degradación de las cadenas de HA. Paralelamente, se prepararon *scaffolds* de HA sin hacer uso del molde porogénico como muestras control.

2.2.2. Síntesis de polietil acrilato (PEA) en forma de scaffolds

Los *scaffolds* de PEA fueron sintetizados a partir de una mezcla monomérica que contenía 97% (% peso) de acrilato de etilo, un 2% de EGDMA, utilizado como entrecruzante y un 1% de benzoína, como fotoinicador. Tras agitar la mezcla durante 20', ésta fue inyectada en moldes porogénicos de PMMA.

Los moldes fueron obtenidos previamente mediante sinterización de las micropartículas de PMMA con ayuda de una prensa hidráulica. Las microesferas de PMMA de diámetro conocido (100-120 micras), fueron sinterizadas aplicando varios ciclos de compresión (100-200 bar) y temperatura (hasta 160°C). El porcentaje de compresión de las placas fue del 20%, con un grosor final de 2.5mm aproximadamente. En este caso se utilizaron microesferas de PMMA para preparar los *scaffolds* debido a que el monómero de acrilato de etilo disuelve las partículas de PEMA.

Una vez empapados los moldes en la mezcla monomérica, se colocaron en una cámara con luz ultravioleta durante 8 horas para iniciar la polimerización por vía radical del poliacrilato de etilo (ver Figura 2.2). Pasado este tiempo, los moldes fueron mantenidos durante un mínimo de 12 horas en un horno a 90°C con el objetivo de evaporar los restos de monómero sin reaccionar. Posteriormente, los moldes fueron lavados en acetona usando un montaje de reflujo Soxhlet para poder eliminar los residuos de la polimerización junto con el molde de PMMA. Se realizaron 4 ciclos de lavado durante 8 horas cada uno y se renovó el solvente tras el primer y tercer ciclo.

El uso de moldes porogénicos de PMMA de alto peso molecular requiere el uso de acetona para su disolución, pues comparado con el etanol, la acetona disuelve las microesferas de PMMA y a la vez hincha la estructura del PEA lo suficiente como para facilitar la eliminación.

Los *scaffolds* de PEA resultantes, muy hinchados en acetona, fueron colocados en un recipiente en el cual la acetona fue sustituida gradualmente por mezclas con proporciones crecientes de agua, en un período de 3 horas, para evitar la deformación de la estructura de PEA. Una vez estabilizados en agua, los *scaffolds* se secaron a vacío y a 50°C en un desecador durante 24 horas.

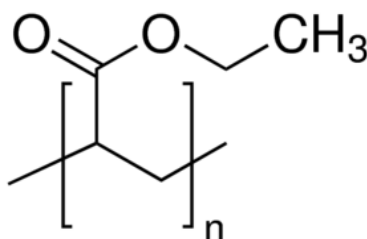


Figura 2.2 Poliacrilato de etilo (PEA)

2.2.3. Síntesis de redes poliméricas interpenetradas (IPN) de ácido hialurónico y polietil acrilato (HA-i-PEA) en forma de scaffolds

Los *scaffolds* de HA-i-PEA fueron preparados a través del método de síntesis que se describe a continuación, utilizando las espumas de HA liofilizadas incluidas en los moldes porogénicos de PEMA como punto de partida. En primer lugar, se preparó una disolución de HA al 5% (%peso/volumen) en una solución de NaOH 0.2M, manteniéndola en agitación durante 8 horas o hasta disolver el HA. Posteriormente se le añadió DVS hasta el 1.4% (%peso) gota a gota y bajo agitación durante 15 segundos, se inyectó la mezcla a vacío en los moldes porogénicos de PEMA y se dejó que curaran durante 1h, seguidamente se enfriaron a -80°C durante 2 horas y se liofilizaron. A continuación se realizó una mezcla que contenía un 97%(%peso) de acrilato de etilo, un 2% de EGDMA y un 1% de benzoína. La mezcla monomérica se agitó durante 20 minutos y se inyectó a vacío en los moldes de espuma de HA. Posteriormente, los moldes impregnados con la mezcla monomérica fueron introducidos en una cámara de luz UV durante 8h para iniciar la reacción de polimerización por vía radical.

Una vez polimerizados, los moldes inyectados con HA-i-PEA fueron lavados con etanol en ebullición en un Soxhlet durante 24 horas, renovando el etanol cada 8 horas con el fin de disolver las micropartículas del porógeno. Finalmente, los *scaffolds* de HA-i-PEA fueron hidratados gradualmente en concentraciones crecientes de agua en un intervalo de 2h, seguidamente de un período de acondicionamiento de 8h en agua desionizada. Posteriormente, las redes de HA-i-PEA se enfriaron a -80°C durante 2 h y se liofilizaron. Estos materiales se corresponden a la primera versión de IPN producida.

Con el objetivo de obtener *scaffolds* de HA-i-PEA con diferentes composiciones de PEA y HA, se realizaron modificaciones al método de síntesis explicado anteriormente (ver Figura 2.3). Básicamente, se variaron 3 parámetros fundamentales: (i) la concentración de HA utilizado en la preparación de la plataforma inicial, (ii) la concentración de la mezcla monomérica, mediante diluciones en etanol y (iii) proceso

de hidratación del molde de HA previo a la liofilización e inyección de la mezcla monomérica. En la tabla 2.1 se resumen los códigos utilizados para cada tipo de *scaffolds* de HA-i-PEA según la variante de síntesis.

El parámetro (i) fue modificado con el objetivo de controlar el contenido de PEA a través de la cantidad inicial de HA: a menor presencia de HA en el molde, mayor debería ser la cantidad de PEA que polimerice en el interior del mismo. En cambio, el parámetro (ii) pretende reducir la cantidad de PEA a través de su dilución. Por último, el proceso de hidratación adicional del HA tras el gelificado –parámetro (iii)-, aumentaría la porosidad del molde+hidrogel de HA tras la liofilización, favoreciendo la invasión del monómero de EA y aumentando presumiblemente la cantidad relativa de PEA en las IPNs.

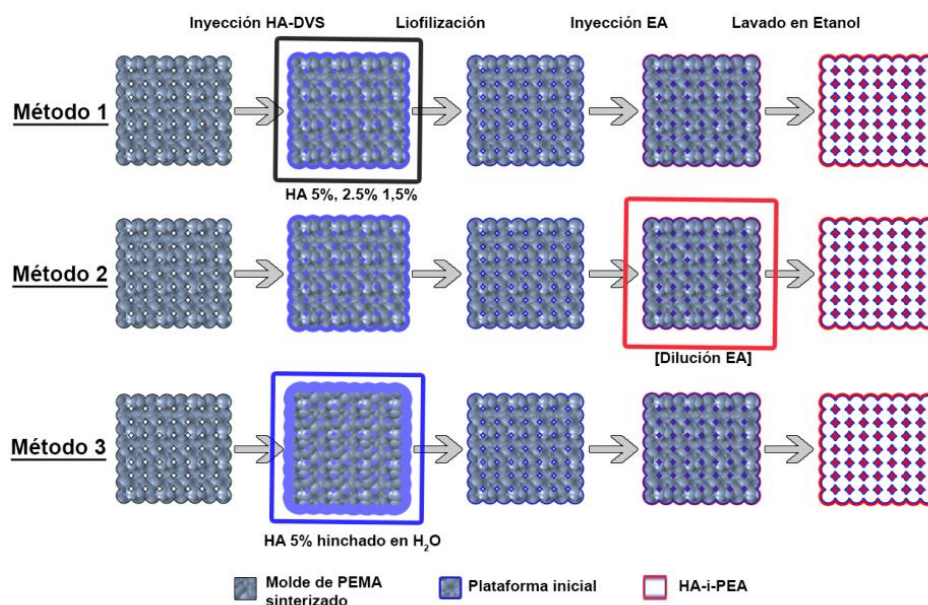


Figura 2.3. Esquema de síntesis de los scaffolds de redes poliméricas interpenetradas de HA y PEA, (HA-i-PEA). El parámetro (i) se modifica en el Método 1 y el Método 2, donde se utilizan tres concentraciones diferentes de HA (1.5%, 2.5% y 5%), mientras que en el Método 3 solamente se utiliza HA al 5%. La variación del parámetro (ii) se introduce en el Método 2, en el cual se

modifica la concentración de la mezcla monomérica, mediante la adición de etanol. Por último, se modifica el parámetro (iii) del método inicial, mediante la hidratación adicional del hidrogel de HA, dando lugar al Método 3.

Tabla 2.1 Codificación de los scaffolds de HA-i-PEA, según las variantes de síntesis utilizadas.

Código de muestra	[HA] (%)	Dilución del EA	Tratamiento de hinchado en agua	Método de síntesis
<i>150N</i>	5	No	No	1
<i>125N</i>	2,5	No	No	1
<i>115N</i>	1,5	No	No	1
<i>150D</i>	5	Si	No	2
<i>125D</i>	2,5	Si	No	2
<i>115D</i>	1,5	Si	No	2
<i>150NS</i>	5	Si	Si	3

2.3. Métodos de caracterización de los materiales

2.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido

Los *scaffolds* de HA, PEA y HA-i-PEA fueron pegados sobre portamuestras de un material conductor y se les aplicó un recubrimiento con oro volatilizado por bombardeo iónico. A continuación se introdujeron en la cámara de vacío del microscopio electrónico de barrido JSM-5410 (Jeol, Tokio, Japón). Las muestras se fotografiaron a una distancia de trabajo de 15mm, con un voltaje de 15 kV. Las imágenes obtenidas a 100 aumentos fueron procesadas mediante el software gratuito *ImageJ/FIJI*, con el objetivo de medir el tamaño medio de los poros, mediante el uso del *plug-in* 'Nearest neighbour Distance' (*NnD*, de Yuxiong Mao).

Además, muestras en húmedo de HA-i-PEA fueron fotografiadas mediante *cryoSEM* en un microscopio JSM-5410 (Jeol), equipado con una unidad criogénica CT-1500 (Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido). Para ello, las muestras se hidrataron durante 48 horas mediante inmersión en agua destilada y se congelaron sumergiéndolas

en nitrógeno líquido antes de ser sometidas a vacío y baja temperatura en la misma célula criogénica con tal de sublimar el agua y desvelar la estructura porosa de los *scaffolds*. Para estas muestras se usó un voltaje de 20 kV.

2.3.2. Densidad

Se realizó el cálculo de las densidades (ρ) de los *scaffolds* de cada material mediante el principio de Arquímedes: midiendo masa de cada muestra en seco al aire (m_{aire}), y luego completamente inmersa en n-octano (m_{oct}), tras asegurarse de que éste ocupara sus poros, aplicando vacío con un émbolo de ser necesario. Finalmente fue aplicada la fórmula:

$$\rho_{muestra} = \frac{m_{aire}}{m_{aire} - m_{oct}} \rho_{oct}$$

En ésta se asume que, según Arquímedes, el peso de un cuerpo inmerso en un líquido es el resultado de la diferencia entre su masa y la masa de líquido desplazado por su volumen. Por lo tanto la densidad de una muestra puede calcularse dividiendo su masa en seco por el volumen de n-octano desplazado (la diferencia entre peso al aire y sumergido, dividida a su vez por la densidad del n-octano a la temperatura de trabajo).

2.3.3. Porosidad

La porosidad de los *scaffolds* fue determinada a través de medidas de masa, primero en seco al aire (m_{aire}), luego completamente llenos de octano al aire (m'_{aire}), y finalmente llenos e inmersos en octano (m_{oct}). La fórmula siguiente fue utilizada para calcular la porosidad:

$$\phi = \frac{V_{poro}}{V_{total}} = \frac{V_{poro}}{V_{scaff} + V_{poro}} = \frac{m'_{aire} - m_{aire}}{(m_{aire} - m_{oct}) + (m'_{aire} - m_{aire})}$$

En ésta se utiliza también el principio de Arquímedes para considerar la diferencia de masas entre la medida en aire y en octano para calcular el volumen de octano desplazado por la fase sólida del *scaffold* ($V_{scaff} = [m_{aire} - m_{oct}] / \rho_{oct}$), mientras que el

volumen de poro se calcula a través del volumen de octano que rellena el *scaffold* ($V_{poro} = [m'_{aire} - m_{aire}] / \rho_{oct}$). El valor de densidad del n-octano es despejado al desarrollar la fórmula. Se asume que no existe hinchamiento de los materiales por parte del n-octano.

2.3.4. Análisis Termogravimétrico

Muestras de unos 5-10 mg de cada material fueron analizados en un termogravímetro TA-Instrument SDT-Q600, monitoreando su masa mientras eran calentados hasta los 900°C a una velocidad de 10°C/min, manteniéndolos en una atmósfera inerte de nitrógeno (N₂) con un flujo de gas de 50mg/min. Con el objetivo de eliminar cualquier molécula de agua persistente en la estructura del ácido hialurónico de las muestras, éstas fueron pre-tratadas calentándolas hasta los 100°C a 10°C/min, manteniéndolas a esa temperatura durante 10 minutos antes de volverlas a enfriar hasta los 30°C, sometiénolos a una atmósfera inerte de nitrógeno durante todo el proceso.

2.3.5. Análisis Elemental

Se obtuvo la composición elemental de los *scaffolds* mediante espectroscopía de energía dispersa por rayos X (EDS). Los datos fueron extraídos en un aparato FESEM (Carl Zeiss Ultra 55, Germany). El voltaje se fijó en 10 kV, y fueron medidas 5 zonas distintas en cada muestra, usando 3 réplicas para cada tipo de muestra para obtener la composición elemental promedio.

2.3.6. Hinchamiento en agua

La absorción de agua de los *scaffolds* se determinó a través de su masa antes (m_0) y tras inmersión en PBS 1x a 37°C en diferentes tiempos (m), hasta alcanzar el equilibrio. El contenido en agua (WC) fue calculado mediante la fórmula:

$$WC = \frac{(m - m_0)}{m_0}$$

El valor de WC en equilibrio equivale a EWC (Contenido de Agua en el Equilibrio o *Equilibrium Water Content*). De forma adicional se midió el grosor de las muestras antes y después del hinchamiento.

Se realizó también un experimento para medir el hinchamiento en ambiente con humedad relativa del 98%, dejando equilibrar las muestras en dicho ambiente durante una semana; pesándolas antes y después de la exposición a ambiente húmedo para extraer el EWC.

2.3.7. Espectroscopia de Infrarrojos con Transformada de Fourier

Los espectros infrarrojos de las muestras fueron obtenidos mediante la técnica de ATR-FTIR *ThermoNicolet Nexus* (EEUU) a partir del procesado de 64 barridos de longitudes de onda entre 650 y 4000 cm^{-1} , eliminando ruidos procedentes del ambiente, y con una resolución de 4 cm^{-1} . El procesado de los datos se realizó mediante el software OMNIC.

2.3.8. Análisis mecánico

2.3.8.1 Respuesta a la tensión

Los *scaffolds* fueron cortados en forma de barras de 20x10x1 mm^3 . Los ensayos de tensión se llevaron a cabo a una velocidad constante de 5 mm/min en un aparato TMA/S6000 (Seiko Instruments Inc.). Las medidas de deformación (ΔL) y fuerza (F) fueron usadas para calcular la deformación ($\varepsilon = \Delta L/L_0$) y la carga ejercida sobre la sección de material ($\sigma = F/A$) a partir de la longitud inicial (L_0) y área de la sección (A) de cada muestra. El módulo de Young de cada muestra (E) fue extraído de la pendiente inicial (hasta 0.05 o 5% de deformación) de la curva de carga-deformación, según la fórmula:

$$E = \frac{\varepsilon}{\sigma} = \frac{F/A}{\Delta L/L_0}$$

De forma adicional, y mediante los datos de porosidad extraídos de cada tipo de muestra (ver apartado 2.3.3), se pudo extrapolar el módulo de Young de la fase polimérica de los *scaffolds* (E'), suponiendo un aporte nulo de la fase porosa a la resistencia de los mismos.

$$E' = E \cdot \frac{A}{A'} = \frac{E}{1 - \emptyset}$$

Ya que la relación entra la sección polimérica (A') con respecto a la sección total del *scaffold* (A), es:

$$A' = A \cdot (1 - \emptyset)$$

2.3.8.2 Respuesta a la compresión

Se midió la respuesta de los distintos *scaffolds* al estrés por compresión en un aparato TMA/S6000 (Seiko Instruments Inc.). Los materiales en forma de discos fueron sometidos a una fuerza máxima de -1N, a una velocidad de -100nN/min, mientras se encontraban inmersos en agua desionizada a 37°C. De forma previa se dejó hinchar las muestras en dicho medio durante 10 minutos. Tras el hinchamiento, se midió el grosor y diámetro de cada disco de material.

2.3.9. Degradación

Muestras secas de los distintos *scaffolds* fueron pesadas antes y después de permanecer inmersas durante distintos periodos de tiempo en dos tipos de medio: una solución conteniendo 10 unidades/ml de hialuronidasa, ácido cítrico 300mM, fosfato de sodio 150mM y cloruro de sodio 150mM, estabilizada a pH 6.3, y una solución de PBS 1x estabilizada a pH 7.4. Los medios de degradación fueron sustituidos cada 2-3 días durante 3 semanas. Se realizó este proceso con cuatro réplicas para cada muestra y tiempo de degradación.

Un estudio de degradación rápida se llevó a cabo con tal de observar los residuos de PEA en los *scaffolds* de HA-i-PEA en cryoSEM, para ello se sumergieron en una solución concentrada de HCl a pH 1 hasta un máximo de 48 horas.

Un tercer estudio de degradación se realizó con la batería de IPNs preparadas bajo diferentes variantes del método de síntesis. El estudio incluyó 3 medios de degradación distintos: una solución de PBS 1x, estabilizada a pH 7.4; una solución de HCl en PBS 1x, estabilizada a pH 4, y una solución de hialuronidasa en PBS 1x, estabilizada a pH 5.7. Se recogió y congeló el sobrenadante de cada muestra a días 1, 7, 14 y 21, sustituyéndolo por medio de degradación nuevo. A continuación se midió la concentración de los residuos de hialurónico de cada sobrenadante, mediante un ensayo de reacción de carbazol en placas de 96 pocillos para la detección de ácido urónico [259], en un lector de placas *Victor Multilabel Counter* 1420 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Mediante estos residuos y el uso de patrones de dilución de una solución de ácido hialurónico al 2,5% se pudo medir la degradación del polisacárido en cada muestra. Cinco réplicas fueron usadas para cada tipo de muestra.

2.4. Ensayos biológicos. Cultivos *in vitro*

2.4.1. Acondicionamiento y siembra de los materiales para el cultivo *in vitro*

Las muestras fueron higienizadas con un tratamiento en etanol al 70% (vol%) durante 12 horas. Una vez desinfectadas, se lavaron con una solución de PBS 1x a pH 7.4 y posteriormente se acondicionaron incubándolas durante una noche en el medio de cultivo. Para las siembras se colocaron los *scaffolds* en placas de 48 pocillos y, tras retirarles el exceso de medio, se pipeteó sobre cada uno una suspensión conteniendo $2 \cdot 10^4$ fibroblastos L929 en 20 μ l de medio de cultivo (ver más adelante), e incubando durante 30' para permitir la adhesión inicial de las células antes de rellenar con otros 400 μ l. Los cultivos fueron realizados en incubadora, renovando el medio cada 48 horas, hasta un período máximo de 10 días de cultivo.

2.4.1. Ensayos de citotoxicidad

Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos de citotoxicidad o viabilidad celular, uno indirecto y otro directo. En ambos se hizo uso de la línea celular de fibroblastos L929 llevados hasta el pase 9. A su vez, el medio de cultivo fue el DMEM alto en glucosa (4,5g/L), suplementado con un 10% de suero bovino fetal y un 1% de mezcla de penicilina/estreptomicina. Todas las muestras a usar se desinfectaron con etanol y agua estéril antes de su uso.

La citotoxicidad indirecta de las muestras de *scaffolds* de HA, PEA y HA-i-PEA fue medida a través de extractos de las mismas obtenidos de su incubación en 1ml de medio de cultivo, a 37°C y en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, durante 24 horas. Estos extractos fueron luego usados como medio en cultivos de células previamente sembradas (en las mismas condiciones de temperatura, humedad y CO₂) en placas de 96 pocillos con medio fresco durante 24 horas. Como control positivo para citotoxicidad se utilizó el extracto de una pieza de látex, mientras que para el negativo se usó medio fresco de cultivo. Los cultivos fueron analizados a las 24, 48 y 72 horas de incubación mediante un ensayo de MTT. Primero, se les retiró el medio a los pocillos y se les añadió a cada uno 100µl de medio MTT, preparado con un 90% de DMEM y un 10% de solución MTT de 1mg/ml, dejándolos incubar en oscuridad durante 2.5 horas. Luego se sustituyó el medio MTT de cada pocillo con 120µl de isopropanol. Tras mantener 1 minuto en agitación, se extrajo 100µl de cada pocillo a una placa de 96 para medir su absorbancia a 550nm (*Victor Multilabel Counter 1420*, Perkin Elmer).

2.4.2. Ensayos de adhesión y proliferación celular en los scaffolds

2.4.2.1 Adhesión celular mediante fluorescencia de la actina

La adhesión y proliferación de las células L929 en los distintos *scaffolds* (HA, PEA y HA-i-PEA) fue analizada a través de la observación de su citoesqueleto de actina a los

10 días de cultivo *in vitro*. En este ensayo no se midió la fuerza de la adhesión sino simplemente la capacidad de las células para reconocer y asentarse en el sustrato. En primer lugar, se fijó cada una de las muestras provenientes del ensayo de viabilidad tratándolas con paraformaldehído al 4% durante 20', para luego lavarlas con una solución sin sales de tampón fosfato (PB) y sumergirlas en otra solución de PB con un 10% de FBS y un 1% de Tritón X-100 durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante otra hora en una dilución 1:200 de *Phalloidin Bodipy FL* con un 1% de suero de albúmina bovina en PB y en ausencia de luz durante 12 horas. Para finalizar, se lavaron las muestras con PB y se incubaron durante 10' en una dilución 1:5000 de una solución 4,6-diamidino-2-fenilindona dihidroclorito (DAPI) en PB, seguida de otros dos lavados en PB. Las muestras ya teñidas fueron examinadas usando un microscopio de fluorescencia Nikon eclipse 80i, y un microscopio confocal LSM Zeiss 780 Axioobserver z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Se usaron tres réplicas para cada tipo de muestra. Los espectros de excitación y emisión usados para detectar el *Phalloidin Bodipy FL* (actina) fueron 505 y 512, respectivamente.

2.4.2.2 Viabilidad celular mediante MTS

La viabilidad de las células sembradas en los distintos materiales se midió a través de ensayos MTS después de 1, 5 y 10 días de cultivo, usando tres réplicas para cada tiempo y material. Primeramente, se retiró el medio de cultivo de todas las muestras y se lavaron tres veces con PBS 1x, tras lo cual se añadió 400µl por pocillo de la mezcla MTS (conteniendo una parte de reactivo MTS por cada 5 de medio DMEM sin rojo fenol). Tras 2 horas en incubación, se retiró la solución MTS de todas las muestras, dividiéndola en 3 pocillos distintos de una placa de 96 para su lectura a 490nm en un lector multiplaca *Victor Multilabel Counter 1420* (Perkin Elmer).

2.4.2.3 Observación de las morfología celular mediante SEM.

Las muestras provenientes de cultivos in vitro fueron fijadas con glutaraldehído al 3% en PBS 1x, durante 60' a 37°C, y luego con tetraóxido de osmio al 2% durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido por cuatro lavados en agua destilada. Las muestras fijadas se deshidrataron aplicándoles concentraciones crecientes de etanol y luego se secaron a vacío. Posteriormente fueron tratadas para su observación siguiendo el protocolo mencionado anteriormente.

2.5. Análisis estadístico

Los resultados se expresan en forma de *promedios ± desviación estándar* de al menos tres réplicas diferentes para cada una de las muestras. Los datos fueron analizados mediante un test ANOVA, con un valor de $p < 0.05$. Los datos con diferencias significativas son tenidos en cuenta al describir y discutir los resultados.

Capítulo 3.

Resultados

3.1. Síntesis de *scaffolds* de PEA, HA y HA-i-PEA

La síntesis de los *scaffolds* de cada uno de los materiales se realizó de forma satisfactoria según los procedimientos descritos en el apartado 2.2 de materiales y métodos. La morfología de todos los *scaffolds* revela una estructura porosa regular con poros interconectados. El tamaño medio de poro en el caso de los *scaffolds* de PEA fue de $104\pm 18\mu\text{m}$, resultado que concuerda con lo esperado debido a que el diámetro promedio de las micropartículas de PMMA utilizado como porógeno fue de $100\mu\text{m}$. En el caso de los *scaffolds* de HA y las primeras IPNs de HA-i-PEA se obtuvo un tamaño de poro promedio de 174 ± 32 y $182\pm 20\mu\text{m}$, respectivamente. En ambos casos se ha obtenido un tamaño ligeramente menor comparado con el diámetro inicial de las micropartículas de PEA ($200\mu\text{m}$) utilizada como porógeno en la confección del molde. Dicha disminución puede deberse al segundo proceso de liofilización que se llevó a cabo en la preparación de las muestras, aunque resultó ser menor en el caso de las IPNs, presumiblemente debido a la presencia no higroscópica del PEA. Puede esperarse también un cambio en el tamaño de los poros tras el hinchado de esas muestras en agua.

Las imágenes de SEM permiten distinguir claramente el aspecto de los *scaffolds* de PEA y HA liofilizado, en las cuales el segundo aparece formando más rugosidades y pliegues que el primero. En el caso del HA-i-PEA, las imágenes de SEM no permiten distinguir fases diferenciadas que se correspondan a los dos componentes.

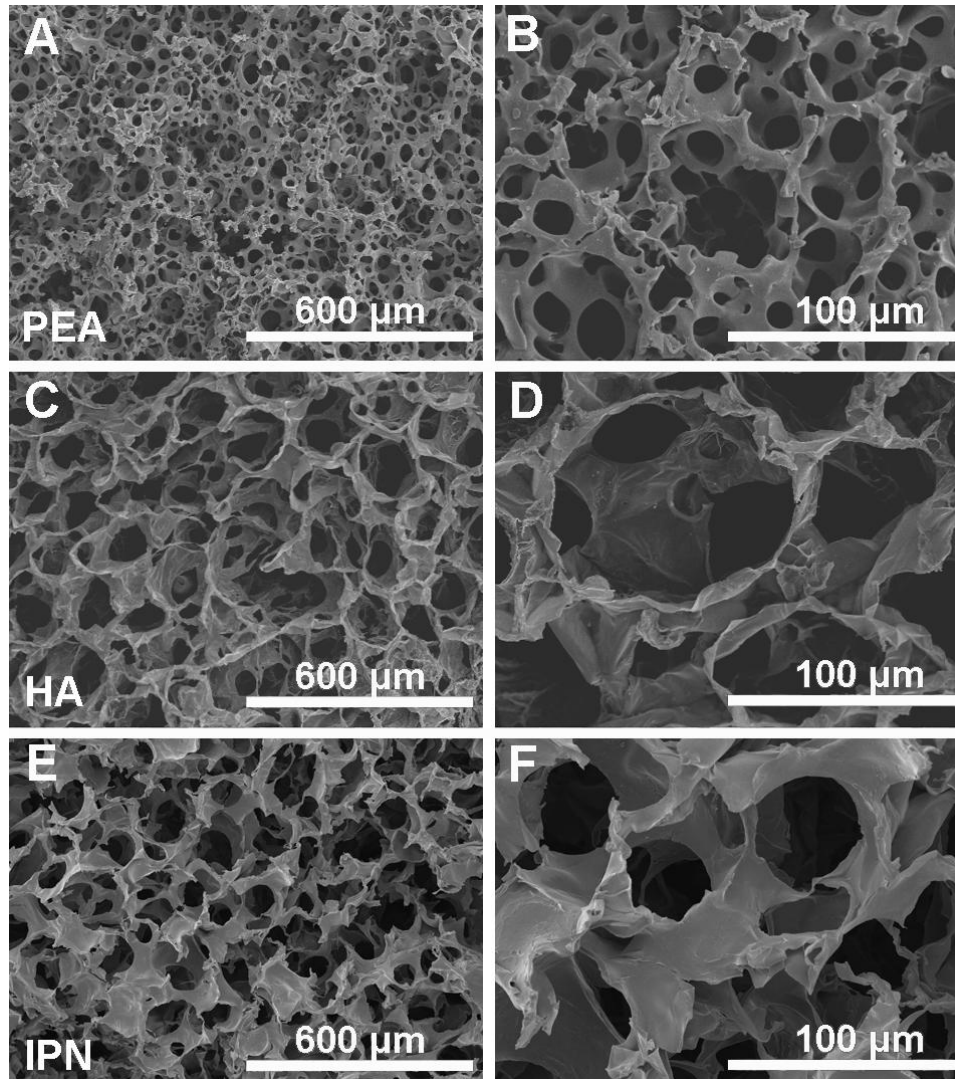


Figura 3.3 Imágenes obtenidas mediante SEM de los primeros scaffolds obtenidos: PEA (A, B), HA (C, D), HA-i-PEA (E, F)

Los resultados de porosidad de la primera IPN, así como de los controles de HA y PEA, pueden consultarse en la Tabla 3.2. La porosidad media es significativamente menor en el caso del PEA, aunque los valores de la IPN y el HA podrían verse alterados tras su hinchamiento en medio acuoso.

Con respecto a las diferentes variantes del método de síntesis de la IPN, pueden distinguirse varios cambios en la morfología de los materiales a nivel microscópico mediante las imágenes de SEM, los valores de porosidad y el diámetro medio de poro. En todos los materiales, el aspecto observado en el SEM se corresponde en gran medida con el de los controles de HA, o plataforma inicial, de su misma concentración (Figura 3.2). Puede afirmarse que su estructura microscópica depende en gran parte de la estructura obtenida en la plataforma inicial, tanto para el Método 1 como para el Método 2. Para el Método 3 (muestra I50NS) no puede realizarse dicha afirmación ya que se utilizó una sola concentración de HA para preparar la plataforma inicial. Para este último se obtuvieron los valores más bajos de porosidad, cercanos a los del control de PEA (ver Figura 3.3), si bien el tamaño de poro se mantuvo con respecto a las otras IPNs. Si se tiene en cuenta que la variación de dicho método se produce durante la preparación de la plataforma inicial, se confirma que esta última es determinante en la morfología y porosidad de las IPNs así como en la incorporación de PEA. Los valores de porosidad no mostraron variaciones significativas en los materiales obtenidos por el Método 1 y 2, manteniéndose cerca de los valores obtenidos para todos los controles de HA. Otra vez, debe tenerse en cuenta que estas medidas se produjeron en seco, eliminando el efecto de hinchado del ácido hialurónico en las IPNs y los controles.

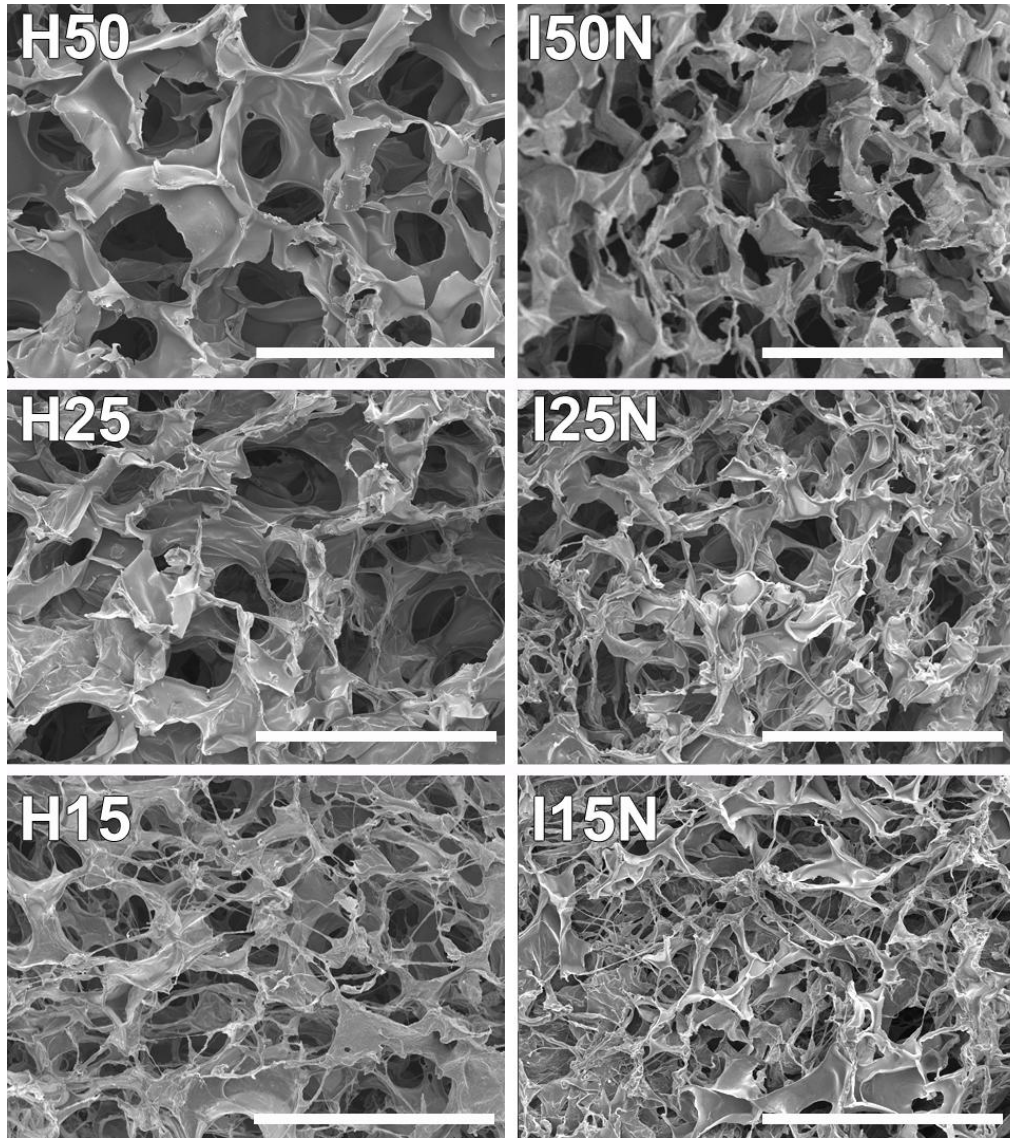


Figura 3.2 Muestras representativas de las imágenes obtenidas en SEM, a 200 aumentos, de los distintos materiales. Barras de escala: 600 micras.

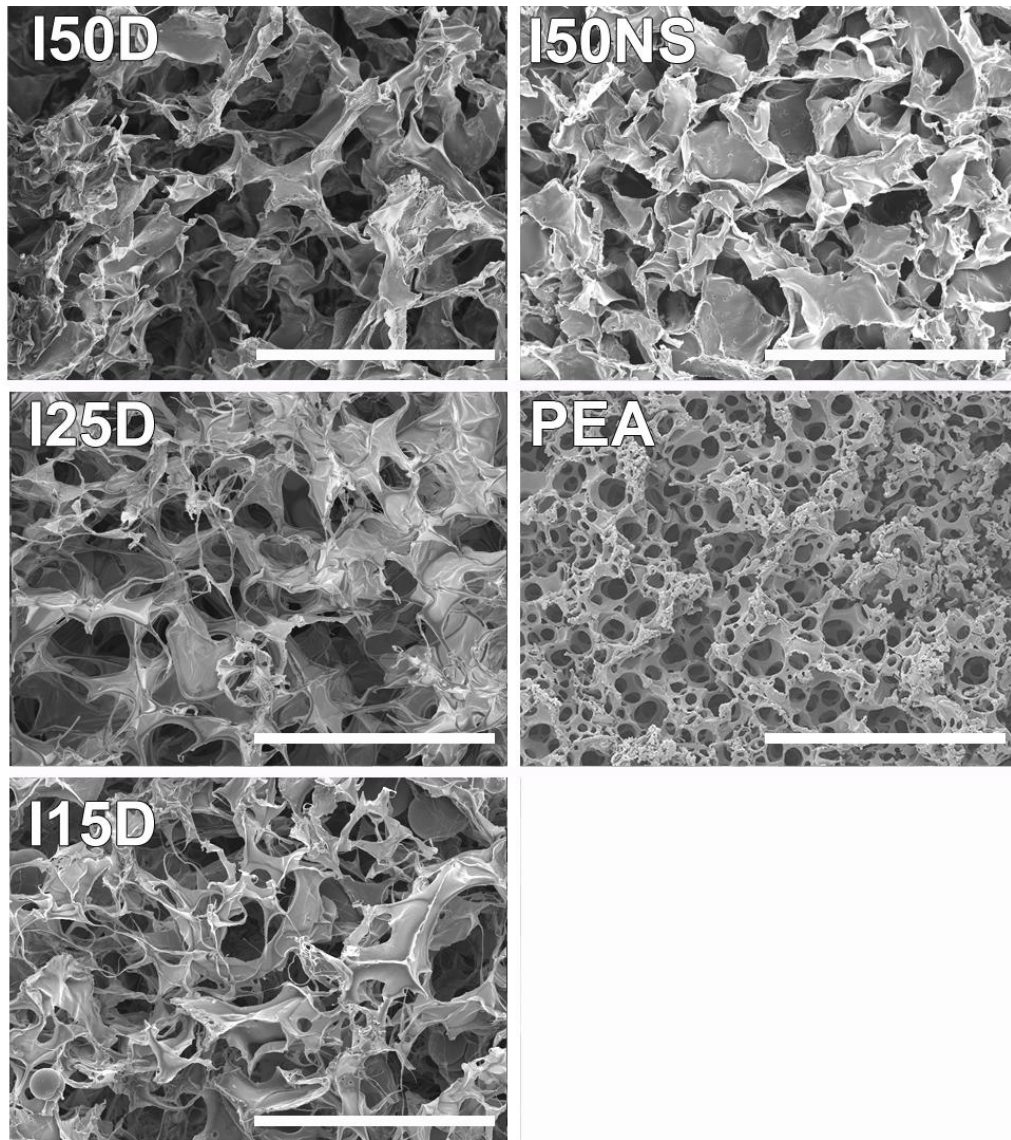


Figura 3.2 (Continuación) Muestras representativas de las imágenes obtenidas en SEM, a 200 aumentos, de los distintos materiales. Barras de escala: 600 micras.

Tabla 3.1 Principales propiedades de la primera IPN sintetizada

	HA	PEA	HA-i-PEA
Diámetro de poro (μm)	174 ± 32	104 ± 18	182 ± 20
Grosor (en seco) (mm)	2.07 ± 0.05	1.26 ± 0.11	1.89 ± 0.10
Grosor (en hinchado) (mm)	2.73 ± 0.22	1.26 ± 0.11	2.27 ± 0.07
Densidad (ρ) (g/cm^3)	0.94 ± 0.12	1.13 ± 0.01	1.00 ± 0.16
Porosidad (\emptyset) (%)	95.85 ± 0.32	61.79 ± 6.62	96.87 ± 2.16
E.W.C. (scaff.) ($m_{\text{eq}}-m_0$)/ m_0	78.06 ± 9.31	2.53 ± 0.80	66.39 ± 5.58
E en tensión (MPa)	0.05 ± 0.02	0.85 ± 0.09	0.28 ± 0.04
E / (1- \emptyset) (MPa)	1.16	2.23	9.02
ω_{PEA} por TGA (%)	-	-	23.4 ± 4.4
ω_{PEA} por EDS (%)	-	-	23.2 ± 0.4

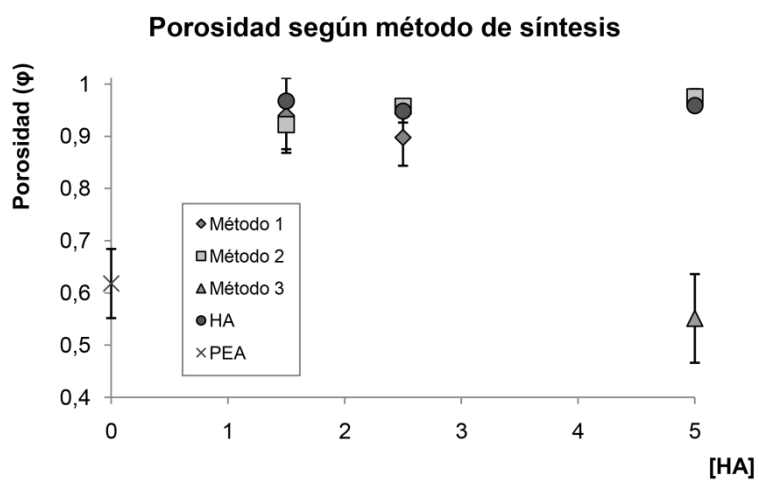


Figura 3.3 Relación entre el contenido de HA de la plataforma inicial y la porosidad medida en las muestras secas tras la síntesis, distinguiendo entre los distintos métodos usados y los controles.

3.2. Caracterización de los *scaffolds*

Las propiedades medidas en la primera IPN se listan en la Tabla 3.2, mientras que las propiedades medidas de los materiales obtenidos mediante variaciones de la técnica inicial se listan en la Tabla 3.3. Los valores de densidad de la primera IPN se encuentran entre los del PEA y el HA, algo que puede relacionarse con la proporción de ambos en el mismo (ver el apartado 3.2.1 de este capítulo). Del mismo modo ocurre con los valores de absorción de agua por inmersión de los *scaffolds*. La absorción de agua en los *scaffolds* de PEA se corresponde casi únicamente al agua retenida en sus poros y no incrementa con el tiempo, mientras que el contenido en agua de la IPN y el HA incrementa rápidamente durante la primera hora, estabilizándose lentamente hasta llegar a su valor máximo en un período de 3 a 5 días (ver Figura 3.3), teniendo la IPN siempre un contenido menor en agua que el HA respecto a su masa en seco. El incremento del grosor (y diámetro) de los discos tras el hinchado es también menor en la IPN si se compara al del HA (Tabla 3.2). De forma adicional, las imágenes de cryoSEM permiten observar la IPN en un estado hinchado (Figura 3.10), apreciándose que la fase de HA se expande creando mallas porosas mientras que la fase de PEA aparece en forma de láminas rígidas.

Los controles de HA correspondientes a las distintas plataformas iniciales del Método 1 y 2 (H50, H25 y H15) poseen valores distintos de densidad y contenido en agua (EWC) en humedad relativa (HR). Concretamente, los *scaffolds* de HA con menor densidad muestran una mayor absorción de agua. Por su parte, los valores de EWC en HR de las distintas IPNs son siempre menores que sus respectivos controles de HA. En lo que respecta a su densidad, ésta aumenta con respecto a los controles en el caso de las muestras con plataforma inicial de HA al 5% y 2.5% (I50 e I25 con respecto a H50 e H25), mientras que disminuye con respecto al control en el caso de la plataforma con HA al 1.5% (I15 respecto a H15), que posee el valor más alto de densidad de los controles de HA, aún por debajo del de PEA.

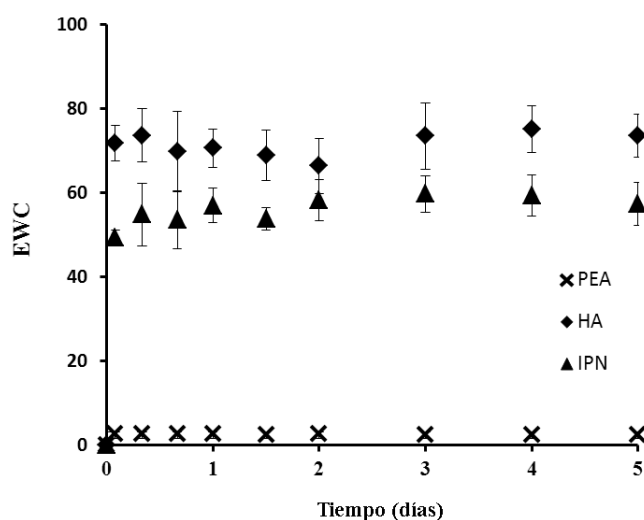


Figura 3.4 Gráfica con las medidas de hinchamiento dinámico por inmersión de los primeros scaffolds obtenidos.

Cabe mencionar que el proceso de preparación de las plataformas iniciales podría dar lugar a aire encapsulado en el interior de las trabéculas de HA, afectando a la fiabilidad de las medidas de porosidad y densidad durante el proceso de inmersión en octano (ver apartados 2.3.2 y 2.3.3 del capítulo anterior) además de durante la inyección de PEA en las plataformas iniciales. Esto se hace especialmente evidente a través de las medidas en H25, cuyo pesaje en inmersión en n-octano dio resultados de peso nulo e incluso negativo, incluso tras varios procesos de inyección del solvente a vacío. Sin embargo, ese aire encapsulado sí se vería desplazado durante el hinchamiento por inmersión del HA y las IPNs en agua. Teniendo en cuenta el conjunto de datos de densidad e hinchamiento, la presencia de este aire encapsulado sería mayor en el caso de las plataformas iniciales de HA al 2.5%, algo menor en las de HA al 5% del método 1 y 2 y mucho menor o nula en el caso de las de HA al 1.5% y de las de HA al 5% del

Método 3. Una alta compactación de las cadenas de HA liofilizado o una muy baja compactación de las mismas evitarían la aparición del mencionado encapsulamiento.

Tabla 3.2 Principales propiedades de los distintos materiales producidos a partir de las variaciones del método de síntesis.

Código de muestra	ω_{PEA} (%)	Densidad (ρ)	Porosidad (φ) (%)	Módulo de Compresión (E_1) [KPa]	Módulo de Compresión (E_2) [KPa]	EWC en HR 98%	Diámetro de poro (μm)
H50	-	1,08±0,07	0.96±0.01	9.53±1.77	85±14	1,09±0,10	184±21
H25	-	0,70±0,00	0.95±0.02	8.37±0.57	87±20	2,02±0,51	216±26
H15	-	1,48±0,06	0.97±0.01	6.01±0.90	75±16	0,54±0,86	191±33
PEA	-	1,54±0,00	0.61±0.06	76.67±0.02	2.10±0.01 (MPa)	0,00±0,01	100±22
I50N	25,26±3,64	1,16±0,12	0.97±0.02	8.22±0.83	71±09	0,60±0,14	179±11
I25N	46,26±4,60	1,09±0,18	0.90±0.05	7.27±1.20	97±23	0,44±0,19	184±15
I15N	59,17±8,95	1,29±0,15	0.94±0.07	5.38±0.51	65±09	0,13±0,06	188±20
I50D	12,69±4,43	1,13±0,13	0.98±0.01	6.22±0.67	63±07	0,88±0,12	200±39
I25D	48,26±1,26	1,17±0,08	0.96±0.01	5.88±1.27	102±35	0,62±0,21	190±14
I15D	59,49±13,20	1,30±0,03	0.92±0.05	6.97±1.92	91±21	0,63±0,27	173±16
I50NS	68,64±1,69	1,42±0,03	0.55±0.08	37.49±5.96	161±25	0,14±0,03	178±37

3.2.1. Composición de las IPNs

La degradación térmica o TGA se expresó en un gráfico que relaciona la masa residual del material en función de la temperatura (Figura 3.4). La derivada de esta curva (ver detalle en la misma Figura) permite distinguir en qué rangos de temperatura se producen los principales eventos de degradación, revelándose que tanto el HA como el PEA poseen un solo pico principal de degradación entre los 25°C y los 900°C. En el caso del HA, la mayor parte de la masa inicial se volatiliza alrededor de los 240°C, mientras que en el PEA esto ocurre sobre los 400°C.

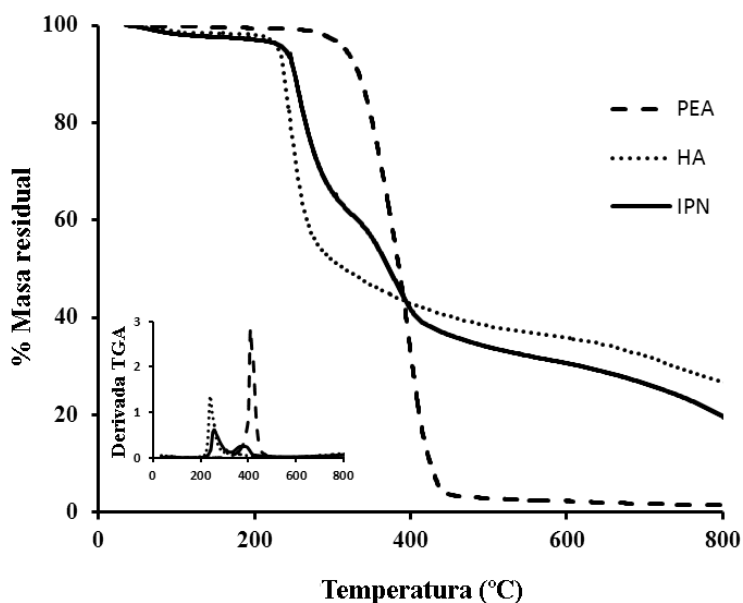


Figura 3.5 Resultados del TGA de los primeros scaffolds de PEA, HA y HA-i-PEA, mostrando la evolución de la masa (su pérdida) respecto a la temperatura. Abajo a la izquierda, la gráfica derivada de esas mismas curvas, mostrando los principales eventos de degradación.

Otra diferencia es que el PEA no presenta apenas residuos sobre los 500°C, mientras un 20% del HA inicial sigue presente en forma de residuos incluso a 800°C, degradándose (o volatilizándose) muy lentamente aún a estas temperaturas.

Por otra parte, la IPN presenta los mismos picos que el HA y el PEA, sin otros picos adicionales, lo cual es indicativo de que ambos componentes degradan de forma independiente. Esto permite usar los valores de masa residual de la IPN (m_{IPN}) para calcular la proporción másica de PEA (ω_{PEA}) en la misma, al compararlos con las masas residuales de los *scaffolds* de dichos componentes a la misma temperatura, según la fórmula:

$$m_{IPN} = m_{PEA} \cdot \omega_{PEA} + m_{HA} \cdot (1 - \omega_{PEA})$$

Los valores calculados de (ω_{PEA}) varían según la temperatura de TGA escogida para obtener la masa residual, si bien algunos de esos valores son compatibles entre ellos; por ejemplo el cálculo a 800°C da como resultado un porcentaje en masa de PEA de 23.43±4.50%, cercano al de 23.07±0.85% obtenido con las masas residuales a 240°C, mientras que esos mismos datos a 500°C dan un valor de 12.23±0.83%. Este conflicto en los resultados puede deberse a diferencias en la liberación de residuos volátiles de PEA entre los *scaffolds* de IPN y los de PEA.

Como valor definitivo de composición por TGA se escogió el obtenido mediante las masas residuales a 800°C, cuando la red de PEA ya se ha volatilizado completamente. No obstante, esta medida no está libre de incertidumbre, puesto que pequeños fragmentos de HA podrían verse arrastrados por el flujo de gas nitrógeno durante el análisis.

Para confirmar estos resultados, se comparó el cálculo de composición de la primera IPN con una medida independiente a través de un análisis elemental cuantitativo en FESEM. Asumiendo que no hay contaminación de las muestras, la presencia de nitrógeno elemental (N) en las muestras de IPN proviene directamente de su contenido de HA. Por lo tanto, si comparamos esa medida de nitrógeno con las encontradas en las muestras de PEA y HA, seremos capaces de cuantificar la proporción de PEA:

$$N_{IPN} = N_{PEA} \cdot \omega_{PEA} + N_{HA} \cdot (1 - \omega_{PEA})$$

Siendo N la fracción promedio de nitrógeno elemental medida por EDS cuantitativo. Tras realizar esta medida en la primera IPN (ver Tabla 3.4), se confirma la consistencia con los valores de composición anteriores, al obtenerse un valor de ω_{PEA} del $24.0 \pm 0.7\%$.

Tabla 3.3 Resultados del análisis elemental cuantitativo por EDS. La presencia de Na depende también de la fracción de HA ya que se encuentra en forma de sal de sodio.

	N atómico (%)	Na atómico (%)
HA	4.4±1.2	5.6±0.1
PEA	0.1 ±0.1	0
HA-i-PEA	3.4±0.7	4.2±0.2

De forma adicional, y suponiendo que ambos componentes de la IPN mantienen sus propiedades físicas individuales, se usaron también los valores de densidad de las muestras para calcular el porcentaje másico de cada componente, según la fórmula:

$$\frac{1}{\rho_{IPN}} = \frac{1}{\rho_{PEA}} \cdot \omega_{PEA} + \frac{1}{\rho_{HA}} \cdot (1 - \omega_{PEA})$$

En la anterior fórmula se tiene en cuenta que el volumen específico (el inverso de la densidad) es una propiedad que se mantiene proporcional a la aportación másica de cada componente en el compuesto, siempre que no exista una fracción de volumen desocupada (u ocupada por aire) entre dichos componentes durante la medida de estas propiedades.

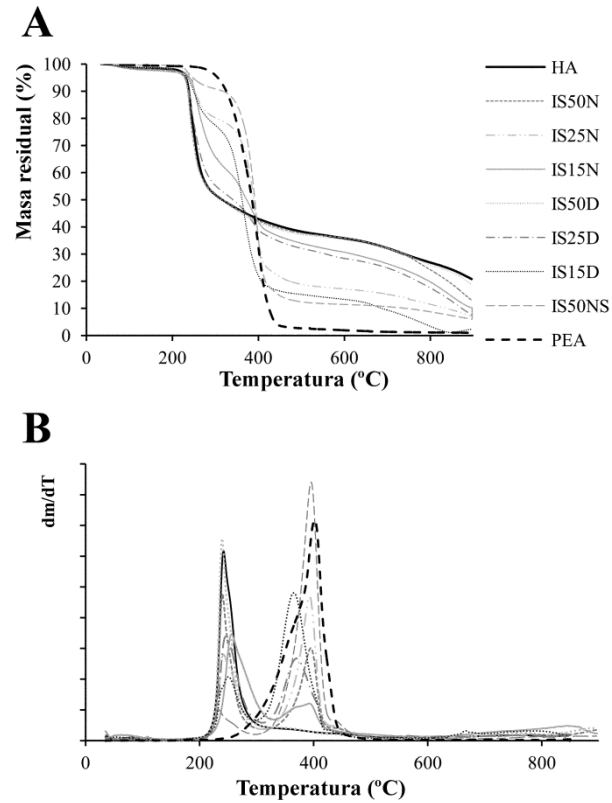


Figura 3.6 Resultados del TGA de los segundo scaffolds de PEA, HA y HA-i-PEA, en todas sus variantes, mostrando la evolución de la masa (su pérdida) respecto a la temperatura (A). Abajo, la gráfica derivada de esas mismas curvas, mostrando en detalle los principales eventos de degradación (B, misma leyenda).

El valor obtenido por esta fórmula, teniendo en cuenta los datos de densidad de los tres tipos de *scaffolds* (ver Tabla 3.2), es de 0.35 ± 0.06 (o $35 \pm 6\%$) de fracción de PEA en la IPN. Este valor dista del valor de composición obtenido mediante TGA, lo cual puede deberse a la existencia de aire retenido en los *scaffolds* durante las medidas de densidad (ver sección 2.3.2) o quizás por una alteración de las propiedades del HA o el PEA en la IPN respecto a los controles. Teniendo en cuenta los valores de densidad obtenidos de las variantes de *scaffold* de HA (H50, H25 y H15, ver Tabla 3.3), se confirma que

puedan darse huecos de aire en la estructura de HA liofilizado que interfieran en las medidas de densidad (y porosidad).

Una vez obtenidas las variantes de HA y HA-i-PEA, se analizaron mediante TGA (Figura 3.5), comprobando que no aparecían nuevos procesos de degradación térmica y realizándose el cálculo de su porcentaje másico a partir del residuo a 800 °C (ver Tabla 3.3). Para cada variante de IPN se usó como referencia de residuo el *scaffold* de plataforma inicial con la misma concentración (H50, H25 ó H15). Las muestras que presentan un mayor porcentaje másico de PEA se corresponden a la variante I50NS.

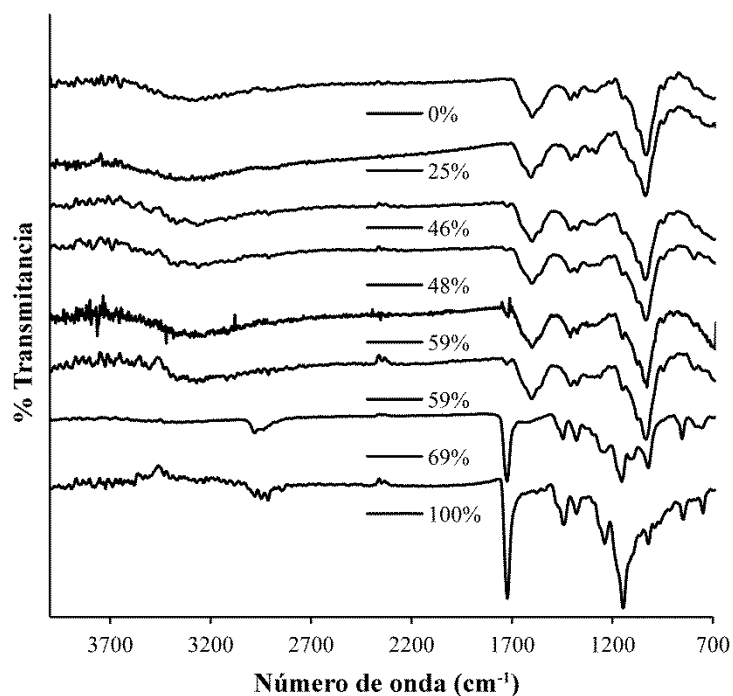


Figura 3.7 Espectros de transmitancia del espectro infrarrojo de los diferentes scaffolds, según su composición medida por TGA (leyenda adyacente).

De forma paralela se realizó el barrido ATR-FTIR de varias muestras representativas, cuyos espectros se ilustran en la Figura 3.7, asociándolos directamente a los valores de

composición obtenidos a través del TGA. En casi todas las muestras de IPN, las señales apreciables en forma de pico invertido o surco se corresponden con los controles de HA, mientras que en otros se hacen visibles además otros picos en longitudes de onda que coinciden con las del PEA, en particular la señal del grupo éster alrededor de los 1700 nanómetros. En ningún caso se producen picos adicionales que puedan corresponderse con modificaciones químicas o enlaces en los polímeros constituyentes. Tampoco pueden usarse estas señales de transmitancia del espectro infrarrojo (IR) para medir la presencia relativa de los mismos, puesto que su distribución en el material puede producir apantallamiento y afectar su detección mediante este método.

3.2.2. Degradación

Durante las cuatro semanas que duró el ensayo de degradación de la primera IPN (Figura 3.8) no se detectó pérdida de masa de los *scaffolds* de PEA en ninguno de los dos medios usados. Por otra parte, los *scaffolds* de HA perdieron masa en un rango de 5-10% en el medio con PBS, y un 10-15% en medio con hialuronidasa (HAsa). La IPN mostró una degradación similar a la del HA, siendo significativamente menor a día 28 en el medio con HAsa. En medio con PBS a pH 7.4, la diferencia en la pérdida de masa inicial de HA de la IPN en PBS a pH 7.4 es el doble de que la del control a día 28 (Figura 3.8 D), por lo que pueden darse alteraciones en la susceptibilidad a hidrólisis del componente HA entre la plataforma inicial y la IPN producida.

El ensayo de detección de ácidos urónicos mediante carbazol fue llevado a cabo para determinar la cantidad de HA liberada al medio a través de la degradación o desintegración de las distintas variantes de IPN y plataformas iniciales de HA, al medir su absorbancia y compararla con la de soluciones no degradadas de HA sin entrecruzar. Los resultados obtenidos de los distintos medios de degradación se expresaron como la fracción de masa degradada con respecto a la masa inicial de ácido hialurónico de cada muestra (según su composición, ver la tabla 3.3) frente al tiempo de degradación. Se ha

asumido que el componente PEA es estable en todos los medios (HAsa, pH7.4 y pH4). Todos los valores expresan la degradación acumulada hasta ese tiempo (Figura 3.9).

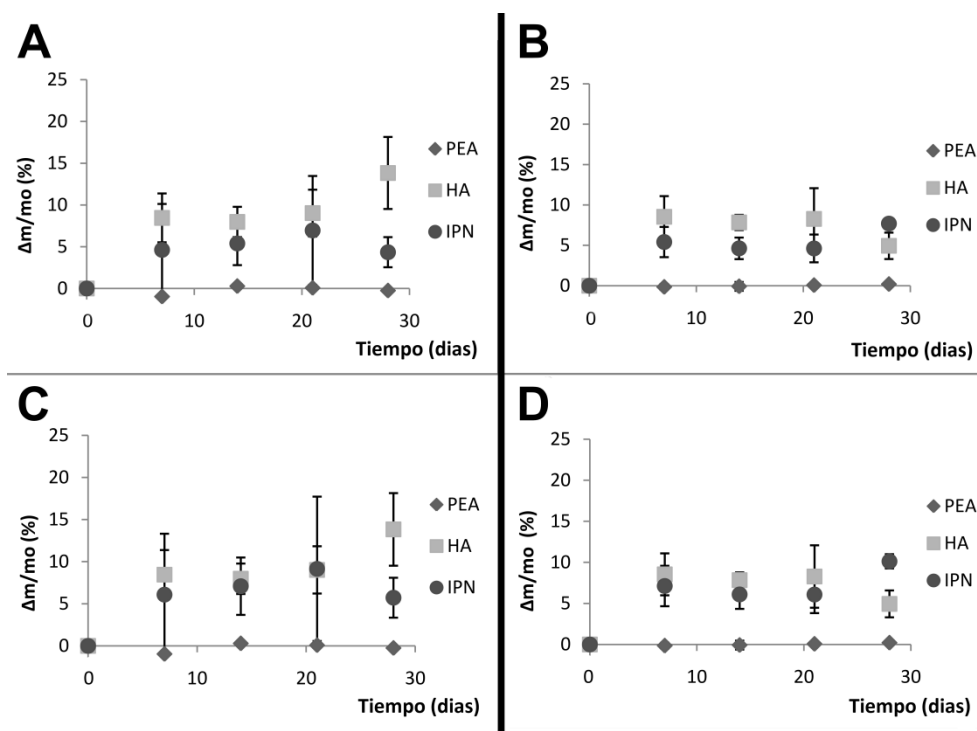


Figura 3.8 Ensayo de degradación de las primeras muestras, a lo largo del tiempo, en hialuronidasa (A), y en PBS a pH 7.4 (B). En el caso de la IPN, se ha corregido el valor de la fracción de masa degradada dividiéndola por la fracción de masa de HA calculada a través del análisis elemental, en hialuronidasa (C) y en PBS (D).

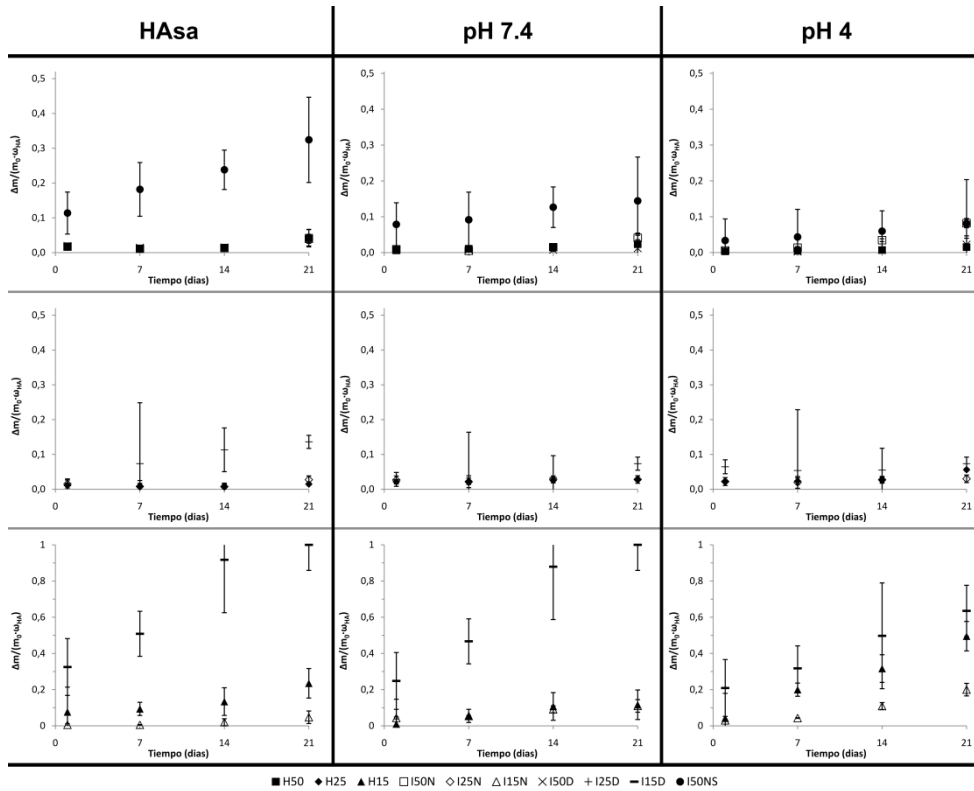


Figura 3.9 Ensayo de degradación de la segunda batería de muestras, a lo largo del tiempo, en hialuronidasa (HAsa), PBS a pH 4 y en PBS a pH 7.4. Se muestran por separado los resultados de las muestras producidas a partir de plataformas iniciales de HA al 5% (fila superior), al 2.5% (fila central) y al 1.5% (fila inferior) en cada tipo de medio.

Durante los ensayos de degradación, las muestras correspondientes a la plataforma inicial de hialurónico al 1.5% tienden a liberar gran parte de su estructura o incluso desintegrarse, independientemente del medio usado. Por otra parte, al comparar todas las variantes basadas en hialurónico al 5% (ver Figura 3.9, fila superior), se aprecia una mayor degradación del componente HA en las muestras I50NS.

Los primeros *scaffolds* de HA-i-PEA tratados mediante degradación rápida (pH=0.1) fueron observados en el cryoSEM. Sin embargo, las muestras de 48 horas resultaron

imposibles de manejar al desintegrarse fácilmente, revelando que el PEA no forma una estructura continua en las mismas. Por este motivo solamente se pudieron observar al microscopio aquellas con 24 h de tratamiento (Figura 3.10). En éstas se aprecia, entre los restos de HA sin degradar, que la fase de PEA forma no solamente láminas, sino también filamentos que no podían ser apreciados en las muestras sin degradar. Estos filamentos se encontrarían retenidos en el interior de la estructura del HA en la IPN, al no encontrarse unidos entre ellos ni el resto de PEA.

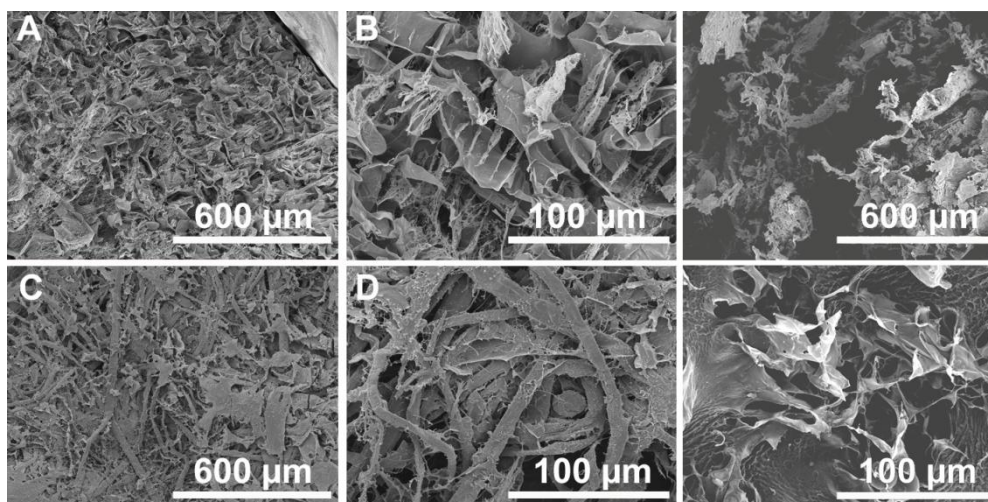


Figura 3.10 Imágenes de cryoSEM de la primera IPN hinchada hasta el equilibrio en agua (A, B), y de la misma muestra tras la degradación casi completa de su red de HA (C, D). A la derecha, imágenes del scaffold de I50NS tras una degradación completa de su red de HA.

El ensayo de degradación rápida de la segunda tanda de muestras dio lugar a la desintegración de todos los *scaffolds*, con la excepción de las muestras I50NS, que conservaron una estructura de PEA tras la degradación completa de la fase de HA (Figura 3.10). A esta estructura se le midió la porosidad mediante el método mencionado anteriormente, dando como resultado un promedio del $87.00 \pm 1.72\%$ entre las tres réplicas degradadas, un 58% mayor que la porosidad de esas mismas muestras

sin degradar, pero aun así por debajo del resto de las IPNs. La densidad media de esta fase PEA residual es de 1.42 ± 0.6 g/ml.

3.2.3. *Propiedades mecánicas*

Los ensayos de tracción permitieron analizar las diferencias en la respuesta de los distintos materiales a este tipo de esfuerzo. Este ensayo se realizó únicamente en los primeros materiales obtenidos, analizando la respuesta de deformación a un incremento constante de la fuerza de tracción sobre los materiales, como vemos en la Figura 3.11. Los valores del módulo de Young (E) de las IPN (0.28 ± 0.04 MPa) confirman el refuerzo mecánico de los *scaffolds* mediante la incorporación de la red de PEA (0.83 ± 0.09 MPa), en comparación con los *scaffolds* iniciales de HA (0.05 ± 0.02 MPa).

De forma adicional se calculó el módulo de la sección polimérica (no porosa) a partir de los anteriores módulos, al dividirlos por la fracción correspondiente al polímero ($1 - \phi$) extraída de las medidas de porosidad -en seco- de cada tipo de muestra. Estos cálculos revelan que la resistencia a la tracción por parte de la fase polimérica de los *scaffolds* de IPN (9.02 MPa) es varias veces superior a la del HA (1.16 MPa) e incluso a la del PEA (2.23 MPa). No obstante, las medidas de tracción se realizaron con muestras hidratadas por lo que el dato de porosidad en seco puede ser menor al real.

Por otra parte, los ensayos de compresión en TMA permitieron analizar la respuesta dinámica de los materiales a este otro tipo de esfuerzo, ejercido con una fuerza creciente y en inmersión a 37°C , sin estar confinados. En este caso se pretende analizar cómo se distribuye la red de PEA en las diferentes variantes de IPN con respecto a la red inicial de HA a través de la respuesta mecánica en compresión. Esto último no puede apreciarse a través de los ensayos de tracción.

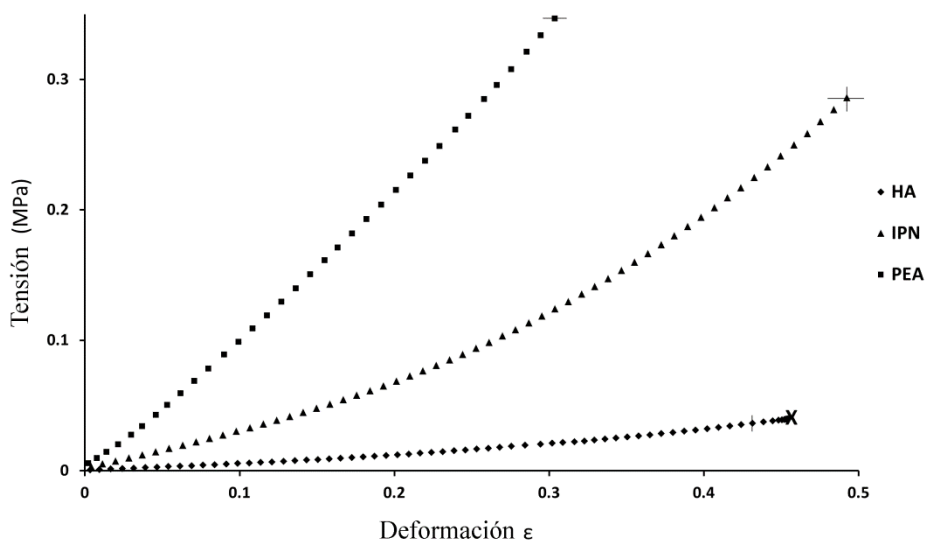


Figura 3.11 Curvas de tensión/deformación de los primeros scaffolds obtenidas en los ensayos de tracción.

Los gráficos de compresión contra deformación en inmersión no confinada se pueden ver en la Figura 3.12, distinguiéndose dos procesos: una primera deformación consistente en el colapso de los poros (por debajo de 1HPa, aproximadamente y para la mayoría de muestras), y una segunda deformación ($>1\text{HPa}$) donde se comprime el material en bloque una vez ha colapsado su estructura de *scaffold*. El módulo de Young de cada proceso se calculó, como se puede ver en la Tabla 3.3.

Al comparar los valores de los módulos de compresión de las distintas IPNs y sus controles puede afirmarse que, en general, la incorporación de PEA no permite un refuerzo apreciable de los *scaffolds* a este tipo de esfuerzo, suponiendo incluso una pérdida de la resistencia del componente HA en algunos casos. Esto puede explicarse por la reducción del hinchamiento en agua en las IPNs, ya que ésta al ser incompresible aporta una resistencia extra a la compresión del HA incluso sin confinamiento, al encontrarse retenida en el interior del material. Por otro lado, las muestras I50NS

presentan una gran resistencia a la compresión, debida presumiblemente a una interconexión de las estructuras formadas por el componente PEA (ver apartado 4.2.3 del capítulo de Discusión).

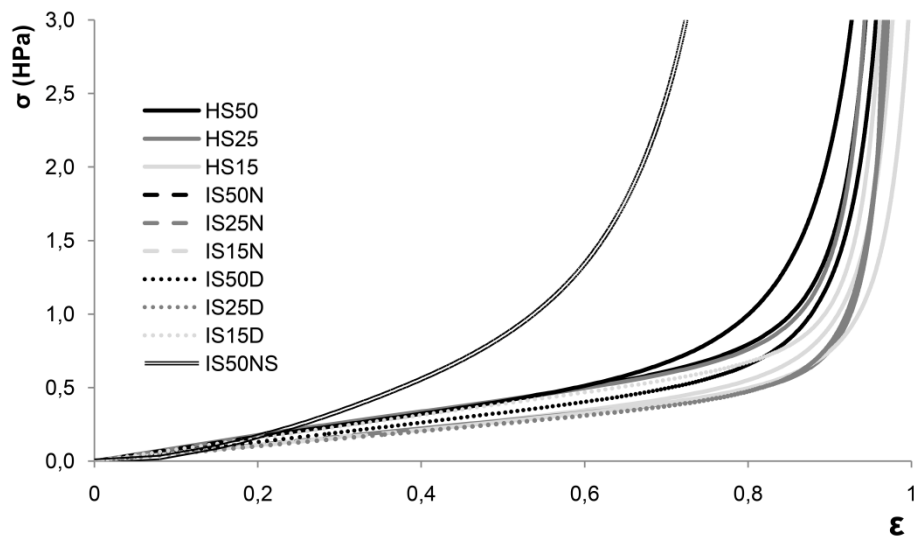


Figura 3.12 Curvas de compresión/deformación de la segunda batería de scaffolds, obtenidas en los ensayos de compresión.

3.3. Estudios *in vitro* con fibroblastos L929

3.3.1. Citotoxicidad de los materiales

El ensayo de citotoxicidad indirecta revela que los extractos de IPN dan valores de viabilidad menores que el control positivo a las 24h y 28h de cultivo, menores incluso que los extractos de HA y PEA a los mismos tiempos (Figura 3.13A). No obstante, tras 96 horas de exposición en cultivo los extractos de todas las muestras dan valores de viabilidad celular significativamente superiores al control positivo (100% de viabilidad).

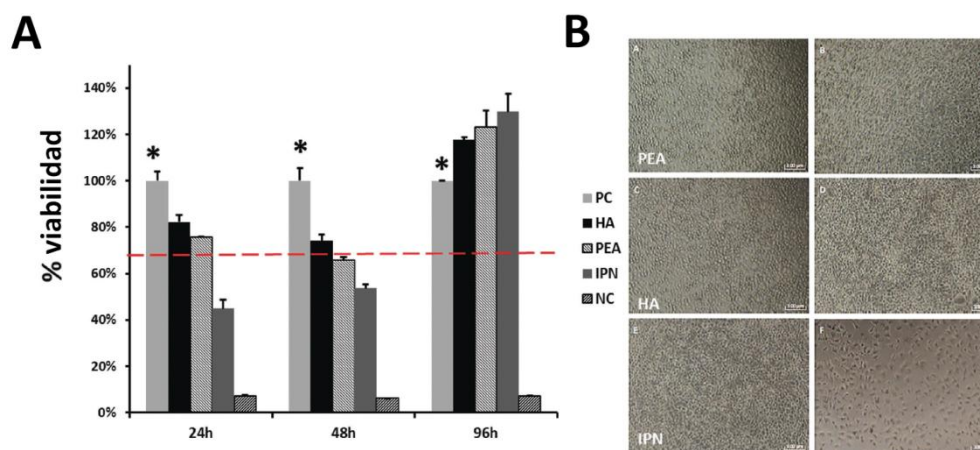


Figura 3.13 Resultados de viabilidad mediante MTT de los cultivos realizados con extractos de los primeros materiales para medir su citotoxicidad (A). Imágenes de los cultivos con extractos a las 96 horas de cultivo (B).

Las imágenes de microscopio óptico de los distintos cultivos L929 con extractos (Figura 3.13B) no revelan diferencias importantes entre ellos y el control positivo, con la excepción del control negativo de látex donde las células muestran claramente una menor densidad de población. Según estos resultados, ninguno de los materiales a analizar debe considerarse citotóxico.

3.3.2. Adhesión y proliferación celular en los distintos scaffolds

La proliferación de las células L929 sembradas sobre los distintos *scaffolds* se midió mediante un ensayo MTS (Figura 3.14). Tras un día de incubación, no se aprecian diferencias en el crecimiento celular entre los distintos materiales y el control 2D. A día 5 y 10, sin embargo, el crecimiento de las células en los *scaffolds* de HA y HA-i-PEA son significativamente mayores que en el PEA, siendo la IPN el sustrato con mayor proliferación celular.

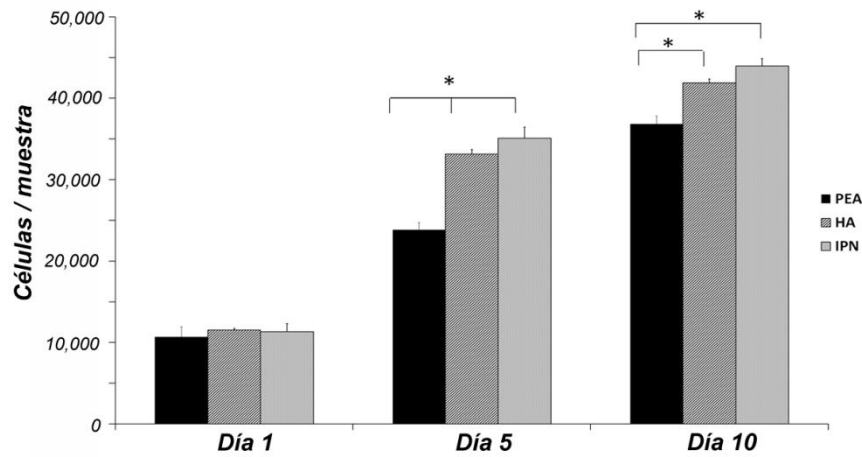


Figura 3.14 Resultados de los ensayos MTS de las células sembradas y cultivadas de forma directa sobre los distintos materiales.

Las imágenes SEM de los cultivos a día 10 sobre los materiales (Figura 3.15) permiten ver los fibroblastos L929 creciendo en el interior de los *scaffolds*, unidos a las paredes interiores de los poros y trabéculas. Estas células se muestran extendidas sobre la superficie del material, con sus núcleos con morfología esférica y aparecen empaquetadas sobre la superficie de los materiales, sin apreciarse grandes diferencias entre la IPN, el HA y el PEA.

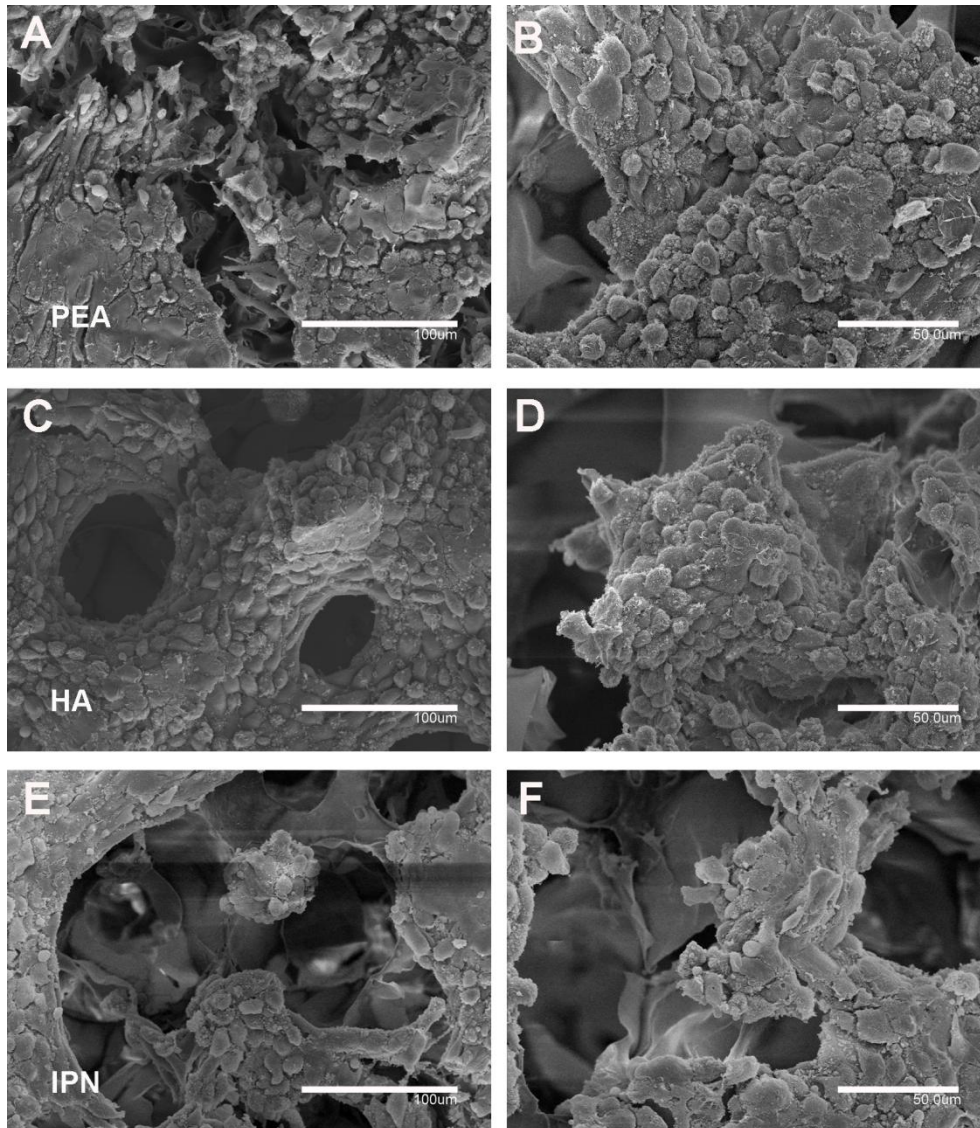


Figura 3.15 Imágenes SEM de los fibroblastos L929 cultivados sobre los distintos scaffolds: PEA (A, B), HA (C, D) y HA-i-PEA (E, F). Barras de escala: 100 µm (A, C, E) y 50 µm (B, D, F).

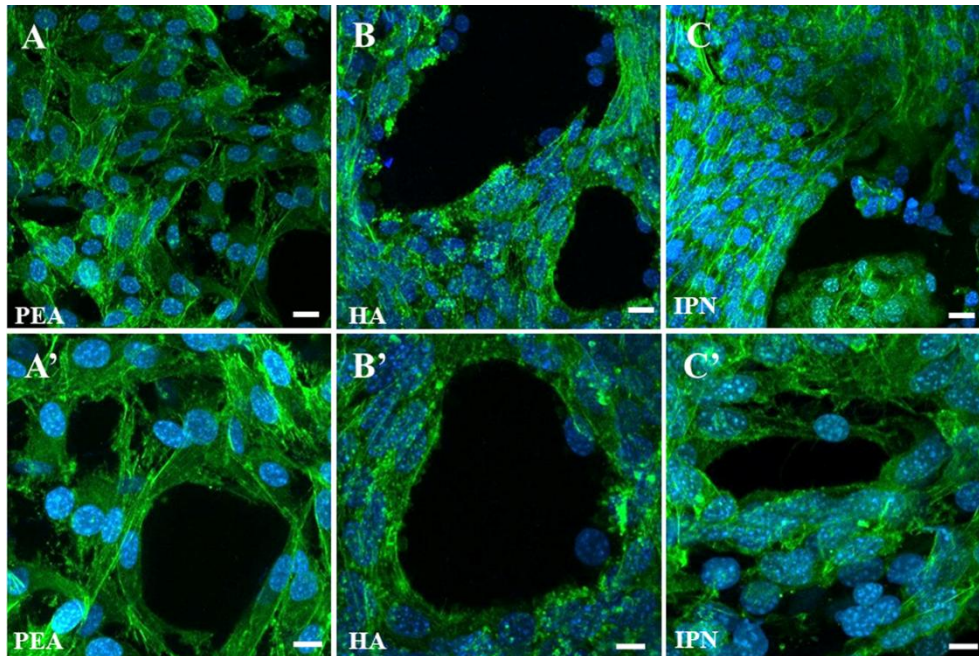


Figura 3.16 Fotografías obtenidas mediante fluorescencia de los fibroblastos L929 cultivados sobre los distintos scaffolds, usando un fluoróforo conjugado con falacidina, capaz de unirse a la proteína de actina (verde en las imágenes), y DAPI para teñir los núcleos (azul en las imágenes): PEA (A, A'), HA (B, B') y HA-i-PEA (C, C'). Barras de escala: 20 μm (A, B, C) y 10 μm (A', B', C').

En el caso de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia, mediante tinción del citoesqueleto de actina con *Phalloidin* (Figuras 3.16 y 3.17), se pueden apreciar diferencias en la morfología y tipo de adhesión ejercido por las células en los distintos materiales. En los *scaffolds* de PEA, los fibroblastos se encuentran extendidos mostrando un citoesqueleto denso de actina con múltiples fibras de estrés¹ bien definidas. En los *scaffolds* de HA, en comparación con los de PEA, las células se encuentran menos extendidas aunque siempre en forma de huso, y en mayor densidad;

¹ Traducido comúnmente del inglés: (*actin stress fibers*)

y mientras que la actina de su citoesqueleto también comprende fibras alineadas y orientadas a lo largo de la célula, ésta se presenta también en forma de múltiples cúmulos de proteína sin alinear. En la IPN estos cúmulos disminuyen e incluso desaparecen en algunas zonas, encontrándose su citoesqueleto de actina más extendido que el de las mismas células sobre el HA, aunque no tanto como en las del PEA, siendo la densidad de células mayor que en este último material. Además, las células en la IPN muestran tanto forma de huso como otras formas más extendidas. Las células se encuentran invadiendo el interior de los *scaffolds* en el caso del HA y la IPN

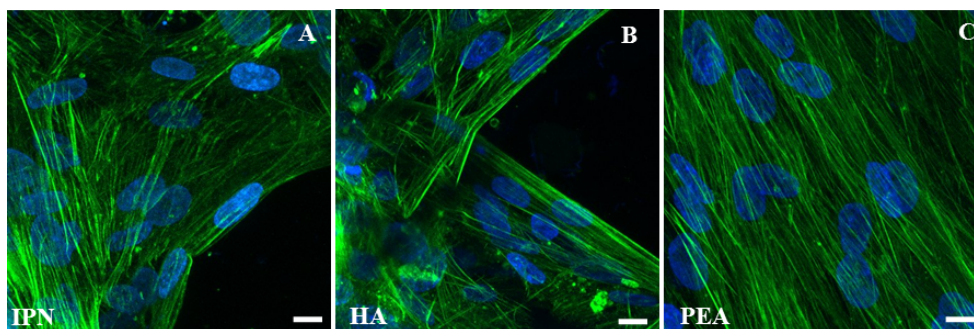


Figura 3.17 Detalle de los cultivos realizados con células L929 cultivados sobre los distintos scaffolds, obtenidos mediante tinción de la actina (verde en las imágenes), y el uso de DAPI para teñir los núcleos (en azul): HA-i-PEA (A), HA (B) y PEA (C). Barras de escala: 5 μ m.

Capítulo 4.

Discusión

4.1. Síntesis de *scaffolds* de PEA, HA y HA-i-PEA

La técnica usada para la obtención de las IPNs se basa en un sistema a dos pasos que incluye la síntesis de una plataforma inicial de HA liofilizado y la posterior infiltración de una mezcla monomérica y su polimerización, dando lugar a *scaffolds* porosos de HA-i-PEA (redes interpenetradas de HA y PEA).

Cabe recalcar la importancia de la formación de poros y canales microscópicos tras la liofilización de los cristales de agua en la plataforma inicial de HA, que han de ser luego ocupados por el monómero de EA, permitiendo polimerizar una fase PEA hidrofóbica en el interior de la estructura de un glicopolisacárido altamente hidrofílico e higroscópico. Esto da como resultado una IPN secuencial [257, 258], en la que la presencia e interconectividad de la fase PEA depende de distintos factores como son: 1) la cantidad de agua absorbida por el hidrogel de HA antes de su congelación; 2) la nucleación y crecimiento de cristales de agua en el HA durante la congelación previa a liofilizar; 3) la densidad de entrecruzamiento del polímero de HA y/o su concentración efectiva en forma de hidrogel hidratado antes de liofilizar (algo que también influye la formación de cristales en 2); 4) la interconectividad de los poros e intersticios creados en la plataforma inicial de HA tras el liofilizado, y 5) la concentración/dilución del monómero de EA inyectado en los huecos creados en el HA liofilizado. Es posible entonces alterar la composición de las IPNs obtenidas, así como la distribución de la fase PEA, si se modifican dichos parámetros en la preparación de la plataforma inicial de HA, tal como vemos en las variantes de IPN sintetizadas.

Las imágenes en SEM de los distintos materiales obtenidos revelan cómo el HA liofilizado en las plataformas iniciales de los métodos 1 y 2 forma láminas y trabéculas que sin embargo aparecen completamente lisas en su superficie, sin poros en su estructura a nivel nanométrico. Esto reduce en gran parte la interconectividad de la fase porosa de cara a inyectar y polimerizar el PEA, produciéndose una inyección poco eficiente y/o provocando que la estructura de PEA se encuentre dispersa y sea en parte eliminada durante el proceso de lavado de los materiales. En este sentido, el tratamiento de hinchado en agua llevado a cabo durante la fase de preparación de la plataforma inicial en las IPNs del Método 3 aumentaría dicha interconectividad y con ella la efectividad de la inyección del segundo polímero.

Al analizar en los diámetros medios de poro de los *scaffolds* en seco, comparándolos con el valor de ω_{PEA} en los mismos (Figura 4.1), se aprecia que tienden a disminuir ligeramente, pero logran mantenerse en los mismos rangos; algo esperable si tenemos en cuenta el uso de moldes durante la preparación de las muestras. No obstante, si nos fijamos en los valores de porosidad respecto a ω_{PEA} (Figura 3.3) se ve claramente como en I50NS el valor de porosidad disminuye en gran medida, lo cual podría indicar que el monómero de EA ha disuelto el porógeno, si no fuera porque el tamaño de poros se mantiene, y además el residuo de PEA tras la degradación de I50NS (fotografiado en la Figura 3.10) posee un valor de porosidad del 87%. Esto es indicativo de que en las IPNs de I50NS, a diferencia del resto de IPNs, la fase PEA logra invadir en mayor medida todos los espacios creados en la plataforma inicial de HA, llegando a crear una estructura continua y aun así manteniendo los niveles de porosidad atribuibles a la estructura de porógeno.

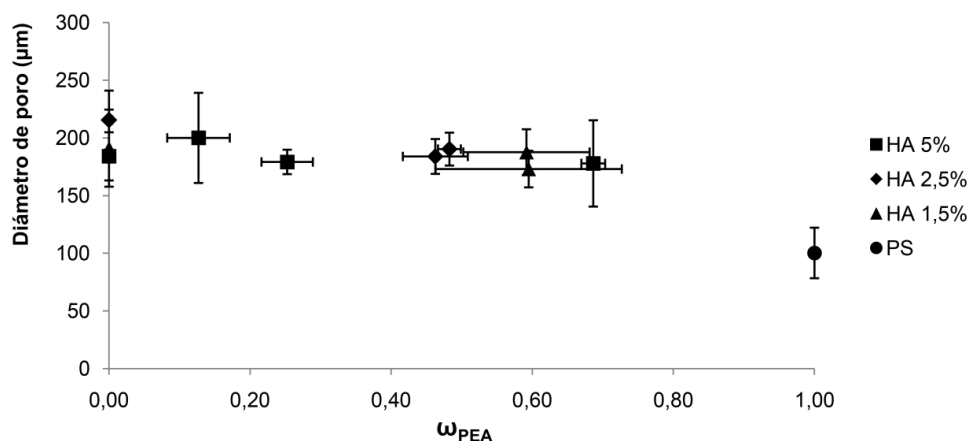


Figura 4.1 Relación entre el diámetro medio de poro medido en seco y el porcentaje en masa de PEA (ω_{PEA}) incorporado en las IPNs.

4.2. Caracterización de los *scaffolds*

A través de las propiedades de las distintas IPNs obtenidas, y la comparación con los correspondientes *scaffolds* de HA, podemos llegar a extrapolar cómo afecta la incorporación del PEA en las mismas, e incluso cómo se distribuye por los distintos materiales. Sabemos, por los resultados de la primera IPN, que el PEA polimeriza en los espacios creados por el HA tras la liofilización, principalmente en canales del interior de las trabéculas y en el interior de los poros, entre el HA y el porógeno. Pero las distintas variantes de IPN pueden dar lugar a variaciones en las plataformas iniciales de HA, y/o en la forma que el PEA polimeriza en las mismas.

Las distintas IPNs producidas presentan un menor EWC en humedad relativa en comparación con las plataformas iniciales control de HA, algo que cabe esperar debido a la naturaleza hidrofóbica de la fase PEA que contribuye a su masa en seco (ver Figura 4.2). Sin embargo, es posible que se produzca una reducción en la capacidad higroscópica de la fase HA por los procesos adicionales de liofilizado y exposición a UV que ocurrirían durante la síntesis de las IPN a diferencia de los *scaffolds* de HA,

puesto que estos procesos serían capaces de degradar parcialmente las cadenas de alto peso molecular del HA en fragmentos más pequeños, disminuyendo la capacidad de retención de agua de las redes de glicopolisacárido [225, 227].

Por otro lado, el hinchamiento de los *scaffolds* de IPN podría verse afectado adicionalmente por un constreñimiento volumétrico por parte de la fase no higroscópica de PEA, algo visible en el ratio de engrosamiento o estiramiento de las muestras medido en los ensayos de hinchamiento (ver Tabla 3.1). No obstante, este constreñimiento sería parcial en el caso de que las estructuras de PEA carezcan de continuidad, como se puede observar en el cryoSEM de las muestras degradadas (Figura 3.10 C y D).

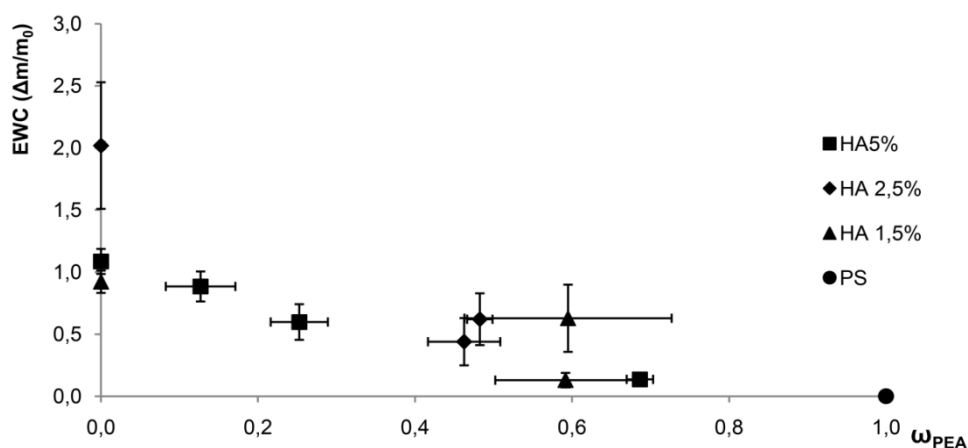


Figura 4.2 Relación entre el contenido en agua en equilibrio (en humedad relativa del 98%) y el porcentaje en masa de PEA (w_{PEA}) incorporado en las IPNs, en función de la concentración de HA de sus plataformas iniciales. Nótese que el peso de PEA no se ha eliminado en el cálculo de EWC, por lo que no se miden diferencias en la absorción de agua del HA sino las propiedades del scaffold.

Las medidas de densidad (o volumen específico) de las muestras no permite extrapolar la composición de las mismas, e incluso presentan grandes diferencias entre las plataformas iniciales dependiendo de la concentración de HA usada (ver Figura 4.3).

En este sentido, parecen guardar algún tipo de similitud con las medidas de hinchamiento en HR (Figura 4.2).

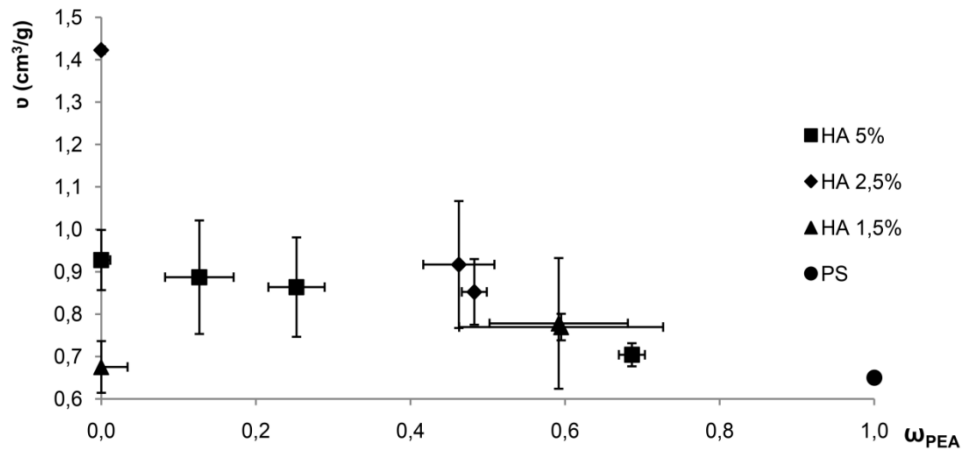


Figura 4.3 Relación entre las medidas de volumen específico de las muestras y su porcentaje en masa de PEA (ω_{PEA}), en función de la concentración de HA de sus plataformas iniciales.

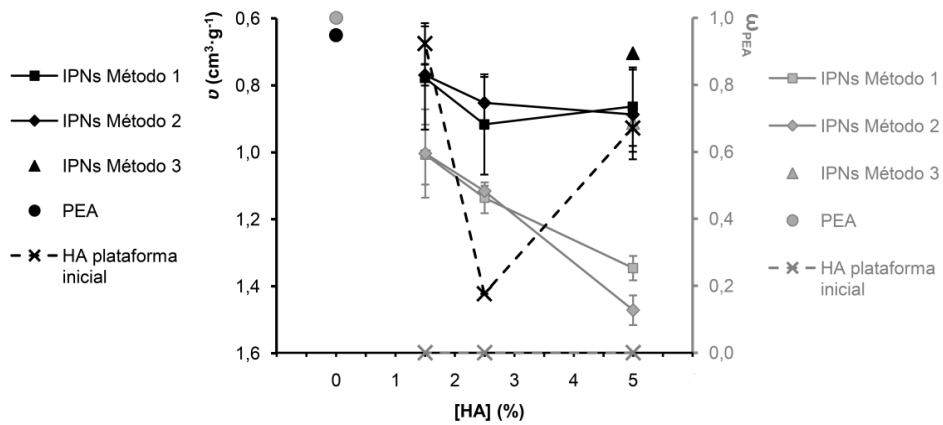


Figura 4.4 Gráficas superpuestas indicando por un lado la relación entre las medidas de volumen específico de las muestras y la concentración de HA de sus plataformas iniciales (eje vertical izquierdo) y por otro lado la relación entre su porcentaje en masa de PEA (ω_{PEA}) y la concentración de HA de sus plataformas iniciales (eje vertical derecho).

Si comparamos tanto el volumen específico (v) como la proporción de PEA (ω_{PEA}) en relación a la concentración de HA usada ($[HA]$, ver Figura 4.4), vemos cómo la variación que ocurre entre los valores de v de las plataformas iniciales deja de producirse entre las IPNs de los métodos 1 y 2, y parece no afectar a la proporción de PEA que acaban incorporando. No obstante, mientras que para las IPNs con plataforma inicial de HA al 2.5% su v disminuye acercándose al del PEA, en el caso de las del 5% su valor de v se aleja tanto del de su plataforma inicial como del v del PEA.

4.2.1. Composición de las IPNs

La masa residual del TGA de las IPNs y los otros *scaffolds* de PEA y HA a 800°C han permitido estimar la composición relativa al porcentaje másico de sus componentes, tras comprobar que los valores obtenidos concuerdan con el análisis elemental cuantitativo en FESEM.

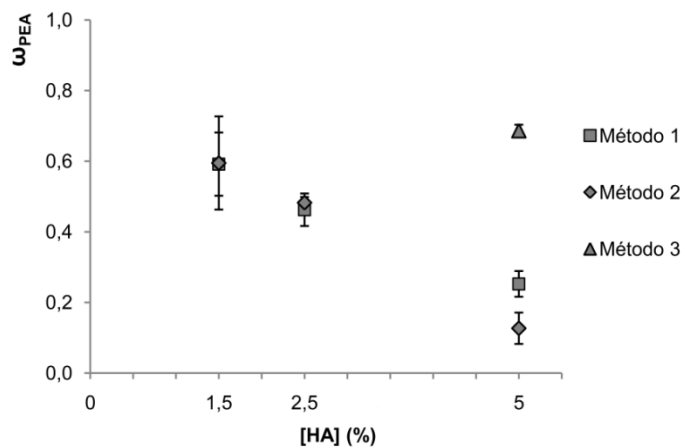


Figura 4.5 Representación de los valores obtenidos en el porcentaje final en masa de PEA en las IPNs (ω_{PEA}), con respecto a la concentración de HA de sus plataformas iniciales y del método de síntesis usado.

Una vez establecidos los valores de composición de las IPN, resulta de interés compararlos con las técnicas usadas en la obtención de las mismas. Como se aprecia en la Figura 4.5, hay una relación lineal entre el ω_{PEA} de las IPNs obtenidas y la

concentración de HA en solución para la preparación de la plataforma inicial ([HA]). Por otro lado, la dilución de la mezcla de polimerización del PEA con etanol apenas disminuye la cantidad de polímero final en el compuesto (Método 2) frente a la no dilución (Método 1). Lo que si resulta determinante es el tratamiento de hinchado del hidrogel de HA antes de congelar y liofilizar (Método 3), pues al parecer aumenta la interconectividad de los espacios creados para la inyección del monómero de EA, lo que a su vez permite la creación de una red continua de PEA que se retiene tras el lavado de las muestras, a diferencia de lo que puede ocurrir en el resto de las IPNs.

4.2.2. Degradación

Los primeros ensayos de degradación revelan que los *scaffolds* de HA y HA-i-PEA son particularmente resistentes a la degradación con hialuronidasa (Figura 2.9), según los protocolos usados, distinguiéndose por muy poco del control en PBS a pH 7.4. No obstante, podemos esperar que la densidad de entrecruzamiento del HA sea especialmente alta, dado el ratio molar de monómero de HA contra el DVS usado en la reacción de gelificación, cercano a 1:1, lo que reduciría en efecto la degradabilidad del HA [209, 260]. Este hecho se produciría en el caso de haberse logrado un alto rendimiento de la reacción [213] (especialmente si se evita la polimerización del DVS), resultando en una red de HA muy resistente a la degradación por enzimas, como se ha visto en otros estudios semejantes [260]. Por otro lado, se sabe que la exposición del HA a procesos de liofilizado y luz UV (como en el caso de la IPN) puede fragmentarlo y crear oligómeros en el hidrogel que aumentan su degradabilidad [225-228, 260]. Pero si el entrecruzamiento es tan alto que se producen distancias internodales de uno o pocos disacáridos, la degradación a esperar sería la que observamos en nuestros experimentos, ya que dichos efectos por liofilización y UV afectarían solamente a las cadenas más largas de HA [227].

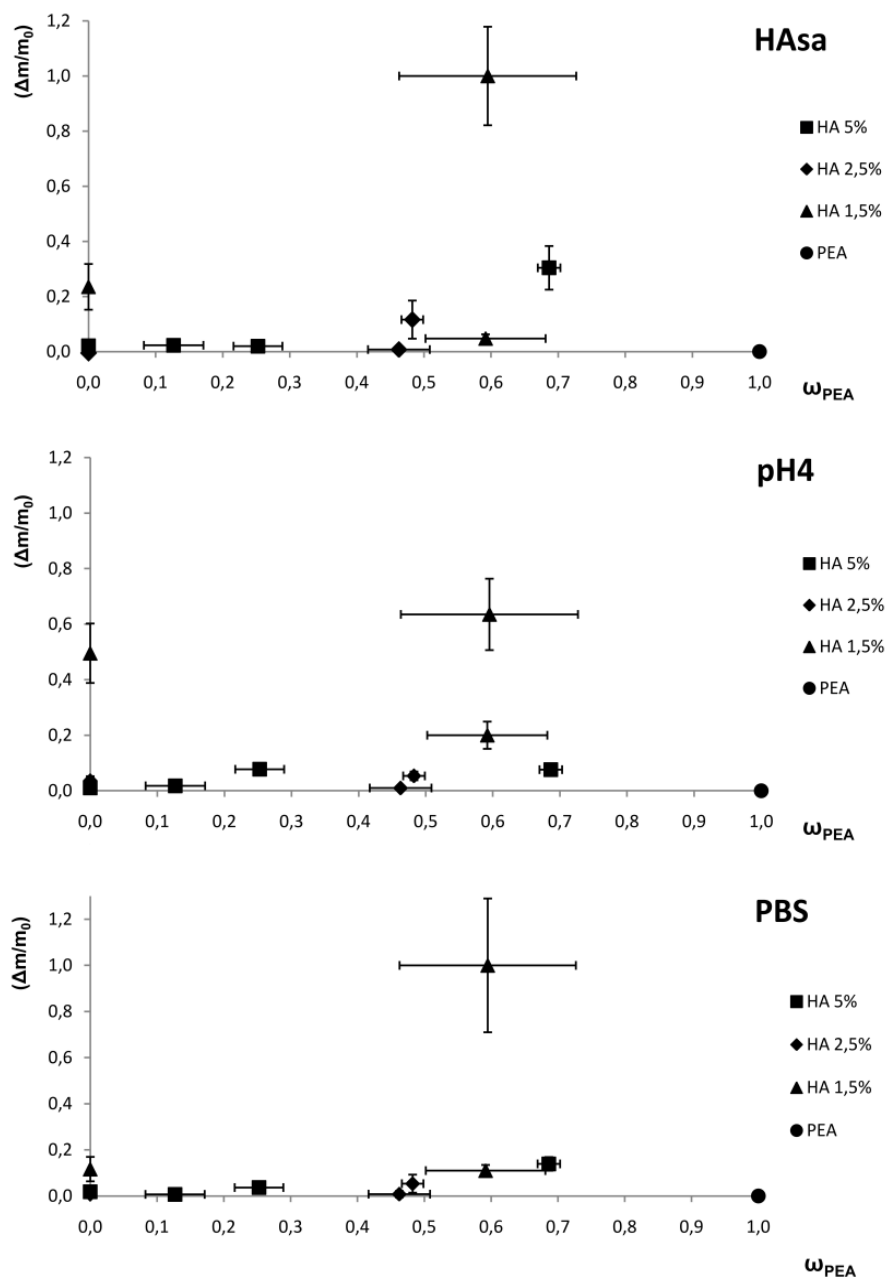


Figura 4.6 Nivel de degradación de la fracción de ácido hialurónico (HA) frente al porcentaje másico de PEA (ω_{PEA}) y la concentración de HA de la plataforma inicial.

Los resultados de la degradación en medios acuosos parecen indicar que, más que por la incorporación de una fase PEA, la degradabilidad de la estructura de HA de los materiales depende principalmente de los procesos de síntesis de la plataforma inicial (Figura 4.6). En primer lugar, los *scaffolds* producidos a partir del hidrogel de HA al 1,5% tendieron a desintegrarse a lo largo del ensayo (con excepción de I15N), dando lugar a los niveles de degradación registrados a través de la cuantificación de residuos de HA en el sobrenadante. Esto se debe, muy probablemente, a la endeble estructura trabecular de estos *scaffolds*, algo que en ciertos casos sería compensado por la presencia estructural del PEA. No se observa esta desintegración en ninguno de los *scaffolds* con [HA] al 2,5% y 5%.

Si comparamos la degradabilidad de los materiales procedentes del HA al 5% podemos apreciar que el factor más destacable se corresponde al Método 3, es decir al hinchamiento previo a la congelación y liofilizado del hidrogel de HA (que se corresponde al mayor valor de ϕ_{PEA} de todas las muestras). Se ha visto que esta parte del proceso puede aumentar en gran medida la cantidad e interconectividad del EA que polimeriza y se retiene en la plataforma inicial de HA, por lo que es razonable que también ayude a exponer cadenas o fragmentos de HA para que sean liberados tras la hidrólisis, o para que sean alcanzados por las unidades de hialuronidasa, o ambos. Es posible también que el tratamiento de hinchamiento de I50NS reduzca la efectividad del entrecruzamiento con respecto a los otros tipos de IPN, al separar las cadenas del hidrogel de HA mediante el agua absorbida, aumentando las distancias internodales del hidrogel. Esto explicaría también la mayor degradación específica mediante hialuronidasa de estos materiales.

4.2.3. Propiedades mecánicas

Tras comprobar el refuerzo mecánico a la tracción que se produjo tras la incorporación del PEA al HA en la primera IPN, se realizó un estudio sobre la respuesta a la compresión de las diferentes variantes de IPN. Al analizar el módulo de compresión las

dos principales fases de la compresión - el colapso de la estructura trabecular (módulo 1) y la densificación (módulo 2) -, se puede extrapolar la distribución de sendos componentes en cada material (Figura 4.7). En todas las IPNs, con excepción de I50NS (Método 3), la incorporación de PEA no supone un refuerzo de cara al colapso de la estructura trabecular. Esto debe de asociarse a una falta de interconectividad de las estructuras de PEA en la dirección de la compresión. Por otra parte, apenas aparece un aumento del módulo 2 correspondiente a la densificación del material en la mayoría muestras, algo atribuible al menor hinchamiento en agua y por tanto menor resistencia a compresión de la estructura HA en las IPNs (si tenemos en cuenta la incompresibilidad del agua retenida en el interior de la fase de hidrogel).

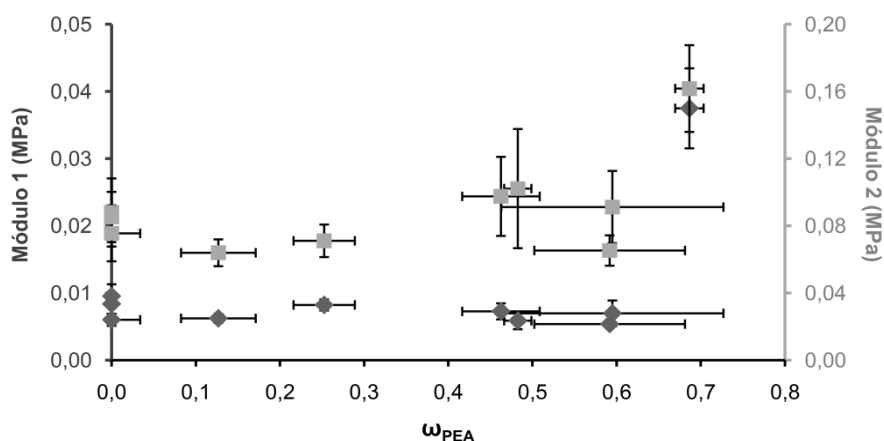


Figura 4.7 Gráficos superpuestos relacionando los dos principales módulos de respuesta a la compresión con la incorporación efectiva de PEA en las muestras (ω_{PEA}), en diferentes escalas para facilitar la representación. A la izquierda se muestra el eje correspondiente al módulo de colapso de las trabéculas (puntos en gris oscuro), y a la derecha se muestra el eje correspondiente al módulo de densificación (puntos en gris claro).

Con tal de discernir mejor el tipo de distribución de ambas fases tras el hinchamiento de la fase HA, se tomó el modelo de Takayanagi [261] para modelizar los dos procesos de compresión de los *scaffolds* en el TMA: el colapso de los poros y la densificación; usando como referencia los valores del módulo de los *scaffolds* de PEA y plataforma inicial de HA al 2,5% (H25). Para ello, se asumió un modelo de distribución dispersa

de la fase PEA en una matriz de HA (esquema en Figura 4.8), para diferentes valores del factor de dispersión λ .

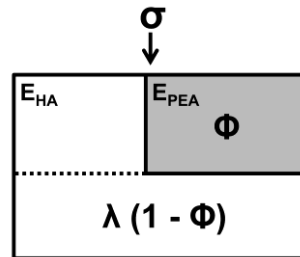


Figura 4.8 Esquema representativo de un modelo de Takayanagi. La parte gris representa el componente disperso del material que ocupa un porcentaje volumétrico ϕ , y λ representa el factor de dispersión de dicho componente con respecto a la fase continua del material. En la parte superior se indica la dirección del esfuerzo mecánico ejercido sobre el material (σ).

Los módulos de respuesta a compresión (σ) de los modelos Takayanagi se calcularon según la fórmula:

$$\frac{1}{E'_{IPN}} = \frac{1 - \xi}{\psi E_{PEA} + (1 - \psi) E_{HA}} + \frac{\xi}{E_{HA}}$$

Para $\xi = \lambda(1 - \phi)$; $\psi = \frac{\phi}{(1 - \xi)}$. ϕ se corresponde con la fracción volumétrica de PEA y λ representa la fracción volúmica de la fase continua que trabaja mecánicamente en serie (misma tensión) y que, por lo tanto, da idea del grado de dispersión de los componentes en la dirección de la compresión (esquema en Figura 4.8).

Con tal de obtener la fracción volumétrica en seco del PEA (ϕ'_{PEA}), se partió de los datos de fracción másica y volumen específico de las IPNs en seco, además del valor de volumen específico del PEA, según la fórmula:

$$\phi'_{PEA} = \frac{V_{PEA}}{V_{IPN}} = \frac{m_{PEA} \cdot v_{PEA}}{m_{IPN} \cdot v_{IPN}} = \frac{m_{IPN} \cdot \omega_{PEA} \cdot v_{PEA}}{m_{IPN} \cdot v_{IPN}}$$

$$\phi'_{PEA} = \frac{\omega_{PEA} \cdot v_{PEA}}{v_{IPN}}$$

Donde ω_{PEA} es la fracción másica de PEA en la muestra y υ_{IPN} y υ_{PEA} son los valores de densidad de ambas fases calculadas a través de las medidas en las IPNs y el control de PEA (ver apartado 2.3.2).

No obstante, al haberse realizado la compresión con las muestras inmersas en agua, debe tenerse en cuenta que el agua y el HA hidratado pasan a ocupar un espacio adicional en los *scaffolds*, mientras que el PEA mantiene su volumen. Si se supone que la porosidad de los materiales no varía tras el hinchado, se puede asumir que el volumen del HA aumenta en la misma proporción en la que lo hacen los discos de IPN durante el hinchado (V/V_0). Por ese motivo, y para calcular más fielmente la fracción volumétrica de PEA en la IPN hinchada (φ_{PEA}), se midió el aumento volumétrico de los materiales antes de las medidas de compresión. De este modo se usó la fórmula:

$$\varphi_{PEA} = \frac{V_{PEA}}{V_{IPN} + V_{HA} \cdot \left(\frac{V}{V_0}\right)}$$

Donde (V/V_0) es el incremento promedio del volumen de cada tipo de muestra tras el hinchamiento. Por otra parte, el volumen ocupado por el HA en la IPN seca puede expresarse según la fórmula:

$$V_{HA} = V_{IPN} - V_{PEA} = m_{IPN} \cdot \upsilon_{IPN} - m_{IPN} \cdot \omega_{PEA} \cdot \upsilon_{PEA}$$

Si combinamos las fórmulas anteriores, obtenemos la fórmula para calcular la fracción volumétrica de PEA tras el hinchado.

$$\varphi_{PEA} = \frac{m_{IPN} \cdot \omega_{PEA} \cdot \upsilon_{PEA}}{m_{IPN} \cdot \upsilon_{IPN} + (m_{IPN} \cdot \upsilon_{IPN} - m_{IPN} \cdot \omega_{PEA} \cdot \upsilon_{PEA}) \cdot \left(\frac{V}{V_0}\right)}$$

$$\varphi_{PEA} = \frac{\omega_{PEA} \cdot \upsilon_{PEA}}{\upsilon_{IPN} + (\upsilon_{IPN} - \omega_{PEA} \cdot \upsilon_{PEA}) \cdot \left(\frac{V}{V_0}\right)}$$

Tras introducir los valores de ambos módulos de las IPNs en las gráficas, junto con los modelos de distribución de Takayanagi (Figura 4.9.B y .C), puede apreciarse como en

la mayoría de las IPNs la fase PEA apenas aporta resistencia a la compresión, debido a una distribución dispersa y discontinua. Eso no ocurre en los *scaffolds* de I50NS (valor mayor de φ_{PEA}), pues tienen una mayor presencia de PEA en las trabéculas, tal y como vemos en el modelo para la primera compresión (Figura 4.9.B), donde el valor de λ es cercano a 0.1, mientras que en la compresión en bloque o densificación (Figura 4.9.C) pasa a ser de 0.75. De hecho, la distribución continua del PEA en la estructura trabecular de I50NS (Método 3) podría interpretarse también como un modelo Takayanagi en el que el HA sea la fase dispersa del material. Lo que se puede apreciar es en el modelo para el colapso de los poros es que I50NS (Método 3) se distribuye prácticamente forma continua en la dirección de la compresión ($\lambda=0.1$), mientras que en la fase de densificación, una vez colapsados los poros, se corresponde con un modelo de distribución dispersa, con un valor de λ cercano a 0.75. Esto indica que el PEA efectivamente crea una estructura continua en el interior de los *scaffolds* de I50NS creando el refuerzo mecánico observado, si bien el HA hidratado sigue ocupando gran parte de la estructuras y confiere un comportamiento menos rígido en las zonas internas del material.

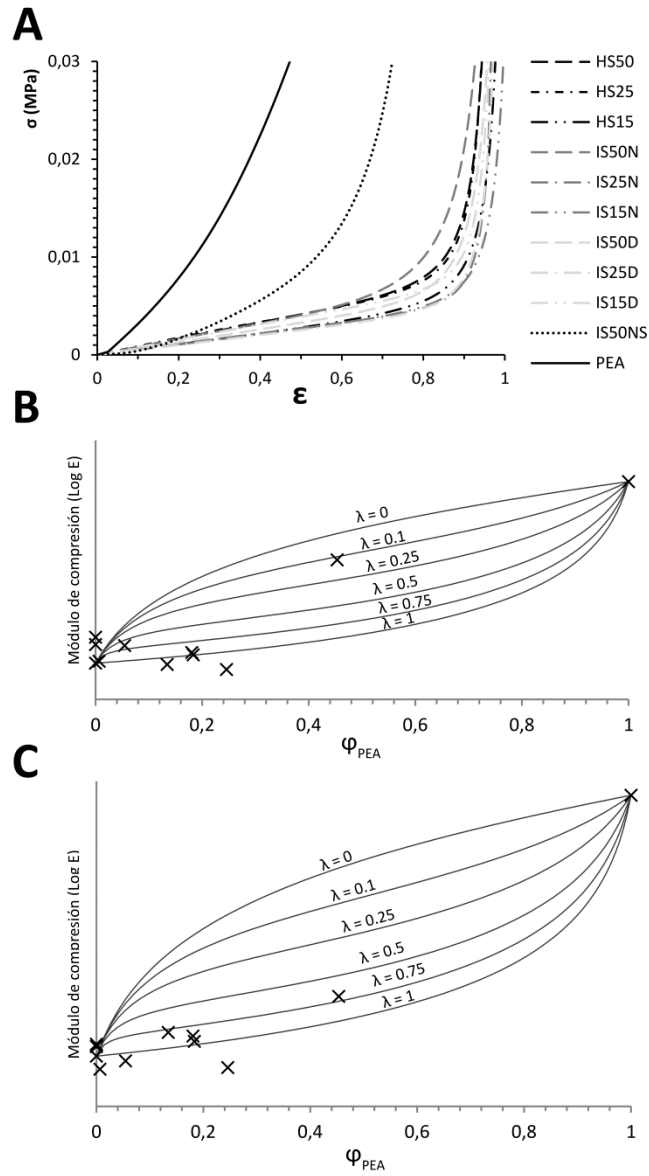


Figura 4.9 Curvas de compresión contra deformación de las distintas muestras (A); curvas teóricas de módulo de compresión respecto a fracción volumétrica del componente disperso, o ϕ , del modelo de Takayanagi aplicando varios valores al factor de dispersión λ y tomando al PEA como componente disperso de la IPN y la plataforma inicial H15 como módulo de referencia para la fase continua de HA, tanto en la fase de colapso de poros (B) como en la posterior densificación (C).

4.3. Estudios *in vitro* con fibroblastos L929

4.3.1. Citotoxicidad de los materiales

La citotoxicidad de los materiales se evaluó de dos formas distintas. En primer lugar, la citotoxicidad indirecta pretende medir la liberación al medio por parte de los materiales de aquellas sustancias que interfieran en los procesos celulares de forma que se vea afectada su supervivencia o proliferación. Esto se mide a través de la actividad celular con el uso de moléculas como el MTT y el MTS, que son indicadoras de la actividad mitocondrial a través de las enzimas reductasas de ese orgánulo. Al reducir estas moléculas a formazan, de color liláceo, permite medir por espectrometría la presencia de las mismas tras reaccionar. Los estudios *in vitro* con extractos de los materiales en fibroblastos L929 permitieron comprobar de forma sencilla que los materiales no presentan citotoxicidad a nivel celular en contraste con los controles, si bien aún podrían aparecer otras interacciones a nivel de tejidos u órganos tras el implante. Este tipo celular fue escogido por ser un modelo ampliamente usado en la bibliografía, tanto en estudios de citotoxicidad como en otros tipos de estudio. Por otra parte, el estudio de viabilidad de los cultivos de esas mismas células sembradas directamente sobre los materiales resulta de interés para determinar su potencial en posteriores aplicaciones biomédicas, ya que no todos los materiales son adecuados como sustrato o incluso podrían resultar citotóxicos por contacto directo con la célula viva. En el caso de esta línea de fibroblastos se puede apreciar que los cultivos proliferan favorablemente, produciéndose la adhesión, proliferación e invasión de la superficie y el interior de estos materiales por parte de las células (Figuras 3.13, 3.14, 3.15 y 3.16).

4.3.2. Adhesión y proliferación celular en los distintos scaffolds

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, los ensayos MTS de los cultivos realizados sobre los materiales revelan que las células pueden proliferar sin problemas sobre los materiales. De hecho, los resultados muestran que la proliferación en los *scaffolds* de HA es mayor incluso que en el PEA, un hecho que no estaba previsto, ya

que el HA no es una molécula de adhesión celular *per se* sino que debe interactuar con otras proteínas de la matriz para permitir el anclaje celular. Además, en forma de hidrogel no permite adhesión celular de ningún tipo ya que las células no son capaces de detectar un sustrato rígido, si bien en este caso se encuentra entrecruzado de forma que se comporta hasta cierto grado como un sustrato rígido. Dicho esto, los altos niveles de proliferación encontrados siguen sin ser los esperados [197] en comparación con los del PEA, un sustrato que ya ha demostrado un alto rendimiento tras la siembra de células en anteriores estudios [89, 251, 262, 263]. Estos resultados pueden explicarse por distintos motivos que son además compatibles entre sí. En primer lugar, el tamaño y porosidad de los *scaffolds* de PEA es menor que el del HA una vez hinchado en el medio (un 62% de porosidad del PEA contra un 96-97% del HA y la IPN, y un tamaño un 54% menor que el de los *scaffolds* de HA hinchados, de acuerdo a las medidas (ver Tabla 3.1); y por lo tanto también es menor la superficie disponible para las células sobre el PEA. En segundo lugar, las células se extienden más sobre el PEA que sobre el HA (si atendemos a las imágenes obtenidas por fluorescencia de la actina), reduciendo el número de ellas necesario para alcanzar la confluencia. En tercer lugar, la adhesión de las células al HA (que debería ser baja) se ve favorecida por el pretratamiento en medio de cultivo antes de la siembra, puesto que dicho medio contiene FBS y por tanto fibronectina soluble, capaz de unirse al HA y ser reconocido por las células para adherirse al sustrato [104, 264, 265], de modo que se enmascara el efecto producido por el tipo de sustrato [266]. Se sabe además que el HA potencia el efecto de adhesión inicial mediada por fibronectina en los fibroblastos, través de sus receptores específicos en la superficie celular [104, 229, 267]. Por último, la creación de oligómeros de HA en el mismo mediante la liofilización favorecerían de forma adicional la adhesión de las células [227, 228, 260, 268]. Pese a todo, la IPN muestra un valor de proliferación igual o mayor que el HA en todos los tiempos (Figura 3.14).

La observación del citoesqueleto de actina de las células sobre los distintos materiales a día 10 (Figura 3.16) permite distinguir el efecto de cada material en su comportamiento

celular. La morfología del mismo es un indicador de la fuerza con la que las células se adhieren al sustrato, o incluso si se desplazan sobre él, y su correcta formación es necesaria para activar diversas funciones celulares, e incluso para activar la diferenciación celular a través de distintas vías de señalización. En primer lugar, puede observarse cómo la superficie altamente hidrofóbica del PEA produce una morfología extendida en las células (Figura 3.16.A y .A'), característica de sustratos rígidos [84, 135], aunque por otro lado esto limita la superficie disponible y por tanto el crecimiento celular a través de la inhibición por contacto entre células, como se refleja en el ensayo con MTS (Figura 3.14).

En los *scaffolds* de HA, las aparición manchas de actina sin alinear revela un comportamiento dinámico del citoesqueleto (Figura 3.16.B y .B'), algo que esperable debido a que el HA promueve la motilidad celular a través de la desactivación de las uniones focales mediante el receptor RHAMM [84, 231]. Estas manchas suelen aparecer en las fases iniciales de la polimerización del citoesqueleto de actina, cerca del lado citoplasmático de las integrinas unidas al sustrato, en procesos de adhesión celular y movilidad celular mediante lamelipodios [269]. Dichas manchas suelen desaparecer minutos después de formarse, al desplazarse y unirse los cúmulos de actina en frentes que llegan hasta el borde de la célula, extendiendo la superficie celular en contacto con el sustrato y ayudando así a expandir la célula sobre el mismo [58]. No obstante, en el HA aparecen estas manchas junto con fibras de actina típicas de adhesiones focales estables. Esto puede explicarse ya que las adhesiones focales son compatibles sobre este tipo de material –poco rígido– una vez se ha llegado a la confluencia, cuando las células son capaces de crear uniones entre ellas, camuflando en parte el efecto producido por la rigidez del sustrato en la morfología de la actina [83, 84]. Según esto, las células podrían mostrar tanto las fibras de tensión de actina derivadas de la adhesión célula-célula, a la vez que un proceso interrumpido (incluso activo) de adhesión o migración sobre un sustrato secundario.

Por último, en los *scaffolds* de HA-i-PEA (Figura 3.16.C y .C') las células no muestran las manchas de actina mencionadas (o por lo menos éstas no son tan visibles), si bien son capaces de crecer con una densidad superior a la vista en el PEA y con una morfología más fusiforme. Esto estaría relacionado con la disponibilidad de ambos polímeros en la superficie del material, con lo que cabría esperar un proceso de durotaxis, o migración celular hacia las áreas de sustrato más rígido; pero este fenómeno también se vería anulado una vez se alcanza la confluencia del cultivo. No obstante, y a diferencia de lo que ocurre en los fibroblastos en confluencia sobre el HA, algunas células de la monocapa se encontrarían presumiblemente ancladas a zonas de sustrato más rígido (PEA), desde donde podrían transmitir esfuerzos de tensión al resto de células a través de la matriz extracelular [166]. Esto es compatible con la observación de una alta colonización y densidad celular en los *scaffolds* de la IPN, semejantes o superiores a los de HA, junto con la formación de un citoesqueleto de actina maduro más semejante al observado en las células cultivadas sobre PEA.

Cabe recalcar que el comportamiento observado de los cultivos sobre la IPN se corresponde a la primera variante de material, donde las estructuras de PEA carecen de continuidad, si tenemos en cuenta el análisis mecánico y la comparación con el modelo de Takayanagi realizados. Aunque las células dispongan de un sustrato variable de PEA y HA en el interior de los *scaffolds* en todas las IPNs, el uso de una IPN con PEA continuo como es el caso de I50NS abriría la posibilidad realizar cultivos celulares con estímulos mecánicos externos combinados con nichos de sustrato blando en forma de hidrogel de HA.

Capítulo 5.

Conclusiones

La hipótesis inicial de este trabajo defendía que *es posible combinar el ácido hialurónico con un polímero acrílico, concretamente el polietilacrilato, en un mismo material con aspecto de scaffold; de modo que se puedan mantener las propiedades bioactivas del primero a la vez de que se modifiquen sus propiedades físicas como material y la adhesión celular a través de la incorporación del segundo.*

Con tal de demostrarlo fueron fijados los primeros objetivos:

1. *Obtener scaffolds compuestos por redes interpenetradas (IPNs) de ácido hialurónico y polietilacrilato, o HA-i-PEA.*
2. *Medir las propiedades de los scaffolds de HA-i-PEA obtenidos y compararlas con las de scaffolds de sus dos componentes por separado, incluyendo su citotoxicidad y adhesión celular en cultivos in vitro de fibroblastos L929.*

Estos objetivos fueron completados mediante la síntesis de la primera IPN de HA-i-PEA junto con su caracterización y estudios *in vitro*. Las propiedades del material obtenido desvelaron que ambos materiales se encuentran incorporados en los *scaffolds*, reduciéndose el hinchamiento de agua con respecto a los *scaffolds* de HA. Del mismo modo, se apreció una respuesta celular positiva en cultivo, con ausencia de citotoxicidad directa o indirecta y una adhesión celular diferenciada con respecto al PEA y al HA por separado tras observar el citoesqueleto de actina de los fibroblastos L929. Por tanto, los resultados obtenidos confirman la validez de la primera hipótesis inicial de esta tesis.

La segunda hipótesis inicial planteó que *es posible obtener distintas proporciones de ambos componentes para así controlar las propiedades del biomaterial resultante.*

Para demostrarlo fueron fijados los diferentes objetivos:

3. *Obtener scaffolds de HA-i-PEA con diferentes proporciones de cada componente mediante variaciones en el método de síntesis.*
4. *Medir las propiedades de los distintos scaffolds de HA-i-PEA obtenidos, comparándolas con la proporción de sus componentes.*

Tras realizar varias modificaciones en el método inicial de síntesis se obtuvo una serie de *scaffolds* de IPN HA-i-PEA con distintas propiedades. Los resultados del TGA sirvieron para calcular la fracción másica de PEA en las muestras mediante un método validado a través de EDS en la primera IPN. Los datos de composición demostraron que se habían obtenido diferentes proporciones de PEA en los constructos, y a su vez permitieron revelar la aportación de dicho polímero al conjunto de propiedades de las IPNs, así como el efecto producido por cada paso de síntesis en las propiedades del componente HA. El análisis de todos los datos experimentales obtenidos permite afirmar que el límite de incorporación máxima de PEA, así como la distribución y conectividad de la red de PEA resultante dependen principalmente de la preparación de la plataforma inicial de HA. Asimismo, el componente HA no se vio afectado químicamente por la incorporación del PEA, por lo que sus propiedades finales en la IPN dependen únicamente de los procesos previos al liofilizado. Este hecho resulta de interés ya que supone que el HA podría llegar a usarse sin ningún tipo de modificación, incluyendo el uso de reticulantes químicos. La técnica aquí desarrollada permite el uso de varios diseños de matriz porógena, incluyendo moldes tridimensionales producidos por impresión 3D que se adapten a la terapia clínica. Por lo tanto, se confirma la segunda y última hipótesis inicial planteada en esta tesis.

En conclusión, puede afirmarse que los objetivos de la presente tesis quedan satisfechos, y ambas hipótesis iniciales confirmadas. No obstante, restan muchas

posibilidades de estudio para con estos materiales, en cualquiera de sus variantes, y más aún si tenemos en cuenta todos los posibles ensayos con cultivos *in vitro*. Entre las muchas posibilidades que ofrece la técnica de síntesis está el desarrollo de *scaffolds* obtenidos mediante moldes negativos producidos por extrusión de dos materiales en impresoras 3D. Este tipo de moldes permitirían retirar uno de los dos negativos tras liofilizar el HA, aumentando los espacios disponibles para la inyección y polimerización del PEA y creando así zonas del *scaffold* donde la estructura del PEA sea continua y refuerce en mayor grado las propiedades mecánicas de la IPN de HA-i-PEA. De este modo, el abanico de posibilidades de estos materiales haría factible su uso en gran variedad de tejidos, desde sistema nervioso hasta piel o cartílago, donde la presencia de HA de alto peso molecular resultaría altamente beneficiosa en procesos regenerativos.

Referencias

1. Sun A, Parisius W, Macmorine H, Sefton M, Stone R. *An artificial endocrine pancreas containing cultured islets of Langerhans*. *Artif Organs*. 1980;4(4):275-8.
2. Kim J-H, Yoo S-J, Oh D-K, Kweon Y-G, Park D-W, Lee C-H, et al. *Selection of a Streptococcus equi mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid*. *Enzyme Microb Technol*. 1996;19(6):440-5.
3. Rangaswamy V, Jain D. *An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*. *Biotechnology letters*. 2008;30(3):493-6.
4. Ueda H, Hong L, Yamamoto M, Shigeno K, Inoue M, Toba T, et al. *Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor- β 1 to promote bone repair in skull defects in rabbits*. *Biomaterials*. 2002;23(4):1003-10.
5. Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S. *Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003;65(4):489-97.
6. Gómez Sazo RE, Maenaka K, Gu W, Wood PM, Bunge MB. *Fabrication of growth factor- and extracellular matrix-loaded, gelatin-based scaffolds and their biocompatibility with Schwann cells and dorsal root ganglia*. *Biomaterials*. 2012;33(33):8529-39.
7. Körbling M, Katz RL, Khanna A, Ruirok AC, Rondon G, Albitar M, et al. *Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells*. *N Engl J Med*. 2002;346(10):738-46.
8. Thomas ED, Lochte Jr HL, Lu WC, Ferrebee JW. *Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy*. *N Engl J Med*. 1957;257(11):491-6.
9. Gao P. *Turning "Waste" Into Gold: Identification of Novel Stem Cells From Human Umbilical Cord Blood*. *N Engl J Med*. 1957;257:491-6.

10. Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. *Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus*. The Journal of Neuroscience. 2001;21(18):7153-60.
11. Gaillard, Pieter J, Voorwinden, Levina H, Nielsen, Jette L, et al. *Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes*. Kindlington, ROYAUME-UNI: Elsevier; 2001.
12. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. *Stem cells find their niche*. Nature. 2001;414(6859):98-104.
13. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnab e-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. *Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin*. Nature cell biology. 2001;3(9):778-84.
14. Temple S. *The development of neural stem cells*. Nature. 2001;414(6859):112-7.
15. Song H, Stevens CF, Gage FH. *Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells*. Nature. 2002;417(6884):39-44.
16. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature. 2002;418(6893):41-9.
17. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science. 2007;318(5858):1917-20.
18. Kim D, Kim C-H, Moon J-I, Chung Y-G, Chang M-Y, Han B-S, et al. *Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins*. Cell stem cell. 2009;4(6):472.
19. Terasaki PI. *A brief history of HLA*. Immunol Res. 2007;38(1):139-48.
20. Sachs DH, Bach FH. *Immunology of xenograft rejection*. Hum Immunol. 1990;28(2):245-51.

21. Garry MG, Garry DJ. Humanized organs in gene-edited animals. *Future Medicine*; 2016.
22. Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, et al. *Tissue engineering of heart valves—human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves*. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1998;14(3):279-84.
23. Ribatti D, Conconi MT, Nico B, Baiguera S, Corsi P, Parnigotto PP, et al. *Angiogenic response induced by acellular brain scaffolds grafted onto the chick embryo chorioallantoic membrane*. *Brain Res*. 2003;989(1):9-15.
24. Hu J, Zhu Q-T, Liu X-L, Xu Y-b, Zhu J-K. *Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells*. *Exp Neurol*. 2007;204(2):658-66.
25. Ott HC, Matthiesen TS, Goh S-K, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*. *Nat Med*. 2008;14(2):213-21.
26. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. *In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells*. *Genes Dev*. 2003;17(10):1253-70.
27. Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, et al. *Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny*. *Science*. 2015.
28. Blau HM, Brazelton T, Weimann J. *The evolving concept of a stem cell: entity or function?* *Cell*. 2001;105(7):829-41.
29. Bibikova M, Chudin E, Wu B, Zhou L, Garcia EW, Liu Y, et al. *Human embryonic stem cells have a unique epigenetic signature*. *Genome Res*. 2006;16(9):1075-83.
30. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science*. 1999;284(5411):143-7.

31. Weissman IL. *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell. 2000;100(1):157-68.
32. Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoudé GA, Barrandon Y. *Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface*. Nature. 2008;456(7219):250-4.
33. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science. 1998;282(5391):1145-7.
34. Reubinoff BE, Pera MF, Fong C-Y, Trounson A, Bongso A. *Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro*. Nat Biotechnol. 2000;18(4):399-404.
35. Robertson EJ. *Teratocarcinomas and embryonic stem cells*: IRL; 1987.
36. Andrews PW. *From teratocarcinomas to embryonic stem cells*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2002;357(1420):405-17.
37. Solter D. *From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research*. Nature Reviews Genetics. 2006;7(4):319-27.
38. Rodriguez A-M, Elabd C, Amri E-Z, Ailhaud G, Dani C. *The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Biochimie. 2005;87(1):125-8.
39. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. *Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury*. Circulation. 2004;110(21):3300-5.
40. Segers VF, Tokunou T, Higgins LJ, MacGillivray C, Gannon J, Lee RT. *Local delivery of protease-resistant stromal cell derived factor-1 for stem cell recruitment after myocardial infarction*. Circulation. 2007;116(15):1683-92.
41. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy*. Circ Res. 2008;103(11):1204-19.

42. Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, Amado LC, Martin BJ, Pittenger MF, et al. *In Vivo Magnetic Resonance Imaging of Mesenchymal Stem Cells in Myocardial Infarction*. *Circulation*. 2003;107(18):2290-3.
43. Jendelová P, Herynek V, Urdzíkova L, Glogarova K, Kroupová J, Andersson B, et al. *Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord*. *J Neurosci Res*. 2004;76(2):232-43.
44. Syková EVA, Jendelová P. *Magnetic Resonance Tracking of Implanted Adult and Embryonic Stem Cells in Injured Brain and Spinal Cord*. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1049(1):146-60.
45. Ikada Y. *Challenges in tissue engineering*. *J R Soc Interface*. 2006;3(10):589-601.
46. Peppas NA, Langer R. *New challenges in biomaterials*. *Science*. 1994;263(5154):1715-20.
47. Hench LL. *Biomaterials: a forecast for the future*. *Biomaterials*. 1998;19(16):1419-23.
48. Hench LL. *Bioactive materials: the potential for tissue regeneration*. *J Biomed Mater Res*. 1998;41(4):511-8.
49. Shin H, Jo S, Mikos AG. *Biomimetic materials for tissue engineering*. *Biomaterials*. 2003;24(24):4353-64.
50. Rahmany MB, Van Dyke M. *Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review*. *Acta Biomaterialia*. 2013;9(3):5431-7.
51. Flaim CJ, Teng D, Chien S, Bhatia SN. *Combinatorial signaling microenvironments for studying stem cell fate*. *Stem cells and development*. 2008;17(1):29-40.
52. Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke W, Chen CS. *Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix*. *Cell stem cell*. 2009;5(1):17-26.

-
53. Marklein RA, Burdick JA. *Controlling stem cell fate with material design*. *Advanced Materials*. 2010;22(2):175-89.
54. Hubbell JA. *Biomaterials in tissue engineering*. *Nat Biotechnol*. 1995;13(6):565-76.
55. Bosman FT, Stamenkovic I. *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. *The Journal of Pathology*. 2003;200(4):423-8.
56. Piskin E. *Biodegradable polymers as biomaterials*. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1995;6(9):775-95.
57. Phillips JB, Bunting SC, Hall SM, Brown RA. *Neural tissue engineering: a self-organizing collagen guidance conduit*. *Tissue Eng*. 2005;11(9-10):1611-7.
58. Collin O, Tracqui P, Stephanou A, Usson Y, Clément-Lacroix J, Planus E. *Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility*. *J Cell Sci*. 2006;119(9):1914-25.
59. Xie J, MacEwan MR, Schwartz AG, Xia Y. *Electrospun nanofibers for neural tissue engineering*. *Nanoscale*. 2010;2(1):35-44.
60. Tibbitt MW, Anseth KS. *Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture*. *Biotechnol Bioeng*. 2009;103(4):655-63.
61. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. *RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond*. *Biomaterials*. 2003;24(24):4385-415.
62. Pérez ER, García Cruz DM, Araque Monrós MC, Gómez-Pinedo U, Pradas MM, Escobar Ivirico JL. *Polymer chains incorporating caprolactone and arginine-glycine-aspartic acid functionalities: Synthesis, characterization and biological response in vitro of the Schwann cell*. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2013;28(1):50-65.
63. Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, et al. *Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(8):2292-6.

64. Taipale J, Keski-Oja J. *Growth factors in the extracellular matrix*. The FASEB Journal. 1997;11(1):51-9.
65. Galler KM, Aulisa L, Regan KR, D'Souza RN, Hartgerink JD. *Self-assembling multidomain peptide hydrogels: designed susceptibility to enzymatic cleavage allows enhanced cell migration and spreading*. J Am Chem Soc. 2010;132(9):3217-23.
66. van Dijk M, van Nostrum CF, Hennink WE, Rijkers DT, Liskamp RM. *Synthesis and characterization of enzymatically biodegradable PEG and peptide-based hydrogels prepared by click chemistry*. Biomacromolecules. 2010;11(6):1608-14.
67. Nagase H, Woessner JF. *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem. 1999;274(31):21491-4.
68. Allo BA, Costa DO, Dixon SJ, Mequanint K, Rizkalla AS. *Bioactive and biodegradable nanocomposites and hybrid biomaterials for bone regeneration*. Journal of functional biomaterials. 2012;3(2):432-63.
69. Chen F-M, Wu L-A, Zhang M, Zhang R, Sun H-H. *Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: promises, strategies, and translational perspectives*. Biomaterials. 2011;32(12):3189-209.
70. Lee JH, Jung HW, Kang I-K, Lee HB. *Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups*. Biomaterials. 1994;15(9):705-11.
71. Lee JH, Khang G, Lee JW, Lee HB. *Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient*. J Colloid Interface Sci. 1998;205(2):323-30.
72. Miller C, Shanks H, Witt A, Rutkowski G, Mallapragada S. *Oriented Schwann cell growth on micropatterned biodegradable polymer substrates*. Biomaterials. 2001;22(11):1263-9.
73. Dewick PM. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*: John Wiley & Sons; 2002.
74. Lim F, Sun AM. *Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas*. Science. 1980;210(4472):908-10.

75. Bozkurt A, Deumens R, Beckmann C, Olde Damink L, Schugner F, Heschel I, et al. *In vitro cell alignment obtained with a Schwann cell enriched microstructured nerve guide with longitudinal guidance channels*. *Biomaterials*. 2009;30(2):169-79.
76. Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomidou L, et al. *Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung*. *Nat Med*. 2010;16(8):927-33.
77. Engelberg I, Kohn J. *Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study*. *Biomaterials*. 1991;12(3):292-304.
78. Kambic HE. *Biomaterials' mechanical properties*: ASTM International; 1994.
79. Oz MC, Konertz WF, Kleber FX, Mohr FW, Gummert JF, Ostermeyer J, et al. *Global surgical experience with the Acorn cardiac support device*. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2003;126(4):983-91.
80. Lv S, Dudek DM, Cao Y, Balamurali M, Gosline J, Li H. *Designed biomaterials to mimic the mechanical properties of muscles*. *Nature*. 2010;465(7294):69-73.
81. Neal RA, Jean A, Park H, Wu PB, Hsiao J, Engelmayer GC, Jr., et al. *Three-dimensional elastomeric scaffolds designed with cardiac-mimetic structural and mechanical features*. *Tissue Eng Part A*. 2012;19(5-6):793-807.
82. Dembo M, Wang Y-L. *Stresses at the Cell-to-Substrate Interface during Locomotion of Fibroblasts*. *Biophys J*. 1999;76(4):2307-16.
83. Lo C-M, Wang H-B, Dembo M, Wang Y-l. *Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate*. *Biophys J*. 2000;79(1):144-52.
84. Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, Marg B, Ortiz M, Funaki M, et al. *Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion*. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005;60(1):24-34.
85. Arinstein A, Burman M, Gendelman O, Zussman E. *Effect of supramolecular structure on polymer nanofibre elasticity*. *Nature nanotechnology*. 2007;2(1):59-62.

86. Dusunceli N, Colak OU. *Modelling effects of degree of crystallinity on mechanical behavior of semicrystalline polymers*. International Journal of Plasticity. 2008;24(7):1224-42.
87. Liu W, Merrett K, Griffith M, Fagerholm P, Dravida S, Heyne B, et al. *Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes*. Biomaterials. 2008;29(9):1147-58.
88. Lawrence BD, Marchant JK, Pindrus MA, Omenetto FG, Kaplan DL. *Silk film biomaterials for cornea tissue engineering*. Biomaterials. 2009;30(7):1299-308.
89. Alio del Barrio JL, Chiesa M, Gallego Ferrer G, Garagorri N, Briz N, Fernandez-Delgado J, et al. *Biointegration of corneal macroporous membranes based on poly(ethyl acrylate) copolymers in an experimental animal model*. J Biomed Mater Res A. 2015;103(3):1106-18.
90. Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud MV. *Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems*. Trends Biotechnol. 2004;22(7):354-62.
91. Hollister SJ. *Porous scaffold design for tissue engineering*. Nature materials. 2005;4(7):518-24.
92. Wang HB, Mullins ME, Cregg JM, McCarthy CW, Gilbert RJ. *Varying the diameter of aligned electrospun fibers alters neurite outgrowth and Schwann cell migration*. Acta Biomaterialia. 2010;6(8):2970-8.
93. Kotwal A, Schmidt CE. *Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials*. Biomaterials. 2001;22(10):1055-64.
94. Pethig R, Kell DB. *The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology*. Phys Med Biol. 1987;32(8):933-70.
95. Valentini RF, Vargo TG, Gardella JA, Aebischer P. *Electrically charged polymeric substrates enhance nerve fibre outgrowth in vitro*. Biomaterials. 1992;13(3):183-90.

-
96. Fine EG, Valentini RF, Bellamkonda R, Aebischer P. *Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidene fluoride-trifluoroethylene copolymer guidance channels*. *Biomaterials*. 1991;12(8):775-80.
97. Jianqing F, Huipin Y, Xingdong Z. *Promotion of osteogenesis by a piezoelectric biological ceramic*. *Biomaterials*. 1997;18(23):1531-4.
98. Prasad CK, Muraleedharan C, Krishnan LK. *Bio-mimetic composite matrix that promotes endothelial cell growth for modification of biomaterial surface*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007;80(3):644-54.
99. Khew ST, Yang QJ, Tong YW. *Enzymatically crosslinked collagen-mimetic dendrimers that promote integrin-targeted cell adhesion*. *Biomaterials*. 2008;29(20):3034-45.
100. Shekaran A, García AJ. *Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2011;96(1):261-72.
101. Sevastianov VI, Drushlyak IV, Eberhart RC, Wan Kim S, editors. *Blood compatible biomaterials: Hydrophilicity vs. hydrophobicity*. *Macromolecular Symposia*; 1996: Wiley Online Library.
102. Karakeçili AG, Gümüşdereliolu M. *Comparison of bacterial and tissue cell initial adhesion on hydrophilic/hydrophobic biomaterials*. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2002;13(2):185-96.
103. Rabinow B, Ding Y, Qin C, McHalsky M, Schneider J, Ashline K, et al. *Biomaterials with permanent hydrophilic surfaces and low protein adsorption properties*. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1995;6(1):91-109.
104. Grinnell F, Feld MK. *Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium*. *J Biol Chem*. 1982;257(9):4888-93.
105. Campillo-Fernández REU, Kirsten Peters, Sven Halstenberg, Marina Santos, Manuel Salmerón Sánchez, Jose Maria Meseguer Dueñas, Manuel Monleón Pradas, Jose Luis Gómez Ribelles, and C. James Kirkpatrick. . *Analysis of the Biological Response of Endothelial and Fibroblast Cells Cultured on Synthetic Scaffolds with Various Hydrophilic/Hydrophobic Ratios: Influence of Fibronectin Adsorption and Conformation*. *Tissue Engineering Part A*2009. p. 1331-41.

106. Freij-Larsson C, Nylander T, Jannasch P, Wesslén B. *Adsorption behaviour of amphiphilic polymers at hydrophobic surfaces: effects on protein adsorption*. *Biomaterials*. 1996;17(22):2199-207.
107. Cui H, Webber MJ, Stupp SI. *Self-assembly of peptide amphiphiles: From molecules to nanostructures to biomaterials*. *Peptide Science*. 2010;94(1):1-18.
108. Compan V, Guzmán J, Riande E. *A potentiostatic study of oxygen transmissibility and permeability through hydrogel membranes*. *Biomaterials*. 1998;19(23):2139-45.
109. Seliktar D. *Designing Cell-Compatible Hydrogels for Biomedical Applications*. *Science*. 2012;336(6085):1124-8.
110. Akala EO, Kopečková P, Kopeček J. *Novel pH-sensitive hydrogels with adjustable swelling kinetics*. *Biomaterials*. 1998;19(11):1037-47.
111. Sharpe J, Sammons R, Marquis P. *Effect of pH on protein adsorption to hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics*. *Biomaterials*. 1997;18(6):471-6.
112. Lee J-W, Serna F, Nickels J, Schmidt CE. *Carboxylic acid-functionalized conductive polypyrrole as a bioactive platform for cell adhesion*. *Biomacromolecules*. 2006;7(6):1692-5.
113. Vale FM, Castro M, Monteiro J, Couto FS, Pinto R, Gia J. *Acrylic bone cement induces the production of free radicals by cultured human fibroblasts*. *Biomaterials*. 1997;18(16):1133-5.
114. Oral E, Rowell SL, Muratoglu OK. *The effect of α -tocopherol on the oxidation and free radical decay in irradiated UHMWPE*. *Biomaterials*. 2006;27(32):5580-7.
115. Yin J-J, Lao F, Fu PP, Wamer WG, Zhao Y, Wang PC, et al. *The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials*. *Biomaterials*. 2009;30(4):611-21.
116. Törmälä P. *Biodegradable self-reinforced composite materials; manufacturing structure and mechanical properties*. *Clin Mater*. 1992;10(1):29-34.

-
117. Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. *Hydrolytic degradation of devices based on poly (DL-lactic acid) size-dependence*. *Biomaterials*. 1995;16(4):305-11.
118. Benali S, Aouadi S, Dechief A-L, Murariu M, Dubois P. *Key factors for tuning hydrolytic degradation of polylactide/zinc oxide nanocomposites*. *Nanocomposites*. 2015;1(1):51-61.
119. Smith M, Barbenel J, Courtney J, Grant M. *Novel quantitative methods for the determination of biomaterial cytotoxicity*. *The International journal of artificial organs*. 1992;15(3):191-4.
120. Nishi C, Nakajima N, Ikada Y. *In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification*. *J Biomed Mater Res*. 1995;29(7):829-34.
121. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. *Hyaluronan fragments: An information-rich system*. *Eur J Cell Biol*. 2006;85(8):699-715.
122. Kopeček J. *Controlled biodegradability of polymers—a key to drug delivery systems*. *Biomaterials*. 1984;5(1):19-25.
123. Meredith JE, Schwartz MA. *Integrins, adhesion and apoptosis*. *Trends Cell Biol*. 1997;7(4):146-50.
124. Ilić D, Almeida EA, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, Damsky CH. *Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis*. *The Journal of cell biology*. 1998;143(2):547-60.
125. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *The cytoskeleton and cell behavior*. 2002.
126. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. *Focal adhesion regulation of cell behavior*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2004;1692(2):103-19.
127. Wight TN, Kinsella MG, Qwarnström EE. *The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation*. *Curr Opin Cell Biol*. 1992;4(5):793-801.
128. Oertli B, Beck-Schimmer B, Fan X, Wüthrich RP. *Mechanisms of hyaluronan-induced up-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression by murine kidney tubular*

epithelial cells: hyaluronan triggers cell adhesion molecule expression through a mechanism involving activation of nuclear factor- κ B and activating protein-1. The Journal of Immunology. 1998;161(7):3431-7.

129. Ruoslahti E, Reed JC. *Anchorage dependence, integrins, and apoptosis.* Cell. 1994;77(4):477-8.

130. Scott JE. *Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues.* The FASEB journal. 1992;6(9):2639-45.

131. Daley WP, Peters SB, Larsen M. *Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine.* J Cell Sci. 2008;121(3):255-64.

132. Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B. *Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes.* Biochem Soc Trans. 2004;32(3):416-20.

133. Galbraith CG, Yamada KM, Galbraith JA. *Polymerizing Actin Fibers Position Integrins Primed to Probe for Adhesion Sites.* Science. 2007;315(5814):992-5.

134. Schwarzbauer JE, Sechler JL. *Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly.* Curr Opin Cell Biol. 1999;11(5):622-7.

135. Solon J, Levental I, Sengupta K, Georges PC, Janmey PA. *Fibroblast Adaptation and Stiffness Matching to Soft Elastic Substrates.* Biophys J. 2007;93(12):4453-61.

136. Kamiguchi H, Hlavin ML, Yamasaki M, Lemmon V. *Adhesion Molecules and Inherited Diseases of the Human Nervous System.* Annu Rev Neurosci. 1998;21(1):97-125.

137. Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U. *Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development.* Development. 2004;131(7):1619-28.

138. Radtke C, Spies M, Sasaki M, Vogt PM, Kocsis JD. *Demyelinating diseases and potential repair strategies.* Int J Dev Neurosci. 2007;25(3):149-53.

139. Carey DJ, Eldridge CF, Cornbrooks CJ, Timpl R, Bunge RP. *Biosynthesis of type IV collagen by cultured rat Schwann cells.* J Cell Biol. 1983;97(2):473-9.

140. Tohyama K, Ide C. *The localization of laminin and fibronectin on the Schwann cell basal lamina*. Arch Histol Jpn. 1984;47(5):519-32.
141. LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R. *Structure and function of basement membranes*. Experimental biology and medicine (Maywood, NJ). 2007;232(9):1121-9.
142. Thesleff I, Partanen A, Vainio S. *Epithelial-mesenchymal interactions in tooth morphogenesis: the roles of extracellular matrix, growth factors, and cell surface receptors*. J Craniofac Genet Dev Biol. 1990;11(4):229-37.
143. Choy M, Armstrong MT, Armstrong PB. *Regulation of proliferation of embryonic heart mesenchyme: role of transforming growth factor- β 1 and the interstitial matrix*. Dev Biol. 1990;141(2):421-5.
144. Caplan AI. *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine*. J Cell Physiol. 2007;213(2):341-7.
145. Rico P, Hernández JCR, Moratal D, Altankov G, Pradas MM, Salmerón-Sánchez M. *Substrate-Induced Assembly of Fibronectin into Networks: Influence of Surface Chemistry and Effect on Osteoblast Adhesion* Tissue Eng. 2009;15(11):10.
146. Hernández JCR, Salmerón Sánchez M, Soria JM, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas M. *Substrate Chemistry-Dependent Conformations of Single Laminin Molecules on Polymer Surfaces are Revealed by the Phase Signal of Atomic Force Microscopy*. Biophys J. 2007;93(1):202-7.
147. Tuan TL, Nichter LS. *The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation*. Mol Med Today. 1998;4(1):19-24.
148. Fawcett JW, Asher RA. *The glial scar and central nervous system repair*. Brain Res Bull. 1999;49(6):377-91.
149. Biswas A, Hutchins R. *Embryonic stem cells*. Stem cells and development. 2007;16(2):213-22.
150. Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. *Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle*. Science. 2003;302(5650):1575-7.

151. Conboy IM, Rando TA. *Aging, stem cells and tissue regeneration: lessons from muscle*. Cell cycle. 2005;4(3):407-10.
152. Adams JC, Watt FM. *Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix*. DEVELOPMENT-CAMBRIDGE-. 1993;117:1183-.
153. Baker BM, Chen CS. *Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues*. J Cell Sci. 2012;125(13):3015-24.
154. Hakkinen KM, Harunaga JS, Doyle AD, Yamada KM. *Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices*. Tissue Eng Part A. 2011;17(5-6):713-24.
155. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. *Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering*. Trends Biotechnol. 2003;21(4):157-61.
156. Wüst S, Müller R, Hofmann S. *Controlled positioning of cells in biomaterials—approaches towards 3D tissue printing*. Journal of functional biomaterials. 2011;2(3):119-54.
157. Lam CXF, Mo X, Teoh S-H, Hutmacher D. *Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer*. Materials Science and Engineering: C. 2002;20(1):49-56.
158. Campbell JJ, Davidenko N, Caffarel MM, Cameron RE, Watson CJ. *A multifunctional 3D co-culture system for studies of mammary tissue morphogenesis and stem cell biology*. PLoS One. 2011;6(9):e25661.
159. Rosner BI, Hang T, Tranquillo RT. *Schwann cell behavior in three-dimensional collagen gels: Evidence for differential mechano-transduction and the influence of TGF-beta 1 in morphological polarization and differentiation*. Exp Neurol. 2005;195(1):81-91.
160. Stevens MM, George JH. *Exploring and Engineering the Cell Surface Interface*. Science. 2005;310(5751):1135-8.
161. Dubey N, Letourneau P, Tranquillo R. *Guided neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration*. Exp Neurol. 1999;158(2):338-50.

162. Chew SY, Mi R, Hoke A, Leong KW. *The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation*. *Biomaterials*. 2008;29(6):653-61.
163. Brewer GJ, Cotman CW. *Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen*. *Brain Res*. 1989;494(1):65-74.
164. Dunn J, Yarmush M, Koebe H, Tompkins R. *Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration*. *The FASEB Journal*. 1989;3(2):174-7.
165. Berthiaume F, Moghe PV, Toner M, Yarmush ML. *Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration*. *The FASEB journal*. 1996;10(13):1471-84.
166. Wang N, Tytell JD, Ingber DE. *Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus*. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(1):75-82.
167. Conejero-García A, Vilariño-Feltrer G, Martínez-Ramos C, Monleón Pradas M, Vallés-Lluch A. *Channeled polymeric scaffolds with polypeptide gel filling for lengthwise guidance of neural cells*. *European Polymer Journal*. 2015;70:331-41.
168. Naughton BA, Halberstadt CR, Sibanda B. *Method for culturing three-dimensional tissue in diffusion gradient bioreactor and use thereof*. Google Patents; 2001.
169. Karande TS, Ong JL, Agrawal CM. *Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing*. *Ann Biomed Eng*. 2004;32(12):1728-43.
170. Griffith LG, Swartz MA. *Capturing complex 3D tissue physiology in vitro*. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(3):211-24.
171. Yu H, Meyvantsson I, Shkel IA, Beebe DJ. *Diffusion dependent cell behavior in microenvironments*. *Lab on a Chip*. 2005;5(10):1089-95.

172. Park JE, Keller G-A, Ferrara N. *The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF*. Mol Biol Cell. 1993;4(12):1317-26.
173. Ingber DE, Folkman J. *Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix*. The Journal of cell biology. 1989;109(1):317-30.
174. McNeil PL, Muthukrishnan L, Warder E, D'Amore PA. *Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells*. The Journal of cell biology. 1989;109(2):811-22.
175. DeLong SA, Moon JJ, West JL. *Covalently immobilized gradients of bFGF on hydrogel scaffolds for directed cell migration*. Biomaterials. 2005;26(16):3227-34.
176. Sant S, Hancock MJ, Donnelly JP, Iyer D, Khademhosseini A. *Biomimetic gradient hydrogels for tissue engineering*. The Canadian journal of chemical engineering. 2010;88(6):899-911.
177. Sia SK, Whitesides GM. *Microfluidic devices fabricated in poly (dimethylsiloxane) for biological studies*. Electrophoresis. 2003;24(21):3563-76.
178. Chung BG, Flanagan LA, Rhee SW, Schwartz PH, Lee AP, Monuki ES, et al. *Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device*. Lab on a Chip. 2005;5(4):401-6.
179. Burdick JA, Khademhosseini A, Langer R. *Fabrication of gradient hydrogels using a microfluidics/photopolymerization process*. Langmuir. 2004;20(13):5153-6.
180. Astrup J, B K Siesjö, and L Symon. *Stroke* 1981. p. 723-5.
181. Hakim AM. *Ischemic penumbra: The therapeutic window*. Neurology. 1998;51(3 Suppl 3):S44-S6.
182. De Keyser J, Sulter G, Luiten PG. *Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing?* Trends Neurosci. 1999;22(12):535-40.

183. Fisher M. *The Ischemic Penumbra: Identification, Evolution and Treatment Concepts*. Cerebrovasc Dis. 2004;17(suppl 1)(Suppl. 1):1-6.
184. Callow A. *Historical overview of experimental and clinical development of vascular grafts*. Biologic and synthetic vascular prostheses. 1982:11-26.
185. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, et al. *VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain*. The Journal of Clinical Investigation. 2000;106(7):829-38.
186. Rajnoch C, Chachques JC, Berrebi A, Bruneval P, Benoit MO, Carpentier A. *Cellular therapy reverses myocardial dysfunction*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2001;121(5):871-8.
187. Nillesen STM, Geutjes PJ, Wismans R, Schalkwijk J, Daamen WF, van Kuppevelt TH. *Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF*. Biomaterials. 2007;28(6):1123-31.
188. Kirkpatrick CJ, Fuchs S, Unger RE. *Co-culture systems for vascularization--learning from nature*. Adv Drug Deliv Rev. 2011;63(4-5):291-9.
189. Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR. *Functions of hyaluronan*. Ann Rheum Dis. 1995;54(5):429-32.
190. Fraser J, Laurent T, Laurent U. *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. J Intern Med. 1997;242(1):27-33.
191. Ivanov D, Neamtu A. *Molecular dynamics evaluation of hyaluronan interactions with dimethylsilnediol in aqueous solution*. Rev Roum Chim. 2013;58(2-3):229-38.
192. Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. *An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases*. J Mol Biol. 2003;328(2):307-17.
193. DeAngelis PL. *Evolution of glycosaminoglycans and their glycosyltransferases: implications for the extracellular matrices of animals and the capsules of pathogenic bacteria*. The Anatomical Record. 2002;268(3):317-26.

194. O'Sullivan D, Maruszak B, Felding-Habermann B. *Elevated hyaluronidase 1 expression in an in vivo tumor model predicts the metastatic phenotype*. Cancer Res. 2007;67(9 Supplement):3101-.
195. Zhang L, Underhill CB, Chen L. *Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior*. Cancer Res. 1995;55(2):428-33.
196. Hofmann M, Rudy W, Zöller M, Tölg C, Ponta H, Herrlich P, et al. *CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines*. Cancer Res. 1991;51(19):5292-7.
197. Turley EA. *Proteoglycans and cell adhesion. Their putative role during tumorigenesis*. Cancer Metastasis Rev. 1984;3(4):325-39.
198. Cervelli V, De Angelis B, Lucarini L, Spallone D, Balzani A, Palla L, et al. *Tissue regeneration in loss of substance on the lower limbs through use of platelet-rich plasma, stem cells from adipose tissue, and hyaluronic acid*. Advances in skin & wound care. 2010;23(6):262-72.
199. Mast BA, Flood LC, Haynes JH, Depalma RL, Cohen IK, Diegelmann RF, et al. *Hyaluronic acid is a major component of the matrix of fetal rabbit skin and wounds: implications for healing by regeneration*. Matrix. 1991;11(1):63-8.
200. Mescher AL. *The cellular basis of limb regeneration in urodeles*. Int J Dev Biol. 2004;40(4):785-95.
201. Missinato MA, Tobita K, Romano N, Carroll JA, Tsang M. *Extracellular component hyaluronic acid and its receptor Hmhr are required for epicardial EMT during heart regeneration*. Cardiovasc Res. 2015;107(4):487-98.
202. Laurent TC, Fraser JR. *Hyaluronan*. The FASEB Journal. 1992;6(7):2397-404.
203. Fujii T, Sun YL, An KN, Luo ZP. *Mechanical properties of single hyaluronan molecules*. J Biomech. 2002;35(4):527-31.
204. Guss J, Hukins D, Smith P, Winter W, Arnott S, Moorhouse R, et al. *Hyaluronic acid: molecular conformations and interactions in two sodium salts*. J Mol Biol. 1975;95(3):359-84.

205. Arnott S, Mitra A, Raghunathan S. *Hyaluronic acid double helix*. J Mol Biol. 1983;169(4):861-72.
206. Scott JE, Cummings C, Brass A, Chen Y. *Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer*. Biochem J. 1991;274 (Pt 3):699-705.
207. Mensitieri M, Ambrosio L, Nicolais L, Bellini D, O'Regan M. *Viscoelastic properties modulation of a novel autocrosslinked hyaluronic acid polymer*. J Mater Sci: Mater Med. 1996;7(11):695-8.
208. Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD. *Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern*. Biomaterials. 2005;26(4):359-71.
209. Collins MN, Birkinshaw C. *Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels*. J Mater Sci: Mater Med. 2008;19(11):3335-43.
210. Collins M, Birkinshaw C. *Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications*. Journal of Applied Polymer Science. 2007;104(5):3183-91.
211. Leach JB, Schmidt CE. *Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds*. Biomaterials. 2005;26(2):125-35.
212. Bencherif SA, Srinivasan A, Horkay F, Hollinger JO, Matyjaszewski K, Washburn NR. *Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties*. Biomaterials. 2008;29(12):1739-49.
213. Shimojo AA, Pires A, Lichy R, Santana MH. *The Performance of Crosslinking with Divinyl Sulfone as Controlled by the Interplay Between the Chemical Modification and Conformation of Hyaluronic Acid*. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2015;26(3):506-12.
214. Jeon O, Song SJ, Lee K-J, Park MH, Lee S-H, Hahn SK, et al. *Mechanical properties and degradation behaviors of hyaluronic acid hydrogels cross-linked at various cross-linking densities*. Carbohydrate Polymers. 2007;70(3):251-7.

215. Eng D, Caplan M, Preul M, Panitch A. *Hyaluronan scaffolds: A balance between backbone functionalization and bioactivity*. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(7):2407-14.
216. Stern R, Jedrzejewski MJ. *Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action*. *Chem Rev*. 2006;106(3):818-39.
217. Jedrzejewski MJ, Stern R. *Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2005;61(2):227-38.
218. Linker A, Meyer K, Hoffman P. *The production of unsaturated hyaluronides by bacterial hyaluronidases*. *J Biol Chem*. 1956;219(1):013-25.
219. Lepperdinger G, Müllegger J, Kreil G. *Hyal2—less active, but more versatile?* *Matrix Biol*. 2001;20(8):509-14.
220. Hoffman P, Meyer K, Linker A. *Transglycosylation during the mixed digestion of hyaluronic acid and chondroitin sulfate by testicular hyaluronidase*. *J Biol Chem*. 1956;219(2):653-63.
221. Oh EJ, Kang SW, Kim BS, Jiang G, Cho IH, Hahn SK. *Control of the molecular degradation of hyaluronic acid hydrogels for tissue augmentation*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008;86(3):685-93.
222. Haxaire K, Braccini I, Milas M, Rinaudo M, Pérez S. *Conformational behavior of hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modeling*. *Glycobiology*. 2000;10(6):587-94.
223. Tokita Y, Okamoto A. *Hydrolytic degradation of hyaluronic acid*. *Polymer Degradation and Stability*. 1995;48(2):269-73.
224. Balazs EA, Laurent TC, Howe AF, Varga L. *Irradiation of mucopolysaccharides with ultraviolet light and electrons*. *Radiat Res*. 1959;11(2):149-64.
225. Ramamurthi A, Vesely I. *Ultraviolet light-induced modification of crosslinked hyaluronan gels*. *J Biomed Mater Res A*. 2003;66(2):317-29.

226. Doherty MM, Hughes PJ, Kim SR, Mainwaring DE, Charman WN. *Effect of lyophilization on the physical characteristics of medium molecular mass hyaluronates*. Int J Pharm. 1994;111(3):205-11.
227. Tokita Y, Ohshima K, Okamoto A. *Degradation of hyaluronic acid during freeze drying*. Polymer Degradation and Stability. 1997;55(2):159-64.
228. Wedlock D, Phillips G, Davies A, Gormally J, Wyn-Jones E. *Depolymerization of sodium hyaluronate during freeze drying*. Int J Biol Macromol. 1983;5(3):186-8.
229. Zimmerman E, Geiger B, Addadi L. *Initial Stages of Cell-Matrix Adhesion Can Be Mediated and Modulated by Cell-Surface Hyaluronan*. Biophys J. 2002;82(4):1848-57.
230. Prehm P. *Hyaluronate is synthesized at plasma membranes*. Biochem J. 1984;220(2):597-600.
231. Hall CL, Wang C, Lange LA, Turley EA. *Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity*. J Cell Biol. 1994;126(2):575-88.
232. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. *CD44 and its interaction with extracellular matrix*. Adv Immunol. 1992;54:271-335.
233. UNDERHILL C. *CD44: the hyaluronan receptor*. J Cell Sci. 1992;103(2):293-8.
234. Bartolazzi A, Nocks A, Aruffo A, Spring F, Stamenkovic I. *Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan*. The Journal of cell biology. 1996;132(6):1199-208.
235. Bollyky PL, Lord JD, Masewicz SA, Evanko SP, Buckner JH, Wight TN, et al. *Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol. 2007;179(2):744-7.
236. Noble PW. *Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair*. Matrix Biol. 2002;21(1):25-9.
237. Maleski MP, Knudson CB. *Hyaluronan-mediated aggregation of limb bud mesenchyme and mesenchymal condensation during chondrogenesis*. Exp Cell Res. 1996;225(1):55-66.

238. Toole BP. *Hyaluronate and hyaluronidase in morphogenesis and differentiation*. Am Zool. 1973;13(4):1061-5.
239. Toole BP, Jackson G, Gross J. *Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1972;69(6):1384-6.
240. Abatangelo G, Martelli M, Vecchia P. *Healing of hyaluronic acid-enriched wounds: histological observations*. J Surg Res. 1983;35(5):410-6.
241. Morra M. *Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan*. Biomacromolecules. 2005;6(3):1205-23.
242. Vashist A, Vashist A, Gupta Y, Ahmad S. *Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body*. Journal of Materials Chemistry B. 2014;2(2):147-66.
243. Kogan G, Šoltés L, Stern R, Gemeiner P. *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications*. Biotechnology letters. 2007;29(1):17-25.
244. Balazs EA, Leshchiner A. *Cross-linked gels of hyaluronic acid and products containing such gels*. Google Patents; 1987.
245. Huang LL. *Cell tissue gel containing collagen and hyaluronan*. Google Patents; 2014.
246. Johann J. *Method and device for providing a composition containing hyaluronic acid*. Google Patents; 2016.
247. Ochoa EHH. *Regeneration of articular cartilage damaged by grade I and II osteoarthritis by means of the intraarticular application of a mixture of sodium hyaluronate and chondroitin sulfate in a gel vehicle*. Google Patents; 2005.
248. Pouyani T, Prestwich GD. *Functionalized derivatives of hyaluronic acid*. Google Patents; 1997.

-
249. Matyjaszewski K, Davis TP. *Handbook of radical polymerization*: Wiley Online Library; 2002.
250. Liu X-M, Wang L-S, Wang L, Huang J, He C. *The effect of salt and pH on the phase-transition behaviors of temperature-sensitive copolymers based on N-isopropylacrylamide*. *Biomaterials*. 2004;25(25):5659-66.
251. Perez Olmedilla M, Garcia-Giralt N, Pradas MM, Ruiz PB, Gomez Ribelles JL, Palou EC, et al. *Response of human chondrocytes to a non-uniform distribution of hydrophilic domains on poly (ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymers*. *Biomaterials*. 2006;27(7):1003-12.
252. Ivirico JLE, Martínez EC, Sánchez MS, Criado IM, Ribelles JLG, Pradas MM. *Structure and properties of methacrylate-endcapped caprolactone networks with modulated water uptake for biomedical applications*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2007;83B(1):266-75.
253. Kyritsis A, Spanoudaki A, Pandis C, Hartmann L, Pelster R, Shinyashiki N, et al. *Water and polymer dynamics in poly(hydroxyl ethyl acrylate-co-ethyl acrylate) copolymer hydrogels*. *European Polymer Journal*. 2011;47(12):2391-402.
254. Mayo FR, Lewis FM. *Copolymerization. I. A basis for comparing the behavior of monomers in copolymerization; the copolymerization of styrene and methyl methacrylate*. *J Am Chem Soc*. 1944;66(9):1594-601.
255. Alfrey T, Price CC. *Relative reactivities in vinyl copolymerization*. *Journal of Polymer Science*. 1947;2(1):101-6.
256. Fineman M, Ross SD. *Linear method for determining monomer reactivity ratios in copolymerization*. *Journal of Polymer Science*. 1950;5(2):259-62.
257. Frisch HL. *Interpenetrating polymer networks*. *British Polymer Journal*. 1985;17(2):149-53.
258. Sperling LH. *Interpenetrating polymer networks and related materials*: Springer Science & Business Media; 2012.
259. Cesaretti M, Luppi E, Maccari F, Volpi N. *A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction*. *Carbohydrate Polymers*. 2003;54(1):59-61.

260. Ibrahim S, Kang QK, Ramamurthi A. *The impact of hyaluronic acid oligomer content on physical, mechanical, and biologic properties of divinyl sulfone-crosslinked hyaluronic acid hydrogels*. J Biomed Mater Res A. 2010;94(2):355-70.
261. Takayanagi M, Uemura S, Minami S, editors. Application of equivalent model method to dynamic rheo-optical properties of crystalline polymer. Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia; 1964: Wiley Online Library.
262. Martínez-Ramos C, Arnal-Pastor M, Vallés-Lluch A, Pradas MM. *Peptide gel in a scaffold as a composite matrix for endothelial cells*. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2015:n/a-n/a.
263. Soria JM, Martinez Ramos C, Bahamonde O, Garcia Cruz DM, Salmeron Sanchez M, Garcia Esparza MA, et al. *Influence of the substrate's hydrophilicity on the in vitro Schwann cells viability*. J Biomed Mater Res A. 2007;83(2):463-70.
264. Lord MS, Pasqui D, Barbucci R, Milthorpe BK. *Protein adsorption on derivatives of hyaluronic acid and subsequent cellular response*. J Biomed Mater Res A. 2009;91(3):635-46.
265. Ramamurthi A, Vesely I. *Smooth muscle cell adhesion on crosslinked hyaluronan gels*. J Biomed Mater Res. 2002;60(1):195-205.
266. Schakenraad JM, Busscher HJ, Wildevuur CRH, Arends J. *The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins*. J Biomed Mater Res. 1986;20(6):773-84.
267. Ghosh K, Ren X-D, Shu XZ, Prestwich GD, Clark RA. *Fibronectin functional domains coupled to hyaluronan stimulate adult human dermal fibroblast responses critical for wound healing*. Tissue Eng. 2006;12(3):601-13.
268. Patel VR, Amiji MM. *Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach*. Pharm Res. 1996;13(4):588-93.
269. Gerisch G, Bretschneider T, Müller-Taubenberger A, Simmeth E, Ecke M, Diez S, et al. *Mobile Actin Clusters and Traveling Waves in Cells Recovering from Actin Depolymerization*. Biophys J. 2004;87(5):3493-503.

Lista de publicaciones realizadas por el autor

Artículos

Pérez, E. R., et al. (2013). "Polymer chains incorporating caprolactone and arginine-glycine-aspartic acid functionalities: Synthesis, characterization and biological response in vitro of the Schwann cell." *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **28**(1): 50-65.

This study describes a strategy for the covalent immobilization of active adhesion peptide moieties onto polymers through the intermediacy of itaconic acid. The arginine-glycine-aspartic acid peptide was grafted to a novel poly(caprolactone 2-(methacryloyloxy) ethyl ester)-co-itaconic acid bulk biomaterial, in order to improve the cell adhesion of the polymer. First, the arginine-glycine-aspartic acid sequence was grafted onto itaconic acid via an amidation reaction using N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride/N-hydroxysuccinimide as activation complex. The itaconic acid-arginine-glycine-aspartic acid macromer was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and ¹H-NMR, yielding a functionalization degree of 85%. In a second step, poly(caprolactone 2-(methacryloyloxy) ethyl ester-co-itaconic acid-arginine-glycine-aspartic acid) (with a feed mixture of 90 wt% of caprolactone 2-(methacryloyloxy) ethyl ester and 10 wt% of itaconic acid-arginine-glycine-aspartic acid macromer) and a series of copolymers of caprolactone 2-(methacryloyloxy) ethyl ester and itaconic acid with different compositions (weight fractions of itaconic acid up to 20 wt%) were synthesized by radical copolymerization. The microstructure and network architecture of the new polymer systems were investigated. Mechanical moduli of poly(caprolactone 2-(methacryloyloxy) ethyl ester-co-itaconic acid), evaluated by dynamic-mechanical analysis, increase with the itaconic acid content. In poly(caprolactone 2-(methacryloyloxy) ethyl ester-co-itaconic acid-arginine-glycine-aspartic acid), the glass transition temperature and the mechanical moduli of the system are smaller than in the nonfunctionalized poly(caprolactone 2-(methacryloyloxy) ethyl ester-co-itaconic acid) copolymers, and the polymer is less hydrophilic. The results indicate that arginine-glycine-aspartic acid grafting of

poly(caprolactone 2-(methacryloyloxy) ethyl ester-co-itaconic acid) copolymer networks can be useful for tissue engineering applications, because regenerative processes in the nervous system can be promoted and accelerated, thus, opening a possibility to generate materials with a high potential for clinical applicability.

Martinez-Ramos, C., et al. (2014). "Design and assembly procedures for large-sized biohybrid scaffolds as patches for myocardial infarct." *Tissue Eng Part C Methods* **20**(10): 817-827.

OBJECTIVE: To assemble a biohybrid cardiac patch consisting of a large (5 x 5 cm) elastomer scaffold whose pores are filled with a self-assembling peptide (SAP) gel entrapping adipose stem cells, to be used as a novel implant in a big animal model (sheep) of myocardial infarction. The study focuses on the way to determine optimal procedures for incorporating the SAP solution and the cells in the patch to ensure cell colonization and a homogeneous cell distribution in the construct before implantation. The problems associated with the scale-up of the different procedures raised by the large size of the construct are discussed. **MATERIALS AND METHODS:** Experiments were performed to choose between different assembling alternatives: incorporation of the SAP gel before cell seeding or simultaneous SAP and cell loading of the scaffold; surface seeding of cells or cell injection into the scaffold pores; dissemination of the cells throughout the scaffold before incubation by gentle shaking or by centrifugation. Immunocytochemistry techniques and confocal and scanning electron microscopies were employed to assess and quantify cell colonization of the material and early cell distribution. Cell concentrations and the uniformity of cellular distribution throughout the scaffold were taken as the main criteria to decide between the different alternative procedures. **RESULTS:** The combination of peptide preloading, cell injection, and shaking before incubation yielded the best results in terms of greater cell density and the most uniform distribution after 24 h of culture compared with the other methods. These techniques could be

scaled-up to obtain large biohybrid cardiac patches with success.
CONCLUSIONS: The results obtained after the different seeding methods allowed us to establish an effective protocol for the assembly of large biohybrid patches for their subsequent implantation in the heart of a big animal model of myocardial infarct in the context of a preclinical study.

Rodriguez-Perez, E., et al. (2016). "Scaffolds of Hyaluronic Acid-Poly(Ethyl Acrylate) Interpenetrating Networks: Characterization and In Vitro Studies." Macromol Biosci.

Hyaluronic acid (HA) provides many advantages to regenerative implants through its bioactive properties, but it also has many limitations as a biomaterial if it is not chemically modified. In order to overcome some of these limitations, HA has been combined with poly(ethyl acrylate) in the form of interpenetrating polymeric networks (IPNs), in which the HA network is crosslinked with divinyl sulfone. Scaffolds of this IPN have been produced through a template-leaching methodology, and their properties have been compared with those of single-network scaffolds made of either PEA or crosslinked HA. A fibroblast cell line has been used to assess the in vitro performance of the scaffolds, revealing good cell response and a differentiated behavior on the IPN surface when compared to the individual polymers. Altogether, the results confirm that this type of material offers an interesting microenvironment for cells, which can be further improved toward its potential use in medical implants.

Patentes

Ref: P201231147 Rodríguez, P. E., et al. (2014). Material compuesto de ácido hialurónico y al menos un polímero acrílico para aplicaciones biomédicas

Material compuesto de ácido hialurónico y al menos un polímero acrílico para aplicaciones biomédicas. Material compuesto que comprende ácido hialurónico y al menos un polímero acrílico, caracterizado porque este material comprende una estructura porosa de ácido hialurónico al menos parcialmente recubierta por al menos un polímero acrilato. Preferiblemente el polímero acrílico es poliacrilato de etilo. Así como su procedimiento de obtención y un producto seleccionado del grupo que consiste en un implante biomédico, un soporte para cultivo de células y una composición farmacéutica.

Abreviaturas

$\omega_{\text{PEA/HA}}$	fracción másica de PEA/HA en la IPN
$\varphi_{\text{PEA/HA}}$	fracción volumétrica de PEA/HA en la IPN
BSA	albúmina de suero bovino (del inglés <i>bovine serum albumin</i>)
CLSM	microscopía confocal láser de barrido (de confocal laser scanning microscopy). También se denomina así al equipo
CryoSEM	sistema de criopreservación y sublimación acoplado a un microscopio electrónico de barrido
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés <i>Dulbecco's modified Eagle médium</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico o ADN
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DVS	divinilsulfona
ECM	matriz extracelular (del inglés <i>extracellular matrix</i>)
EDS	espectroscopia de energía dispersa
EGDMA	dimetacrilato de etilenglicol
EWC	contenido de agua en equilibrio (del inglés <i>equilibrium water content</i>)
FBS	suero fetal bovino (del inglés <i>fetal bovine serum</i>)
FTIR	espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GAG	glicosaminoglicano
HA	ácido hialurónico (del inglés <i>hyaluronic acid</i>)

HA-i-PEA	redes poliméricas interpenetradas de ácido hialurónico y poliacrilato de etilo
HAsa	hialuronidasa
HR	humedad relativa
IPN/IPNs	red/es polimérica/s interpenetrada/s
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazol
PB	tampón fosfato (del inglés <i>phosphate buffer</i>)
PEA	poliacrilato de etilo (del inglés <i>poly(ethyl acrylate)</i>)
PEMA	polimetacrilato de etilo
PMMA	polimetacrilato de metilo
RGD	polipéptido de arginina, glicina y ácido aspártico
SEM	equipo (y técnica) de microscopía electrónica de barrido (del inglés <i>scanning electron microscopy</i>)
TGA	análisis termogravimétrico
TMA	análisis termomecánico
WC	contenido de agua