

Tesis Doctoral del Programa en Tecnologías para la Salud y el Bienestar
Universitat Politècnica de València
Valencia, noviembre de 2015

Conductos de ácido hialurónico para el crecimiento axonal guiado



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Autor:

Guillermo Vilariño Feltrer

Directores:

Cristina Martínez Ramos

Manuel Monleón Pradas

Ana Vallés Lluch

A Amparo,
por luchadora.

"Et dixi: nunc coepi..."

AGRADECIMIENTOS

Ojalá el conocimiento que se ha obtenido durante esta tesis, fruto de mucho esfuerzo y dedicación, llegue a suponer una contribución, por sutil que sea, en la calidad de vida de algunas personas y en nuestra comprensión de cómo reacciona el cuerpo humano ante estímulos externos. No es un objetivo fácil, pero creo que es lo más noble a lo que puedo aspirar en mi carrera científica.

Ahora bien, cuando hablo de esfuerzo y dedicación no me refiero, ni mucho menos, exclusivamente a mí. Nunca habría imaginado siquiera que fuera posible enfrentarse a enfermedades y daños orgánicos, que de largo los médicos han dado por imposibles, de no ser por la obstinación y la fundamentada fe del Dr. Manuel Monleón. Por no hablar del fascinante mundo de la biología y la biomedicina, en el que no podría haber tenido una entrada más enérgica y entusiasta que con la Dra. Cristina Martínez. Y, por supuesto, nada de esto habría sido posible sin que la Dra. Ana Vallés creyese en mí, me tomara de la mano y me diese impulso para cumplir, como mínimo, dos de los sueños de mi vida.

Y, ¿qué decir de lo fácil que me han allanado el camino mis compañeros del CBIT? La mitad de mis datos e ideas se los debo a mis alumnos, que hace tiempo que dejaron de ser *patitos* para transformarse en amigos de verdad. Desde luego, no se acaba una tesis doctoral en 3 años y pico sin que siempre haya gente dispuesta a enseñarte algo nuevo aunque no le venga bien, o a que te rías y te sientas a gusto en cualquiera de los laboratorios y en el despacho, donde si hace falta se hace noche. Ni sin una buena mesa de comedor donde puedan desterrarse los tabús y se hable de cómo arreglar el mundo, de cómo deshacerse de cadáveres, de las aplicaciones de la comida como *scaffolds* o las fantasiosas aplicaciones de cualquier fluido corporal, pero desde luego nunca de fútbol. Tanto es así que al final nos veíamos obligados a vaciar el *alijo* o la máquina de chocolatinas, para reponer la glucosa consumida.

Y casi más mérito tienen la familia y amigos de siempre que, sin saber muy bien de qué les hablo o por qué iba los fines de semana al laboratorio, fruncen el ceño interesados y orgullosos, y me llaman *doctor* antes de tiempo. Debéis saber que gracias a vuestros ánimos, vuestros cuidados y vuestros planes descabellados he logrado mantener la cordura (más o menos); que en este mundo es muy fácil perder el norte y olvidar la vida. Y los que sí saben lo que hago y, precisamente por ser también científicos, están lejos, están invitadísimos a venir a verme defender la tesis, pese a ser una burda excusa para volver a veros. Aunque la vida de muchas vueltas, espero que todos vosotros seáis una constante en mi futuro.

Apenas menciono nombres. Quién tiene que sentirse aludido, ya se encontrará a sí mismo en mis palabras. Pero os aseguro que no me cansaré de agradecerlo en persona. Puede que incluso os invite a algo, para los que no son sensibles a las indirectas.

Gracias, de corazón.

Y contigo, que me has enseñado la auténtica valentía, bondad y altruismo, tengo una cuenta pendiente por haberme puesto la vida patas arriba, por ahondar con tanta facilidad en la imperturbable frialdad que tanto tiempo tardé en construir y por mostrarme un argumento de peso para nunca dejar de sonreír como un idiota. Ya me encargaré personalmente de que seas plenamente consciente de lo que has hecho y pagues como corresponde... me lleve el tiempo que me lleve.

El presente documento de tesis doctoral ha sido posible gracias a la generosa contribución del Ministerio de Economía y Competitividad de España y de la Comisión Europea a través de los proyectos MAT2011-28791-C03-02 y 03, y ERA-Net NEURON PRI-PIMNEU-2011-1372.

Índice de contenidos

SUMMARY.....	5
RESUMEN	6
RESUM.....	7
GLOSARIO	9
CAPÍTULO I: ESTADO DEL ARTE	13
1. Regeneración en el sistema nervioso	15
1.1. Estructura del sistema nervioso.....	15
1.2. Mecanismos de reacción ante daños	17
1.3. Limitaciones en la regeneración	19
2. Ingeniería tisular	22
2.1. Terapias para la ingeniería tisular.....	22
2.2. El ácido hialurónico	27
2.3. Modificaciones del ácido hialurónico	31
3. Estrategias para regenerar el sistema nervioso	34
3.1. Conductos nerviosos.....	34
3.2. Parámetros de diseño para el conducto nervioso ideal	35
Objetivos y planteamiento del problema	40
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Obtención del conducto acanalado	47
1.1. Modelado de la cinética de reacción	47
1.2. Síntesis de conductos porosos	52
2. Caracterización física, química y mecánica	57
2.1. Análisis macroscópico	57
2.2. Cuantificación de la porosidad tricapa	57
2.3. Caracterización del sustrato de HA entrecruzado.....	60
2.4. Obtención de parámetros termomecánicos	60
3. Evaluación del conducto como hidrogel implantable	62
3.1. Variación dimensional durante el hinchado	62
3.2. Cinética de absorción de agua	62

3.3. Difusión molecular a través de la pared del conducto	64
3.4. Degradación enzimática	68
4. Cultivo de células de Schwann	71
4.1. Viabilidad y proliferación celular en el lumen del conducto	72
4.2. Supervivencia y destino celular de SC	74
4.3. Impermeabilidad celular de la pared del conducto	77
5. Caracterización de vaina celular macroscópica.....	80
5.1. Estudio de la formación de la vaina celular.....	80
5.2. Fenotipo y morfología de las SC	81
5.3. Interacciones célula-célula y célula-sustrato en la vaina	82
5.4. Análisis informático de la continuidad de la vaina.....	83
6. Cocultivos neuronales	85
7. Tratamiento estadístico.....	89
CAPÍTULO III: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS CONDUCTOS	93
1. Resumen	95
2. Resultados y discusión	97
2.1. Reacción de entrecruzamiento HA - DVS.....	97
2.2. Caracterización de los conductos acanalados porosos.....	104
3. Conclusiones	135
CAPÍTULO IV: OBTENCIÓN DE VAINA DE CÉLULAS DE SCHWANN	139
1. Resumen	141
2. Resultados y discusión	143
3. Conclusiones.....	167
CAPÍTULO V: COCULTIVOS NEURONALES	171
1. Resumen	173
2. Resultados y discusión	175
3. Conclusiones.....	176
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES FINALES.....	187
1. Conclusiones finales.....	189
2. Trabajo en curso	191
3. Bibliografía	195

SUMMARY

Since a considerable number of factors limit or prevent the autonomous regeneration of injured or degenerated tracts in the nervous system, its effective restoration is a rare phenomenon. Therefore, conventional medicine has only succeeded in therapies aimed at treating the symptoms and effects of the damage. In order to revert them and to restore the functionality of a neuronal network, tissue engineering is currently researching about the synergic use of cells, bioactive molecules and three-dimensional biocompatible supports. More precisely, the regeneration of nervous system damaged structures is being studied through strategies like the so-called *neural conduits*.

In this thesis, a channeled porous scaffold based on hyaluronic acid, a hydrophilic natural polymer, has been designed, developed and characterized, both physicochemically and biologically. By chemically crosslinking this polymer through divinyl sulfone and next lyophilizing it, a degradable and millimeter-size conduit has been obtained, soft but stable in physiological medium. The conduit wall has a singular three-layer distribution, able to avoid glial cells migration through it, but entirely permeable to nutrients and proteins. Furthermore, if Schwann cells are cultured for 10 days within the conduit's lumen, they create a cell tube-like structure with several hundreds of microns in diameter, thin but dense, similar to those of nerve fascicles.

The ability of the conduits, the Schwann cells macrosheath and a bundle of 30 μm poly-L-lactic acid fibers to guide the growth of neurons in dorsal root ganglia explants has been evaluated as well. Only the biohybrid system, composed by the conduit, the stretched fibers within and the cells macrosheath, is a beneficial enough context to permit neurons grow at a similar rate to other promising strategies in tissue engineering of the nervous system.

RESUMEN

La regeneración de tractos dañados o degenerados del sistema nervioso de manera autónoma es un fenómeno infrecuente, ya que están implicados una considerable cantidad de factores que la limitan u obstaculizan. Por ello, la medicina convencional tan solo ha logrado limitados éxitos a este respecto, tratando únicamente los síntomas y los efectos del daño. Para intentar revertirlo y lograr la reconexión funcional de neuronas, en la actualidad la ingeniería tisular está investigando acerca de la aplicación sinérgica de células, moléculas bioactivas y soportes tridimensionales biocompatibles. Concretamente, para regenerar estructuras del sistema nervioso se trabaja en la estrategia conocida como conductos neurales.

En esta tesis se ha diseñado, desarrollado y caracterizado tanto fisicoquímica como biológicamente un andamiaje acanalado poroso basado en ácido hialurónico, un polímero hidrófilo natural. Mediante el entrecruzamiento químico de este mediante divinil sulfona y su posterior liofilización, se ha logrado obtener un conducto milimétrico degradable, blando pero estable en medio fisiológico que, además, posee una pared con una singular distribución en tres capas capaz de evitar la migración de células de glía a su través, pero totalmente permeable a nutrientes y proteínas. Asimismo, las células de Schwann cultivadas en el interior del conducto proliferan confinadamente hasta formar al cabo de 10 días una estructura celular tubular de varios cientos de micras de diámetro, delgada pero densa, similar a las estructuras fasciculares de los nervios.

Se ha evaluado, además, la capacidad tanto de los conductos acanalados como de la macrovaina de células de Schwann y de un haz de fibras de ácido poli-L-láctico de unos 30 μm de diámetro para guiar el crecimiento de neuronas de explantes de ganglios de la raíz dorsal *in vitro*. Tan solo el sistema biohíbrido formado por el conjunto del conducto, las fibras estiradas en su interior y la vaina de células es capaz de aportar un contexto amigable tal para permitir a las neuronas crecer a tasas del mismo orden que en otras estrategias prometedoras en ingeniería tisular del sistema nervioso.

RESUM

La regeneració autònoma de tractes del sistema nerviós danyats o degenerats és un fenomen infreqüent, en tant que hi son implicats una considerable quantitat de factors que la limiten o obstaculitzen. Per aquesta causa, la medicina convencional tan sols ha assolit èxits limitats a aquest respecte, tractant únicament els símptomes i els efectes del dany. Per tractar de revertir-ho i aconseguir la reconexió funcional de neurones, en l'actualitat l'enginyeria tissular està investigant sobre l'aplicació sinèrgica de cèl·lules, molècules bioactives i suports tridimensionals biocompatibles. Més concretament, per a regenerar estructures del sistema nerviós es treballa amb l'estratègia coneguda com *conductes neurals*.

A aquesta tesi s'ha dissenyat, desenvolupat i caracteritzat, tant fisicoquímica com biològicament, una bastida acanalada porosa basada en àcid hialurònic, un polímer hidròfil natural. Mitjançant el seu entrecreuament químic amb divinil sulfona i la seua posterior liofilització, s'ha aconseguit obtenir un conducte mil·limètric degradable, tou però estable en medi fisiològic que, a més a més, posseeix una paret amb una singular distribució en tres capes capaç d'evitar la migració de cèl·lules glials al seu través, però totalment permeable a nutrients i proteïnes. Tanmateix, les cèl·lules de Schwann cultivades en l'interior del conducte proliferen confinades fins que formen, als 10 dies, una estructura cel·lular tubular de centenars de micres de diàmetre, prima però densa, semblant a les estructures fasciculars dels nervis.

S'ha avaluat, a més, la capacitat dels conductes acanalats, de la baina de cèl·lules de Schwann i d'un feix de fibres d'àcid poli-L-làctic d'uns 30 µm de diàmetre, per guiar el creixement *in vitro* de neurones d'explants de ganglis de l'arrel dorsal. Només el sistema biohíbrid format pel conjunt del conducte, les fibres estirades en el seu interior i la baina de cèl·lules aporta un context amigable tal que permet a les neurones créixer a taxes del mateix ordre que altres estratègies prometedores en enginyeria tissular del sistema nerviós.

GLOSARIO

4-AAP	4-aminoantipirina
BHE	Barrera hematoencefálica
BCA	Ácido bicinconínico (de <i>bicinchoninic acid</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (de <i>bovine serum albumin</i>)
CLSM	Microscopía confocal láser de barrido (de <i>confocal laser scanning microscopy</i>). También se denomina así al equipo
CNTP	Condiciones normales de temperatura y presión
CryoSEM	Sistema de criopreservación y sublimación acoplado a un microscopio electrónico de barrido (ver SEM)
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Medio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco (de <i>Dulbecco's modified Eagle médium</i>)
DMTA	Análisis dinámico térmico mecánico
DNA	Ácido desoxirribonucleico o ADN
DPBS	Tampón fosfato salino de Dulbecco (de <i>Dulbecco's phosphate buffer saline</i>)
DRG	Ganglio de la raíz dorsal (de dorsal root ganglia)
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DVS	Divinil sulfona
ECM	Matriz extracelular (de <i>extracellular matrix</i>)
eDRG	Explante de ganglio de la raíz dorsal de ratas P5
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (de <i>ethylenediaminetetra-acetic acid</i>)
EP	Enfermedad de Parkinson
EWC	Contenido de agua en equilibrio (de <i>equilibrium water content</i>)
FBS	Suero fetal bovino (de <i>fetal bovine serum</i>)
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato (de <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GAG	Glicosaminoglicano
GOx	Glucosa oxidasa
GMP	Buenas prácticas de fabricación (de <i>good manufacturing practices</i>)
Gt	De origen caprino (de <i>goat</i>)
HA	Ácido hialurónico (de <i>hyaluronic acid</i>)
HAS	Hialuronano sintasas
HR	Humedad relativa ambiental
HRP	Peroxidasa de rábano (de <i>horseradish peroxidase</i>)
LP	Proteína de enlace (de <i>link protein</i>)
MAG	Glicoproteína asociada a mielina

Ms	De origen murino (de <i>mouse</i>)
NgR	Receptor de Nogo-66
NSC	Célula madre neural (de <i>neural stem cell</i>)
O/N	Ciclo nocturno, periodo de 12 ~ 16 h (de <i>overnight</i>)
OCT	Compuesto para inclusión de muestras criocortadas
OMgp	Glicoproteína oligodendrocitaria de la mielina
P/S	penicilina potásica 100 U/ml + sulfato de estreptomicina 100 µg/ml
p75	Receptor de baja afinidad de factor de crecimiento nervioso
PB	Tampón fosfato
PCL	Poli-ε-caprolactona
PEA	Poliacrilato de etilo (de <i>poly(ethyl acrylate)</i>)
PEG	Polietilenglicol (de <i>polyethylene glycol</i>)
PI	Yoduro de propidio (de <i>propidium iodide</i>)
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PLLA	Ácido poli-L-láctico
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVA	Polivinil alcohol (de <i>polyvinyl alcohol</i>)
Rb	De origen leporino (de <i>rabbit</i>)
RGD	Polipéptido de arginina, glicina y ácido aspártico
SC	Célula(s) de Schwann (de <i>Schwann cell</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (de <i>scanning electron microscopy</i>). También se denomina así el equipo
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SVZ	Zona subventricular (de <i>subventricular zone</i>)
TGA	Análisis termogravimétrico
TMA	Análisis térmomecánico
UDP-GlcNAc	uridina 5'-difosfoácido glucurónico
UDP-GlcUA	uridina difosfato-N-acetilglucosamina
WC	Contenido de agua

CAPÍTULO I

ESTADO DEL ARTE



1. Regeneración en el sistema nervioso

1.1. Estructura del sistema nervioso

El sistema nervioso comprende el conjunto de órganos que se encargan de relacionar un organismo con su entorno y regular el control de este para lograr un equilibrio homeostático. Aunque existen grandes diferencias entre las células de diferentes partes de un mismo sistema nervioso, desde el punto de vista funcional se considera que este consta de dos unidades básicas: las neuronas, que se encargan de transmitir los estímulos nerviosos y de generar o modificar las redes neurales, y las células gliales o neuroglía, que actúan de apoyo biofísico de los somas neuronales y sus prolongaciones (neuritas). Las neuronas son las únicas células que requieren otras células de apoyo y protección para su buen funcionamiento, precisamente por la diversidad e importancia de las funciones que estas desempeñan.

El sistema nervioso de los mamíferos y otros animales suele dividirse en sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), de acuerdo con las marcadas diferencias fisiológicas y anatómicas que existen entre ellas. El primero comprende todos los órganos que se encargan de gestionar, transformar y almacenar la información en forma de impulsos electroquímicos (cerebro, cerebelo y médula espinal), mientras que el SNP son los nervios que actúan como canal de transmisión para conectar las áreas distales encargadas de la transducción de los estímulos físicos externos, de generar movimientos y segregar sustancias.

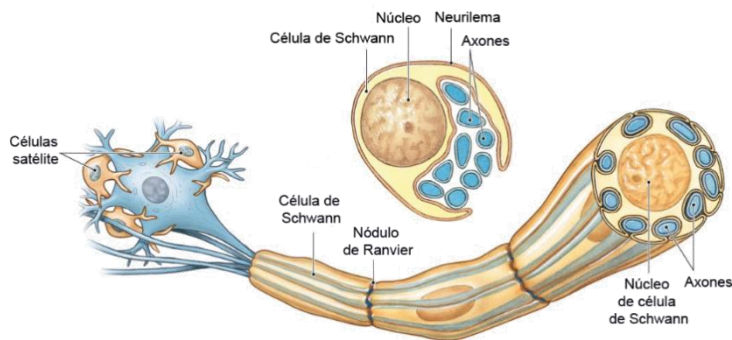


Figura 1. Diagrama de las células presentes en el sistema nervioso periférico: neuronas, células satélite y células de Schwann. Las neuronas (azul) proyectan axones amielínicos en el presente caso. Modificada con la autorización de Pearson Education Ltd.

Los nervios del SNP están organizados en fascículos de fibras paralelas que están protegidas por diferentes capas de tejido conectivo flexible

(endoneuro, perineuro y epineuro, de mayor a menor profundidad en el nervio). Cada una de estas fibras nerviosas está compuesta por uno o más axones envueltos por una vaina de mielina que forman las llamadas células de Schwann (SC), que se enrollan alrededor y permiten una transmisión de impulsos electroquímicos más rápida y eficiente (Figura 1). Además, un segundo tipo de células gliales conocidas como células satélite protegen el soma de las neuronas del SNP. Las capas de tejido conectivo son razonablemente permeables al tránsito de células, fluidos y gases y, de hecho, los nervios están irrigados con múltiples vasos del sistema circulatorio que circulan paralelos a las fibras nerviosas para nutrir a las diversas células presentes. Además, macrófagos, fagocitos y otras células del sistema inmunitario del organismo pueden activarse y acceder a las inmediaciones de los axones en caso de que se produzca una agresión o invasión externa.

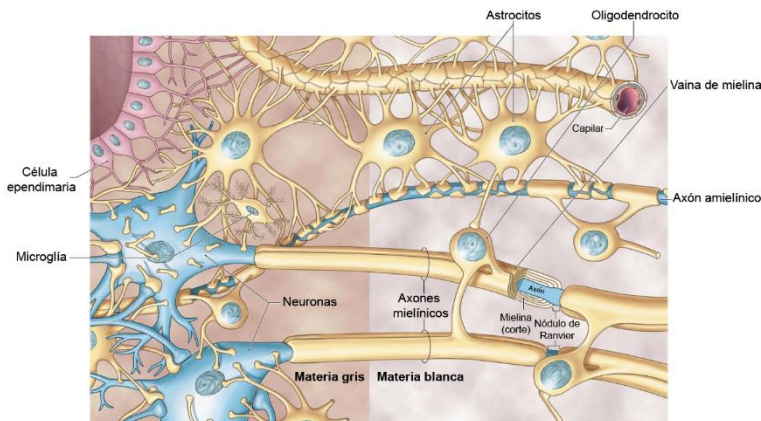


Figura 2. Esquema de los diferentes tipos de células del sistema nervioso central: neuronas, oligodendrocitos, microglía, astrocitos y células endimarias. Nótese cómo los cuerpos neuronales residen siempre en las inmediaciones del epéndimo (materia gris). Modificada con la autorización de Pearson Education Ltd.

El SNC, sin embargo, es un entorno más aislado del resto del organismo. Aunque también existen neuronas, su morfología y dimensiones suelen diferir bastante de las del SNP, ya que en este caso la función está más relacionada con la gestión de la información que con la transmisión rápida. Tampoco la neuroglía encargada de formar las vainas de mielina es la misma, ya que en este caso los oligodendrocitos cubren siempre varios axones a la vez y su soma no está en estrecho contacto con ninguno de ellos (Figura 2). El aporte de nutrientes tan solo tiene lugar a través de pequeños capilares que, a su vez, están recubiertos por prolongaciones de astrocitos, cuyas uniones son muy estrechas para limitar que pasen la mayor parte de moléculas que circulan por el torrente sanguíneo, formando así lo que se conoce como la barrera hematoencefálica (BHE). Los vasos mayores se



encuentran en la parte externa de la BHE, lo que se conoce como epéndimo, formado por células epiteliales columnares (ependimocitos) que solo permiten la evacuación de moléculas de residuo en dirección al líquido cefalorraquídeo, el cual actúa también como líquido hidráulico para suspender los órganos del SNC. Al ser este un sistema mucho más estanco y aislado (prueba de ello es la presencia de la BHE y que se encuentra protegido por estructuras óseas a diferencia del SNP), contiene incluso sus propios leucocitos, llamados microglía, que actúan como macrófagos residentes y sólo se activan ante agresiones externas o desequilibrios metabólicos [1].

Precisamente por estas diferencias entre el SNC y el SNP, los mecanismos que se activan cuando se produce un daño en ellos son muy diferentes y su evolución y desenlace puede depender de factores muy diversos.

1.2. Mecanismos de reacción ante daños

El sistema nervioso en general requiere células de soporte precisamente para defenderse y reaccionar ante daños que se pueden producir por falta de oxígeno y nutrientes, presencia de agentes tóxicos y bacteriológicos, traumas severos que destruyan tejido o la activación de rutas metabólicas degenerativas por mutaciones en el código genético.

Las neuronas son especialmente sensibles ante cualquier variación anómala en su metabolismo en cuanto a que son células cuya vida se extiende hasta equipararse con la de su huésped o incluso más allá [2]. Es decir, a diferencia del resto de células de un organismo, que suelen renovarse de manera periódica (entre unas horas y unos pocos años), las células neurales están especializadas en evitar los procesos naturales de envejecimiento celular. Cualquier modificación no programada de su ciclo vital requiere, por tanto, el apoyo de otros agentes (la neuroglía) para contener el daño y tratar de restablecer la función alterada.

En el SNP, puesto que los axones recorren frecuentemente grandes distancias (hasta 1.5 m) el mayor riesgo para las neuronas es una axotomía, *i.e.* la sección parcial o completa del canal axonal, o una desconexión distal de los botones sinápticos del axón. En el primer caso la regeneración es bastante favorable (de hasta ~ 1.5 mm/día) si el soma de las neuronas afectadas no ha sufrido daños y el tramo afectado es relativamente corto, esto es, menor a unos 2 cm [3]. La interrupción del axón y la apoptosis de las células de Schwann circundantes desencadenan una cascada de señalización celular y la liberación de una serie de enzimas que se conoce

como degeneración *walleriana* [4], donde los macrófagos, que pueden acceder al lugar del daño, comienzan a fagocitar y disgregar los restos de mielina y de células apoptóticas, con la consecuente reacción inflamatoria. Además, la exposición del “muñón” (*stump*) distal de la neurona al medio extracelular y a los iones del entorno, induce la formación de un cono de crecimiento [5]. Este cono, a su vez, emite factores bioquímicos que reclutan nuevas células de Schwann y provocan que estas formen con su propio soma unas estructuras tubulares, conocidas como bandas de Büngner. Dichas estructuras suelen estar en contacto con el extremo desconectado del nervio o la fibra neural. De este modo, cuando el cono de crecimiento de la neurona se encuentra con una banda de Büngner, el axón comienza a extenderse preferencialmente por el canal cilíndrico y puede llegar, eventualmente, a reconectarse con el punto original hacia donde emitía el estímulo la neurona (Figura 3A), pudiéndose restablecer incluso la función fisiológica si dicho punto no se ha degenerado o atrofiado demasiado como efecto de la falta de estimulación.

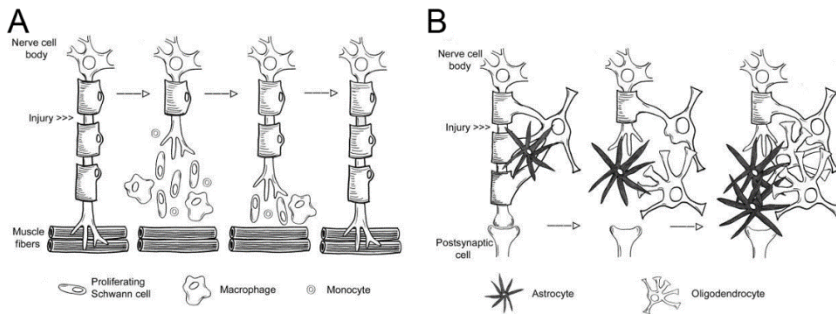


Figura 3. Mecanismos de regeneración en el sistema nervioso periférico (A) y el central (B).
Modificada de la referencia [6].

En cuanto al SNC, la respuesta por parte de la glía es muy diferente, por lo que también lo es el destino de la neurona. Cuando se secciona el canal axonal, los oligodendrocitos que generan la vaina de mielina no entran en apoptosis sino que se retraen y producen, junto con la propia neurona, un cambio en la composición química del medio extracelular. Esta alteración sirve de estímulo quimiotáctico por una parte para la microglía, que cambia su morfología y comienza a segregar enzimas y a alterar el pH del medio [7,8], y por otra para los astrocitos, los cuales se “activan”, modificando así su fenotipo (astrocitos reactivos) para expresar una serie de factores inhibitorios y proteoglicanos que generan una cicatriz glial [9,10]. Esta reacción se produce en un periodo relativamente corto de tiempo y tiene como fin contener el daño y evitar que este se propague (Figura 3B).



1.3. Limitaciones en la regeneración

En la década de los 60 se realizaron una serie de experimentos [11,12] que dieron pie a que se replantease la teoría de que las conexiones neuronales del encéfalo de un adulto son inmutables y no existe posibilidad de regeneración, surgida a raíz de los trabajos de Ramón y Cajal a principios del s. XX [13]. Sin embargo, los subsiguientes ensayos que se realizaron solo permitieron determinar que efectivamente insectos, anélidos y algunas aves poseían células neurales que podían crecer o proliferar aún en organismos adultos y no fue hasta 1992 cuando se encontraron evidencias de neurogénesis no embrionaria en mamíferos [14,15]. Concretamente, se encontraron nichos de células madre neuronales (NSC) en la zona subventricular (SVZ) del encéfalo que restituían las neuronas perdidas en el bulbo olfatorio y, más tarde, en el giro dentado del hipocampo [16] o en el epéndimo del canal central de la médula espinal [17].

Estos hallazgos demostraron que, en principio, las neuronas del sistema nervioso tenían la capacidad intrínseca de regenerarse si las condiciones del entorno eran adecuadas y que estas podían, además, ser sustituidas por nuevas neuronas diferenciadas de progenitores incluso en el SNC.

Ahora bien, como ya se ha expuesto en 1.2. *Mecanismos de reacción ante daños*, la reacción que se desencadena cuando el SNC sufre una lesión tiene como objetivo prioritario sellar rápidamente la vía abierta a través de la BHE y evitar que el daño afecte a más tejido circundante. Como consecuencia, las células gliales adoptan un comportamiento que, paradójicamente, actúa en detrimento de la autorregeneración de los axones afectados, obligando a que la recuperación de la función neural dependa exclusivamente de la capacidad de las neuronas cercanas no afectadas para generar nuevas sinapsis, lo que se conoce como plasticidad neuronal [10,18].

Por una parte, la microglía que acude a la zona del daño produce una respuesta inflamatoria que puede generar disfunciones en el tejido sano cercano [19] ya que, al ser relativamente pocos en número y no poder reclutar monocitos a través del flujo sanguíneo, intentan contrarrestarlo con una reacción más aguda. Sin embargo, es habitual que requieran un periodo bastante largo para fagocitar y degradar los desechos de células y mielina y, mientras esto ocurre, los oligodendrocitos tratan de generar más mielina para envolver de nuevo la parte desnuda del axón. Ahora bien, se cree que tanto los restos de mielina como aquella que sintetizan los oligodendrocitos tienen un efecto inhibitorio del crecimiento, en tanto en cuanto se registró crecimiento axonal *in vitro* cuando se inhibía la formación de mielina [20] y hay indicios de que la etapa de crecimiento y proliferación espontánea de las neuronas embrionarias finaliza cuando los oligodendrocitos comienzan a

sintetizar mielina [21]. En la actualidad se ha detectado que proteínas como la Nogo, la glicoproteína asociada a mielina (MAG) o la glicoproteína oligodendrocitaria de la mielina (OMgp) están directamente implicadas en la retracción del cono de crecimiento axonal y hasta se han descrito posibles mecanismos de interacción con los receptores de membrana NgR y p75 que desencadenarían la inhibición de los procesos naturales de regeneración neuronal [21,22].

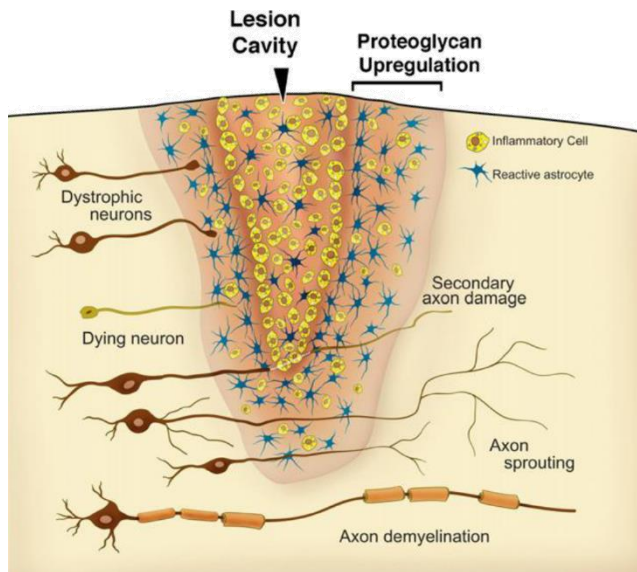


Figura 4. Diagrama de algunos efectos secundarios que produce una lesión o trauma en las neuronas del SNC. Extraída de la referencia [19].

Por su parte, cuando los astrocitos adoptan un fenotipo activado comienzan a expresar semaforinas, tenascina R, efrina B2 y otras proteínas *slit* en exceso que sirven de referencia para delimitar las zonas por las que el axón no debería crecer y las meninges limitrofes entre el SNC y el exterior, por lo que la zona dañada se convierte en una región de tránsito restringido para el cono de crecimiento axonal [19]. Además, dichos astrocitos comienzan a sintetizar grandes cantidades de proteoglicanos de condroitín sulfato, que se encuentran de manera natural en tejidos como el cartílago pero que en el SNC tan solo forman una membrana fibrosa y acelular, conocida como cicatriz glial, que actúa como barrera física [9,19,23].

Por si no fuera suficiente, cuando el daño no lo produce una agresión externa sino una alteración idiopática en el comportamiento de células sanas, no sólo se pueden producir algunas de las respuestas anteriormente descritas sino que, además, se ve disminuido el efecto beneficioso de los agentes que influyen positivamente en la regeneración autónoma. Este es el caso de la



enfermedad de Parkinson (EP), donde se forman inclusiones citoplasmáticas llamadas *cuerpos de Lewy* en el soma de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (el núcleo subcortical) y en células de alrededor [24], que causan que las células interrumpan su metabolismo normal y entren en apoptosis o se retraigan, un comportamiento habitual cuando cuerpos extraños aparecen la membrana celular debida al estrés producido por el retículo endoplasmático. Así, los axones degeneran espontáneamente y se reduce drásticamente la liberación de dopamina en el cuerpo estriado de los ganglios basales, el principal blanco de las sinapsis del tracto nigroestriatal. Se cree que estos agregados de proteínas intracelulares están asociadas a alteraciones genéticas relacionadas con alguna de las proteínas que intervienen en la ruta metabólica de la proteólisis de la α -sinucleína (la propia α -sinucleína, la ubiquitina hidrolasa L1 carboxi-terminal, la ligasa parkina, la pink1, la DJ-1 y otras) [24,25]. Esto provocaría que aumenten los niveles de sinucleína extracelular, que podría agruparse en precipitados macroméricos estables o que las propias células podrían alojar en su citoplasma para evitar su conformación oligomérica soluble (actualmente hay controversia al respecto).

Precisamente por todos estos inconvenientes y limitaciones, la regeneración autónoma del organismo ante un daño o perturbación severa en el SNC es muy desfavorable y no es de extrañar que Ramón y Cajal considerase que en un cerebro adulto *«las vías nerviosas son algo fijo, terminado, inmutable. Todo puede morir, nada puede regenerarse»* [13]. Tanto es así que, siguiendo con el ejemplo de la EP, los tratamientos que se aplican actualmente tan solo pretenden intentar aliviar la sintomatología asociada a la enfermedad [26,27]. Por ejemplo, la administración crónica de levodopa, un precursor de la dopamina que puede atravesar la BHE, se utiliza con mucha frecuencia para tratar la EP pero con la única intención de mantener de manera exógena los niveles de dopamina en el cuerpo estriado por encima de un umbral crítico. Es decir, que las terapias farmacológicas u otras más modernas como la estimulación cerebral profunda [28] no buscan en ningún caso inducir un ambiente favorable para que se restablezcan las conexiones perdidas. Incluso ante las angiopatías, ictus o hemorragias que afectan al sistema nervioso, donde los mecanismos moleculares que se alteran están mucho más descritos [29,30], solo tienen un pronóstico optimista los estudios del SNP tras el uso de fármacos y paliativos similares, con leves indicios de regeneración de tejido sano [31].



2. Ingeniería tisular

A pesar de las sólidas evidencias en contra de la posibilidad de poder recuperar tejido del sistema nervioso (u otros) que hubiera resultado dañado o destruido, a raíz de que se desarrollaron herramientas de análisis citológico más precisas y de que se descubriese que las células de un organismo adulto mantenían una cierta capacidad para generar tejido nuevo, incluso en el SNC, surgió un nuevo enfoque para tratar de enfrentarse técnicamente a cualquier daño o patología: la ingeniería tisular. Esta, según la describieron Langer y Vacanti [32], consiste en aplicar los fundamentos de la biología y la ingeniería para desarrollar sustitutos funcionales del tejido dañado. Aunque *a priori* podría parecer que cualquier tipo de prótesis ortopédica podría encajar en dicha definición, es importante recalcar que cuando se habla de un sustituto *funcional* se refiere a una solución ideal que restablezca por completo la función afectada, que se integre lo mejor posible al tejido circundante del huésped y que sirva para el resto de la vida del afectado. Por tanto, una prótesis metálica de cadera o una válvula cardíaca, que requieren una intervención quirúrgica agresiva, habitualmente medicación para evitar el rechazo, que tienen una vida de 10 – 15 años en el mejor de los casos y que, además, no pretenden restablecer el tejido sino sustituirlo, no entrarían dentro de este campo, aunque la experiencia obtenida gracias a estas técnicas sí constituye un sólido cimiento para desarrollar otros conceptos que pudieran, incluso, cooperar con el organismo para que este se regenere.

2.1. Terapias para la ingeniería tisular

Si bien la ingeniería tisular ha obtenido relevantes avances en la reconstrucción de tejido útil y sano en sistemas orgánicos como hueso [33], vasos sanguíneos [34], apéndices faciales [35] u órganos parciales [36] en cuestión de solo dos o tres décadas, recuperar las conexiones perdidas en el sistema nervioso ha supuesto tradicionalmente un reto muy complejo y en el que los investigadores han debido ser especialmente prudentes y metódicos.

La primera idea que se abordó con ese fin fue utilizar segmentos de otro nervio del propio sujeto para utilizarlo como autoinjerto en zonas donde hubiese quedado dañada una longitud excesiva para empalmar los extremos distal y proximal. Aunque esta idea no es estrictamente nueva [3,37], ha ofrecido resultados muy prometedores regenerando de manera funcional distancias de hasta 15 – 20 cm en SNP o pequeños segmentos del encéfalo [38], hasta el punto en que es complejo encontrar un dispositivo que dé un



resultado igual de satisfactorio [39] y, de hecho, se utiliza en la actualidad como la referencia estándar o control positivo de otras soluciones experimentales [40–42]. El inconveniente de este procedimiento es bien claro, puesto que requiere dos intervenciones quirúrgicas invasivas (una para tomar un fragmento de nervio y otra para injertarlo donde se requiere) y tejido sano del sujeto, lo que obviamente es una fuente limitada. Para evitar tener que recurrir a seccionar nervios sanos, se han realizado ensayos con otros tejidos más abundantes aunque similares como colágeno tendinoso [43], epimisio de fibras musculares [44] o incluso matriz extracelular (ECM) del SNC [45], pero por muy prometedores que sean los resultados, la tendencia actual va encaminada a intentar buscar terapias que no dependan de otras zonas de tejido del huésped.

Para sortear este inconveniente, se pensó en aplicar las técnicas de ingeniería para el desarrollo de materiales con dimensiones, morfología y características determinadas de la industria en la síntesis de dispositivos implantables o biomateriales. La idea de esta estrategia es utilizar sustancias o reactivos de fuente exógena al organismo dañado para confeccionar estructuras que presenten similitudes a las que están presentes en los órganos y sistemas, de modo que estas sean biocompatibles, se integren adecuadamente en el tejido circundante y puedan ser invadidos o sustituidos por células nativas para que estas restituyan la función orgánica perdida.

Los primeros biomateriales en los que se trabajó fueron sustancias de origen natural y de naturaleza idéntica o muy similar al tejido a restituir, bajo la hipótesis de que las células generarán un rechazo menor en contacto con estructuras y moléculas que puedan reconocer y que no interfieran en sus funciones metabólicas. Así, se comenzó a probar con matrices basadas en mezclas genéricas de sustancias de la ECM [46,47], pero también con andamiajes o *scaffolds* (por su nombre en inglés) constituidos por moléculas purificadas también de la ECM o mezclas controladas de estas [48,49]. Ejemplos como el colágeno [50–53], otras proteínas [54,55] y algunos polisacáridos [50,56,57] son especialmente interesantes porque son relativamente abundantes en la matriz extracelular y las propiedades del *scaffold* son muy reproducibles (por ser sustancias o mezclas puras). Además, estos se pueden obtener en forma de matrices tridimensionales porosas, de fibras, de conductos tubulares o incluso de soluciones líquidas gelificables *in situ*. Este último concepto ha ganado mucha aceptación en los últimos años porque permite introducir el biomaterial con una mera inyección, ya que coagula en contacto con alguna propiedad fisiológica (temperatura, presencia de iones...) y, aunque la mayoría están basados en polipéptidos autoensamblantes [58–61] que no se encuentran en los tejidos



de mamíferos, presentan motivos proteicos similares a secuencias de interacción célula-entorno muy conocidas y favorables para las células como la RGD (arginina, glicina y ácido aspártico). Ahora bien, no debe olvidarse que los tejidos de un organismo se forman gracias a un complejo entramado de interacciones jerárquicas entre diferentes tipos celulares que son prácticamente imposibles de emular tomando los elementos por separado, por lo que el principal defecto de los *scaffolds* de origen natural o de composición muy similar es que suelen ser muy blandos, difíciles de manipular y acostumbran a ser degradados por el entorno en un tiempo insuficiente como para que sirvan de apoyo efectivo. Además, las moléculas naturales se suelen extraer de fuente animal o bacteriológica porque suele ser más económico que sintetizarlas químicamente, por lo que siempre existe cierto riesgo de contaminación biológica o incompatibilidad inmune por las diferencias entre especies o sujetos.

Los biomateriales de origen sintético han pretendido, desde su introducción en la ingeniería tisular, suplir las carencias de los naturales en cuanto a que se conocen múltiples modos de sintetizarlos, se pueden conformar como estructuras de morfología muy controlable (Figura 5) y además sus propiedades se pueden modular realizando pequeñas variaciones en su estado físico o termodinámico. Originalmente, para regeneración de SNP se comercializaron sencillos conductos de silicona, pero estos fueron rápidamente sustituidos y optimizados por no ser degradables, porque formaban una cápsula fibrosa excesiva y por problemas con la compresión de los nervios. De entre los más usados actualmente se encuentra la poli-ε-caprolactona [62–64], el ácido poli-L-láctico [65,66], el copolímero ácido poli(láctico-co-glicólico) o PLGA, [67,68] u otros de diferente naturaleza [69–71]. Cada uno de ellos tiene un módulo mecánico y viscoelástico, una densidad, una reactividad química, una temperatura de transición vítrea (en su caso) y una solubilidad en diferentes solventes que le es característica y que suele ser cuantitativamente diferente del resto, por lo que dependiendo del tipo de tejido que se pretende regenerar se puede seleccionar el más adecuado y conformarlo en forma de un *scaffold* tridimensional que emule dicho tejido. Por ejemplo, se pueden seleccionar polímeros elásticos y resistentes para sustituir cartílago o tendones, pero si se desean obtener implantes corneales el material deberá ser necesariamente flexible y transparente.

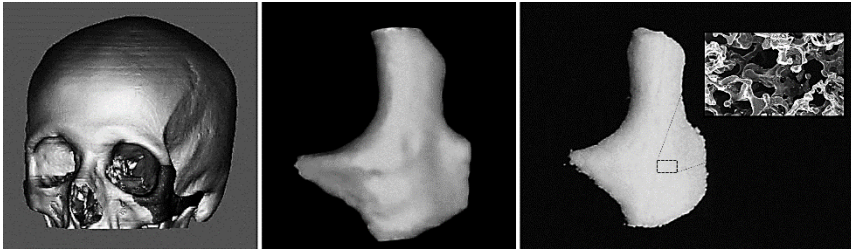


Figura 5. Se está experimentando actualmente con la posibilidad de utilizar las técnicas de diagnóstico por imagen para generar implantes óseos para reconstrucción maxilofacial. En el ejemplo, a partir de una secuencia tomográfica exacta del paciente (izquierda), se modelizó la pieza ósea sustituta con un programa CAD 3D (centro) y se imprimió un scaffold de PLGA (derecha) con dimensiones y porosidad controladas (detalle). Extraída de la referencia [72].

Cabe destacar, para dar cuenta del auge que han tenido los biomateriales en general en las últimas décadas, que todos los ejemplos citados están orientados al sistema nervioso y que, si bien es cierto que la mayoría de las soluciones están diseñadas para regeneración de nervios porque permiten estrategias bastante sofisticadas y se obtienen resultados muy prometedores [73], existen algunas orientadas a restituir tejido del SNC e incluso algunas aproximaciones para tejido encefálico [62,63], a pesar de las limitaciones ya descritas. Ahora bien, los biomateriales sintéticos tampoco constituyen un remedio perfecto, en cuanto a que no se conocen por completo las rutas metabólicas de las células del huésped con las que el biomaterial puede interaccionar, suelen generar una moderada reacción a cuerpo extraño que impide la óptima integración del implante y suelen requerir técnicas de cirugía invasiva. Es más, tanto si son biodegradables por el organismo como si no, pueden suponer un problema ya que en el primer caso los metabolitos de degradación pueden producir toxicidad y si no son degradables forman una barrera al libre flujo de nutrientes, gases y moléculas bioactivas.

Paralelamente, hace ya bastante tiempo que se puso en práctica la posibilidad de trasplantar células directamente en el tejido lesionado con el fin de compensar la pérdida de estas en la zona dañada e intentar que generen tejido nuevo sano. En un primer momento se utilizó células maduras del mismo linaje celular que aquellas que se habían perdido, tomando pequeñas muestras mediante biopsias [74,75]. Más tarde, los descubrimientos que se hicieron acerca de la multipotencialidad de algunas células y la capacidad para controlar su diferenciación según las condiciones ambientales llevaron a los investigadores a experimentar en modelos *in vivo* con injertos de las llamadas *células madre* [76–78], bajo la hipótesis de que el propio entorno del organismo serviría de estímulo para autogestionar la proliferación y diferenciación de dichas células madre hasta alcanzar niveles terapéuticos regenerativos.

Sin embargo, si por una parte las células maduras tenían el defecto de que al estar muy especializadas su tasa de proliferación solía ser relativamente baja y que en ocasiones la cantidad de tejido disponible para biopsiar era muy limitado, la terapia con células madre pronto evidenció sus limitaciones. Al margen de que los reservorios de células madre suelen encontrarse en regiones de acceso complejo, al injertarlas en un entorno nocivo y hostil como es tejido dañado, estas suelen morir espontáneamente o migrar a zonas adyacentes registrándose poblaciones inferiores al 10% tras varias semanas, de las cuales solo una pequeña parte presentaban el fenotipo de células especializadas [79,80]. Y por si fuera poco, al no conocer con rigurosidad muchas de las rutas metabólicas que activan la diferenciación de diferentes linajes celulares, algunos ensayos clínicos e *in vivo* en modelos animales han producido efectos inesperados y adversos, como es el caso de formación de matriz ósea en el párpado de una paciente o la formación de teratomas a falta de un estímulo que inhiba la proliferación descontrolada, de los que desgraciadamente hay varios casos descritos [81].

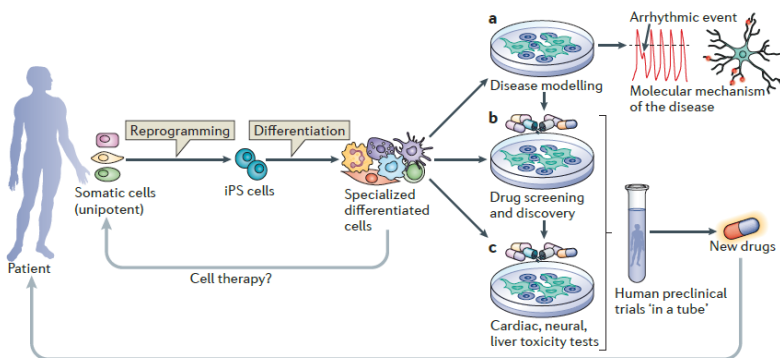


Figura 6. Diagrama de los potenciales usos de la técnica de reprogramación para formar células madres pluripotenciales inducidas (iPS). Extraída de la referencia [82].

En los últimos años el uso de células madre ha despertado un renovado interés desde que el grupo de Yamanaka consiguió reprogramar células maduras para que se comportasen como células madre [83,84], lo que le hizo merecedor del Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 2012 y podría suponer una fuente virtualmente inagotable de células de cualquier linaje a partir de células somáticas, como por ejemplo adipocitos o células epiteliales cutáneas, si se cultivan en condiciones muy controladas. De este modo, sería posible utilizar las células obtenidas para realizar injertos citológicos o realizar cualquier tipo de experimento *in vitro*, como análisis fenotípico y fisiológico de la célula o realizar baterías de pruebas de fármacos y factores para evaluar su rendimiento terapéutico o su toxicidad.



Sin embargo, aunque la terapia celular ha obtenido resultados prometedores y por su parte la farmacología está utilizando los hallazgos en metabolómica en su favor para maximizar el éxito de los tratamientos usando terapia génica, factores bioactivos y fármacos “a medida” [85–87], lo cierto es que estas estrategias por separado no pueden solventar los problemas que les son inherentes. Por ello, la tendencia actual va orientada a combinar los diferentes enfoques de la ingeniería tisular, ya que los biomateriales pueden proporcionar el contexto tridimensional (sirvan como ejemplo las referencias [88–92]) del que carecen las células cuando se implantan al no haber matriz extracelular ni un entorno amigable, y también pueden actuar como dispositivo de liberación controlada de fármacos [93–95] que ayude además a dirigir selectivamente la zona u órgano donde deben actuar estas moléculas, en el caso de administrarlas por vía oral o intravenosa [96,97].

Incluso se están valorando en la actualidad otro tipo de enfoques terapéuticos que han sido menos estudiados desde el punto de vista de la ingeniería tisular [98] para complementar la capacidad regenerativa que se espera obtener con sistemas mixtos mediante el uso de campos electromagnéticos o sistemas nanoelectrónicos que permitan estimular físicamente las células en contacto o recabar información electrofisiológica *in situ* [99,100]. Es más, las técnicas de cultivo *in vitro* se han adaptado a los nuevos requisitos implementando los *scaffolds* tridimensionales y bioreactores que simulan factores como cargas mecánicas intermitentes o flujo continuo de nutrientes para emular mejor las condiciones del organismo de modo que se puedan extrapolar mejor los resultados.

Si se llega a conocer con detalle las rutas metabólicas de las células de diferentes linajes, su comportamiento frente a cualquier estímulo y se consigue obtener una fuente abundante de células sanas autólogas que puedan ser amplificadas *in vitro* en condiciones casi idénticas a las del órgano de origen, la regeneración funcional de los tejidos humanos será una realidad incluso ante lesiones o enfermedades para las que hoy en día no hay ni siquiera remedios paliativos.

2.2. El ácido hialurónico

El ácido hialurónico (HA) es un glicosaminoglicano (GAG) no ramificado constituido por pares de unidades de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina. Se encuentra de manera natural en el tejido conectivo de la mayoría de los vertebrados y se puede encontrar desde en forma de pequeños oligosacáridos hasta como una macromolécula de algo más de 10^6 Da de peso molecular.



Desde el punto de vista químico, es un polímero muy particular, ya que en algunos sentidos tiene un comportamiento muy dispar al de otros polisacáridos como el dextrano, el quitosano o la celulosa, e incluso respecto otros GAG como el condroitín sulfato, el queratán sulfato o la heparina, especialmente en disoluciones acuosas. Desde que en 1934 Meyer lo aislara por primera vez de humor vítreo del globo ocular [101], se le dedicó mucha atención a este GAG por sus propiedades en ocasiones difíciles de justificar. Por una parte, algunos estudios indicaban que la molécula tenía un peso molecular altísimo, se distribuía como un ovillo estadístico y formaba enmarañamientos físicos y ocupaba un gran volumen de exclusión en medio acuoso [102,103]. Pero también había indicios de que en realidad las mezclas tenían una gran polidispersidad (pesos moleculares muy diferentes), que su carácter polielectrolítico generaba interacciones entre cadenas que además eran muy dependientes de los iones del entorno, que la viscosidad de disoluciones acuosas aumentaba con la concentración sin llegar a formar un gel en ningún caso y que había cadenas polipeptídicas íntimamente asociadas a las cadenas de HA [104,105], lo que llevó a dudar de si en realidad se trataría de un proteoglicano.

Para poder determinar con precisión el porqué de obtener resultados que podrían ser incluso contradictorios habría que esperar prácticamente hasta los años 90, cuando por una parte se averiguó la estructura tridimensional de la molécula de HA gracias a instrumentos de análisis químico de precisión y a técnicas de estudio en proteómica [106–108], y por otra parte se descubrió su mecanismo de síntesis biológica. De acuerdo a los hallazgos realizados en algunas bacterias y algunos animales, unas enzimas encargadas de la formación de hialurónico, las hialuronano sintasas (HAS), utilizarían los sustratos uridina 5'-difosfoácido glucurónico (UDP-GlcUA) y uridina difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) para realizar una polimerización alterna en cadena [109,110]. En los mamíferos, las HAS se encuentran en la membrana celular de fibroblastos, queratinocitos, condrocitos y células especializadas en formación de tejido conectivo y extruyen la macromolécula al exterior conforme la producen, lo cual permite obtener HA de peso molecular muy alto y controlado [111], si bien es cierto que las HAS no pueden unir dos oligosacáridos de HA y que tampoco se conoce con precisión si la longitud de la cadena la determinan las interacciones que la molécula de HA ya formada tiene con el entorno o la disponibilidad de UDP-GlcUA y UDP-GlcNAc en el citoplasma.

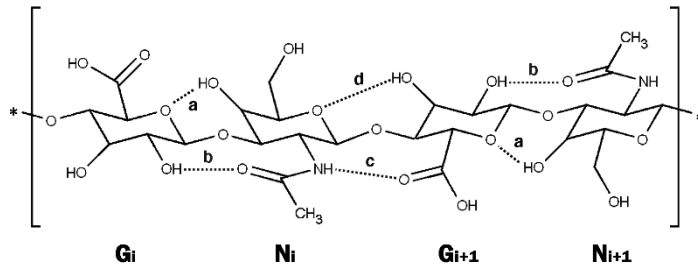


Figura 7. Estructura química de dos unidades de repetición de ácido hialurónico. La estructura de cada par ácido D-glucurónico (G) y D-N-acetilglucosamina (N) está rotada 180° por el eje de la cadena respecto del par disacáridos adyacentes (G_{i+1} y N_{i+1}) de modo que se puedan formar los puentes de hidrógeno representados por las líneas de puntos. Según Heatley [106], en presencia de agua, una molécula de H_2O se intercala en el enlace c y estabiliza la molécula.

En la actualidad la tesis más aceptada a la que se ha llegado aunando los últimos descubrimientos previos es que el HA es un polianión en medio acuoso (por su grupo carboxilo) distribuido como un ovillo estadístico que, a pesar de que puede formar interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno intercatenarios, se organiza de modo que pueda formar varios enlaces de hidrógeno intramoleculares (Figura 7). Esto justificaría el hecho de que el HA, que es tremendamente hidrófilo, en disolución aumente su viscosidad enormemente cuando aumenta la concentración sin llegar a formar un gel: las cadenas se enmarañan e interactúan físicamente, pero tienen movilidad relativa entre ellas porque los enlaces formados son fácilmente sustituibles por moléculas de agua, no así los puentes intramoleculares (salvo el c de la Figura 7), que son los responsables de la estructura secundaria del HA y rigidizan en gran medida los enlaces éter interglucosídicos.

Por su parte, aunque el HA puede alcanzar pesos moleculares superiores a 1 MDa, es habitual que haya fracciones más pequeñas ya que en los tejidos donde hay HA también suelen estar presentes enzimas de la familia hialuronidasa que, como su propio nombre indica, fraccionan las cadenas de ácido hialurónico en función de la necesidad del organismo [112]. Esto es muy interesante, ya que aunque antaño se pensó que el principal cometido del HA era el de contribuir a modificar las propiedades elastoméricas de la ECM, se ha descubierto que también cumple funciones biológicas fundamentales y que estas varían dependiendo del peso molecular de dicho polímero. Así, al HA de alto peso molecular (habitualmente > 60 kDa) se le atribuyen propiedades antiadherentes para las células [113] que podrían inhibir la formación de la cicatriz glial y mantener a los astrocitos en un estado quiescente y no reactivo [114,115]. Además, es la molécula

constitutiva de la sustancia fundamental [116] que, junto con las fibras elásticas y colágenas, forma el tejido conjuntivo y lleva asociadas una gran cantidad de proteoglicanos asociados a esta mediante proteínas de enlace (Figura 8), razón por la cual es frecuente que el HA aparezca inherentemente ligado a proteínas. El ácido hialurónico del complejo HA-proteoglicanos de la sustancia fundamental se asocia a los receptores transmembrana CD44 y RHAMM de modo que se inducen modificaciones en el esqueleto de actina de las células de la neuroglía y se promueve la motilidad de estas [1,117].

Por su parte, los fragmentos (tetrasacáridos, hexasacáridos y otros oligosacáridos de pequeño tamaño) se forman de manera significativa cuando se produce un daño o una alteración anómala del medio extracelular, ya que se activa la expresión de hialuronidasa. Dichos fragmentos se asocian al receptor TLR-4 o a otro isómero del CD44 presente en la microglía, los astrocitos, las células epiteliales y otras y desencadena una cascada de señalización de alerta frente a daños, que incluye la activación de una respuesta inmune [118], angiogénesis localizada [119] y la proliferación y diferenciación de astrocitos que, además, se vuelven reactivos [120].

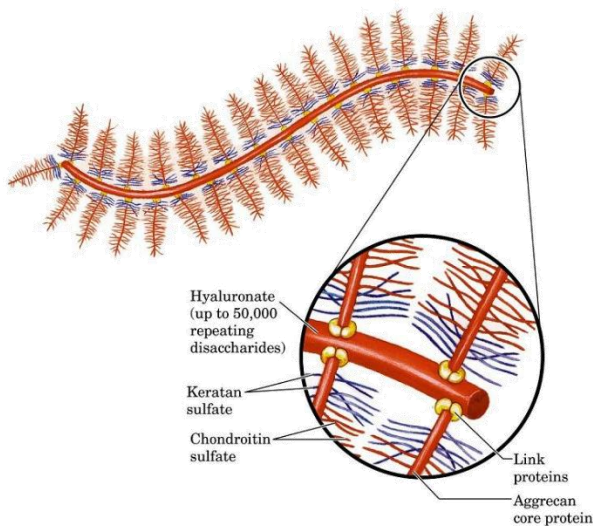


Figura 8. Esquema del complejo de la sustancia fundamental del tejido conjuntivo, formado por una cadena central de HA asociada mediante proteínas de enlace a agreganos que sostienen gran cantidad de GAG.

Por su función en la regeneración de tejido y su naturaleza hidrófila, el HA purificado de origen animal o bacteriano es ampliamente utilizado en la actualidad en preparados cosméticos o en cirugía plástica como relleno



subcutáneo inyectable. Sin embargo, lo que lo hace realmente interesante es que sus únicas propiedades fisicoquímicas y su importancia en el metabolismo de muchas células han llevado a la ingeniería tisular a verlo como un interesante candidato para mejorar la velocidad de curación de heridas y quemaduras de baja gravedad [121], evitar adhesiones entre membranas de tejido tras las intervenciones quirúrgicas [122] o para aplicaciones regenerativas más complejas [57,123].

2.3. Modificaciones del ácido hialurónico

Aunque el uso del ácido hialurónico con fines terapéuticos parece muy interesante teniendo en cuenta su capacidad para modular el comportamiento de las células gliales e inmunitarias, lo cierto es que su aplicación directa no comporta tantos beneficios como cabría esperar. Por una parte, salvo que la fuente de HA sea autóloga, que es una situación poco frecuente, las diferencias entre el organismo huésped y el donante o productor (el origen más frecuente del HA en la actualidad es bacteriológico) suelen inducir una leve reacción a cuerpo extraño con el consecuente aumento en la concentración local de hialuronidasa, lo que provoca que en poco tiempo disminuya la viscosidad de la disolución y los fragmentos de HA difundan hacia regiones cercanas de tejido o al flujo sanguíneo. Además, tampoco es posible aprovechar sus propiedades viscoelásticas porque, al contrario que por ejemplo el colágeno, las interacciones intermoleculares que se forman se disocian con mucha facilidad en medio acuoso, por lo que no es posible formar un gel solo compuesto por HA que contenga y distribuya impactos o esfuerzos. Por este motivo, es bastante frecuente que se modifiquen parcialmente algunos de los grupos funcionales del polímero para ajustar determinadas propiedades fisicoquímicas o estimular determinadas respuestas celulares.

Aunque aquí solo se tratarán algunos ejemplos, las revisiones actualizadas de Lam [124] y Schanté [125] proporcionan un exhaustivo compendio de las modificaciones que se utilizan, sus características y su finalidad, que se pueden englobar en 5 grupos diferentes: entrecruzamientos químicos directos o indirectos, entrecruzamientos físicos, funcionalizaciones metabólicas e injertos para uso como dispensador de fármacos.

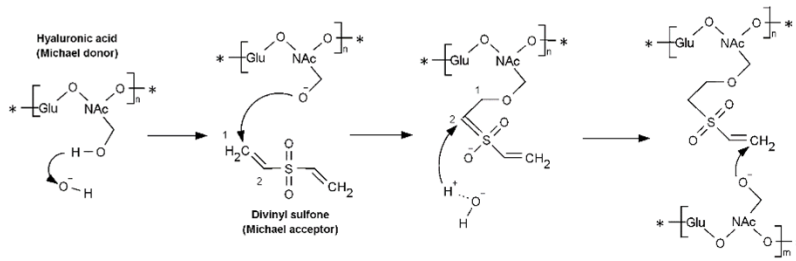


Figura 9. Mecanismo de reacción del entrecruzamiento de cadenas de HA vía DVS en medio básico. Elaboración propia basada en el mecanismo de reacción de tioles con grupos carbonilo α,β -insaturados, de acuerdo con la hipótesis de [126] de que se trata de una adición de Michael. Glu = Ácido glucurónico; NAc = N-acetilglucosamina.

Un entrecruzamiento directo se puede realizar mediante un agente entrecruzante que pueda reaccionar con alguno de los grupos laterales de la cadena principal de HA (el metilol, el carboxilo o el acetamida habitualmente) y tenga dos o más extremos reactivos idénticos, para formar enlaces covalentes entre varias cadenas diferentes, como es el caso de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida [127,128], la divinil sulfona [126,129], la epiclohidrina [130] o el glutaraldehído [131], por citar algunos. El entrecruzamiento indirecto es similar, solo que la molécula que se asocia al HA no reacciona con más de una cadena sino que el entrecruzamiento se produce cuando se unen dos de estas moléculas en unas condiciones determinadas. El primero es un sistema muy práctico ya que suele requerir condiciones muy suaves de entrecruzamiento, como es el caso de la divinil sulfona (DVS, Figura 9) que entrecruza al HA a temperatura ambiente en cuestión de minutos. El segundo suele requerir unas condiciones de síntesis más específicas para que se produzca el enlace al HA pero a cambio permite que el entrecruzamiento en sí se active en cualquier momento mediante fenómenos físicos como la fotoiniciación [132,133].

El entrecruzamiento físico es un procedimiento relativamente novedoso [134] en el que se pretenden formar interacciones semirreversibles gracias a enlazar una ramificación en un grupo lateral del HA, de modo que el polímero se convierta en un amfifilo que pueda enmarañarse lo suficiente como para generar un gel físico en determinadas condiciones.

Las funcionalizaciones metabólicas consisten en unir secuencias de aminoácidos, dominios proteicos o grupos funcionales que estimulen a las células, al HA mediante enlaces covalentes o interacciones electrostáticas. De este modo, la aplicación de HA funcionalizado en un tejido debería poder activar determinadas rutas metabólicas, tanto las que le son inherentes al HA de alto peso molecular (el más utilizado) como las de los añadidos cuyo



cometido puede variar desde activar procesos biosintéticos intracelulares [135,136] hasta servir de anclaje [137,138], pasando por servir meramente para que las integrinas de las células se asocien mejor al HA [139]. Es relativamente frecuente que en estos casos el HA se entrecruce previamente a la adición de motivos proteicos bioactivos [135,137–139] para lograr que la señal actúe durante más tiempo, ya que de otro modo las secuencias de aminoácidos se metabolizarían rápidamente y no podrían cumplir su función.

Por último, también se ha estudiado la posibilidad de usar disoluciones de HA como matriz de liberación de fármacos o factores de crecimiento, para mantener una concentración concreta en el organismo el mayor tiempo posible sin tener que tener que aportar nuevas dosis. Esto se puede realizar mezclando directamente el HA con las moléculas para que gracias a las interacciones electrostáticas y a la alta viscosidad de las disoluciones de HA el fármaco difunda lentamente o uniéndose covalentemente los fragmentos bioactivos de modo que estos se liberen al medio conforme se degrada el HA [140,141].

Dichas modificaciones del HA permiten formar geles estables y manipulables que pueden conformarse con una morfología definida, mejorar sus propiedades mecánicas y aumentar la compatibilidad HA-tejido, por lo que suponen una ventaja significativa sin apenas modificar la estructura original.



3. Estrategias para regenerar el sistema nervioso

Es habitual que a la hora de generar dispositivos para la regeneración de tejido perdido o dañado se tenga en especial consideración tanto la composición química original como las propiedades fisicomecánicas o la morfología estructural de la matriz extracelular. En ese sentido, es evidente que una prótesis regenerativa de hueso debería tener gran resistencia ante cargas mientras que, por ejemplo, un parche cardiaco tendría que ser necesariamente elástico para poder deformarse coordinadamente con el miocardio en cada ciclo de sístole-diástole. Pero también es muy importante que las células que se alojen o invadan el *scaffold* implantado se encuentren con una arquitectura espacial que les resulte familiar y les permita migrar y cumplir con todas las operaciones necesarias para lograr una regeneración tisular funcional y efectiva.

A pesar de su complejidad y las limitaciones que ya se han descrito para lograr que el sistema nervioso regenere, se han realizado bastantes estudios *in vitro* con estrategias diferentes que permiten predecir la efectividad de cada una antes de su aplicación en ensayos clínicos. Aunque se han utilizado para este fin geles inyectados directamente [57], *scaffolds* tridimensionales porosos similares a una esponja [127], mallas con geometría regular de poro [132], microfilamentos alargados y orientados [65] y otras configuraciones que han mostrado ser útiles para otros tejidos, lo cierto es que las mejores aproximaciones han mostrado ser los llamados conductos nerviosos por su estructura tubular acanalada similar a los fascículos nerviosos [73]. Incluso se ha barajado su uso para regenerar no solo axones del SNP sino también médula [142] o encéfalo [143] en vista de que, aunque hay evidentes diferencias, las células funcionales en todo el sistema nervioso son al fin y al cabo neuronas, y ante los frustrantes intentos de la comunidad científica de restituir tejido de SNC dañado [144].

3.1. Conductos nerviosos

Se entiende por conducto nervioso cualquier dispositivo con una estructura estable y alargada que tenga como fin servir al soporte y crecimiento de los axones que hayan perdido la capacidad de establecer conexiones sinápticas por daño o degeneración. Bajo esta definición se pueden encontrar tanto estructuras cilíndricas porosas de colágeno cuyas cavidades elipsoidales tienen una dirección preferencial [143,145] como haces de microfilamentos unidos de PLGA y PCL simulando la estructura subfascicular del endoneuro [142], aunque lo más habitual es usar conductos tubulares con uno o más canales pasantes paralelos [133,146,147] que sirvan de camino



preferencial o guía a los axones, o bien sistemas mixtos de los anteriores [148,149]. Aunque el conducto nervioso en sí no tiene por qué estar orientado necesariamente a regeneración de sistemas del SNP, lo cierto es que la mayoría de los que se han desarrollado fueron diseñados como puente para unir nervios axotomizados. De hecho, los únicos modelos que han sido patentados, aprobados por los comités responsables de la salud pública y posteriormente comercializados, son sencillos tubos de pared maciza de hasta 5 - 7 cm de largo ideados para conectar extremos desconectados de grandes haces nerviosos como el nervio ciático o los nervios espinales (se puede consultar una lista detallada y actualizada en la revisión de Gu [150]). En cuanto al SNC, los experimentos con conductos nerviosos se encuentran de momento limitados a su aplicación como implantes en modelos animales en el mejor de los casos, aunque en su favor debe decirse que no existe ninguna alternativa comercial más allá del tratamiento farmacológico y que estrategias paralelas como el injertos de células se encuentran todavía en fases preliminares de ensayos clínicos en humanos (sirvan de ejemplo los experimentos de Dalton Dietrich o de Saud Sadiq, de la *University of Miami* y el *Tisch MS Research Center of New York*, respectivamente, cuyos ensayos han aparecido en prensa pero de los cuales todavía no hay resultados publicados).

De todos modos, incluso los modelos comerciales ya existentes para regeneración del sistema nervioso están basados en los diseños primitivos con los que se comenzó a estudiar la aplicación de conductos nerviosos hace 30 años [151], por lo que se espera mejorar las propiedades de los conductos que aparecerán en los próximos años en el mercado y, con ello, las perspectivas de una regeneración efectiva y funcional incluso en distancias bastante largas.

3.2. Parámetros de diseño para el conducto nervioso ideal

Los diferentes factores estudiados en los experimentos ya citados [133,142,145-149] han permitido discriminar cuáles de ellos suponían una ventaja significativa para lograr la supervivencia de células gliales y la extensión de axones a lo largo de los diferentes conductos nerviosos. De acuerdo a las recopilaciones efectuadas por Zhang [152], de Ruiter [153], Subramanian [154] y Nectow [155], quienes analizaron un gran volumen de publicaciones científicas para determinar qué fenómenos influían positiva y negativamente en las células en contacto con *scaffolds* de este tipo, existen una serie de variables de diseño que un conducto nervioso ideal debería considerar e incorporar (Figura 10):

- 1) **Estructura acanalada con topografía controlada:** Diversos estudios han definido cómo interaccionan las células a pequeña escala. Por una parte, las células neurales tienden a crecer y desarrollarse mejor sobre estructuras esféricas o cilíndricas, presumiblemente por analogía con las estructuras similares como nervios, fascículos medulares o tractos encefálicos. Que además el material presente poros pequeños [127,128,156,157] es útil para que medie un buen intercambio de nutrientes y productos de desecho y una adecuada comunicación intercelular entre el interior y el exterior del conducto. También las variaciones a nivel de nanómetros en la rugosidad de las superficies [158,159] pueden inducir que estas segreguen predominantemente una determinada sustancia o facilitar la diferenciación de una célula madre en una línea germinal concreta.
- 2) **Biodegradabilidad:** Si bien es cierto que algunos enfoques todavía pretenden desarrollar *scaffolds* no degradables que se integren perfectamente en el lugar de la lesión, los biomateriales fueron en origen planteados como un soporte provisional que más tarde sería sustituido por la propia matriz extracelular que las células producen al invadir de nuevo las áreas a regenerar. Por tanto, sería interesante poder encontrar un material que soportase las condiciones fisiológicas un tiempo pero fuese desapareciendo a la vez que las células del huésped van fabricando nuevo tejido. El estudio de los productos de degradación y si estos son metabolizables o no en el organismo humano es crucial para su adecuada aceptación a nivel clínico.

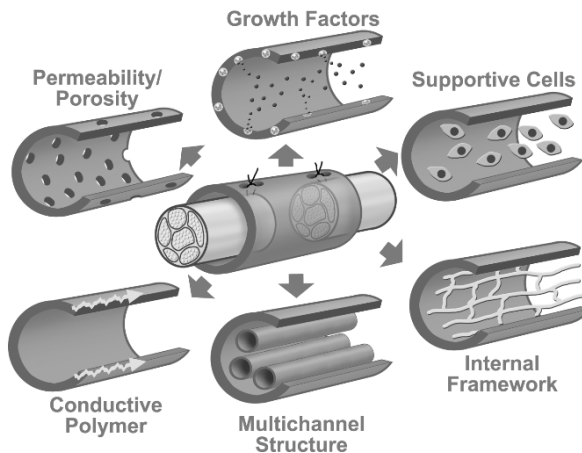


Figura 10. Parámetros cruciales de diseño para generar un conducto nervioso ideal de acuerdo a la revisión de de Ruiter [153].



- 3) **Incorporación de células de apoyo:** Casi todos los trabajos publicados en este ámbito muestran una mejora perceptible en el desempeño de los conductos neurales *in vivo* cuando estos llevan neuroglía precultivada en el interior con respecto a los mismos vacíos. Ya se ha comentado anteriormente los beneficios de las terapias celulares para la ingeniería tisular, pero gracias a la contención que suponen los *scaffolds*, las células multiplican su efecto al no morir ni migrar hacia otras zonas, que era uno de los principales inconvenientes de dicha técnica.
- 4) **Liberación de moléculas bioactivas:** El uso de la otra gran rama de la ingeniería tisular también se ve como un factor clave para lograr modular el comportamiento de las células y mejorar su supervivencia y crecimiento. Aquellos biomateriales que admiten en su matriz citoquinas o moléculas bioactivas que luego pueden ir liberando a una velocidad concreta son especialmente deseables para mantener un efecto prolongado de las moléculas. El hecho de que el material sea degradable o embeber geles y micropartículas de otro material también ayuda a poder establecer más de una vía cinética de actuación para tratamientos de mayor complejidad.
- 5) **Sustrato orientado y angiogénico:** La integración total del dispositivo con el tejido circundante a medio y largo plazo requiere que este se vascularice para poder aportar nutrientes a las nuevas células que lo invadan. Tanto la presencia de puntos por los que las células endoteliales puedan crecer y formar vasos como la presencia de factores angiogénicos y determinadas microtopografías [53,160], pueden influir en la velocidad a la que este fenómeno tiene lugar. Por otro lado, el uso de films o fibras como relleno del conducto se ha postulado como una buena manera de obtener una estructura lo más similar posible al tejido nervioso [73,161,162] para que el relleno sirva de estructura de guía y anclaje intermedio. El mayor inconveniente que puede presentar un conducto híbrido de este tipo es que el relleno constituirá una barrera, al menos temporal, tanto para las células como para el libre flujo de moléculas y gases en el interior del lumen del conducto. En la Figura 11 se muestra un diagrama de algunas propiedades que varían dependiendo de la morfología del conducto y/o el espacio libre que este deja en su lumen. De este modo, dependiendo del uso concreto o la propiedad que se quiera maximizar, se deberá llegar a una solución mixta de compromiso para no sacrificar en exceso ninguna de las otras variables.

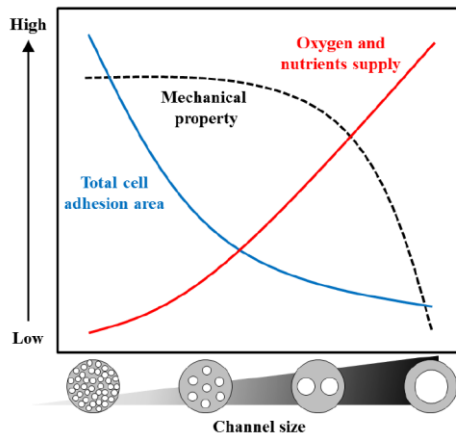


Figura 11. Representación de la relación entre la superficie libre de adhesión celular, el libre flujo de oxígeno y nutrientes, la resistencia mecánica y la morfología de un conducto nervioso. Extraída de la referencia [163].

- 6) **Propiedades fisicoquímicas similares al tejido:** Cuanto más parecido sea el *scaffold* al conjunto de matriz y células de alrededor, tanto mejor y más rápida será la aceptación de este [159]. Por una parte, parámetros como un módulo elástico similar pueden generar una mejor distribución de cargas y una misma naturaleza química ayudará a que la difusión de sustancias y nutrientes sea homogénea. Todo esto contribuye a que las células en la zona en desarrollo reciban estímulos similares a los del tejido sano aledaño y, por tanto, a que la regeneración pueda ser óptima. También suele ser menor la respuesta inmune del huésped [164], lo que limita la formación de una barrera cicatricial. Incluso podría ser beneficioso que el material admitiese una cierta actividad eléctrica que podría suponer una mejora para la transmisión de potenciales de acción sin que las conexiones sinápticas estén totalmente reestablecidas.
- 7) **Protección frente a ambiente nocivo:** Todo daño o degeneración de tejido genera una respuesta por parte de las células del entorno y de otras que acuden por efecto llamada, como las del sistema inmunitario. El SNC es especialmente sensible a este fenómeno porque genera un ambiente hostil y contrario a la regeneración para evitar la propagación del estímulo nocivo, como ya se ha explicado en el apartado 1.3. *Limitaciones en la regeneración*. Conseguir aislar los axones en crecimiento de las agresiones del entorno sin sacrificar que exista una buena permeabilidad a factores bioactivos y nutrientes es un compromiso al que no siempre es fácil llegar.

De acuerdo a la experiencia previa de los investigadores que han dedicado su atención a los conductos nerviosos, si se tienen en cuenta estos criterios



a la hora de elegir el biomaterial a utilizar y el método de síntesis, se debería poder obtener un sistema cuyo desempeño sea óptimo en contacto con células neurales para lograr que estas puedan regenerar un tracto neural desconectado y restituir las funciones que se hayan perdido con ello.

De ser ciertas las hipótesis desarrolladas a partir de las evidencias, en unos pocos años podría desarrollarse y aplicarse una solución que permita revertir los daños causados por una lesión o incluso por un trastorno degenerativo, para ofrecer una adecuada calidad de vida a los pacientes que las padecen.

Objetivos y planteamiento del problema

Considerando los hallazgos logrados respecto al funcionamiento del sistema nervioso, sus limitaciones para regenerarse autológamente y los factores estudiados en el apartado 3.2. *Parámetros de diseño para el conducto nervioso ideal* respecto al uso de estrategias avanzadas para lograr revertir daños axonales, se puede deducir que una buena aproximación terapéutica para este fin sería un cilindro hueco poroso cuyas propiedades fisicoquímicas sean similares al tejido nervioso e inhiban la formación de un ambiente hostil y dentro del cual puedan alojarse células de neuroglía y axones sin que se limite significativamente el acceso de las células a nutrientes y moléculas bioactivas, tal y como representa la Figura 12.

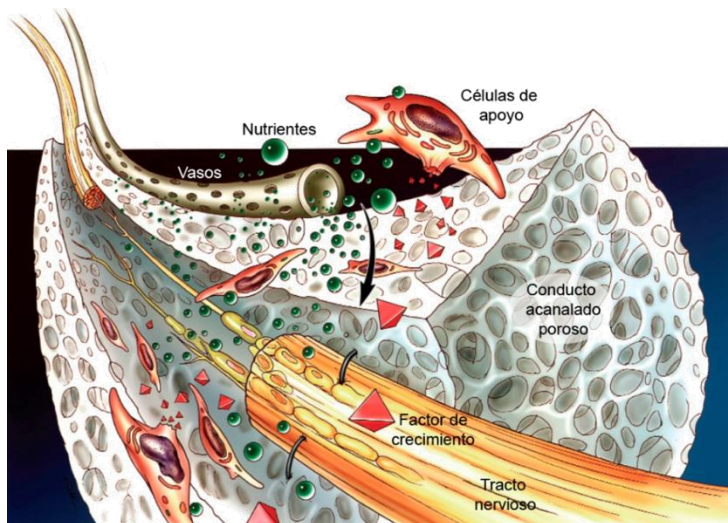


Figura 12. Esquema de algunos aspectos fundamentales de un conducto acanalado óptimo para su uso como injerto en tractos neurales. Traducida de la referencia [165].

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es, pues, diseñar y producir conductos acanalados de en torno a 1 mm de diámetro y 6 mm de longitud, cuyo canal interno o lumen tenga unos 400 μm de diámetro y permita a las neuronas emitir sus axones por su interior para reconectar tractos perdidos. Dichas especificaciones se han elegido en base a las dimensiones del tracto nigroestriatal de rata, de acuerdo a las recomendaciones del Dr. Juan Antonio Barcia, del Hospital Clínico San Carlos en Madrid, y a otras consideraciones basadas en experimentación previa [166].

Además, se pretende aislar eficientemente el lumen del conducto respecto del exterior para formar una pared que evite la interacción de las células internas y externas sin que dicha pared limite el flujo de nutrientes,



sustancias de desecho o factores de crecimiento. Se conjeturó que se podría alcanzar un óptimo en este sentido utilizando un sistema de pared tricapa, donde las superficies externa (capa 1) e interna (capa 3) del conducto tuviesen una distribución controlada de orificios de tamaño inferior a 15 – 20 micras y el interior de la pared (capa 2) tuviese poros mayores e interconectados que dotasen al conducto de una alta permeabilidad.

Se valoró usar ácido hialurónico como sustrato polimérico para producir el biomaterial por su origen natural, por varias de las propiedades que se le atribuyen a él y a sus productos de degradación [167] y porque mediante un simple proceso de entrecruzamiento vía divinil sulfona se pueden producir *scaffolds* blandos y elásticos pero estables y con las dimensiones deseadas. Como precisamente el HA es uno de los componentes mayoritarios de la matriz extracelular del sistema nervioso central, también se pensó que esto limitaría en gran medida las probabilidades de que este biomaterial desencadenase una reacción a cuerpo extraño severa o crónica.

Por otra parte, se quiere evaluar las dimensiones y características fisicoquímicas de los conductos producidos, así como su uso como un hidrogel biodegradable e implantable en un organismo. También se busca validar su compatibilidad biológica y la capacidad para interactuar con células vivas *in vitro*. Se valoró, además, la posibilidad de incorporar fibras paralelas de ácido poli-L-láctico y/o células de Schwann en el lumen de los conductos para generar un biohíbrido que permita acondicionar más aún el entorno para lograr la regeneración de axones. Aunque las células de Schwann son neuroglía originaria del sistema nervioso periférico, se consideró que podría ser una buena aproximación incluso para la reconexión de tractos del sistema nervioso central, ya que existen precedentes [67,168,169].

Por último, se pretende analizar *in vitro* el comportamiento de neuronas o precursores embrionarios de estas en contacto con los conductos acanalados o los biohíbridos que incluyen las fibras de ácido poli-L-láctico y/o las células de Schwann, así como determinar la supervivencia celular y la capacidad de elongación axonal, como paso previo a la experimentación con modelos animales.

Cabe destacar que, si bien existen modelos con parte del fundamento en común con la presente tesis doctoral (sirvan de ejemplo las referencias [147,149]), no se ha encontrado ningún estudio anterior que tenga en cuenta todos los factores aquí expuestos y en cuya combinación se cree que radica el éxito de la capacidad regenerativa de un conducto nervioso.



Para dar respuesta a las hipótesis planteadas, en el Capítulo II del presente documento se describen en detalle todos los experimentos que se han llevado a cabo con ese fin. En los Capítulos III, IV y V, además, se presentan y discuten los resultados de dichos experimentos. Cada uno de ellos trata la obtención y caracterización meramente morfológica o fisicoquímica de los conductos obtenidos, la respuesta biológica *in vitro* de los mismos en contacto con células de Schwann y la capacidad de los conductos y estrategias basadas en estos para lograr el crecimiento guiado de neuronas, respectivamente. El Capítulo VI cita las principales conclusiones a las que se ha llegado a raíz de los resultados analizados, así como las líneas de investigación futuras que este trabajo ha permitido allanar.





CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS





1. Obtención del conducto acanalado

1.1. Modelado de la cinética de reacción

Previamente a obtener los conductos acanalados, se procedió a analizar la reacción de entrecruzamiento entre el HA y la DVS que se pretendía llevar a cabo para ese fin. En primer lugar, se prepararon disoluciones de HA de origen bacteriano (*streptococcus equi*; Sigma-Aldrich, Saint Louis, EE.UU.) al 5% en masa (wt/wt) en hidróxido sódico 0.2M (NaOH; Scharlab, Barcelona, España) y se dejaron 24 h en condiciones normales de temperatura y presión (CNTP, 25 °C y 100 kPa) y agitación suave para limitar el efecto hidrolítico del NaOH, que reduce el peso molecular de las cadenas de HA (en torno a 1 MDa en origen).

El NaOH a dicha concentración afecta al peso molecular de las cadenas de HA, reduciéndolas en ese periodo hasta unos 0,5 MDa (respecto del 1 – 1.2 MDa inicial), ya que ataca a los enlaces glucosídicos. Sin embargo, las disoluciones de NaOH permiten aumentar la concentración de HA soluble con respecto al agua pura y, además, la reacción de entrecruzamiento que se quiere estudiar solo es viable a pH superior a 12, de acuerdo a las investigaciones de Balazs [125], ya que la activación del grupo hidroximetilo requiere la desprotonación de este (ver Figura 9 para la descripción del mecanismo de reacción).

Transcurridas las 24h, se homogenizó la disolución con un agitador magnético en CNTP durante 30 min, se mezcló con divinil sulfona (Sigma-Aldrich) en proporción molar 9:10 respecto al HA (9 moles de DVS por 10 unidades monoméricas de HA) y se agitó vigorosamente durante 10 s para garantizar un buen mezclado. La relación se corresponde con un exceso de DVS del 80% con respecto de la proporción equimolar ya que se pretendió, de este modo, aumentar la conversión de reacción desplazando el equilibrio químico. En lo sucesivo, a esta mezcla HA-DVS previamente agitada de denominará como *mezcla madre al X%* donde X es la proporción masa de HA/masa de disolución. Posteriormente, se pesó una fracción de unos 3 – 6 mg de mezcla y se introdujo en una cápsula de aluminio estanca para proceder a la medición de la entalpía instantánea de reacción a lo largo del tiempo en condiciones isoterma a 298, 300.5, 303, 305.5 y 308 K mediante un calorímetro diferencial de barrido DSC 8000 (PerkinElmer, Waltham, EE.UU.). Cabe destacar que tanto los reactivos como el instrumental utilizado durante la mezcla y el pesado se mantuvieron a 5° – 8 °C hasta que se introdujo la cápsula en el calorímetro con el fin de reducir al mínimo la cantidad de calor producida por la reacción de entrecruzamiento antes de que el equipo pueda registrarla. Se cronometró



el tiempo transcurrido en las tareas desde que se produce la mezcla hasta la monitorización del calor de reacción, que fue inferior a 135 s en todos los casos. Los datos obtenidos de flujo de calor \dot{Q}_i (en mW) para cada instante de tiempo se transformaron en energía, E_i , mediante el método del trapecio para integración numérica y se normalizaron para obtener la entalpía asociada a cada intervalo de tiempo, ΔH_i , dividiendo cada dato entre la masa de la muestra, m_T , de acuerdo a la ecuación 1.

$$\Delta H_i = \frac{E_i}{m_T} = \frac{1}{m_T} \cdot (t_i - t_{i-1}) \frac{\dot{Q}_i + \dot{Q}_{i-1}}{2} \quad (1)$$

Puesto que se sospechaba que la DVS con sus grupos vinilo activados (en medio con $\text{pH} > 12$) podía reaccionar consigo mismo y formar polisulfonas, no se consideró prudente recurrir a la bibliografía en busca de datos de reacción o pronósticos de entalpías de reacción del HA con el DVS, ya que una parte de los datos estarían enmascarados por la propia reacción del DVS. En cualquier caso, si no se pretende discriminar entre la formación de los diferentes enlaces químicos y tan solo se busca obtener los parámetros cinéticos, es posible calcular la conversión global de la reacción (X_t) para un tiempo t , gracias a las conversiones fraccionales X_i y de acuerdo a la igualdad de la ecuación 2.

$$X_t = \sum_{i=0}^t X_i = \sum_0^t \frac{\Delta N_i}{N_{total}} \stackrel{\text{def}}{=} \frac{1}{\Delta H_r} \sum_0^t \Delta H_i = \frac{\sum_0^t \Delta H_i}{\sum_0^\infty \Delta H_i} \quad (2)$$

Nótese que la igualdad por definición se ha utilizado teniendo en cuenta el razonamiento de que la reacción química generará en cada intervalo de tiempo y en condiciones isotermas un flujo de calor (endotérmico o exotérmico) proporcional a la variación de moles reaccionados de HA-DVS o de DVS-DVS en un intervalo de tiempo infinitesimalmente pequeño, ΔN_i , respecto del total.

Como contraste de la hipótesis de que la DVS pudiera reaccionar consigo misma, se repitió el análisis calorimétrico con el DSC 8000 a 308 K pero con una muestra que solo contenía DVS disuelto en NaOH 0.2M en proporción equivalente a si se hubiera añadido HA al 5% wt/wt.

Una vez deducido cómo varía la conversión de la reacción de entrecruzamiento a lo largo del tiempo para cada una de las cinco temperaturas a las que se llevó a cabo el estudio, se procedió a ajustar las curvas obtenidas a un modelo matemático para extraer los parámetros cinéticos comunes que permitiesen extrapolar el sistema a otras condiciones ambientales. Para ello, se analizó los termogramas de DSC y los gráficos de conversión de reacción de acuerdo al procedimiento de Flynn-Wall-Ozawa



[170,171]. De acuerdo a los autores, la variación de la conversión para cada intervalo de tiempo es una función intrínseca del producto de la concentración puntual de reactivos o productos (o, dicho de otro modo, de la propia conversión instantánea) y de un coeficiente de proporcionalidad cinética, K , que solo depende de la temperatura de reacción.

En general, el primer término del producto es muy dependiente de los mecanismos de reacción, de la cantidad de reacciones que tengan lugar o de la capacidad de los productos de reacción de autocatalizar la reacción, entre otros. Si la reacción está muy descrita, es posible desarrollar sistemas de ecuaciones que lleven a una expresión estimada sobre la que plantear la hipótesis de trabajo. Como en este caso no se conocía con precisión el mecanismo de reacción del HA con la DVS (podría, por ejemplo, entrecruzarse a través de grupos que no se hayan previsto), se debió recurrir a considerar la reacción como autocatalítica de orden desconocido, basándose en la forma de las curvas conversión-tiempo y en que las reacciones de entrecruzamiento (también llamado *curado*) donde el producto genera un aumento considerable en la viscosidad suelen estar asociadas a este tipo de fenómenos.

En cuanto al coeficiente cinético, la mayor parte de las reacciones químicas se describen adecuadamente con la ecuación semiempírica de Arrhenius. Es más, salvo aquellas reacciones donde intervienen catalizadores heterogéneos especiales y algún otro caso no muy frecuente, cuando el modelo de Arrhenius no se ajusta adecuadamente, se pueden usar combinaciones lineales de más de un coeficiente cinético, todos ellos basados en esta misma expresión. Por tanto, se optó por recurrir a la fórmula de Arrhenius, como se puede ver en el segundo término de la ecuación 3.

$$\frac{dX}{dt} = f(X) \cdot K(t) = (1 - X)^n \cdot X^m \cdot Z \cdot e^{-E_a/R \cdot T} \quad (3)$$

De acuerdo a dicha expresión, un ajuste matemático de los datos, permitiría extraer los subórdenes de reacción n y m (y de ahí el orden global de reacción, $n + m$), la constante preexponencial Z y la energía de activación E_a . En este caso, puesto que hay fundadas sospechas de que hay reacciones paralelas al entrecruzamiento de HA vía DVS, tanto el orden de reacción como la energía de activación carecen de interpretación física, pero pueden servir, sin embargo, para poder describir el proceso global.

Para el ajuste de los datos a la expresión de la ecuación 3, se decidió que sería conveniente usar un modelo obtenido mediante regresión no lineal. Ahora bien, como dicho sistema suele requerir valores de inicialización, previamente se realizó una linealización de la ecuación 3 aplicando



logaritmos a ambos lados de la igualdad. Se extrajeron estimadores de los coeficientes cinéticos tanto mediante una regresión lineal común como con el método de las aproximaciones isoconversionales de Flynn [172]. Ninguno de los dos procedimientos podía ofrecer valores precisos porque en el primer caso hay multicolinealidad (tanto $\ln(1-X)$ como $\ln X$ son variables de entrada y, claramente, existe correlación entre ellos por partir ambos de la conversión) y en el segundo tan solo se puede obtener el valor de la energía de activación.

En cualquier caso, una vez se obtuvieron los valores de inicialización de los coeficientes cinéticos, se pudo introducir en el software Statgraphics (StatPoint Technologies, Warrenton, EE.UU.) todos los parámetros de entrada para realizar el ajuste por regresión no lineal mediante el algoritmo de cálculo de Levenberg-Marquadt. Puesto que este algoritmo lo admite, se usó directamente la ecuación 3 y no su forma linealizada.

Para obtener datos con los que corroborar el modelo matemático, se utilizó una modificación del método colorimétrico del carbazol para la cuantificación de ácidos urónicos en dos etapas desarrolladas originariamente por Bitter y Muir [173]. De acuerdo a la modificación planteada por Cesaretti [174], que permite realizar el ensayo en una placa multipocillo de 96 pocillos de poliestireno, se toma una muestra cuyo contenido de ácidos urónicos (cualquiera de ellos por definición) se quiera determinar, se añade 4 veces más volumen que la muestra de disolución de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (Sigma-Aldrich) 25 mM en ácido sulfúrico (1.84 g/ml; Scharlab) y se calienta la mezcla durante 10 min a 100 °C para hidrolizar el polisacárido. Posteriormente, se añade el mismo volumen de carbazol (Sigma-Aldrich) 0.125% wt/v en etanol absoluto que el de muestra y se vuelve a calentar 10 min a 100 °C. A dicha temperatura, el carbazol reacciona en muy poco tiempo con los GAG derivados de la hidrólisis y se forma un producto coloreado por la conjugación de dobles enlaces en carbonos β . Además, los iones borato del $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ en disolución aumentan la sensibilidad del producto coloreado, por lo que es posible discriminar cantidades menores de reactivo inicial.

Para el caso concreto de la determinación de HA, se preparó una serie de diluciones de ácido hialurónico en NaOH 0.2M (entre 0.01 a 5% wt/wt), se dejaron agitando 24 h y se neutralizaron con HCl (Sigma-Aldrich) 1M para obtener una recta patrón. Por otro lado, se tomaron alícuotas de la disolución de HA 5%, se mezclaron con DVS en la misma proporción que en el experimento de la determinación calorimétrica de la entalpía de reacción y se agitaron vigorosamente durante 10 s. A cada una de las alícuotas se le añadió HCl 1M tras 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 30 y 60 min para neutralizar



la mezcla y evitar que se consuman más reactivos, puesto que por debajo de pH 13 la cinética de la reacción prácticamente se detiene. Finalmente, se añadió el triple de volumen de agua destilada que de alícuota y se dejó 24 h a 5° C para disolver en una fase fluida el HA no reaccionado, ya que conforme avanza la reacción y se forma el gel, la viscosidad aumenta y no es posible manipular la mezcla como un líquido. Tanto a estas alícuotas como a las disoluciones para la recta patrón se les aplicó el tratamiento del carbazol ya descrito y posteriormente se midió la absorbancia de la muestra mediante un espectrofotómetro lector de placas VICTOR³ 1420 (PerkinElmer) a 550 nm.

Gracias a los datos de absorbancia y la recta patrón, se determinó la evolución de la concentración real de HA (considerando la disolución realizada con agua destilada) a lo largo del tiempo y, consecuentemente, también la conversión de la reacción de acuerdo a la expresión de la ecuación 4, que no es más que una variante de la ecuación 2, asumiendo que C_0 es la concentración inicial (0 s), C_t la concentración para un tiempo concreto y C_{dis} la concentración de la disolución original.

$$X = \frac{C_0 - C_t}{C_{dis}} \quad (4)$$

Como parámetro de control para evaluar la robustez del modelo propuesto, se calculó la suma de los errores relativos para cada uno de los puntos obtenidos con respecto al mismo valor extrapolado por la solución de la ecuación 3 para la temperatura registrada durante la reacción de HA con DVS.

Por último, se determinó la evolución de la viscosidad de la disolución de HA en el transcurso de la reacción con el DVS para arrojar más luz sobre cómo se producen los entrecruzamientos entre cadenas. Se preparó mezcla madre al 5% suficiente para llenar la celda termostatada del viscosímetro Brookfield DV-II (Brookfield Engineering Laboratories, Middleborough, EE.UU.), se agitó durante 10 s, se vertió en la celda y se introdujo el vástago de péndulo para poder realizar las medidas, quedando este totalmente sumergido. Acto seguido se conectó el motor del viscosímetro y se comenzó a registrar datos de viscosidad, variando paulatinamente la velocidad de rotación del vástago para evitar que los valores excedieran los rangos de medida del instrumento. El experimento se detuvo cuando la mezcla se convirtió en gel y el vástago quedó inmóvil.

Estos y otros experimentos se llevaron a cabo exclusivamente para disoluciones de origen de HA en NaOH al 5% wt/wt, a diferencia de algunos de los sucesivos experimentos donde se utilizaron concentraciones

diferentes. La justificación de esta decisión está basada en criterios relativos a la manipulabilidad de las muestras observada en experimentos preliminares y en otras consideraciones debidamente justificadas en el apartado 3. Conclusiones del Capítulo IV.

1.2. Síntesis de conductos porosos

Aunque el fin último de la presente tesis es desarrollar conductos acanalados porosos, algunos de los ensayos de caracterización del biomaterial requerían una morfología diferente por especificaciones técnicas del instrumento de análisis o para minimizar el error de medida. A continuación se describe el procedimiento de síntesis de cada una de las variantes.

Para la preparación de los conductos acanalados con dimensiones controladas se diseñó y fabricó un molde de politetrafluoroetileno (PTFE; SIPEM, Alcàsser, Valencia) con surcos de sección cuadrada de 1.5 mm de profundidad y 1.5 mm de ancho. En el interior de cada surco se ajustó un vástago de policaprolactona (PCL; Polysciences, Warrington, EE.UU.) de sección cilíndrica para usarlo como porógeno para obtener el canal interno. Dichos vástagos se obtuvieron fundiendo y extruyendo la PCL en granza con una miniextrusora Haake Minilab (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.). El rango aceptable de diámetro fue de 400 – 440 μm . Para lograr disponer los vástagos justo en el centro de cada surco, se les acopló unas arandelas cilíndricas de PTFE de 1.5 mm de diámetro exterior y 450 μm de interno, que permitían el acople y centrado del sistema (Figura 13 A).

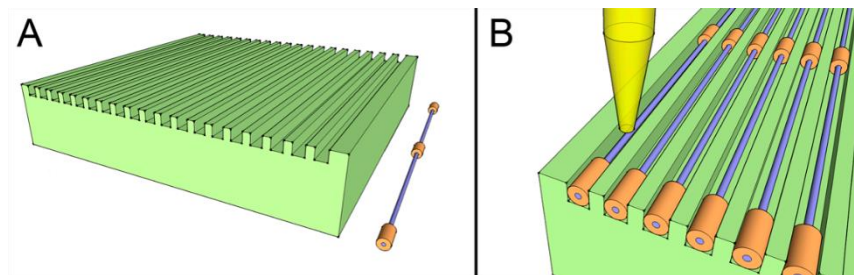


Figura 13. Esquema del molde de PTFE usado para la síntesis de conductos de HA, en verde, y dimensiones relativas del sistema vástago de PCL - arandelas de PTFE; violeta y naranja, respectivamente (A). Detalle del sistema de inyección de la mezcla HA-DVS mediante una micropipeta (en amarillo) con los vástagos de PCL acoplados en los surcos (B).

Se preparó mezclas madre al 1, 3 y 5%, se agitaron durante 10 s y se inyectaron mientras la viscosidad era tal que permeaba hasta el fondo de los surcos del molde. Se determinó que el tiempo de gelificación



(entrecruzamiento) óptimo era de 11, 30 y 120 min a 25 °C para las muestras de 1, 3 y 5%, respectivamente. Se escogió estos puntos buscando un compromiso entre que el gel fuese suficientemente estable pero no se hubiera comenzado a deshidratar apreciablemente. Tras dejar la mezcla gelificar en los moldes en un ambiente con ventilación forzada se los congeló a -20 °C durante un mínimo de 5 h. Posteriormente se congeló los moldes a -80 °C durante una noche (O/N).

El rango de concentración de 1 – 5% de HA en mezcla madre se escogió de acuerdo a experimentos preliminares que mostraron que a concentraciones iguales o inferiores a 0.5% los entrecruzamientos no son capaces de formar geles estables y que en torno a un 8% la viscosidad de la disolución de HA en NaOH (sin añadir DVS) es demasiado alta como para poder manipularla adecuadamente o para garantizar una buena homogeneidad de la mezcla.

A una parte de los moldes con mezcla madre al 1, 3 y 5% congelada se les sometió a un proceso de liofilización a < 10 Pa durante 24 h (nombradas como HA1L, HA3L y HA5L, respectivamente) mediante el equipo LyoQuest - 85 (Telstar, Terrassa, España). Se sabe que gracias a la liofilización de geles derivados de polisacáridos se puede obtener una estructura tridimensional altamente porosa tipo esponja, debida al espacio que los cristales de agua formados durante la congelación dejan al sublimar. El objetivo de utilizar polímeros hidrófobos (PCL y PTFE) como elementos del molde, por su parte, fue intentar obtener una porosidad más controlada y de menor tamaño en las interfases entre el polímero y la disolución, bajo la hipótesis de que los cristales de agua formados durante la congelación verían restringido su avance al acercarse a las superficies poliméricas (Figura 14), lo que debería generar defectos micrométricos en forma de poros cuando dichos cristales desaparecen por la liofilización y las membranas de HA entrecruzado sufren ligeras contracciones. Una vez liofilizada la mezcla en los moldes, se extrajo los vástagos de PCL de los surcos y se retiró los conductos tirando con cuidado de los extremos de los vástagos para que estos perdiesen sección.

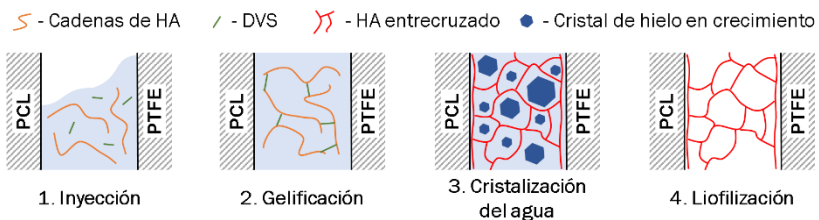


Figura 14. Etapas para la obtención de una matriz de ácido hialurónico entrecruzado con tres capas de porosidad. Nótese como los cristales de agua desplazan las cadenas de HA entrecruzado pero no entran en contacto con las superficies poliméricas hidrófobas.



Los conductos que no se liofilizaron (HA3nL y HA5nL, según la mezcla madre fuera del 3 o el 5%, respectivamente) también se congelaron O/N para reproducir cualquier fenómeno no esperado que pudiera sufrir la reacción química por debajo de los 0 °C, pero posteriormente se descongelaron y secaron a CNTP y en un entorno con ventilación forzada durante 48 h. Para eliminar aún más agua, las muestras se deshidrataron sometiéndolas a vacío durante 2 h en extracción continua. Se predijo que este tipo de secado, a diferencia de la liofilización, provocaría que el agua se evaporase en fase líquida, colapsando la matriz tridimensional que habría generado la formación de cristales de agua durante la congelación y generando, de este modo, una matriz sin discontinuidades ni poros.

También se diseñó con posterioridad un molde diferente de PTFE (Figura 15) que permitiese obtener conductos de sección circular de 1 mm y el mismo diámetro de canal interno (400 – 440 μm). Esta decisión se tomó con el fin de evaluar si era posible escalar y modificar el procedimiento para ajustarlo a diferentes necesidades como, por ejemplo, para poder introducirlo en una cánula de cirugía estereotáctica [175] sin alterar su desempeño ni sus propiedades. Aun así, el grueso del trabajo se llevó a cabo con conductos de base cuadrada por comodidad.

Para ello, se introdujo vástagos de PCL del mismo tipo que en la anterior descripción en los canales perforados para ese uso y se unieron las dos partes del molde. Posteriormente se preparó mezcla madre al 5% y se introdujo en las cámaras de gelificación a través de las vías de inyección hasta que comenzaba a salir exceso de mezcla por las vías de venteo. Cabe comentar que durante la experimentación preliminar con la mezcla madre a diferentes concentraciones se observó que la reacción de entrecruzamiento de HA vía DVS solo se producía adecuadamente si existía contacto de la mezcla con el aire, por lo que a la hora de preparar este segundo molde el diseño fue el resultado de una solución de compromiso entre un control más preciso de la forma final de los conductos cilíndricos y una adecuada ventilación, razón por la cual existen las vías de inyección y venteo. Una vez inyectada la mezcla, se dejó gelificar durante 15 min en ambiente con ventilación forzada, se congeló 5 h a -20 °C y O/N a -80 °C y se liofilizó en las mismas condiciones que las muestras HA1L, HA3L y HA5L. Finalmente, se abrió el molde, se extrajo los vástagos de PCL y se obtuvo los conductos, nombrados esta vez como oHA5L, traccionando de nuevo los vástagos por los extremos.

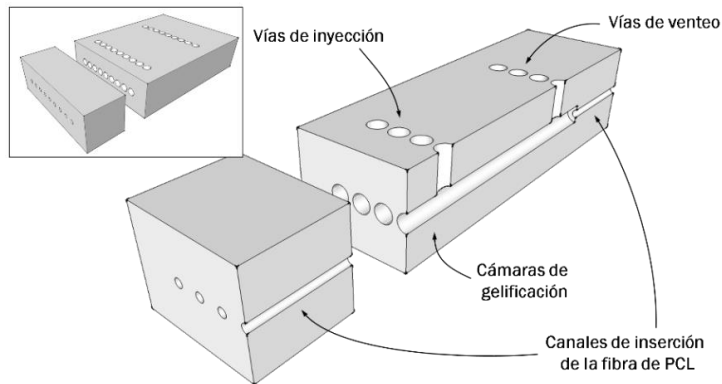


Figura 15. Esquema del molde completo usado para la obtención de conductos oHA5L (detalle) y sección del molde con las partes principales de este.

Por otro lado, se sintetizó films de HA entrecruzado para aquellos ensayos que requerían que las probetas de material tuviesen una morfología especial para poder ser llevados a cabo. Para ello, se preparó mezclas madre al 3, 3.5, 4, 4.5 y 5% que se agitaron vigorosamente y se inyectaron en placas Petri de vidrio para dejar gelificar las mezclas en ambiente con ventilación forzada durante 30, 25, 20, 15 y 11 min, respectivamente, antes de congelarlas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un mínimo de 5 h y, luego, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ O/N. Por último, se liofilizaron durante 24 h obteniendo, así, films de unos 2 – 3 mm de espesor (fHA3L, fHA35L, fHA4L, fHA45L, fHA5L según la concentración de la mezcla madre fuese 3, 3.5, 4, 4.5 o 5%, respectivamente). Parte de los films inyectados con mezcla madre de 3 y 5%, se dejaron descongelar y se desecaron del mismo modo que se hizo con las muestras de conductos no liofilizados, obteniéndose los films fHA3nL y fHA5nL, respectivamente.

Tanto los conductos como los films (liofilizados o deshidratados) fueron conservados en recipientes sellados y a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar su hidratación y la alteración de sus propiedades. Previamente a su uso, las muestras se hidrataron con agua destilada un mínimo de 2 h hasta alcanzar sus dimensiones de equilibrio en hinchado, para luego lavarlas durante 48 h con una mezcla 50% v/v de acetona y agua destilada, renovando el medio cada 12 h para eliminar cualquier traza de reactivos. Una vez tratados, se rehidrató los films y conductos con 3 lavados de 2 h en agua destilada. En este estado, los conductos fueron cortados cada 6 mm y los films troquelados en forma de discos de 5 mm de diámetro. A una parte de los conductos de HA5L hidratados y cortados se les enhebró por el lumen un haz de 20 fibras de ácido poli-L-láctico (Ingeo 6251D; Natureworks, Minnetonka, EE.UU.), dando lugar así a los conductos nombrados como HA5L-PLLA, con objeto de estudiar el efecto de dichas fibras sobre el comportamiento biológico.



Tan solo unos pocos conductos HA5L se cortaron a longitudes superiores a 6 mm (20 - 22 mm) para realizar estudios puntuales. En el apartado 2.1. Análisis macroscópico del Capítulo II, donde aparecen, se justifica debidamente esta decisión.

Para facilitar al lector la interpretación y el posterior seguimiento de qué tipo de muestras se utilizaron en cada experimento, se puede consultar la Tabla 1 como guía. Además, se dispondrán en lo sucesivo esquemas gráficos en algunas imágenes para facilitar la comprensión de la morfología de la muestra o de las secciones realizadas en estas para lograr una mejor visualización de algunos resultados.

Tabla 1. Relación de tipos de muestras usados, código de referencia, concentración de HA, proporción DVS:HA, morfología, si están liofilizados y capítulos en los que se mencionan.

Código	Conc. HA (% wt/wt)	DVS:HA	Tipo	Liofilizado	Capítulos
fHA3L	3.0	9:10	Film	Sí	II, III
fHA3nL	3.0	9:10	Film	No	II, III
fHA35L	3.5	9:10	Film	Sí	II, III
fHA4L	4.0	9:10	Film	Sí	II, III
fHA45L	4.5	9:10	Film	Sí	II, III
fHA5L	5.0	9:10	Film	Sí	II, III, IV
fHA5nL	5.0	9:10	Film	No	II, III
HA1L	1.0	9:10	Conducto	Sí	II, III
HA3L	3.0	9:10	Conducto	Sí	II, III, IV
HA3nL	3.0	9:10	Conducto	No	II, III, IV
HA5L	5.0	9:10	Conducto	Sí	II, III, IV, V
HA5nL	5.0	9:10	Conducto	Sí	II, III, IV
HA5L-PLLA	5.0	9:10	Conducto + fibras	Sí	II, III, IV, V
oHA5L	5.0	9:10	Conducto cilíndrico	Sí	II, IV, V

Cabe destacar que, como se puede apreciar, la proporción molar DVS:HA se mantuvo constante en cada una de las muestras, lo que no significa que siempre se utilizase la misma cantidad de DVS para una misma fracción de disolución, ya que la proporción está asociada a la masa de HA presente y no a la cantidad de disolución de HA en NaOH.



2. Caracterización física, química y mecánica

2.1. Análisis macroscópico

Se tomó algunos conductos de HA1L, HA3L, HA3nL, HA5L y HA5nL en estado seco/lioofilizado e hidratado (> 2 h en agua destilada) y se los fotografió sobre papel milimetrado para observar preliminarmente y de manera cualitativa su aspecto y forma. También se tomó un conducto HA5L que se cortó para que tuviese ~ 20 mm de longitud y, tras hidratarlo, se introdujo mediante una jeringuilla con aguja de 0.45 mm una disolución 50% v/v de agente rojo picosirio en OCT (*Tissue freezing medium*; Leica Biosystems, Nussloch, Alemania) en el conducto interno para revelar el canal interno del mismo y poder fotografiarlo. El OCT es una mezcla muy viscosa de polietilenglicol (PEG) y polivinil alcohol (PVA), entre otros componentes, y se usó para lograr que el colorante quedase retenido en el lumen en lugar de ser absorbido por el HA entrecruzado. El agente rojo picosirio se preparó disolviendo colorante rojo sirio (Sigma-Aldrich) al 0.1% en ácido pícrico 1.3% en solución acuosa (Sigma-Aldrich).

Asimismo, mediante una cuchilla se realizó una sección transversal de un conducto de HA5L hidratado y se observó mediante un microscopio óptico Eclipse E600 (Nikon, Chiyoda, Japón) para corroborar de manera somera que el canal interno del conducto tenía las dimensiones esperadas, que la matriz de HA entrecruzado tenía el aspecto esperado tras la liofilización y que esta no había colapsado.

2.2. Cuantificación de la porosidad tricapa

Para un análisis con más detenimiento de la apariencia y la porosidad de la estructura de los conductos y del efecto de la liofilización sobre estas, se tomaron conductos no hidratados de HA5L y HA5nL, se cortaron longitudinal y transversalmente con una cuchilla en dos mitades y se recubrieron con partículas metálicas de oro para poder visualizarlos con un microscopio electrónico de barrido JSM6300 (SEM; JEOL, Akishima, Japón) a 15 kV de tensión de trabajo.

Además de las vistas generales del aspecto de ambos tipos de conducto, se tomó micrografías de diferentes sectores de la superficie externa e interna de los conductos de HA5L, así como del interior de la pared de estos (mínimo 15 micrografías de 5 conductos diferentes, para cada caso). Gracias a estas imágenes, se pudo delimitar el contorno de los poros, determinar su área y, consecuentemente, su diámetro equivalente, mediante el programa informático de tratamiento de imagen ImageJ (National Institutes of Health,



Bethesda, EE.UU.). En el caso de las superficies interna y externa del conducto poroso, las imágenes se transformaron en monocromas y se pudo realizar un contaje automático de partículas negras (los poros). En cuanto a la pared del conducto, puesto que no fue posible aplicar el anterior sistema por la alta interconectividad entre los poros y su estructura tridimensional, se delimitaron manualmente los contornos y se calculó el área de cada uno de ellos.

Se calculó también con el mismo programa la porosidad, entendida como el cociente entre el área total de poros y el área total de cada imagen, de las superficies externa e interna de los conductos. Como este procedimiento no ofrecía resultados fiables para la pared del conducto, se calculó mediante otro sistema que se detalla en el siguiente apartado.

También se analizó con SEM tanto secciones transversales como longitudinales de los conductos oHA5L obtenidos, para poder comparar si las modificaciones del molde de la Figura 15 (cavidades cilíndricas en lugar de cuadradas y menor diámetro externo) alteraban la microestructura con respecto a los conductos HA5L, sus equivalentes. En este caso, los conductos hubieron de ser previamente congelados con nitrógeno nieve en condiciones de hinchado en inmersión y sometidos a vacío en una cámara Alto Cryo-Transfer System (Gatan, Pleasanton, EE.UU.) para realizar una fractura frágil que revelase el interior del conducto y sublimar el agua residente en el hidrogel. Se utilizó este sistema para no tener que recurrir a realizar las secciones con una cuchilla ya que, al ser la pared del conducto más fina, esta solía colapsar, ofreciendo un aspecto que no era fidedigno a los mismos conductos sin alterar. Una vez sublimada el agua (vacío durante 45 min a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), se transfirió las muestras al interior del SEM JSM5410 (JEOL) al que iba acoplado el Alto Cryo-Transfer System y se tomaron las micrografías en condiciones similares a las anteriores muestras. Dicho conjunto de instrumentos se conoce como CryoSEM, y así se le denominará en lo sucesivo.

Con el fin de analizar si la pared porosa tricapa obtenida mediante la liofilización de los conductos en contacto con polímeros hidrófobos era la verdadera responsable del tamaño de los poros de los estratos superior, se diseñó un experimento que permitiese determinar la relación entre hidrofiliidad del sustrato en contacto y el tamaño de poro generado tras la liofilización (ver, de nuevo, la Figura 14). En primer lugar se prepararon films o membranas de 1 mm de espesor de materiales de diferente naturaleza para ser usados después como sustratos sobre los que depositar la disolución de HA, de acuerdo a las condiciones que se enuncian a continuación:



- **Poliacrilato de etilo (PEA):** Se mezcló acrilato de etilo (Sigma-Aldrich) con etilenglicol dimetacrilato (EGDMA; Sigma-Aldrich) al 2% wt/v y peróxido de benzoilo (BPO; Sigma-Aldrich) al 1% wt/v y se vertió la mezcla entre dos placas de vidrio con una separación de 1 mm entre ellas.
- **PTFE:** Se obtuvo una lámina de 1 mm de grosor del fabricante (Sipem).
- **PCL:** Se usó la misma granza de polímero que la usada para generar los vástagos del molde, prensando esta entre dos placas de acero a 80 °C y 100 bar durante 10 min.
- **Celulosa:** Se cortó una fracción de film comercial usado como membrana para diálisis (Spectrumlabs, EE.UU.). Se lavó primero con agua destilada durante 30 min para eliminar el conservante (glicerina y azida sódica).
- **Agar:** Se disolvió agar (Sigma-Aldrich) al 1% wt/v en agua tipo 1 a 60 °C hasta alcanzar su total homogeneización. Luego se vertió la mezcla en una placa Petri y se dejó secar hasta obtener el espesor deseado.
- **Vidrio:** Se usó un portaobjetos de vidrio (VWR, Radnor, EE.UU.), previamente lavado con etanol, con agua tipo 1 y dejado secar O/N bajo campana.

Mediante el equipo OCA 20 (Dataphysics, San Jose, EE.UU.), que disponía de un sistema de inyección y una cámara de alto contraste, se obtuvo el ángulo de contacto de cada uno de los materiales, γ_G , un parámetro relacionado con la afinidad de un líquido por la superficie sólida sobre la que se asienta y que se determina midiendo el ángulo que forma la silueta curva de una gota del fluido cuando está en equilibrio respecto el plano que constituye la lámina de cada material. El subíndice G se debe a que, en lugar de agua, se usó glicerol (VWR) como líquido de referencia para depositar la gota sobre cada lámina, ya que el agua, el más convencional, no permitía obtener ángulos de contacto medibles en el caso de la celulosa, el agar y el vidrio porque la gota se aplanaba en exceso o era absorbida por el propio material.

Se dispuso los films y láminas de manera paralela y, sobre ellos, se apoyó una gradilla de plástico con orificios circulares de 5 mm de diámetro. Se preparó mezcla madre al 5% y, una vez preparada para inyectar, se vertió en cada uno de los orificios (6 orificios para cada material), de modo que la mezcla entrase en contacto con cada uno de los materiales. Se dejó gelificar la mezcla 11 min y, luego, se congeló a -20 °C O/N, para luego liofilizar el conjunto, aún en contacto con las láminas de diferente composición.

Una vez liofilizados los discos de HA entrecruzado se extrajeron de la gradilla y se trataron para fotografíarlos mediante SEM por la cara que había estado en contacto con las láminas. También se aplicó el tratamiento de imagen mediante el software ImageJ para realizar el contaje automático de los poros o, en su caso, de las celdillas expuestas y sus dimensiones, a partir de las imágenes de SEM tomadas.



2.3. Caracterización del sustrato de HA entrecruzado

Puesto que uno de los objetivos principales de cualquier terapia relacionada con biomateriales para su aplicación en ingeniería tisular es obtener sustratos de características parecidas al tejido a regenerar, se analizó la densidad de los conductos porosos, parámetro frecuentemente ligado a la elasticidad y compactación en cuanto a redes poliméricas se refiere. Usando la balanza de precisión AX205 (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza) se usó el fundamento del principio de Arquímedes para calcular la densidad de cada tipo de conducto mediante la ecuación 5:

$$\rho_i = \frac{m_c}{m_{so}} \rho_o \quad (5)$$

En primer lugar, se pesó 5 conductos de HA3nL, HA3L, HA5nL y HA5L en estado seco, m_c . Luego, se sumergieron todas ellas en N-octano (Sigma-Aldrich), disolvente orgánico de densidad ρ_o en el que el HA entrecruzado no hincha ni lo absorbe, y se sometieron a vacío durante 5 min para lograr sustituir el aire de los poros por el disolvente. Los conductos con N-octano en su interior se volvieron a pesar (obteniendo m_{co}) y, por último y con la ayuda del módulo de densidad del instrumento, se midió su peso equivalente sobre una pletina sumergida en N-octano, m_{so} .

Gracias a haber tomado el valor de la masa de cada conducto con sus poros rellenos pero sin hinchar, m_{co} , se pudo calcular, además, la porosidad, π , de cada grupo de muestras de acuerdo al desarrollo de la ecuación 6.

$$\pi = \frac{V_{poros}}{V_{total}} = \frac{V_{poros}}{V_{desalojado}} = \frac{(m_{co}-m_c)/\rho_o}{m_{desalojado}/\rho_o} = \frac{m_{co}-m_c}{m_{co}-m_{so}} \quad (6)$$

2.4. Obtención de parámetros mecánicos

Hidrogeles como la agarosa, el colágeno, la acrilamida o el alcohol polivinílico suelen caracterizarse mecánicamente mediante parámetros derivados de ensayos reológicos, es decir, del estudio de la deformación de una sustancia que es capaz de fluir ante la aplicación de un esfuerzo. Ahora bien, aunque la reología de disoluciones de HA o derivados de este han sido ya estudiadas con mucho detenimiento [176], la transformación química que se sobreviene tras la adición de la DVS genera una matriz tridimensional rígida (el gel) que, si bien es capaz de absorber agua y otros disolventes por los grupos funcionales hidrófilos libres de las cadenas de HA, contiene una gran cantidad de nudos formados por los enlaces covalentes nuevos que restringen la movilidad relativa de las cadenas, especialmente cuando la



reacción entre la DVS y el HA alcanza conversiones razonablemente altas. A causa de este fenómeno, los procedimientos convencionales de análisis reológico no ofrecen resultados satisfactorios, por lo que se debió proceder a considerar los geles de HA entrecruzado como sólidos elásticos con el fin de poder determinar algunas de sus propiedades mecánicas.

En primer lugar, se tomó un disco de 5 mm de diámetro y >3 mm de altura de las muestras fHA5L, fHA3L y fHA5nL a modo de ejemplo para determinar si la hipótesis de considerar los geles de HA como sólidos elásticos en presencia de agua en exceso tenía fundamento o si bien era preferible tratarlos como fluidos viscoelásticos de baja componente viscosa. Para ello, se sumergió cada muestra en agua destilada a 37 °C y se sometió a un ensayo de relajación de tensiones deformándolo un 5% de la altura original instantáneamente y registrando la tensión requerida para mantener dicha deformación a lo largo del tiempo mediante un dilatómetro TMA/SS6000 (Seiko Instruments, Chiba, Japón).

Una vez justificado el tipo de respuesta mecánica que cabía esperar de los biomateriales sintetizados a partir de HA entrecruzado vía DVS, se tomó 5 discos de 5 mm de diámetro de fHA3L, fHA3nL, fHA5L y fHA5nL y se procesaron mediante un análisis termomecánico (TMA) usando el mismo dilatómetro TMA/SS6000 para comprimirlos sumergidos en tampón DPBS a 37 °C a una tasa de 100 mN/min hasta los 1500 mN (inferior al límite de rotura por compresión) para registrar la disminución de su altura como respuesta frente a la carga. Se normalizó los valores de fuerza y variación de altura dividiendo estas por el área de la probeta y la altura inicial, respectivamente, para obtener la curva tensión-deformación mediante la cual es posible calcular valores de módulo elástico axial o de *Young* con los que comparar el material con otros de similares características o con el mismo tejido del sistema nervioso.

Con respecto a las propiedades termodinámicas de hidrogeles derivados de ácido hialurónico, se sabe que los resultados dependen de la cantidad de agua absorbida por el HA [177]. Puesto que se realizaron varios ensayos previos (DSC, análisis termogravimétricos o TGA...) y los resultados fueron de difícil interpretación aun en los rangos de fracción de agua contenida que son especialmente favorables para determinar variables como la temperatura de transición vítrea (T_g) [178], se decidió que era preferible recurrir a fuentes bibliográficas para discutir y relacionar los resultados obtenidos en otros experimentos con las propiedades termodinámicas del HA entrecruzado con DVS.



3. Evaluación del conducto como hidrogel implantable

3.1. Variación dimensional durante el hinchado

Se tomó conductos de HA3L, HA3nL, HA5L y HA5nL (5 de cada tipo) en su estado no hidratado, se cortó una sección transversal de unos ~ 2 mm de espesor de cada uno con una cuchilla y se midió la longitud restante de cada conducto con un micrómetro. Los cortes transversales se fotografiaron de modo que se apreciase la circunferencia del canal interno mediante una cámara de alto contraste y una fuente de luz difusa posterior (incluida en el equipo OCA 20 de medidas de ángulo de contacto). Tanto los conductos como los cortes transversales se dejaron hidratar en inmersión con agua destilada un mínimo de 2 h a temperatura ambiente y, posteriormente, se volvieron a medir con el micrómetro y fotografiar con el montaje de la cámara de alto contraste, respectivamente. Mediante el software de tratamiento de imagen ImageJ se midió la dimensión del lado de los conductos tanto en estado seco como hinchado y el área, A_c , de la pseudocircunferencia que delimita el canal interno. Se corroboró que la circularidad de dichas circunferencias era superior a 0.9 y se dedujo el diámetro de estas, d_c , de acuerdo con la relación elemental $A_c = \pi \cdot d_c^2 / 4$. Por último se calculó el cociente entre cada una de las dimensiones medidas en estado hidratado y seco y se obtuvo el promedio para cada muestra.

Destacar que en este caso no se pudo utilizar los conductos HA1L por su difícil manejabilidad en estado hidratado y lo complejo que resultaba definir con precisión los contornos del conducto a causa de la gran cantidad de agua que absorbían. Por este motivo, no se prepararon conductos de mezcla madre al 1% sin liofilizar (ya que habrían absorbido aún más agua) y se descartó en este punto la posibilidad de realizar ensayos más complejos con dichos conductos HA1L. Tan solo fue posible utilizarlos en el experimento descrito en el apartado siguiente, de donde se obtuvo datos que permiten justificar la decisión.

3.2. Cinética de absorción de agua

Con el fin de obtener algún parámetro que permitiese describir la velocidad a la que el HA entrecruzado de los conductos captaba agua del entorno, se realizó un ensayo de hinchado en atmósfera saturada de agua. Se pesó 4 conductos liofilizados de HA1L, HA3L y HA5L y se los introdujo en tubos de microcentrífuga o *Eppendorfs*, que también habían sido previamente pesados.



Por otra parte, se preparó una cámara estanca de unos 6000 cm³ con un recipiente con 250 ml de agua en su interior y se permitió que el ambiente llegase al equilibrio dejándola 24 h a 37 °C (humedad ambiental, o HR, del 100%). Luego, se dispuso los *Eppendorfs* con muestra en el interior de la cámara, que se mantuvo a 37 °C y cerrada, y se volvieron a extraer para ser pesados tras 1, 2, 4, 8, 24, 96, 128, 168, 192 y 266 h. Se introdujo en la cámara 4 *Eppendorfs* sin muestra que fueron pesados en los mismos intervalos para poder sustraer el posible efecto de aumento de masa debida a la absorción de agua por parte de estos.

Para poder comparar las muestras entre sí, se calculó el contenido de agua retenida en cada instante, WC, de acuerdo con la ecuación 7:

$$WC = \frac{m_i - m_0}{m_0} \quad (7)$$

donde m_i es la masa de cada conducto hidratada en uno de los intervalos de muestreo, i , y m_0 es la masa del mismo en estado seco. Se determinó también el contenido de agua en equilibrio, EWC, tomando como m_i el último punto de la serie temporal, entendiendo que el sistema había alcanzado un estado estacionario.

Este experimento también fue planificado para incluir los conductos HA3nL y HA5nL. Sin embargo, debido a problemas relacionados con la metodología del experimento que se detallan más adelante (ver el párrafo correspondiente en 2.2. *Caracterización de los conductos acanalados porosos* del Capítulo III), estos datos no fueron finalmente considerados para estudio.

También se sometió las muestras HA1L, HA3L y HA5L a un tratamiento de datos para poder analizar si su cinética de hinchado se podía describir mediante la ecuación semiempírica 8, descrita por Ritger y Peppas [179] (y frecuentemente usada para estudios de liberación en hidrogeles [180]), suponiendo que la captación de moléculas de agua en la matriz sea un fenómeno de difusión fickiana (la 2ª ley de Fick se desarrolla más en detenimiento en el siguiente apartado):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{m_i - m_0}{m_\infty - m_0} = \frac{WC_i}{EWC} = 4 \sqrt{\frac{D \cdot t}{\pi \cdot e^2}} \quad (8)$$

Aquí, M_t/M_∞ es la relación entre la masa de agua absorbida en el intervalo de tiempo i y la masa de agua absorbida en un intervalo muy grande (equilibrio), m_∞ es el valor de masa medido a tiempos grandes, e es el espesor de la pared y D es el coeficiente de difusión, la constante de



proporcionalidad de la 2ª ley de Fick entre la variación de la concentración de un soluto en una región del espacio y la variación de dicha concentración en el tiempo.

La expresión semiempírica, de acuerdo a los autores que la describieron [179], tan solo es útil para aquellos puntos registrados que cumplan $M_t/M_\infty \leq 0.6$. Además, también debe cumplirse que el material no cambie sus dimensiones durante la difusión o que el hinchado que experimente sea moderado, que la transferencia de materia solo ocurra en una dirección del espacio y que la difusión gobierne sobre otros fenómenos de transporte. El segundo y tercer supuesto son asumibles teniendo en cuenta que se puede considerar simetría radial y que el proceso está controlado por la difusión si este es suficientemente lento, como pasa con la captación de agua del ambiente, respectivamente. En cuanto al hecho de que el hinchado sea moderado, es algo que se discutirá al analizar los resultados del punto 3.1. *Variación dimensional durante el hinchado.*

Con el fin de estudiar más en profundidad el efecto de los diferentes fenómenos de captación de agua por parte del HA entrecruzado y el efecto de la fuerza iónica de sales introducidas en el ambiente que modifiquen la actividad del agua, se realizó también experimentos similares de hinchado en otras condiciones. Se tomó un mínimo de 4 muestras HA3L y HA5L y se los introdujo en este caso en pocillos de varias placas de 48 pocillos (una por cada experimento). Una placa se introdujo en una cámara estanca como en el anterior experimento, pero en este caso con una disolución saturada de K_2SO_4 en lugar de agua destilada, ya que de este modo se logra un ambiente con HR del 97% [181]. En los pocillos de las otras dos se añadió directamente líquido, agua destilada en un caso y DPBS en el otro, y se cerraron de manera estanca para evitar la pérdida de las soluciones. Todas las muestras se dejaron a 37 °C durante > 280 h (muestras hinchadas en ambiente HR 97%) o > 24 h (muestras sumergidas en solución) y se pesaron antes y después tomándolas con unas pinzas en lugar de pesar directamente el recipiente como en el anterior caso. Los conductos HA1L no se usaron para estos ensayos por lo inmanejables que eran en condiciones de hinchado en inmersión.

3.3. Difusión molecular a través de la pared del conducto

El principal inconveniente de contener células en el interior de un conducto es que estas podrían ver restringida la libre circulación de nutrientes, iones y productos de desecho, que son fundamentales para mantener adecuadamente las funciones metabólicas. Por ello, se creyó conveniente analizar la velocidad de difusión a través de la pared del conducto de



moléculas modelo del sistema nervioso central como pueden serlo la glucosa, por ser el principal nutriente de las neuronas, o la albúmina de suero bovino (BSA), una proteína que se utiliza como molécula modelo [182] por haber sido ampliamente descrita y caracterizada en el pasado.

Se dispuso conductos ligeramente hidratados ($WC \sim 0.8$) de HA3L, HA3nL, HA5L y HA5nL (muestra de 4 conductos de cada tipo en cada ensayo) en vertical y se aplicó una pequeña fracción de unos 20 μl de mezcla madre al 5% al extremo superior para sellar el canal. Se dejó gelificar 15 min para posteriormente invertir los conductos de modo que quedase el extremo no sellado hacia arriba. Se introdujo 7 μl de disolución de glucosa (Sigma-Aldrich) 100 mg/ml en agua destilada o de BSA (Sigma-Aldrich) 30 mg/ml en agua destilada (dependiendo de la molécula cuya difusión se quiere estudiar) y se volvió a sellar el extremo libre con mezcla madre al 5%. Tan pronto como la mezcla de sellado estuvo gelificada (otros 15 min), se introdujo cada conducto en un pocillo de placa de 48 pocillos con 1 ml de agua destilada y se dejó la placa cerrada a 37 °C. A los 20, 45, 90, 180, 270, 360, 540 y 720 min, se extrajo cada conducto del pocillo para evitar forzar la difusión durante el muestreo, se tomó alícuotas de 0.5 ml de cada pocillo y se repuso el líquido perdido añadiendo 0.5 ml de agua destilada.

Cabe destacar que no se realizaron los ensayos introduciendo ambas moléculas de estudio a la vez porque en ensayos previos se comprobó que la glucosa generaba interferencias en el método de detección de la BSA. Además, se usó agua en lugar de alguna disolución salina que simulase los fluidos corporales para aumentar la sensibilidad de los métodos de detección, si bien es cierto que la presencia de iones y sales disueltas podría alterar la fuerza iónica del medio y, consecuentemente, el plegamiento de la BSA. Las concentraciones de glucosa y BSA introducidas en el interior del conducto fueron elegidas de acuerdo a valores basales encontrados en fuentes bibliográficas.

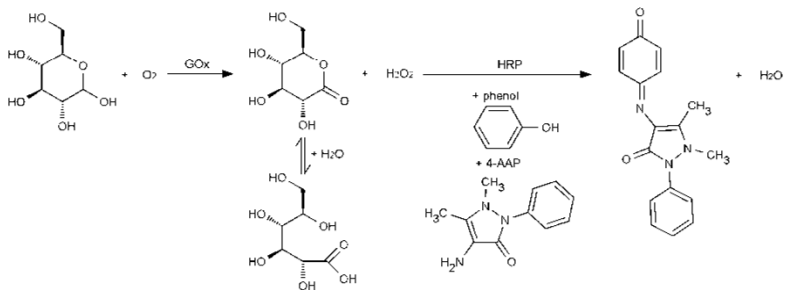


Figura 16. Reacción enzimática de la glucosa para obtener 1,5-dimetil-4-[(4-oxociclohexa-2,5-dien-1-ilideno)amino]-2-fenilpirazol-3-ona, una quinonaimina coloreada.

Para cuantificar la cantidad de glucosa presente en las alícuotas correspondientes se decidió recurrir a un método de análisis colorimétrico basado en dos reacciones enzimáticas sucesivas [183]. Este consiste en diluir 1:5 en volumen cada alícuota en una disolución acuosa de 4-aminoantipirina (4-AAP) 0.3 mM, fenol 8.5 mM, glucosa oxidasa (GOx) 10 U/ml y peroxidasa de rábano (HRP) 0.3 U/ml (denominada *solución Trinder* en adelante), dejar la mezcla reaccionar durante 5 min a CNTP y medir la absorbancia del medio a 505 nm (Espectrofotómetro Super Aquarius CE9200; Cecil Instruments, Cambridge, Reino Unido). Como se ha descrito gráficamente en la Figura 16, la GOx genera, en presencia de glucosa y oxígeno, peróxido de hidrógeno como producto. Este, a su vez, actúa como sustrato en la reacción de la HRP junto con el fenol y la 4-AAP como aceptor de oxígeno para producir una quinonaimina, una familia de sustancias que se utilizan como indicadores químicos por su intensa tonalidad.

También se usó un método colorimétrico basado en un kit comercial de cuantificación de proteínas (Pierce BCA Protein Kit Assay; Thermo Fisher Scientific), una optimización del ensayo de biuret, para la cuantificación de BSA en las alícuotas. De manera breve, el kit contiene reactivos que aportan iones Cu^{2+} , para que los enlaces peptídicos de las proteínas los reduzcan a Cu^{1+} , y ácido bicinconínico (BCA), que secuestra los cationes y forma de este modo un complejo de coordinación que presenta coloración en el espectro visible (Figura 17). Se diluyó cada alícuota 1:2 en la mezcla sugerida por el protocolo del Pierce BCA Protein Kit Assay y se incubó durante 1 h a 60 °C en un baño termostataado. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia de la solución con el espectrofotómetro Super Aquarius CE9200 a 562 nm, longitud de onda de máxima absorbancia para el complejo de agregación del BCA.

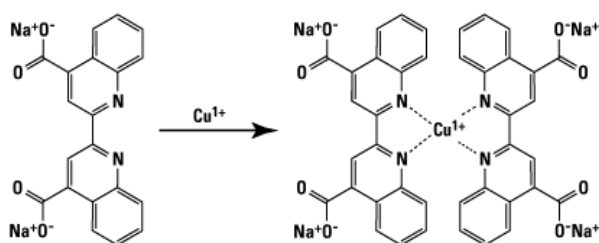


Figura 17. Formación de un complejo de coordinación coloreado gracias a la quelación de iones cobre (I) por parte de las moléculas de BCA. Reproducida con la autorización de Life Technologies.

En ambos casos, se realizó una recta de calibrado con diluciones seriadas de disoluciones de glucosa o BSA, que posteriormente fueron cuantificadas con cada uno de los métodos descritos anteriormente, para poder determinar la relación entre la concentración de cada compuesto con la



absorbancia registrada al final del proceso y lograr, de este modo, calcular la concentración de glucosa y BSA en cada una de las alícuotas medidas.

Además, para poder comparar los diferentes parámetros de los conductos (HA3L, HA3nL, HA5L y HA5nL) entre ellos y respecto a otras referencias externas, se intentó calcular el coeficiente de difusión de la glucosa y la BSA a través de la pared de cada uno de los conductos. Para ello, puesto que el conducto se puede aproximar a un cilindro, se decidió intentar abordar el problema considerando la segunda ley de Fick en términos de simetría radial (considerando despreciable la difusión en la longitud del cilindro).

$$2^{\text{a}} \text{ ley Fick } \boxed{\frac{\partial C}{\partial t} = D \nabla^2 C}$$

$$\text{Simetría radial } \boxed{\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(D r \frac{\partial C}{\partial r} \right) \xrightarrow{D=\text{cte}} \frac{\partial C}{\partial t} = D \left[\frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} + \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \right]}$$

Si a dicha ecuación diferencial se le aplica la transformación $C = u \cdot e^{-D \cdot \alpha^2 \cdot t}$, se llega a la siguiente expresión:

$$\frac{d^2 u}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} + \alpha^2 \cdot u = 0 \tag{9}$$

Que no es más que la ecuación de Bessel de orden cero. Si además se considera que se trata de un cilindro macizo de radio r_a y se utilizan las siguientes condiciones iniciales:

$$\begin{aligned} C &= C_0 & 0 \leq r < r_a & & t = 0 \\ C &= C_{ext} & r \geq r_a & & t \geq 0 \end{aligned}$$

Entonces se obtiene un problema que, de acuerdo con Fu, Hagemer y Moyer [184], tiene la siguiente solución exacta.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{m_t - m_0}{m_\infty - m_0} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{4}{r_a^2 \cdot \alpha_n^2} e^{-D \cdot \alpha_n^2 \cdot t} \tag{10}$$

Donde D es, de nuevo, el coeficiente de difusión, m_t es la masa total liberada en cierto instante t , m_0 la masa liberada inicial (considerada 0), m_∞ es la masa liberada total una vez alcanzado el estado estacionario y las α_n son las raíces de la expresión $J_0(r_a \cdot \alpha_n) = 0$, siendo $J_0(x)$ la función de Bessel de primera especie y orden 0, es decir, la solución a la ecuación 9.

Este planteamiento es bastante más complejo que el modelo usado en el ensayo de la cinética de absorción de agua por parte del sustrato de HA



entrecruzado. Esto se debe a que apenas había datos que cumplieren la condición de $M_t/M_\infty \leq 0.6$, además de que los conductos HA5nL y HA3nL no eran aptos para el sencillo modelo semiempírico de Ritger y Peppas por razones que se discuten al presentar los resultados. En cualquier caso, la solución de la ecuación 10 permite calcular directamente el coeficiente de difusión D , lo que puede ser muy conveniente para contrastarlos con valores bibliográficos comparables.

Utilizando los datos obtenidos durante la cuantificación de las alícuotas obtenidas en el ensayo de difusión (la obtención de las masas liberadas a partir de las concentraciones de cada alícuota es trivial), se calculó cada uno de los coeficientes de difusión que minimizaba las diferencias cuadráticas entre el término M_t/M_∞ calculado mediante la ecuación 10 y el obtenido experimentalmente, tanto para las diferentes sustancias ensayadas como para los diferentes factores estudiados en los conductos.

Como se puede apreciar en el planteamiento de las condiciones iniciales, para la aplicación de la solución al problema se consideró que el conducto no modificaba sus dimensiones por efecto de la variación de concentración, que la concentración en el exterior era prácticamente 0 y constante en el tiempo y que en el interior del conducto se genera un perfil de concentración variable con el tiempo igual al que se formaría si este fuera macizo. Las dos primeras son sencillas de justificar, ya que, a pesar de ser un hidrogel, el conducto ya se encontraba hinchado en el momento de empezar el experimento y además se van tomando alícuotas periódicamente que van reduciendo la concentración con frecuencia. En el caso del tercer supuesto, aunque es cierto que el conducto desarrollado dista mucho de ser un cilindro macizo, puesto que el material hinchado es agua en mayor medida (60.78% wt/wt para un WC de 1.55 en el caso del conducto que menos hincha, de acuerdo con el apartado 2.2. *Caracterización de los conductos acanalados porosos* del Capítulo III) el perfil de concentración que se forme en el interior será similar al producido por un hipotético cilindro estático de agua. Además, cualquiera de las alternativas supondría asumir una alteración de los efectos difusivos o conocer como varía la concentración interna con el tiempo, lo que no es posible de antemano.

3.4. Degradación enzimática

Por otro lado, la velocidad a la que un implante biomédico degradable desaparece del organismo es un parámetro crucial. Una biodegradación demasiado rápida puede hacer que el implante no llegue a cumplir su función de sustitución del tejido dañado, mientras que si este es muy estable en el tiempo puede llegar a suponer un impedimento a la formación de nueva



matriz extracelular por parte de las células del huésped que lo hayan invadido.

Por ello, se estudió la velocidad de degradación de los conductos de HA entrecruzado en condiciones similares a las fisiológicas. Se tomó discos de 5 mm de diámetro tanto secados al aire (fHA3nL y fHA5nL) como liofilizados (fHA3L, fHA35L, fHA4L, fHA45L y fHA5L), todos en estado seco y de masa conocida, y se los introdujo en Eppendorfs que contenían disolución tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS; Sigma-Aldrich) con 10 U/ml de enzima hialuronidasa testicular bovina (HAasa; Sigma-Aldrich). Todos los Eppendorf se incubaron a 37 °C y tras 8 h, 1, 2, 3, 5, 7, 11, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71 y 78 días se inactivó la enzima sumergiendo los Eppendorf en un baño termostataado a 97 °C durante 90 segundos para evitar que la enzima continuase hidrolizando selectivamente los enlaces glucosídicos β -1,3. Posteriormente, se extrajo los discos sólidos (siempre y cuando fueran mecánicamente estables) del medio de degradación, se los liofilizó para extraer todo el agua que fuera posible y se midió su peso mediante la balanza AX205. Se trabajó con 4 muestras para cada condición y tiempo de degradación. También se introdujo una fracción de las muestras en Eppendorfs que solo contenían DPBS y se sometieron a las mismas condiciones del ensayo de degradación (aunque los muestreos se realizaron con menos frecuencia) para evaluar la degradación no enzimática en igualdad de condiciones y compensar, además, el aumento de masa en el residuo sólido de los discos que se debía a la precipitación de sales del DPBS.

Algunas de las muestras de fHA3L y fHA5L, así como sus respectivos controles, fueron ordenados de acuerdo a la serie temporal y fotografiados para analizar la variación en las dimensiones de los discos de manera visual. Posteriormente, las muestras de 0, 16 y 78 días de degradación se analizaron mediante SEM con el fin de observar con más detalle los cambios topográficos y morfológicos. Este ensayo cualitativo no se hizo para los films fHA3nL o fHA5nL por las escasas diferencias existentes entre ambos grupos a lo largo del tiempo.

También es de gran interés predecir el efecto que tendrán los residuos de degradación de un implante sobre el organismo en el que se ha introducido, ya que la agresividad de la respuesta inmunitaria influye en gran medida sobre el grado de integración a medio y largo plazo de este y, por tanto, sobre su éxito para regenerar tejido. Sin embargo, el ensayo que se realizó a este respecto se hizo en contacto con células vivas, por lo que se explica debidamente en el apartado 4.1. *Viabilidad y proliferación celular en el*



lumen del conducto, donde ya se habrán introducido los protocolos de manipulación de cultivos biológicos.



4. Cultivo de células de Schwann

Para la primera fase de la evaluación de la respuesta biológica de los conductos de HA entrecruzados solo se usó células de Schwann, por ser células de soporte del SNP y porque se conocen muy bien sus condiciones de cultivo, pero también porque una de las estrategias para la cual se planteó usar el conducto estaba basada en el uso de implantes biohíbridos que contengan y retengan células de apoyo en su interior.

Dichas células eran SC extraídas de nervios espinales de rata (Innoprot, Derio, España), que fueron expandidas con *Schwann Cell Medium* (Innoprot) en un frasco de cultivo de 75 cm² incubado a 37 °C y con un 5% de CO₂, hasta alcanzar el 4^o - 5^o pase celular. En dicho punto, las SC se lavaron con DPBS templado para eliminar células muertas y enjuagar las proteínas solubles y se cultivaron 2 min a 37 °C con una mezcla enzimática quelante de tripsina 0.25% w/v y 1x EDTA (Thermo Fisher Scientific) para despegar las células vivas del frasco de cultivo. Se bloqueó la enzima añadiendo el doble de volumen de DMEM (Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.) con 10% v/v de suero fetal bovino (FBS; Fisher Scientific, Pittsburgh, EE.UU.) que de la mezcla anterior y se trasvasó la mezcla a un frasco de centrifuga de punta cónica. Este se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min y, posteriormente, se retiró el sobrenadante. Se resuspendió cuidadosamente el *pellet* de SC en *Schwann Cell Medium* para obtener una concentración aproximada de 5·10⁴ células/μl y se procedió a sembrarlas según cada experimento.

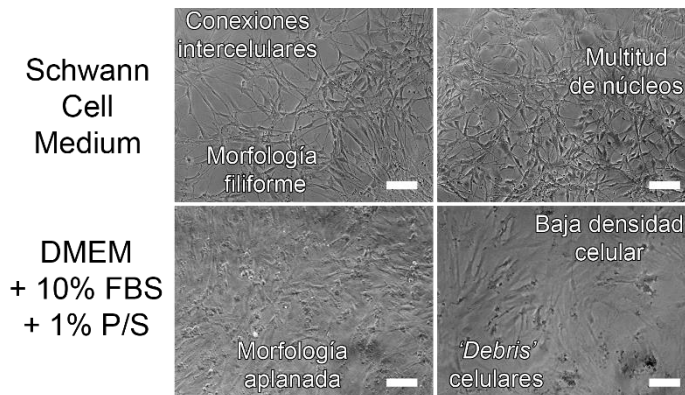


Figura 18. Imágenes de microscopía de alto contraste de células de Schwann cultivadas en frasco de 75 cm² con dos medios de cultivo de diferente composición. En cada imagen se describen los aspectos morfológicos más relevantes. Barra de escala: 100 μm.

Utilizar un medio de cultivo comercial cuya composición es desconocida supuso una limitación de cara a poder evaluar los efectos de cada uno de los componentes del medio. Sin embargo, este fue el medio óptimo (ver



Figura 18) para el cultivo de las SC de entre las varias pruebas preliminares que se realizaron con medios de composición conocida como por ejemplo DMEM 4.5 g/l glucosa (Life Technologies), 10% v/v FBS y penicilina potásica 100 U/ml + sulfato de estreptomocina 100 µg/ml (1% v/v P/S; Lonza, Basilea, Suiza).

Asimismo, antes de poder utilizar los conductos para cultivos celulares, estos debieron ser sanitizados para evitar que constituyesen una fuente de contaminación biológica. Una vez hidratados durante > 2 h en agua destilada, se realizó dos lavados de 1 h con etanol 70°, el segundo de ellos en el interior de una cabina de flujo laminar. Posteriormente, se lavó los conductos con etanol 50° y 30° durante 10 min cada vez y se enjuagaron 3 veces con agua MilliQ (agua tipo 1) estéril durante otros 10 min para eliminar cualquier resto de etanol. Por último, los materiales se acondicionaron sustituyendo el agua por medio DMEM e incubándolos O/N a 37 °C en un ambiente controlado.

4.1. Viabilidad y proliferación celular en el lumen del conducto

En primer lugar, en este apartado se intentó determinar qué factores de los estudiados a la hora de sintetizar los conductos acanalados de HA suponían un beneficio para el cultivo de las SC en su interior. Para ello, se sembró 10^5 SC en el lumen de cada uno de los conductos a estudiar (HA3L, HA3nL, HA5L y HA5nL; 4 muestras por condición) con ayuda de una jeringuilla Hamilton de 5 µl de capacidad (SGE Analytical Science, Melbourne, Australia) y se cultivaron con *Schwann Cell Medium* durante 1, 7 y 14 días en una placa multipocillos de 48 pocillos dentro de una incubadora a 37 °C con 5% CO₂. Transcurrido cada uno de estos tiempos, los conductos con las células se lavaron con DPBS a 37 °C y se incubaron durante 3 h más con una mezcla 1:6 en volumen de reactivo MTS (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega, Madison, EE.UU.) en DMEM sin rojo fenol (Life Technologies). El reactivo MTS es una sal de tetrazolio, concretamente el (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, que tiene la particularidad de que, al ser reducida por procesos metabólicos de prácticamente todas las células animales, se forma un producto coloreado llamado formazán. Como se conoce la cinética de reducción celular del MTS, se sabe que la relación entre el número de células presente y el producto coloreado formado es directamente proporcional, por lo que se pueden realizar análisis semicuantitativos de poblaciones celulares. Por ello, tras la incubación se agitó la placa multipocillos y se tomó alícuotas de 100 µl que se trasladaron a otra placa multipocillos de 96 pocillos para poder realizar una lectura de la absorbancia del medio a 570 nm mediante el espectrofotómetro lector de placas VICTOR³ 1420.



También se cultivaron de nuevo SC en conductos de todos los tipos estudiados durante 14 días para evaluar paralelamente los resultados del MTS mediante microscopía óptica. Transcurrido el tiempo de cultivo, se incubó los conductos con células con una disolución 2 μM de calceína acetoximetilada o *calceína AM* + 4 μM homodímero de etidio (LIVE/DEAD assay; Life Technologies) en DPBS durante 45 min a temperatura ambiente. La calceína presenta una coloración fluorescente verde ($\lambda \approx 520$ nm) y el homodímero de etidio roja ($\lambda \approx 630$ nm), por lo que es posible discriminar qué células están vivas y muertas, porque cada sustancia se asocia a unas u otras dependiendo de sus condiciones. Con ese fin, tras la incubación con disolución LIVE/DEAD, se realizó dos lavados con DPBS fresco, se cortaron los conductos longitudinalmente para revelar el interior del conducto y se fotografiaron los lúmenes de los conductos mediante un microscopio de fluorescencia Eclipse 80i (Nikon).

Cabe destacar que en todos los casos en los que se utilizó microscopía (cualquiera de las variantes) se debió proceder a realizar los cortes longitudinales de los conductos, ya que la alta porosidad y el diferente índice de refracción de la matriz de HA entrecruzado respecto del de las disoluciones acuosas hacían imposible realizar micrografías a través de la pared del conducto.

Una vez determinado el par de condiciones óptimas para el cultivo celular de SC, se procedió a evaluar el beneficio relativo que les proporciona la morfología tridimensional en el interior del conducto con respecto a otras alternativas que se utilizan como referencia de entorno amigable. Por una parte, se sembró 10^5 SC en la superficie de un disco de 5 mm de fHA5L y en el interior de un conducto HA5L. También se sembró la misma cantidad de SC sobre un film de ácido poli-L-láctico (fPLLA), obtenido mediante la técnica de *solvent casting*, vertiendo una disolución de granza de PLLA (Ingeo 4042D; Natureworks) al 10% w/v en cloroformo (Scharlab) en una placa Petri y dejándola secar al aire durante 24 h. El PLLA es un sustrato ampliamente estudiado y utilizado en aplicaciones de ingeniería tisular [185,186] y, por ello se sembró del mismo modo los conductos HA5L-PLLA descritos anteriormente, a fin de analizar si las fibras paralelas de PLLA introducidas en el lumen de los conductos (tal y como se describe anteriormente) permite aunar las ventajas que ambos sistemas aportan por separado. Por último, se usó como control positivo de viabilidad un cubreobjetos de vidrio borosilicatado de 12 mm de diámetro (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania). Tras 1, 5 y 10 días de cultivo con *Schwann Cell Medium* en incubador a 37 °C y 5% CO₂, se repitió el ensayo MTS en las mismas condiciones que el primer experimento de viabilidad y se volvió a medir la absorbancia de alícuotas del medio a 570 nm. Cada grupo



experimental y cada tiempo de cultivo contó con un tamaño muestral mínimo de 4 elementos.

Como complemento al apartado 3.4. *Degradación enzimática*, se realizó también un ensayo de citotoxicidad indirecta basado en los principios de la norma ISO 10993-5. Se tomó un extracto del medio tampón con enzima obtenido tras retirar los films degradados del grupo fHA3L tras 4, 8 y 18 días y se diluyó 1:5 v/v en *Schwann Cell Medium* (Extr. 4d, Extr. 8d y Extr. 18d, respectivamente). Se seleccionaron solo las muestras fHA3L puesto que estas tuvieron la tasa de degradación más rápida de entre las estudiadas, por lo que con los tres tiempos fijados es posible analizar el contacto de las células con residuos de HA entrecruzado de mayor o menor peso molecular. Con dichos extractos se cultivó 10^5 SC en fondos de pocillo de placa multipocillos durante 1 y 5 días. Como control positivo (Medio) se usó el mismo volumen de *Schwann Cell Medium* con DPBS en lugar del extracto y como control negativo (Control -) una dilución 1:5 v/v de DPBS que había estado en contacto 24 h con látex en *Schwann Cell Medium*, con los que fueron incubadas el mismo número de células en el mismo intervalo de tiempo (N muestral de 4 en todos los casos). Finalmente, se repitió el ensayo de viabilidad celular MTS tras los tiempos de cultivo establecidos.

4.2. Supervivencia y destino celular de SC

Con el fin de extraer más información acerca del estado de las SC sembradas en cada momento y su pronóstico futuro, se procedió a cuantificarlas mediante citometría de flujo, una técnica que permite contar y evaluar las propiedades individuales de los individuos de una población relativamente grande de células.

En primer lugar, se sembró 10^5 SC en el interior de conductos HA5L y HA5L+PLLA y en la superficie de cubreobjetos de vidrio, usado este último como control. Estos se incubaron con *Schwann Cell Medium* durante 1, 5 y 10 días. Transcurrido cada periodo, una parte de los conductos se trataron de acuerdo a la descripción de un protocolo comercial de detección de células apoptóticas y muertas (ver referencia de anexina V FITC y yoduro de propidio). Se lavó las muestras dos veces con DPBS a 37 °C para posteriormente despegar las células de los distintos sustratos con tripsina-EDTA (ver 4. *Cultivo de células de Schwann*) durante 3 min. En el caso de los conductos (HA5L y HA5L-PLLA), el tiempo de incubación fue algo mayor (5 – 7 min) por estar las células confinadas en el interior del canal. Para bloquear la acción de la enzima, se añadió el doble de volumen de DMEM + 10% FBS que de tripsina-EDTA y, una vez suspendidas las células, se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el



pellet de SC en una solución tampón de asociación de anexina V. Dicha solución tampón estaba constituida por Hepes 10 mM (Life Technologies), NaCl 140 mM (Scharlab) y CaCl₂ 2.5 mM (Scharlab), tamponado a pH = 7.4 con NaOH (Scharlab). Posteriormente, se diluyó anexina V FITC (Immunostep, Salamanca, España) al 1:200 v/v en el tampón de asociación y se incubó las células con la dilución durante 15 min a temperatura ambiente. Por último, se diluyó yoduro de propidio (PI; Immunostep) en el tampón y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para luego añadir volumen de tampón de asociación suficiente (unas 2 - 3 veces el volumen de tampón inicial).

La anexina V es una proteína que presenta mucha afinidad por la fosfatidilserina, un fosfolípido presente en la bicapa que constituye la membrana celular que solo se expone hacia el exterior cuando la célula ha iniciado procesos que conducen a la apoptosis. Así, como la anexina V está asociada en este caso al fluoroforo isotiocianato de fluoresceína (FITC), tan solo las células que se encuentran en fase apoptótica presentarán coloración fluorescente verde. Por su parte, el PI es un agente fluorescente rojo e intercalante del ADN que actúa de forma similar al homodímero de etidio, ya que es impermeable a la membrana celular y solo puede asociarse a los ácidos nucleicos cuando ésta presenta defectos (procesos necróticos o apoptóticos tardíos).

Respecto a la otra parte de las muestras, se despegó y centrifugó de igual modo las SC de los conductos y los cubreobjetos, solo que estas se trataron con disolución LIVE/DEAD (calceína AM + homodímero de etidio) a la hora de resuspender el *pellet* de células, del mismo modo que se hizo en el apartado 4.1. *Viabilidad y proliferación celular en el lumen del conducto*. También se añadió un volumen suficiente de tampón suficiente (2 - 3 veces el volumen de incubación) como paso final, esta vez DPBS.

El N muestral fue de 3 para cada factor de estudio, tiempo de cultivo y mezcla fluorescente de tinción para que el número de células de cada lectura fuera suficientemente grande y representativo.

Tanto las muestras teñidas con disolución LIVE/DEAD como aquellas tratadas con anexina V FITC/PI, fueron cuantificadas mediante un citómetro de flujo con láseres de excitación FC500 (Beckman Coulter, Pasadena, EE.UU.) considerando un mínimo de $5 \cdot 10^4$ SC por cada grupo de estudio. Posteriormente, mediante el software RXP (Beckman Coulter) se realizó un análisis de la fluorescencia de cada célula contabilizada, representando cada dato en un diagrama de dispersión bidimensional donde los ejes de coordenadas correspondían a la intensidad de señal del par de marcadores

fluorescentes correspondientes (ver ejemplo del par anexina V FITC/PI en la Figura 19). A raíz de ese diagrama de dispersión, el técnico experto en citometría trazó dos umbrales perpendiculares de acuerdo al rango de intensidad registrado para cada fluoróforo, por debajo de los cuales se consideró que la señal era nula o no significativa.

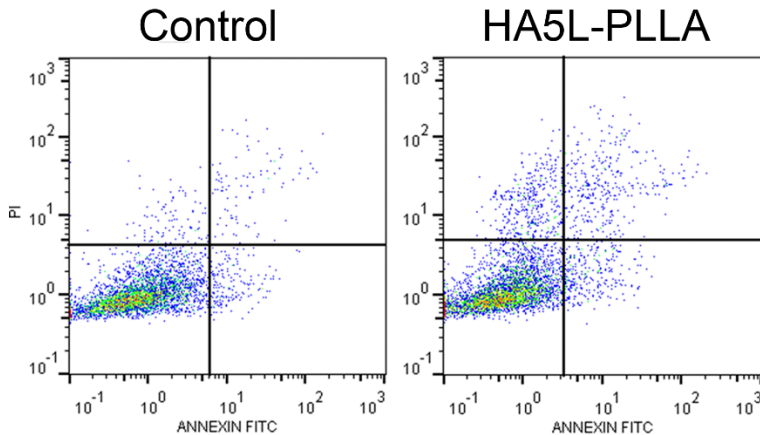


Figura 19. Diagrama de densidad de dispersión de puntos obtenido tras teñir las células de las muestras Control y HA5L-PLLA con yoduro de propidio (PI) y anexina (ANEXIN FITC) y analizarlas mediante citometría de flujo. Los ejes de coordenadas determinan la intensidad de fluorescencia registrada y los puntos se presentan coloreados de acuerdo a su superposición, de mayor (rojo) a menor densidad de puntos por área (azul). Los límites de los cuadrantes fueron delimitados por el técnico especialista.

En el caso de las muestras cuyas SC fueron teñidas con disolución LIVE/DEAD, tan solo se cuantificó el número de células muertas, es decir, positivas para homodímero de etidio pero negativas para calceína AM con respecto al número total de células cuantificadas. Las células positivas para calceína AM fueron consideradas como vivas y también así para el caso de ambos marcadores fluorescentes positivos, ya que una célula no puede estar viva y muerta a la vez. Este criterio se tomó teniendo en cuenta que para que la calceína AM presente fluorescencia debe ser modificada por procesos metabólicos complejos, característicos de una célula viva y sana. Las células negativas para calceína AM y homodímero de etidio fueron consideradas residuos celulares y, por tanto, no contabilizadas.

Los resultados del ensayo con anexina V FITC/PI fueron tratados de diferente manera, puesto que las SC pueden presentar emisión de ambos marcadores sin caer en un absurdo. En la Tabla 2 se presenta un resumen de la interpretación que se realizó de los puntos ubicados en cada uno de los cuadrantes en los que se dividían los diagramas de dispersión obtenidos.



Tabla 2. Nomenclatura de los diferentes cuadrantes en los que se ha dividido los diagramas de dispersión analizados para las muestras teñidas con anexina V FITC/PI e interpretación del destino de las células de acuerdo a su ubicación.

Nombre	Ubicación	Anexina	PI	Interpretación
Q1	Sup. izquierda	-	+	Necrosis
Q2	Sup. derecha	+	+	Apoptosis tardía
Q3	Inf. izquierda	-	-	Célula sana
Q4	Inf. derecha	+	-	Apoptosis

A efectos prácticos, se consideró las células de los cuadrantes Q2 y Q4 como “apoptóticas” de cara al análisis de resultados, ya que en ambos casos algún agente desencadenante debió mediar la activación intracelular de una cascada proteolítica de caspasas. Las células identificadas en Q1, sin embargo, solo han podido llegar a un estado de necrosis por efecto de algún estímulo agudo que haya afectado irreversiblemente a la membrana plasmática y a la capacidad de la célula de mantener su equilibrio iónico.

4.3. Impermeabilidad celular de la pared del conducto

El diseño de la estrategia presentada en la presente memoria requiere que, además de conferir un ambiente amigable a células neurales, el conducto poroso pueda confinar y contener las células injertadas junto con él para evitar que estas se desperdiguen de la zona del implante, que por estar dañada supone un ambiente inherentemente hostil. También sería interesante que células como los macrófagos, la microglía o los astrocitos en su configuración reactiva, no entrasen en contacto directo con las células del interior del conducto, ya que podrían inducir una reacción inmunitaria severa e impedir que estas últimas desarrollasen los procesos regenerativos que se les atribuyen. Por tanto, lo ideal sería que la pared del conducto constituyese una barrera física para la transición de células a su través.

Puesto que la matriz de HA entrecruzado de los conductos HA5L era porosa con un tamaño de poros inferior en las caras interna y externa de la pared, se realizó dos experimentos sencillos para evaluar la migración de células de dentro afuera y viceversa. En ambos casos, se sembró 10^5 SC/conducto HA5L, solo que la siembra se realizó en el interior del conducto del modo que ya se ha explicado anteriormente para evaluar si las SC escapaban del lumen y para analizar cuánto podían penetrar desde el exterior se sembraron sobre las superficies externas, procurando no introducirlas en el interior del conducto por accidente. Se dejó las SC 45 min sin más medio que el de siembra para que se asentasen en los sustratos y se añadió *Schwann Cell Medium* para cultivarlas durante 5 (migración de fuera hacia dentro) o 10 días (de dentro afuera) a 37 °C y con 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con DPBS a 37 °C y se fijaron durante 20 min con una



disolución 3.7% de formaldehído (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente. Por último, se lavó los conductos 3 veces con DPBS a 4 °C durante 5 min cada vez.

Los conductos HA5L donde las SC habían sido sembradas fuera fueron tratados con una solución permeabilizante de membrana basada en Tween 20 (Sigma-Aldrich) 1:100 v/v en DPBS a temperatura ambiente durante 15 min. Luego se tiñeron los núcleos de las células con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich) 1:5000 v/v en DPBS, un fluoróforo azulado que se asocia al ADN, durante 10 min, tras lo cual se realizaron 3 nuevos lavados con DPBS de 5 min para eliminar el DAPI no asociado a los núcleos. Una vez teñido, se fotografió la superficie externa de los conductos con un microscopio de fluorescencia Eclipse 80i. Después, se seccionaron longitudinalmente los mismos conductos por la mitad para observar el interior y se volvieron a fotografiar.

Respecto al estudio de la migración de las SC desde el interior hacia fuera, también se permeabilizaron y tiñeron con DAPI los conductos de igual modo pero, además, fueron tratadas con una disolución de falacidina BODIPY FL (Life Technologies) 1:40 v/v en DPBS durante 45 min a temperatura ambiente, tras lo que se realizaron 3 lavados de DPBS de 5 min. La falacidina es una falotoxina de origen natural que se asocia a la F-actina de las células. Conjugada al fluoróforo BODIPY FL, permite revelar en luz fluorescente verde dichos filamentos del citoesqueleto de cualquier célula teñida, lo que permite discriminar la orientación de los somas y otros parámetros morfológicos. Los conductos con las SC ya tratadas se seccionaron longitudinalmente y se fotografiaron con un microscopio confocal láser de barrido (CLSM) FV1000 (Olympus, Upper Saucon, EE.UU.).

Como se observó que las SC habían formado una macroestructura singular en el interior del conducto, se postfijaron con glutaraldehído (Scharlab) 2.5% v/v en tampón fosfato 0.1M (PB) 1 h a 37 °C algunos de los conductos ya fijados con formaldehído para poder usarlos en microscopía electrónica. Tras el postfijado, se trataron las muestras con OsO₄ (Aname, Madrid, España) al 2% v/v en PB 0.1M durante 90 min en oscuridad y agitación para ofrecer mayor contraste a la hora de visualizar las células con el microscopio (el osmio es un metal pesado que genera más electrones secundarios con las colisiones electrónicas que elementos más ligeros) y para evitar que algunas proteínas coagulasen en presencia de alcoholes. Esto se debe a que el siguiente paso fue lavar las muestras 4 veces durante 10 min con agua destilada a 4 °C y deshidratarlas mediante lavados sucesivos de 10 min con etanol 30°, 50°, 70°, 90° y 100° (Scharlab). Una vez sumergidas las muestras en etanol 100°, se procedió a sustituir el disolvente por CO₂ líquido, para



posteriormente realizar un secado de los conductos por punto crítico (extracción del CO₂ en estado supercrítico) para evitar que colapsen los poros del material y las estructuras biológicas. Una vez secos, los conductos se seccionaron longitudinalmente con una cuchilla para revelar su lumen y se recubrieron con partículas de oro para poder observarlas en el SEM (S-4800; Hitachi, Tokio, Japón).

Todos los indicios parecieron indicar que al cabo de 10 días de cultivo de SC en el interior de los conductos de HA5L, estas habían formado una especie de manto compacto o vaina que cubría la superficie interna del lumen, y que las células que lo componían estaban muy asociadas entre ellas, pero no tanto al sustrato de HA entrecruzado. Como esta “vaina” formada por las SC presentó analogías con algunas estructuras orgánicas (como las bandas de Büngner) pero no se encuentra en ningún sistema tisular natural, especialmente con esas dimensiones, se decidió analizarla y caracterizarla con especial detenimiento. Esto dio lugar al siguiente apartado 5. *Caracterización de vaina celular macroscópica.*



5. Caracterización de vaina celular macroscópica

El hallazgo de la formación de la peculiar estructura formada por las SC en el interior de los conductos HA5L llevó a plantearse cómo se formaba dicha vaina celular, si esta cubría por completo el lumen del conducto, si las SC que la componían tenían un comportamiento normal y qué efecto tenían las fibras de PLLA introducidas en el canal del conducto sobre dicha vaina.

Para dilucidar estas preguntas, se realizó una serie de experimentos que requirieron sembrar 10^5 SC en el lumen de una cantidad considerable de conductos HA5L y HA5L-PLLA previamente sanitizados y acondicionados para su uso en cultivos biológicos. Estos fueron cultivados con *Schwann Cell Medium* a 37 °C y 5% CO₂ hasta el momento de su uso.

5.1. Estudio de la formación de la vaina celular

En primer lugar, se estudió las etapas de formación de la vaina de SC a partir de las mismas células disgregadas, tal cual se introducen en el lumen del conducto. Se tomó conductos HA5L con SC tras 3, 5, 7, 9 y 11 días de cultivo y se fijaron con formaldehído, al igual que se hizo con anterioridad. Posteriormente, se tiñó las células con DAPI y con BODIPY FL falacidina y, tras lavar las muestras 3 veces con DPBS, se cortó cada conducto con una cuchilla en secciones transversales de 700 – 1000 μm de espesor para poder observar el canal circular del conducto y las células dispuestas sobre él.

Como el conducto está constituido por un hidrogel, las muestras se debían observar hidratadas en exceso con DPBS para evitar una contracción volumétrica por la pérdida de agua. Sin embargo, para evitar que los cortes transversales se desplazasen durante la captación de imágenes a causa del exceso de líquido, se dispusieron en un portaobjetos de vidrio, donde se fijó, en los extremos, dos trozos de cinta adhesiva de doble cara de unos 500 μm y un cubreobjetos rectangular de vidrio apoyado encima de estos para mantener cada sección de conducto entre las superficies del cubreobjetos y el portaobjetos (Figura 20). Mediante este sistema, se pudo fotografiar el lumen de las muestras mediante un CLSM DMi8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

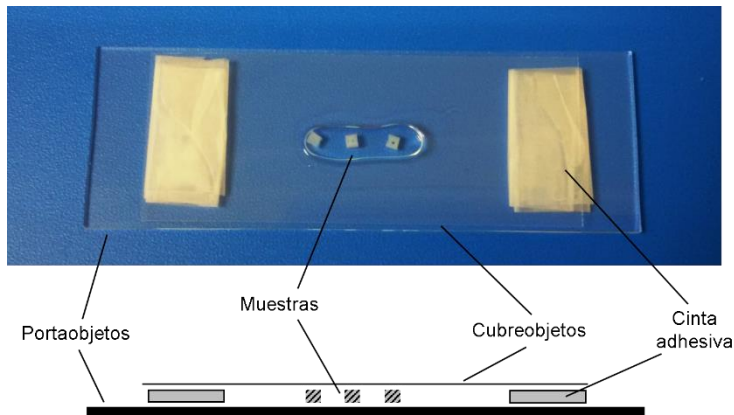


Figura 20. Imagen del montaje ideado para poder fotografiar cortes transversales de conductos HA5L con SC en su lumen (arriba) y esquema del mismo montaje en vista lateral con todos los componentes desglosados (abajo).

5.2. Fenotipo y morfología de las SC

Tras dejar cultivar las células en conductos de HA5L y HA5L-PLLA durante 10 días, se fijaron con formaldehído para realizar ensayos de microscopía que permitiesen observar su morfología, así como la expresión de algunas proteínas características de las SC, para analizar si su fenotipo era el que se les atribuye o si este se había visto modificado por las condiciones en el interior de los conductos (N = 2 para cada ensayo).

Como en este caso se procedió a realizar inmunocitoquímicas en lugar de tinciones, se incubó las muestras 30 min a temperatura ambiente con una solución Tween 20 0.1% v/v y BSA 1% v/v en DPBS (tampón bloqueo en adelante) para permeabilizar la membrana de las células y limitar el número de sitios proteicos activos inespecíficos a los que se puede asociar electrostáticamente un anticuerpo, ya que la albúmina se asocia indiscriminadamente a dichos sitios, bloqueándolos. Posteriormente, se incubó O/N a 4 °C los conductos con SC con anticuerpos primarios de conejo (Rb) específicos contra diferentes moléculas, que se indican en la Tabla 3 junto con la fracción de dilución en tampón bloqueo. Todos los anticuerpos primarios fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, Reino Unido).



Tabla 3. Relación de anticuerpos primarios utilizados en las inmunocitoquímicas realizadas para caracterizar el fenotipo de las SC cultivadas en el interior de los conductos.

Nombre	Dilución (v/v)	Función del antígeno
Rb anti-GFAP	1:500	Componente del citoesqueleto en neuroglía
Rb anti-p75	1:250	Receptor de factor de crecimiento nervioso
Rb anti-S100	1:100	Fosforilación de proteínas, regulación Ca ²⁺ ...

Para eliminar restos del anticuerpo primario, se lavó 3 veces con DPBS durante 5 min, para luego incubar de nuevo las muestras con una disolución 1:200 v/v de anticuerpo secundario policlonal de cabra (Gt anti-Rb Alexa Fluor 488 conjugate; Life Technologies) en tampón bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó 2 veces con DPBS durante 5 min y se teñió los núcleos de las células con disolución 1:5000 de DAPI durante 10 min. Una parte de los conductos HA5L y HA5L-PLLA fijados fueron teñidos con DAPI y BODIPY FL falacidina, tal como se ha descrito con anterioridad, en lugar de realizar la inmunocitoquímica.

Tras realizar los últimos 3 lavados con DPBS con cuidado, se cortó los conductos transversalmente y se fotografió tanto el interior de estos como algunas de las fibras de PLLA por separado mediante el CLSM FV1000.

A otra parte de los conductos HA5L y HA5L-PLLA (N = 3 de cada grupo) con SC cultivadas en su lumen durante 10 días, se los fijó con glutaraldehído, se los trató con OsO₄ y se los deshidrató del mismo modo que se describe en 4.3. *Impermeabilidad celular de la pared del conducto* para poder conservar los tejidos biológicos intactos con el objetivo de observarlos mediante SEM. Una vez secos, los conductos fueron cortados longitudinalmente por el centro y dispuestos de manera que las células quedasen expuestas para poder tomar micrografías detalladas del manto de células que se formó en el interior del conducto y de las SC asociadas a las fibras de PLLA.

5.3. Interacciones célula-célula y célula-sustrato en la vaina

Uno de los aspectos más destacables de la vaina celular formada en el lumen de los conductos HA5L y HA5L-PLLA fue que, a pesar de que parecía ser una membrana delgada, tenía un aspecto denso y compacto y las SC que la componían parecían estar desligadas de la superficie interna de los conductos. Por ese motivo, se intentó diseñar experimentos que permitiesen observar con detenimiento la vaina, su morfología y su composición.

Por una parte, se fijó, trató con OsO₄ y deshidrató con etanol 2 conductos de HA5L tras 10 días de cultivo con SC en su interior, al igual que se hizo con



las muestras para observarlas en SEM. En este caso, el etanol absoluto en el que estaban embebidos los conductos con las células tras la deshidratación fue sustituida gradualmente por óxido de propileno y después por la resina epoxi Durcupan (Sigma-Aldrich) por un técnico especialista de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Dicha resina fue endurecida polimerizándola O/N a 60 °C y, de este modo, se pudieron realizar secciones transversales y longitudinales de 0.5 μm de espesor de los conductos mediante un ultramicrotomo EM UC6 (Leica Microsystems). El pequeño espesor de las secciones permitió tomar micrografías de la capa de células a gran magnificación mediante un TEM Tecnai G2 Spirit (FEI, Hillsboro, EE.UU.).

También se fijó una parte de conductos HA5L con formaldehído a los 10 días de cultivo de SC para aplicar tinciones que revelasen componentes de la vaina celular. Para llevar a cabo la tinción secuencial, se sumergió los conductos en solución hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) durante 10 min. Luego se enjuagaron 10 s con una disolución 0.1% w/v de HCl (Sigma-Aldrich) en alcohol absoluto y se lavaron con agua de red durante 15 minutos, previamente a introducirlos en una disolución de azul alcian 8GX pH 2.5 (Sigma-Aldrich) en ácido acético 3% v/v durante 30 min, que se lavó con agua de red durante 1 h. Por último, se añadió 1% wt/v de rojo picosirio (composición descrita en 2.1. *Análisis macroscópico*). Todos los procesos de tinción se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Finalizados estos, se lavó las muestras 3 veces con ácido acético 3% v/v durante 15 min, dejando el último lavado O/N para eliminar tanto como fuera posible los restos de colorante asociados a la matriz de HA entrecruzado y obtener, así, mejor contraste entre el material y los componentes de origen biológico.

En lugar de incluir las muestras en una resina para cortarlas como en el caso anterior, estas se crioprotegieron sumergiéndolas en sacarosa (Panreac Química, Castellar del Vallès, España) 20% w/v a temperatura ambiente durante 1 h, se incluyeron en OCT O/N a 4 °C y se congelaron a -30 °C durante un mínimo de 5 h. A esta temperatura, la muestra, el tejido orgánico de las células y el OCT presentaban unas propiedades mecánicas similares, por lo que se pudo cortar cada conducto en secciones transversales de entre 2 y 5 μm sin deformarlas con un criostato CM 1520 (Leica Microsystems), que luego se observaron con el microscopio Eclipse 80i.

5.4. *Análisis informático de la continuidad de la vaina*

Por último, se tomó conductos HA5L y HA5L-PLLA y, tras 10 días de cultivo con SC en su lumen, se fijaron y tiñeron con DAPI y falacidina, tal y como se ha descrito en anteriores apartados. En este caso, los conductos también se

seccionaron longitudinalmente en toda su longitud para revelar el interior y se fotografiaron con el microscopio de fluorescencia Eclipse 80i, pero en lugar de obtener detalles de zonas ilustrativas y/o significativas de la morfología de las células de la vaina, se realizó fotografías a baja magnificación a lo largo de todo el conducto. La serie de imágenes de cada conducto se reconstruyeron para obtener una composición de la vaina fluorescente de extremo a extremo del lumen.

Las dos composiciones de imágenes de fluorescencia se analizaron con un programa diseñado e implementado por el Dr. David Moratal, del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tissular de la Universitat Politècnica de València, mediante el software informático MATLAB R2009a (The MathWorks, Natick, EE.UU.). Dicho programa transformaba la composición en una imagen en escala de grises de 8 bits y solicitaba al usuario introducir el valor de la barra de escala ($\mu\text{m}/\text{píxel}$) y el diámetro del conducto (μm), así como trazar manualmente el inicio del conducto, su final y el centro de este a lo largo de toda su extensión. Con estos datos, el programa delimitó los límites del lumen ($\text{centro} \pm \text{diámetro del conducto}/2$) y midió, para cada columna de píxeles de la imagen (eje Y, altura), el valor de intensidad de gris (0 - 256) de cada uno de los puntos comprendidos entre los límites del lumen.

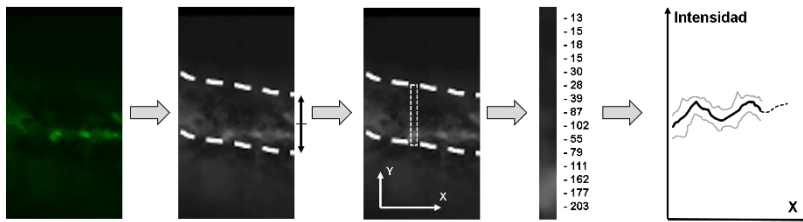


Figura 21. Ejemplo de las etapas del análisis informático de un segmento de vaina de SC. De izquierda a derecha, imagen original, transformación a escala de grises y demarcación de límites del conducto, descomposición en columnas de píxeles, asignación de valores de intensidad de gris y representación del valor medio (negro) \pm desviación estándar (gris).

Por último, se calculó el valor promedio de intensidad de gris de cada columna y la desviación estándar, se normalizó cada uno de estos valores con respecto al mínimo y máximo valor de toda la composición de imágenes (considerados como 0 y 1, respectivamente) y se representó dichos valores promedio normalizados y sus desviaciones estándar para cada unidad de longitud del conducto (eje X, anchura) respecto del origen arbitrario (ver Figura 21).



6. Cocultivos neuronales

Puesto que el objetivo principal de los conductos acanalados porosos de HA entrecruzado es el de servir como un potencial dispositivo implantable para la regeneración de tractos neurales dañados o degenerados, la última parte del desarrollo y caracterización de dichos conductos debe comprender el uso de neuronas o precursores de estas para determinar cómo se comportan en el interior de los conductos. También parece útil estudiar la aplicación de la vaina de SC que se ha descrito en el anterior capítulo como sustrato de apoyo para la regeneración de axones.

En primer lugar, y como etapa decisiva para defender que los conductos oHA5L presentaban las mismas características que sus equivalentes los HA5L (y evitar, así, tener que repetir todos los ensayos con ellos), se planteó un cocultivo de SC con células neuronales. Las seleccionadas para este caso fueron neuronas extraídas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de embriones de rata Sprague/Dawley de 18 días (E18) y posteriormente purificadas (Innoprot). Tras descongelarlas, se cultivaron durante 5 días en frascos de cultivo de 75 cm² a 37 °C y 5% de CO₂ con medio compuesto por DMEM/F12 (Life Technologies) con 30% w/v D-glucosa (Sigma-Aldrich), 7.3% w/v NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), HEPES 1M (Sigma-Aldrich), L-glutamina 0.5mM (Lonza), 1% v/v P/E, apo-transferrina 0.8 g/l (Sigma-Aldrich), insulina 0.2 g/l (Sigma-Aldrich), putrescina 0.9mM (Sigma-Aldrich), progesterona 160nM (Sigma-Aldrich) y selenito de sodio 240nM (Sigma-Aldrich). Aunque estas células tienen una baja capacidad de proliferación, sí son capaces de migrar y requerían, además, un periodo de acondicionamiento antes de poder sembrarlas.

El primer paso fue sembrar y cultivar durante 11 días SC en el lumen de conductos HA5L tal y como se ha detallado en el punto 4. *Cultivo de células de Schwann* de este capítulo y como se ha procedido para la mayor parte de los experimentos de ese y el siguiente punto. Una vez formada la vaina de SC en el lumen de 3 conductos HA5L, se trató las neuronas DRG con tripsina-EDTA para despegar las células del frasco y se centrifugaron a 1200 rpm durante 2 min. Se retiró mientras tanto el *Schwann Cell Medium* de cultivo de las SC para evitar un exceso de líquido en el conducto y se resuspendió las neuronas en un medio de estimulación neuronal basado en sugerencias de la bibliografía, compuesto de Neurobasal Medium (Invitrogen, Waltham, EE.UU.) con 2% v/v suplemento B-27 (Invitrogen), 1% v/v P/S, L-glutamina 0.5mM, D-glucosa 2 g/l, NGF 2.5S 10 ng/ml (Life Technologies) y 10% v/v FBS. Acto seguido, y manteniendo el conducto fuera del medio pero sin llegar a deshidratarse en exceso, se sembró las neuronas DRG (10⁴ células/conducto) en el interior del lumen con una micropipeta. En este caso



no se pudo guiar la siembra mediante la jeringuilla Hamilton como se hizo con las SC, ya que ello habría supuesto rozar la aguja de la jeringuilla con la vaina de las SC y, con toda probabilidad, destruir su estructura.

Las células se cocultivaron con el medio de estimulación neuronal durante 14 días, tras lo cual se fijaron con formaldehído del mismo modo que se hizo en otros experimentos con cultivos únicamente de SC. Una vez fijadas, se sometió las células a un tratamiento inmunocitoquímico. Como el protocolo es idéntico a los mismos tratamientos llevados a cabo en 5.2. *Fenotipo y morfología de las SC*, tan solo se facilita la información de los anticuerpos usados y su concentración. Como anticuerpos primarios se usó Rb anti-GFAP 1:250 v/v y Ms anti-Tuj1 (origen murino, Abcam) y como secundarios Gt anti-Rb Alexa Fluor 555 y Gt anti-Ms Alexa Fluor 647(origen caprino ambos, Abcam). El Ms anti-Tuj1, en realidad, es un anticuerpo que revela β III tubulinas, un componente específico de los microtúbulos del citoesqueleto de las neuronas, pero es bastante frecuente que este haya sido extraído a partir del clon celular de código TUJ-1 y de ahí que se le denomine así con frecuencia. Las células fueron, por último, teñidas con falacidina y DAPI y fotografiadas mediante el CLSM DMi8 tras cortar longitudinalmente los conductos.

Por otro lado, la Dra. Victoria Moreno, del Laboratorio de Regeneración Tisular y Neuronal del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, cedió amablemente un número suficiente de explantes completos de ganglios de la raíz dorsal (eDRG) de ratas Sprague/Dawley postnatales de 5 días (P5) como para poder realizar un ensayo que permitiese determinar el efecto tanto de las fibras de PLLA en las muestras HA5L-PLLA como de la vaina de SC en el lumen de cualquiera de los conductos. Para ello, se cultivó conductos de cada tipo (HA5L y HA5L-PLLA) con SC durante 11 días a 37 °C y 5% CO₂ con medio *Schwann Cell Medium* para obtener la vaina de SC en el interior de estos. Una vez se disponía de las SC precultivadas, se dispuso un eDRG en uno de los extremos de cada tipo de conducto, incluyendo conductos HA5L y HA5L-PLLA sin SC precultivadas. Para este ensayo, se usó 2 conductos de cada tipo, salvo para los conductos de HA5L y HA5L-PLLA con vaina de SC, donde se usó 4 de ellos. Tras 14 días de cocultivo de SC con eDRG, las células se fijaron con formaldehído o, en el caso de 2 de los conductos HA5L y HA5L-PLLA con vaina de SC, con glutaraldehído, como se hizo en anteriores apartados para tratamiento de muestras para SEM.

Las células destinadas para CLSM se trataron mediante una inmunocitoquímica igual que el cocultivo de SC con neuronas DRG (ver el experimento previo con conductos oHA5L), salvo la tinción con falacidina, que no fue posible puesto que las células de los eDRG expresaban una



proteína constitutiva con un fluoróforo verde asociado porque las ratas de las que se extrajeron habían sido transfectadas mediante la secuencia transgénica SD-Tg(UBC-EGFP)2BaIRrrc, y la máxima intensidad de emisión de dicho fluoróforo tenía lugar a una longitud de onda muy similar a la de la falotoxina. Los conductos se seccionaron longitudinalmente con mucho cuidado y tratando de que el explante (y las fibras de PLLA, en su caso) quedasen por completo en uno de las dos mitades y se fotografiaron con el microscopio confocal DMI8.

De modo paralelo a los cocultivos, y para aportar valor añadido a la estrategia de los conductos junto con las fibras y la vaina de SC en su interior, se llevó a cabo tres ensayos considerados preclínicos para justificar la bioseguridad de los dispositivos implantables, de cara a las siguientes etapas de evaluación, como la experimentación en modelos animales.

Para el primero de los ensayos, se planteó usar un ensayo de viabilidad celular *in vitro* para productos sanitarios siguiendo los pasos recomendados por la norma ISO 10993-5, de modo similar a como se hizo en el ensayo de análisis de los residuos de degradación en el apartado 4.1. *Viabilidad y proliferación celular en el lumen del conducto*, pero con mayor rigurosidad para que el resultado sea contrastable con los parámetros de la norma.

Se decidió usar para dicho ensayo fibroblastos de ratón de la línea celular inmortalizada L929 (Sigma-Aldrich) extraídos de tumores C3H/An. Se descongelaron y cultivaron hasta alcanzar el quinto pase celular a 37 °C y 5% CO₂ con medio DMEM 4.5 g/l glucose (Life Technologies) suplementado con 10% v/v de FBS y 1% v/v de P/S. El mismo medio se utilizó para obtener extractos de conductos HA5L y HA5L-PLLA, de polietileno de alta densidad (Goodfellow, Huntingdon, Reino Unido) y de látex, dejando a 37 °C dicho medio en contacto con cada uno de los materiales durante 24 h. El polietileno de alta densidad se recomienda como control positivo (Ctrl +) por ser biocompatible y por promover la adhesión de muchos tipos celulares. El látex, como ya se ha explicado, tiene el efecto opuesto y, aun por contacto indirecto, produce graves alteraciones en el metabolismo de las células que provocan una disminución importante en la viabilidad de estas (Ctrl -). Los fibroblastos se sembraron en una placa de cultivo de 96 pocillos a 10⁴ células/pocillo (3 pocillos por condición y tiempo) y se cultivaron durante 24 h con medio de cultivo sin extracto para acondicionarlas. Transcurrido este tiempo, se sustituyó el medio por medio de cultivo con extracto de alguno de los materiales y se cultivó de nuevo las células durante otras 24, 48 y 72 h. Para evaluar la viabilidad de cada una de las muestras con cada medio de cultivo y a cada tiempo, se utilizó el protocolo descrito por el proveedor del kit de proliferación celular MTT (Roche, Basilea, Suiza). Brevemente, se



preparó la disolución sugerida por el fabricante de MTT en DMEM sin rojo fenol y se sustituyó por el medio de cultivo una vez cumplidos los tiempos. Es importante retirar adecuadamente el medio de cultivo para evitar que los colorantes que lleva (rojo fenol) interfiera en la medida colorimétrica. Se dejó incubar (37 °C) durante 2.5 h y se añadió el mismo volumen de isopropanol que de disolución de MTT en DMEM sin rojo fenol para facilitar la disolución del producto coloreado que se forma. Se disolvió dejando la placa 5 min en un agitador de placas y, luego, se midió directamente la absorbancia del medio de cada pocillo a 570 nm con el espectrofotómetro VICTOR³ 1420. Para la representación de los datos de viabilidad, los valores de absorbancia (o densidad óptica, como así lo llama la norma) se normalizan dividiéndolos entre el dato de absorbancia promedio del Ctrl + para cada tiempo de estudio y se expresan como tanto por ciento. De cara al análisis, se considera que el extracto de medio de cultivo presenta citotoxicidad si a las 72 h la absorbancia relativa correspondiente es inferior al 70%.

También se realizó un ensayo de detección de aberraciones cromosómicas, también conocido como test de micronúcleo, que permite determinar si una sustancia o material en contacto con células induce en éstas defectos cromosómicos que produzcan errores durante la mitosis, con la consecuente formación de estructuras en el interior de la célula compuestas por material genético aislado, como si fuera un núcleo pero más pequeño y sin función metabólica ninguna. Se siguió el procedimiento recomendado por la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. para este fin [187].

Por último, se encargó a la empresa Dynamimed (Madrid, España) el análisis de endotoxinas presentes en los conductos HA5L, para extrapolar si los niveles de estas podrían inducir una respuesta pirogénica al implantarse los conductos en un organismo. Puesto que este análisis es el más riguroso y estricto de todos, se modificó el protocolo de síntesis de los conductos HA5L que se facilitaron al laboratorio de análisis, incluyendo medidas de tipo GMP (de buenas prácticas de fabricación) como usar disolventes previamente filtrados con filtros de 0.22 µm de luz de malla, realizar las mezclas y la inyección en el interior de cabinas de flujo laminar sanitizadas o limpiar los útiles y las superficies con una disolución de NaOH 2M y después con etanol 100° previamente a comenzar a trabajar. De acuerdo con el informe facilitado, el ensayo en concreto que se llevó a cabo está basado en el documento publicado en 1987 por la *Food and Drug Administration* estadounidense, de título “*Guideline on Validation of the Limulus ameocyte Lysate Test (L.A.L.) as an End-product Endotoxin Test for human and animal parenteral drugs, biological products and medical devices*”.



7. Tratamiento estadístico

Muchos de los experimentos llevados a cabo no requerían ningún tipo de análisis posterior porque las propias imágenes o datos obtenidos tenían significancia por sí mismos o bien porque los grupos tenían obvias diferencias entre sí. Otros, en cambio, requerían cierto tratamiento matemático o el cálculo de un gran volumen de datos, por lo que para poder establecer comparaciones entre sí se debían tratar los resultados con herramientas estadísticas.

En la Tabla 4 se resumen todos los análisis estadísticos que se han realizado en cada uno de los experimentos que así lo han requerido, marcando con una X cuándo los datos fueron sometidos a una de las pruebas, con el fin de facilitar la comprensión del lector.

Las abreviaturas usadas para cada uno de los análisis estadísticos, con sus correspondientes características y parámetros introducidos, son las siguientes:

- **Reg L-MC:** Ajuste de datos a expresión matemática por regresión lineal por mínimos cuadrados convencionales. También implicaba el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson o el coeficiente de determinación, en su caso.
- **Reg nL-LM:** Ajuste de datos a expresión matemática por regresión no lineal con el algoritmo de cálculo de Levenberg-Marquardt y valores de inicialización adecuados.
- **Histogr:** Representación en histograma de la distribución de los datos en N clases según la frecuencia de cada clase.
- **N(m,s):** Ajuste de los datos a una distribución normal de media m y desviación estándar s . La bondad de dicho ajuste se determinó calculando la curtosis y la asimetría de la distribución muestral. Se consideraron datos normales si ambas se encuentran en el rango $[-2,2]$.
- **ANOVA:** Análisis de la varianza para determinar si la varianza intragrupos es significativamente menor que la varianza entre grupos, dados unos factores que pueden generar diferencias en la respuesta. Se determinó de acuerdo a un test F de Fisher para un intervalo de confianza del 95%.
- **Tukey HSD:** Test de comparación de medias muestrales de Tukey de la *diferencia significativa honesta*, para determinar de manera simultánea si dos o más grupos tienen diferencias significativas. Se calculó para un intervalo de confianza del 95%, aunque requiere un análisis previo que determine que las varianzas de cada grupo no son diferentes entre sí.
- **2T Pares:** Test de contraste de medias muestrales mediante la comparación de un par de muestras con un test T de Student de dos colas, usado solo



cuando no se cumplía la condición de igualdad en las varianzas de los grupos. Requería $N!/[2!(N-2)!]$ contrastes para N grupos y las diferencias significativas se definieron para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 4. Resumen de los análisis estadísticos realizados en los diferentes experimentos llevados a cabo en el presente documento de tesis doctoral. Ver más arriba para descripción de las abreviaturas usadas para describir los experimentos.

	Reg L-MC	Reg nL-LM	Histogr	N(m,s)	ANOVA	Tukey HSD	2T Pares
1.1. Cinética de reacción	X	X					
2.2. Contaje de poros				X			
2.2. Porosidad tricapa			X				
2.2. Ángulo de contacto							
2.2. Hidrofilicidad – diámetro poro	X						
2.3. Densidad				X			
2.3. Porosidad				X			
2.4. Módulo mecánico	X			X			
3.1. Ratio de hinchado				X			
3.2. Contenido de agua				X			
3.2. Coeficiente cinético hinchado	X						
3.3. Difusión molecular				X			
3.3. Coeficiente de difusión		X					
3.4. Degradación enzimática				X			
4.1. Biocompatibilidad conductos					X	X	
4.1. Citotoxicidad de residuos					X	X	
4.1. Proliferación de SC					X	X	X





CAPÍTULO III
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN
DE LOS CONDUCTOS





1. Resumen

En este capítulo se recogen todos aquellos resultados que tienen como fin evaluar el grado de éxito a la hora de generar conductos acanalados como los que se describen en los objetivos del presente documento, así como analizar su aspecto, su morfología y su comportamiento ante factores mecánicos, físicos o bioquímicos.

Se engloban aquí, por tanto, tantos los datos obtenidos en los experimentos que estudiaban la reacción de síntesis de los conductos y su cinética como aquellos obtenidos durante la caracterización de estos para determinar qué factores influyen en el comportamiento del biomaterial (concentración de HA en la mezcla madre y sistema de secado tras la gelificación) y de qué manera lo hacen. Entre estos experimentos de caracterización se encuentran el análisis morfológico macroscópico, la cuantificación de la porosidad tricapa, el análisis químico de la estructura tridimensional del conducto, la respuesta de este ante estímulos mecánicos, la variación en sus direcciones principales y la captación de agua durante el hinchado, la difusión de moléculas modelo a través de la pared del conducto y su degradación enzimática.

Para obtener más información acerca de los procedimientos que han dado lugar a los siguientes resultados, se pueden consultar los apartados 1 a 3 del *Capítulo II: Materiales y métodos*.





2. Resultados y discusión

2.1. Reacción de entrecruzamiento HA – DVS

El primer experimento llevado a cabo fue el de la determinación de los parámetros cinéticos de la reacción de HA y DVS mediante calorimetría diferencial de barrido, para poder obtener más información acerca de dicho proceso. La Figura 22 recoge los datos obtenidos mediante DSC de muestras de mezcla madre al 5% dejadas reaccionar a 298, 300.5, 303, 305.5 y 308K. Puesto que se trata de calorimetría diferencial, el sistema más común de representación no incluye numeración en el eje de ordenadas, sino un patrón de escala con un valor de referencia (0.05 W/g) en este caso y un vector que indique el sentido del calor desde la fuente hacia la muestra, en este caso como referencia a la dirección de crecimiento ante un fenómeno exotérmico (*exo*).

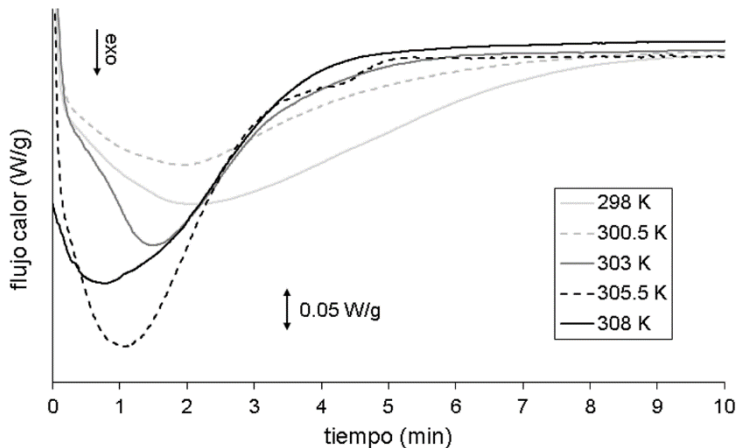


Figura 22. Termogramas de DSC de las muestras de mezcla madre al 5% de HA durante la reacción de entrecruzamiento isoterma a 298, 300.5, 303, 305.5 y 308 K.

Como se puede deducir de las curvas abombadas hacia abajo, la reacción de entrecruzamiento del HA con el DVS fue un suceso espontáneo (exotérmico) a las temperaturas de estudio, precisamente porque gracias al medio alcalino ($\text{pH} > 12$) los grupos vinilo de la DVS se encontraban activados. Aunque se tomó datos de flujo de calor hasta los 40 min, la reacción ya había alcanzado un equilibrio hacia los 10 min para todas las temperaturas, ya que no se ven variaciones importantes y las curvas parecen planas para ese dato. Además, se nota que el tiempo que se tarda en alcanzar el mínimo valor de las curvas es inversamente dependiente de la temperatura de reacción, lo cual tiene sentido teniendo en cuenta que a

mayor temperatura, la mayoría de las reacciones químicas aumentan su velocidad por lo que se alcanzan antes las mayores tasas de reacción.

Puesto que se sospechaba que los dobles enlaces de los grupos vinilo de la DVS podían reaccionar entre ellos en las mismas condiciones en las que el HA se asocia al DVS, se procedió a analizar los resultados de repetir el análisis por DSC a 308 K, pero esta vez con una disolución de DVS en NaOH 0.2M en la misma proporción que las mezclas madre preparadas al 5%, mostrados en la Figura 23.

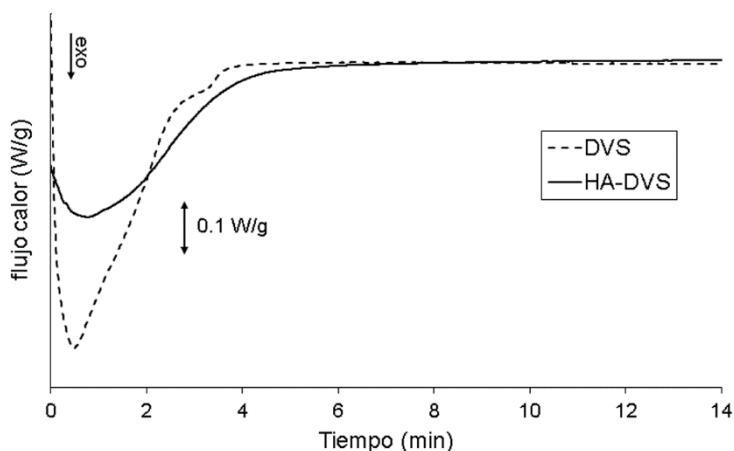


Figura 23. Termogramas de DSC de mezcla madre al 5% de HA (HA-DVS) y de una disolución de DVS en NaOH con la misma proporción de DVS que la mezcla madre, ambas durante su reacción de entrecruzamiento o polimerización isoterma a 308 K.

Como era de prever, la DVS activada era capaz de reaccionar consigo misma a 308 K y a pH suficientemente alto, hecho que se desprende de la llamativa cantidad de calor que el calorímetro tuvo que extraer para mantener el sistema isoterma (línea discontinua de la Figura 23). Es más, la energía liberada durante la reacción DVS-DVS era casi el doble en magnitud que la registrada en la muestra de mezcla madre al 5% (denominada HA-DVS en la figura), aunque ambas mezclas parecen alcanzar el equilibrio en torno a los 5 min.

Esto no quiere decir que solo se produzcan enlaces entre moléculas de DVS aunque haya presencia de cadenas de HA sin entrecruzarse, ya que eso supondría que el calor liberado por la muestra HA-DVS habría sido mayor (el área bajo la curva de la muestra DVS es mayor que la HA-DVS en la Figura 23, para proporciones equivalentes) y el resultado habrían sido partículas blancas en suspensión en lugar de un gel translúcido, que es lo que se observó que se producía. Lo que sí supone es que existe una alta



probabilidad de que la DVS esté reaccionando indistintamente con el HA a través del grupo metilol y con otras moléculas de DVS, lo que formaría una red tridimensional entrecruzada más aleatoria y quizá con ramificaciones no entrecruzadas. Puesto que no se dispone de información acerca de la energía liberada durante la formación de un enlace entre el HA y la DVS, no es posible obtener una estimación de la proporción de enlaces HA-DVS y DVS-DVS que se forman durante la reacción de la mezcla madre al 5%.

De todos modos, ya se ha explicado que el inconveniente de la reacción paralela de la DVS consigo misma no supone un obstáculo para determinar la cinética de reacción del producto conjunto, que es al fin y al cabo el biomaterial que se quiere obtener y estudiar.

Mediante la transformación de los datos de flujo de calor a energía y estos a su vez a conversión, se pudo realizar el ajuste de regresión lineal convencional y el procedimiento de aproximación mediante rectas de isoconversión para obtener los parámetros de la ecuación, de modo que que estos se ajustasen razonablemente bien a los datos experimentales. Ambos ensayos ofrecieron índices de bondad de ajuste bastante satisfactorios pero, como ya se ha justificado en el apartado 1.1. *Modelado de la cinética de reacción* del Capítulo II, los parámetros obtenidos de este modo solo podían usarse como valores de estimación.

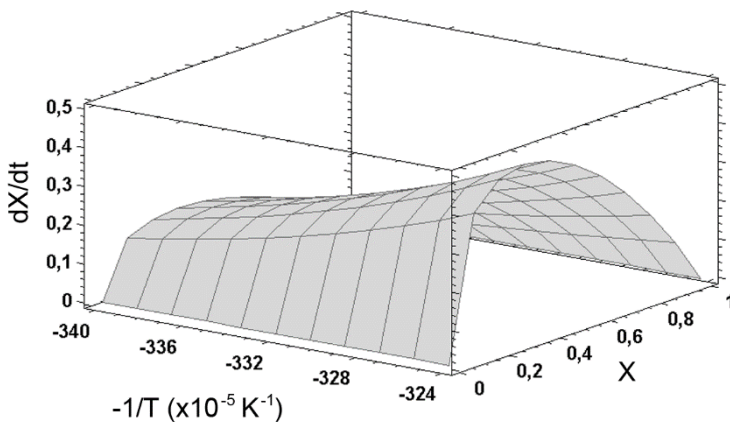


Figura 24. Curva de respuesta de las dos variables de entrada (X , $-1/T$) y la variable de salida (dX/dt) obtenida por el software Statgraphics tras optimizar los parámetros de la ecuación 3 mediante una regresión no lineal calculada con el algoritmo de Levenberg-Marquardt.

Dichos estimadores (listados como “Estimación (input)” en la Tabla 5) se introdujeron en el programa Statgraphics para que calculase los parámetros óptimos que minimizaban el error de la función mediante un ajuste de regresión no lineal con el método de Levenberg-Marquardt (Figura 24). Los



valores optimizados de cada parámetro, para los cuales el programa calculó un coeficiente de determinación de $R^2 = 96.955\%$, se muestran en la Tabla 5 como *Modelo (output)*. En el caso de los estimadores, no se muestran sus desviaciones estándar porque carece de sentido, ya que no son valores considerados precisos en ningún momento. En cuanto a los parámetros óptimos del modelo, no se muestra tampoco su error estadístico pero en este caso porque la gran cantidad de datos disponibles (más de 5600 grados de libertad del sistema) provocaron que el error de cálculo fuese muy inferior a cada variable, por lo que sería engorroso tabularlo. Sirva de ejemplo la desviación estándar más grande de todas, en el caso del orden n de reacción, donde aun así el valor es de 2.07×10^{-3} . Cabe volver a recordar que el valor de la energía de activación carece en este caso de equivalencia física por existir evidencias de que puede ser un promedio de más de una reacción química en paralelo.

Tabla 5. Parámetros de estimación obtenidos mediante regresión lineal ordinaria (n, m, Z) y el método de la aproximación isoconversional de Flynn (E_a) y como resultado de la regresión no lineal calculada con el algoritmo de Levenberg-Marquardt.

Tipo de parámetro	n	m	Z ($\times 10^8$)	E_a (kJ/mol)
Estimación (<i>input</i>)	0.780	0.217	1.035	59.161
Modelo (<i>output</i>)	0.928	0.397	2.149	49.194

El paso siguiente fue contrastar los datos de conversión frente al tiempo que se obtuvo transformando los datos de la Figura 22 con las curvas obtenidas sustituyendo los coeficientes optimizados del modelo en la solución a la ecuación 3 (que relaciona X con t). Puesto que los modelos que consideran reacciones autocatalíticas tienen el defecto de que no son calculables en los instantes iniciales ($t \approx 0$), se aplicó la transformación sugerida por Flynn (ver la ecuación 14 de la referencia [172]), utilizando un valor suficientemente pequeño ($X_{t=0} = 10^{-5} \ll 1$) como si fuese la conversión a tiempo inicial.

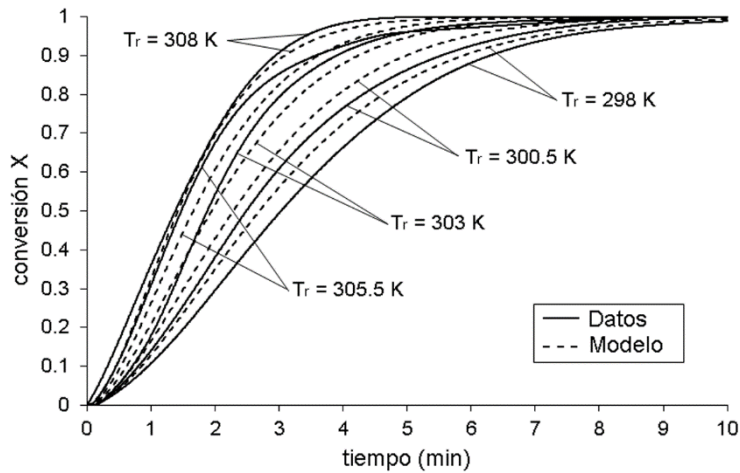


Figura 25. Conversión de la reacción de entrecruzamiento de HA-DVS a lo largo del tiempo a 298, 300.5, 303, 305.5 y 308 K calculada a partir de los datos de la Figura 22. Las líneas de puntos representan las curvas obtenidas para la conversión frente al tiempo resolviendo la ecuación 3 y con los parámetros de la Tabla 5.

La Figura 25 muestra la representación gráfica tanto de los datos de conversión como de los valores calculados mediante el modelo para todas las temperaturas ensayadas. Aunque existe un leve grado de discrepancia entre las curvas experimentales (*Datos*) y las obtenidas a partir de la ecuación matemática (*Modelo*) para cada temperatura, que probablemente podría compensarse si se supiese más acerca de las reacciones que tienen lugar, es evidente que las curvas Modelo permiten realizar extrapolaciones robustas y precisas de indicadores como el tiempo que requiere cada condición para alcanzar el equilibrio aparente.

Ahora bien, la bondad de ajuste de un modelo nunca debe obtenerse comparando la función matemática obtenida con los datos usados para obtener dicho modelo, sino que deben obtenerse datos nuevos, preferiblemente en condiciones algo diferentes y con procedimientos o equipos también distintos en la medida de lo posible. Por ello se realizó el experimento de contraste de modelo (Figura 26) que comparó los resultados obtenidos matemáticamente con la conversión calculada a partir de las concentraciones de reactivo.

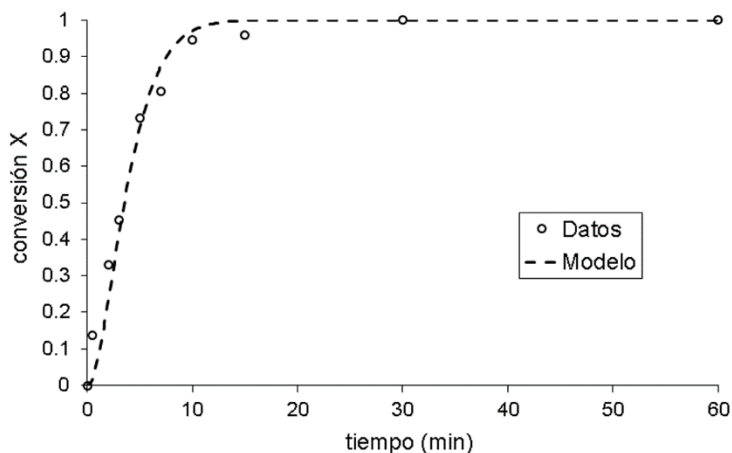


Figura 26. Conversión de la reacción de entrecruzamiento HA-DVS de acuerdo al método del carbazol para cuantificación de HA. Los datos calculados a partir del modelo propuesto para la temperatura de reacción, de 21.5 °C, se representan mediante la línea discontinua.

En ella, la conversión graficada como *Datos* se refiere a la máxima cantidad de HA transformada en HA entrecruzado, no a la cantidad de HA introducida originalmente (ya que entonces se obtendrían valores de conversión inferiores a 1 y el modelo no sería comparable). En este caso, los puntos de la serie *Datos* también parecen ajustarse bastante bien a la curva discontinua definida mediante la expresión matemática del modelo (*Modelo*), a pesar de que las condiciones de temperatura eran inferiores a los límites usados para construir el modelo.

En cualquier caso, se calculó la varianza residual de los puntos experimentales con respecto al modelo para obtener un parámetro objetivo de la bondad de ajuste. Gracias a la varianza residual se pudo calcular el coeficiente de determinación, que en este caso resultó ser $R^2 = 97.59\%$. Esto significa que el modelo era capaz de explicar más del 95% de la variabilidad que afecta a las medidas experimentales de la conversión, de modo que aunque el modelo no fuera perfecto, mostró ser tremendamente útil a efectos predictivos. Esto ayudó, entre otras cosas, a determinar que el tiempo de gelificación requerido para lograr alcanzar el 99% de la reacción de entrecruzamiento posible entre el HA y la DVS entre 20 y 25 °C (temperatura ambiente) es de al menos 11 min, lo que sería muy provechoso a la hora de planificar la síntesis de los conductos planteados en los objetivos.

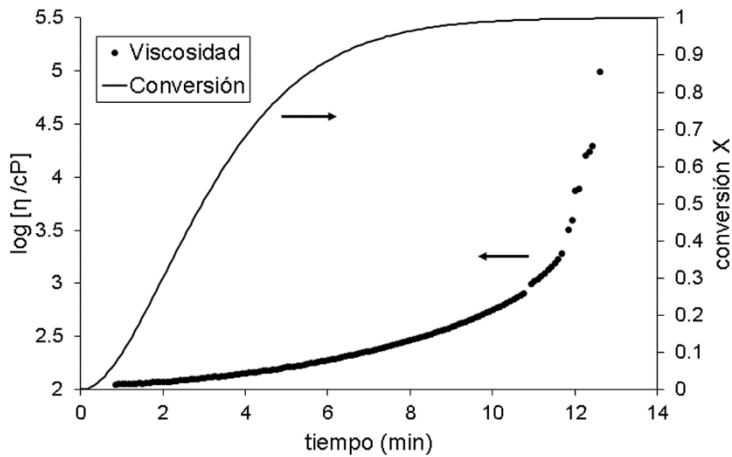


Figura 27. Logaritmo neperiano de la viscosidad dinámica de la mezcla madre al 5% y conversión según modelo de la reacción de entrecruzamiento a lo largo del tiempo. La temperatura de reacción registrada durante la viscosimetría fue de 24.3 °C.

Gracias también a dicho modelo se pudo comparar el grado de avance de las reacciones químicas que tienen lugar en el sistema de la mezcla madre al 5% (HA-DVS, DVS-DVS y cualquier otra no predicha) con la viscosidad del fluido durante dicha gelificación, magnitud que se midió mediante el ensayo de viscosimetría isoterma ya explicado con anterioridad y cuyos resultados se plasman en la Figura 27. Es importante observar que los datos de viscosidad (η , en cP) se presentan en realidad transformados como $\log[\eta]$ debido a que de otro modo no era posible ver la evolución inicial a causa del súbito y acusado aumento en la viscosidad a partir de los 11 – 12 min. También cabe destacar que los puntos que generan varias discontinuidades (sobre todo a partir de los 11 min) se deben a que eventualmente se debió cambiar la velocidad de rotación del vástago para evitar que los valores de viscosidad se saliesen de escala, lo que producía inestabilidad en los datos durante unos 10 - 15 segundos.

Como se aprecia, durante los primeros minutos la viscosidad apenas aumenta un orden de magnitud (de unos 200 hasta los 1000 cP aproximadamente), pero a partir de cierto punto la viscosidad se dispara alcanzando los 100000 cP, último valor registrable antes de que el instrumento diera error por haberse formado el gel por completo. Esto supone que no es sino cuando se han formado prácticamente el 96% de los enlaces cuando se forma de manera efectiva el gel. Puesto que en los polímeros la viscosidad está inherentemente ligada al peso molecular de las cadenas lineales o, en este caso, al número de nudos formados en una red tridimensional entrecruzada, se podría inferir que las moléculas de DVS activadas en presencia de largas cadenas de HA prefieren asociarse entre sí



(enlaces DVS-DVS) o de manera individual a los grupos libres de las cadenas de HA (enlaces DVS-HA) y que, solo cuando ya no existe tanta disponibilidad espacial de más grupos de este tipo, los dobles enlaces de las moléculas de DVS ya asociadas a una cadena de HA atacan a grupos metilol libres del HA, generando enlaces HA-DVS-HA que limitan mucho la movilidad de las cadenas de polímero.

También es cierto que en polímeros muy viscosos, especialmente en aquellas reacciones donde se produce un curado, se ha descrito [188] que se dan 4 fases transitorias de reacción diferentes y que en las dos últimas el avance de la reacción queda condicionado a la difusión de los reactivos a través de la fase pseudosólida, lo que acaba produciendo que se detenga la reacción por completo aun antes de que la conversión total de reacción esté completa. Ahora bien, ni se tienen datos suficientes de los mecanismos de reacción de entrecruzamiento HA-DVS ni es sencillo obtener algunos de los parámetros que requieren este tipo de modelos, como la temperatura de transición vítrea del HA gelificado [178]. Como además en la Figura 27 se puede observar que, cuando la viscosidad aumenta considerablemente, la conversión hace 3 o 4 min que está por encima del 90%, es posible que este efecto se pueda despreciar en este caso sin que ello afecte en gran medida al error cometido asumiendo que el modelo obtenido es viable.

2.2. Caracterización de los conductos acanalados porosos

En primer lugar se analizó el aspecto general que presentaban cada uno de los tipos de conductos sintetizados variando los diferentes factores de estudio, tanto después de proceder a su secado como hidratados durante más de 2 h en agua destilada. También se observó la apariencia macroscópica de algunas variantes como los conductos HA5L con fibras de PLLA en su interior (serie HA5L-PLLA), los HA5L de más de 2 cm con el canal interno teñido o los conductos cilíndricos oHA5L.

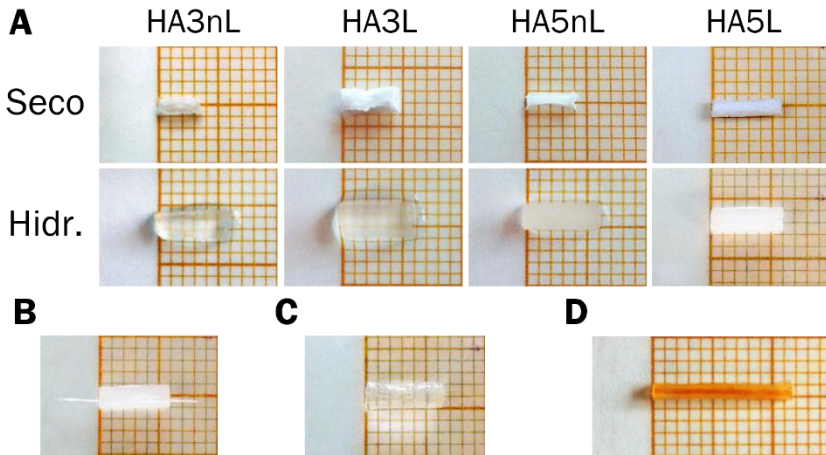


Figura 28. Apariencia de los conductos de ácido hialurónico entrecruzado con diferentes parámetros de síntesis y postprocesado (A), tanto totalmente secos como tras haber sido hidratados (Hidr.). Conducto de la serie HA5L-PLLA parcialmente hidratado, con las fibras de PLLA en su interior (B). Conducto de la serie oHA5L parcialmente hidratado (C). Conducto HA5L de más de 2 cm de longitud con el canal interno destacado con rojo picosirio (D). Cada cuadrado del papel milimetrado usado como fondo tiene un área de 1 mm^2 .

Como se puede apreciar en la Figura 28, todos los conductos de sección cuadrada obtenidos fueron blancos, opacos y de aspecto esponjoso tras su etapa de secado. Sin embargo, al hidratarse los conductos captaron una gran cantidad de agua, por lo que su aspecto cambió considerablemente, volviéndose más transparentes. Aunque en seco no se observó diferencias considerables entre los diferentes materiales, sí se pudo apreciar que tras captar agua, los conductos producidos a partir de mezcla madre al 3% (HA3nL y HA3L) eran sutilmente más transparentes que los otros, lo que vendría a estar justificado por el hecho de que tendrían una cantidad de HA menor en proporción durante el proceso de síntesis, lo que formaría una estructura menos densa y compacta. También se identificaron diferencias debidas al hinchado para cada una de las condiciones ensayadas, pero dichas diferencias se estudiaron con parámetros más objetivos durante los experimentos descritos en el apartado 3.1. *Variación dimensional durante el hinchado* del Capítulo II, cuyos resultados se presentan más adelante. En la Figura 28B se puede apreciar que la introducción de las fibras de PLLA para formar los conductos HA5L-PLLA no altera apreciablemente el aspecto de los conductos HA5L. A pesar de ser 20 fibras de PLLA, estas apenas son distinguibles en ambos extremos del conducto HA5L-PLLA porque el diámetro de estas es muy pequeño y todas ellas caben holgadamente en el lumen.

Los conductos cilíndricos (oHA5L) también presentaban un aspecto algo más transparente, a pesar de tener la misma composición y haber sido procesados de igual modo que los conductos HA5L. Esto se debe a que las dimensiones del molde usado para su fabricación eran diferentes, por lo que la pared de los conductos oHA5L era más fina. También se apreciaba que dichos conductos eran algo más estrechos que el resto aun en estado hinchado, pero de nuevo cabe recordar que el diámetro de los surcos del molde donde se produjeron era más pequeño que los de los moldes con surcos de sección cuadrada.

La Figura 28D sirve para ilustrar por una parte que mediante los moldes de PTFE de sección cuadrada y el proceso de síntesis descrito anteriormente es posible obtener conductos de longitud algo superior a 2 cm. También permite discernir claramente cómo la solución de rojo picosirio quedó retenida en el lumen del conducto, tiñendo ligeramente la pared de este de amarillo, lo que sirve prueba de que el conducto es efectivamente hueco y que el canal es pasante de extremo a extremo.

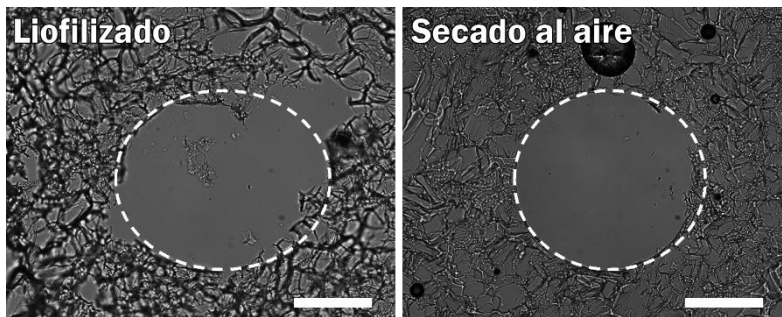


Figura 29. Imagen de microscopía de alto contraste de un corte transversal de conductos HA5L y HA5nL hidratados (izquierda y derecha, respectivamente). La línea discontinua define el contorno del hueco interno. Barra de escala: 200 μ m.

También se puede observar con detalle la forma circular del orificio interno en la Figura 29, de donde se puede deducir que en condiciones de hinchado el lumen tiene dimensiones similares a las que tenían los vástagos de PCL usados como contramolde para formar el hueco pasante (algo más de 400 μ m). Como se puede ver, además, la estructura tridimensional de la pared de los conductos depende del sistema de secado usado durante el postprocesado: la liofilización genera una matriz esponjosa con poros interconectados (recordar la explicación de la Figura 14) donde las trabéculas de las celdillas porosas están formadas por cadenas de HA compactas, mientras que si tras la congelación el gel de HA entrecruzado formado se deja secar al aire, la matriz porosa colapsa. Esto resulta en una estructura tridimensional difusa e irregular donde las cadenas de HA entrecruzado no forman una red tan densa (no se aprecian trabéculas



oscuras en la Figura 29 derecha), si bien es capaz de autosoportarse y mantener la forma aún después de extraer los conductos del molde.

Las micrografías de SEM permitieron apreciar con mucho mayor detalle las diferencias de forma y estructura que existían entre las muestras liofilizadas y sin liofilizar, si bien es cierto que las dimensiones de los conductos son algo inferiores porque el SEM requiere que las muestras estén completamente deshidratadas, lo que provoca una ligera contracción.

De la Figura 30A, así como de su detalle A', se valida que, aunque los conductos no liofilizados conservaban la forma esencial a la que se quería llegar mediante el uso de los moldes (conducto de sección cuadrada con canal interno pasante), la pared interna parece haber cedido parcialmente durante el secado, dando lugar a una topografía muy rugosa y densa (Figura 30A'). Además, los cortes transversales se tuvieron que hacer finalmente con fractura frágil en frío (-80 °C) porque si se intentaban realizar cortes con una cuchilla, la estructura interna se colapsaba y tan solo era distinguible una capa continua totalmente maciza.

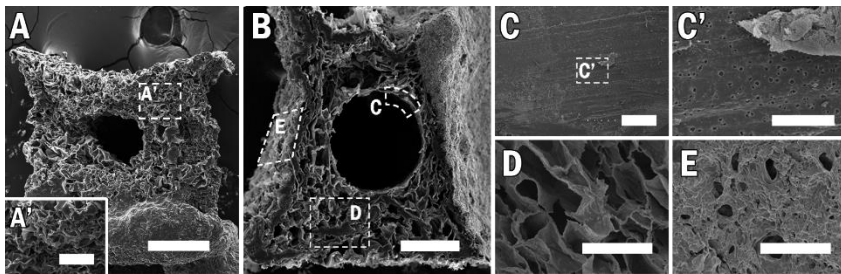


Figura 30. Micrografías de SEM de cortes transversales de conductos HA5nL (A) y HA5L (B), junto con detalles de la superficie interna (C), externa (E) y la pared del conducto (A', D). La imagen C' es un detalle de la C, para poder observar la microporosidad. Barras de escala: 200 μm (A, B), 50 μm (A', C, D, E) y 10 μm (C').

Los conductos que han sido liofilizados tras la gelificación (Figura 30B a E), sin embargo, sí presentaban una estructura de pared relativamente regular, con delgadas celdillas interconectadas como el que se encuentra en un panal de abejas, que soportaban perfectamente la acción mecánica durante los cortes. Además, estas muestras HA5L presentaban poros de un tamaño menor justo en las superficies de contacto del HA con polímeros hidrófobos durante la gelificación, que se cree que podrían estar debidos a microdefectos producidos o al agua asociada al polímero (a diferencia del agua libre de los poros) que desaparece durante la liofilización. A esta estructura de matriz con cavidades de 50 μm o más, limitada por estratos de porosidad mucho menor, se la denominó pared porosa tricapa y, a juzgar por la Figura 30A y A', es un fenómeno que no se producía en el caso de los

conductos HA5nL. De ello se deduce que la pared porosa tricapa era consecuencia de haber liofilizado los conductos gelificados.

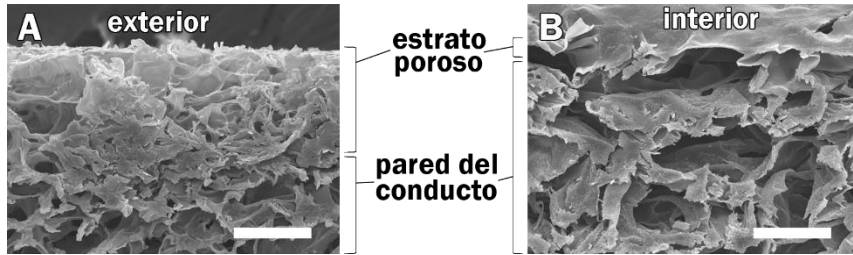


Figura 31. Micrografías de SEM de secciones transversales de conductos HA5L en las regiones donde hay transición entre las celdillas de la pared del conducto y las superficies externa (A) e interna (B) de este. Barra de escala: 30 μm .

Gracias a detalles en las zonas donde existe transición entre la matriz interna de la pared de los conductos HA5L y las superficies microporosas (Figura 31), se pudo observar qué tipo de interfase existía entre ambos tipos de estructuras. Los estratos porosos, tanto el que daba al exterior del conducto (Figura 31A) como el que limitaba con su lumen (Figura 31B), eran una especie de membrana delgada que separaba las celdillas de la pared del conducto del exterior, más que una zona de transición con un gradiente de poros de diferente tamaño. La diferencia más destacable entre ambas superficies se debe a la topografía, ya que mientras que el estrato que daba al interior del canal del conducto era una capa lisa de menos de 5 μm de espesor, la superficie externa presentaba mayor rugosidad ($\sim 40 \mu\text{m}$) y una porosidad más irregular, como también se puede intuir en la Figura 30E.

Para determinar con mayor precisión las dimensiones de los poros de cada una de las estructuras de la pared porosa tricapa, se representaron en histogramas de frecuencia los datos obtenidos mediante el programa ImageJ tras el tratamiento de las imágenes de las superficies externa e interna, así como la pared del conducto HA5L. En la Figura 32 se muestran dichos histogramas divididos en 15 intervalos, indicando el origen de los datos usados para componerlos, aunque no han podido ser representados en un único diagrama por la considerable diferencia entre los diámetros de poro de las diferentes estructuras.

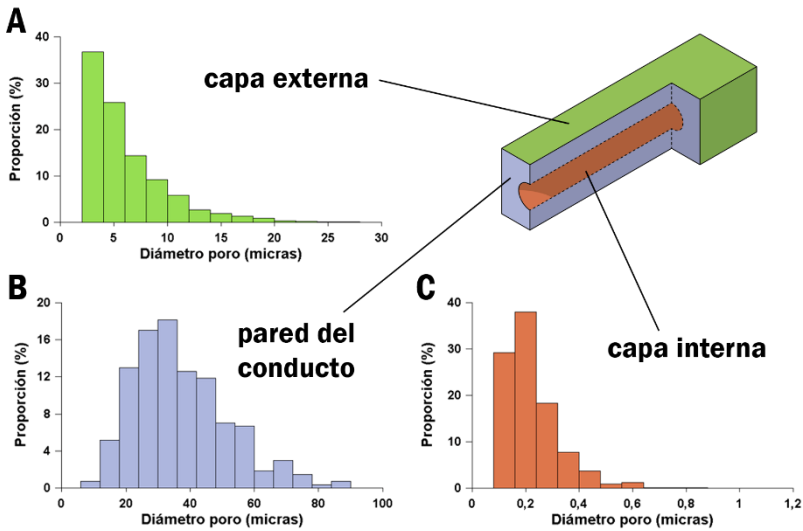


Figura 32. Histogramas de los diámetros de poro registrados a partir de imágenes de SEM de la capa externa (A), la pared del conducto (B) y la capa interna (C) de un conducto HA5L. El esquema de la esquina superior derecha representa una sección abierta del conducto para facilitar la interpretación del origen de los datos.

Los poros medidos en las imágenes de la capa interna (el lumen del conducto) eran inferiores a $1\ \mu\text{m}$, aunque prácticamente ninguno tenía menos de $100\ \text{nm}$ (Figura 32C), lo que contrasta con el diámetro de las celdillas de la pared del conducto, de en torno a $30\ \mu\text{m}$ (Figura 32B). También en la capa externa del conducto HA5L se midieron poros inferiores al promedio de la pared de este, predominantemente menores a $10\ \mu\text{m}$ de diámetro.

Estos rangos de diámetros de poro para las tres capas del conducto liofilizado son muy convenientes para el propósito que se busca con dichos biomateriales, ya que hay diferencias claras entre ellas, por lo que se puede justificar la denominación de pared porosa tricapa. Además, los únicos estratos que tienen tamaños realmente pequeños desde el punto de vista biológico son las caras interna y externa, ya que las células de mamíferos rara vez tienen menos de $15\ \mu\text{m}$ de tamaño, aún en forma redondeada. Esto supone que la pared podría suponer una barrera efectiva para prevenir un contacto físico entre las células del interior y las del exterior del conducto, así como evitar que aquellas que se siembran en el lumen escapen del lugar de injerto. Las cavidades de la pared intermedia del conducto, que son mayores y que solo serían accesibles en etapas posteriores donde las superficies limítrofes hubiesen comenzado a degradar, podrían constituir, por su lado, un entorno tridimensional similar a la matriz extracelular natural que secretan las células durante la formación de nuevo tejido. Ahora bien,

todos estos supuestos deberán someterse a juicio una vez expuestos los resultados de los experimentos donde se han puesto en contacto los conductos liofilizados con las células.

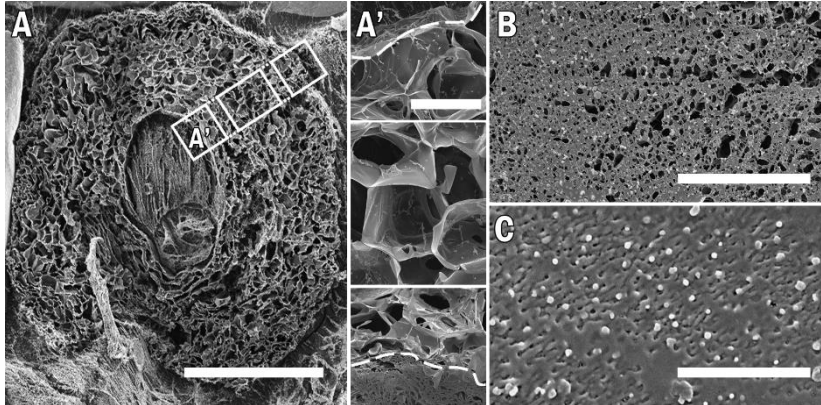


Figura 33. Micrografías de CryoSEM del corte transversal por criofractura de un conducto oHA5L (A) y detalles de la capa interna, intermedia y externa de la pared de este (A', de arriba abajo, respectivamente). Las líneas blancas discontinuas delimitan la pared. Detalles de la superficie externa (B) e interna (C) del conducto en corte transversal. Barras de escala: 500 μm (A), 50 μm (A', B) y 10 μm (C).

Los conductos oHA5L, pese haber sido producidos con un molde de diferentes dimensiones (aun respetando la composición de los materiales), presentaban una estructura muy similar a sus análogos HA5L, con la diferencia de que la sección externa del conducto era circular en lugar de cuadrada, como se puede apreciar en la Figura 33A. Los detalles de la Figura 33A' permiten, además, demostrar las claras analogías que hay entre las límites de las diferentes capas en este caso y en los conductos HA5L. Por su parte, es fácil comprobar que las capas externa e interna (Figura 33B y C, respectivamente) presentaban poros de diámetro tal que se corresponden con los rangos de mayor frecuencia de los histogramas equivalentes de la Figura 32. Los conductos oHA5L son, por tanto, equivalentes en morfología y estructura a los HA5L, por lo que es muy probable que las consideraciones que se hagan con respecto a estos últimos sean extrapolables.

Las escamas que se pueden discernir en el exterior e interior de la pared del conducto oHA5L (Figura 33A), así como los cúmulos blanquecinos depositados sobre la superficie del lumen (Figura 33C) son residuos que deja el agua tras sublimar en el CryoSEM y no deben identificarse como estructuras asociadas a la matriz de HA entrecruzado. No dificultan, en cualquier caso, la interpretación de las evidencias descritas en el anterior párrafo.



Para validar la hipótesis de que una estructura tan singular como la de pared porosa tricapa se debía a la composición de los sustratos poliméricos hidrófobos en contacto con el HA durante la gelificación y liofilizado de este, se recurrió a los resultados que requirieron discos de HA entrecruzado (similares a los fHA5L) preparados en contacto con láminas o films de diferentes materiales. La Figura 34 muestra los datos de diámetro de poro promedio calculados a partir del tratamiento informático de las imágenes de SEM de la superficie de interés de discos de HA entrecruzados y liofilizados en contacto con materiales de diferente hidrofiliicidad, discriminados por su ángulo de contacto con glicerol. Se representa también el trazado del ajuste lineal de los promedios de cada grupo y el coeficiente de correlación lineal, calculado a partir de todos los puntos registrados y no sólo con los promedios muestrales.

Parece evidente que aquellos polímeros con mayor ángulo de contacto tienden a limitar más el diámetro de los poros formados, mientras que los sustratos más hidrófilos o con mayor cantidad de grupos polares expuestos, los “poros” medidos son del mismo orden que las celdillas formadas más allá de la interfase HA-material. Para confirmarlo, no hay más que ver el coeficiente de correlación lineal, r , que en este caso es de un valor muy similar a 1, lo que representa que la mayor parte de la arbitrariedad de la distribución de puntos queda explicada por la relación diámetro de poro – ángulo de contacto del glicerol. Valores bajos de diámetro de poro para el ángulo de contacto correspondiente (caso de la PCL), suponen que hay otros factores que tienen efecto sobre el diámetro de poro y que no se han considerado.

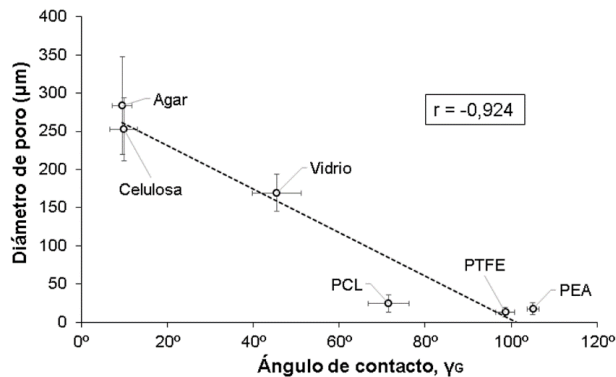


Figura 34. Diámetro de poro calculado en discos de HA entrecruzado que durante la gelificación y la liofilización están en contacto con láminas rígidas de materiales con diferente ángulo de contacto, γ_6 , medido. Cada punto representa el valor promedio \pm desviación estándar de cada variable. En el cuadro se muestra el coeficiente de correlación lineal.



De acuerdo con lo dicho, la conjetura de que la afinidad de los cristales de agua en crecimiento durante la congelación del gel de HA entrecruzado con respecto al material que confina dicho gel determina el tamaño de los poros que se forman durante la liofilización de los cristales parece cobrar más valor. Por tanto, se podría tomar el ángulo de contacto de un material concreto como un referente para obtener una estimación del tamaño de poro que se obtendrá al liofilizar sobre éste HA entrecruzado con DVS.

Con respecto al caso especial de la PCL, se debe hacer una última consideración importante. Si se compara el valor de diámetro de poro de la gráfica de la Figura 34 con los poros cuantificados en la cara interna de los conductos (Figura 32), que era la superficie del gel de HA entrecruzado que permanece en contacto con los vástagos de PCL del molde, parece haber una discrepancia, ya que los valores representados en el histograma parecen ser 20 veces menores. Sin embargo, lejos de deberse a un error, se plantea la posibilidad de que se deba a un fenómeno relacionado con la geometría, ya que en un caso la PCL estaba conformada como una lámina plana y en el otro como una fibra cilíndrica alargada. De ser así, el radio de curvatura de la superficie en contacto con el HA entrecruzado durante la congelación y liofilización tendría también peso sobre la estructura final del estrato del gel más próximo a dicha superficie. En el caso del PTFE, los resultados de la Figura 32 y la Figura 34 son muy semejantes, quizá en este caso porque en ambos casos se trataba de caras planas.

En la Figura 35A, se muestran los resultados de densidad calculados a partir de las medidas de masa de los conductos HA3nL, HA3L, HA5nL y HA5L en estado seco y tras ser sumergidas en N-octano. Si bien es cierto que no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre las densidades de los diferentes grupos ensayados, parece que aumentar la concentración de HA en la mezcla madre obtuvo un ligero incremento en la densidad, lo que tiene sentido ateniéndose a que varios resultados parecen evidenciar una mayor compactación de cadenas de polímero entrecruzado al aumentar la concentración de HA. Asimismo, también parece haber una ligera correlación entre liofilizar las muestras y que estas aumenten su densidad. Este fenómeno, muy sutil, aparece tanto en los conductos HA3L como en los HA5L respecto a sus homólogos no liofilizados y podría justificarse si, como parecen indicar evidencias anteriores, la estructura que le confiere la liofilización a los conductos tras la gelificación del HA es más densa y compacta que si se secan estos al aire.

Además, todos los valores, de entre 1.19 y 1.41 g/cm³, están dentro de los rangos obtenidos en estudios de densidad de tejidos blandos de humanos y simios [189], si bien se predice que dicha densidad pueda disminuir algo al



captar agua, de modo que podrían llegar a ser más similares incluso a la densidad de los tejidos del sistema nervioso, del orden de 1.10 - 1.14 g/cm³.

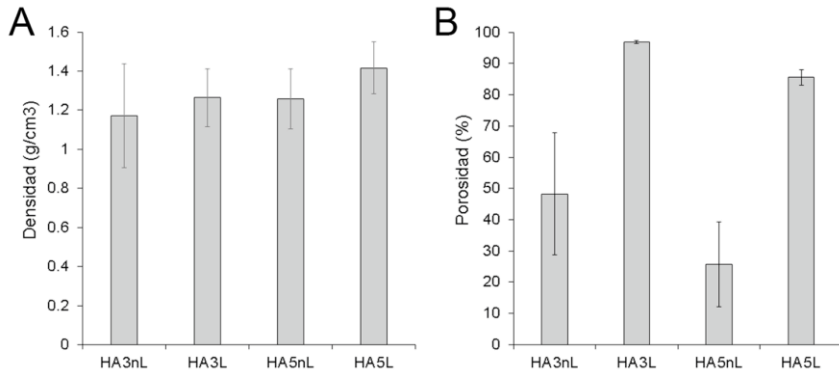


Figura 35. Densidad (A) y porosidad (B) calculada gracias al principio de Arquímedes de los conductos de HA3nL, HA3L, HA5nL y HA5L. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de densidad de las diferentes muestras. Las barras representan el valor promedio \pm la desviación estándar calculada para cada grupo.

La porosidad de los diferentes tipos de conductos, presentada en la Figura 35B, a diferencia de la densidad, es muy dispar según cada condición de síntesis. Por una parte, los conductos HA5L y HA5nL parecen ser algo menos porosos que los preparados a partir de mezcla madre al 3%, lo que es coherente pues contienen más masa de polímero de una densidad similar que forzosamente debe ocupar algo más de espacio. Sin embargo, lo que es realmente singular es el considerable efecto que la liofilización tiene sobre la formación de poros en el conducto, que en el caso de los conductos producidos a partir de mezcla madre al 3% dobla la porosidad (hasta más de un 95%) y que produce más de tres veces más volumen poroso en el caso de los conductos HA5L con respecto a los HA5nL.

Estos resultados, acordes con lo deducido a partir de las imágenes de la Figura 29 y la Figura 30, parecen corroborar que los conductos, aunque de composición y densidad parecida, tienen una configuración tridimensional radicalmente distinta cuando se liofilizan, ya que dicho proceso logra crear poros separados por delgadas paredes que, sin embargo, están formados por cadenas de HA entrecruzado densamente unidas entre sí, a diferencia de los conductos secados al aire, donde el resultado es más similar a una masa semicontinua y homogénea con algunas discontinuidades, pero compuesto por una red tridimensional de HA con una luz de malla molecular razonablemente grande.

Puesto que ya se han presentado los resultados de porosidad de los conductos HA5L, es posible compararlos ahora con la porosidad que fue calculada a partir de imágenes como la C' y la E de la Figura 30, en este caso de $\pi_{int} = 4.81 \pm 4.08\%$ para la capa interna (la que está en contacto con el lumen del conducto) y $\pi_{ext} = 17.70 \pm 5.39\%$ para la externa. Estos valores son muy inferiores a la porosidad global de dichos conductos ($\pi = 85.58\%$), lo que no deja de ser un indicio extra de las diferencias que hay entre las tres capas que forman la pared de los conductos y que, recuérdese, no se produce en aquellos conductos secados al aire.

El comportamiento mecánico de la matriz de HA entrecruzado, a pesar de ser un hidrogel producido a partir de proporciones muy bajas de polímero (5% en masa de la mezcla madre en el mejor de los casos), resultó ser muy conveniente conforme al uso que se le pretende dar a los conductos. En un primer examen cualitativo, en el que se probó a manipular con pinzas los conductos, se observó que estos eran fácilmente manipulables aun en condiciones hidratadas a pesar de sus reducidas dimensiones y de su estructura altamente porosa. Incluso se observó que soportaban pequeñas deformaciones sin perder apreciablemente su forma ni generarse defectos críticos. Tan solo los conductos HA1L eran excesivamente blandos para manipularlos adecuadamente, aunque la decisión de descartar dichas muestras para futuros experimentos se justifica con más rigor a la hora de presentar los datos de cinética de absorción de agua de los materiales (ver más adelante).

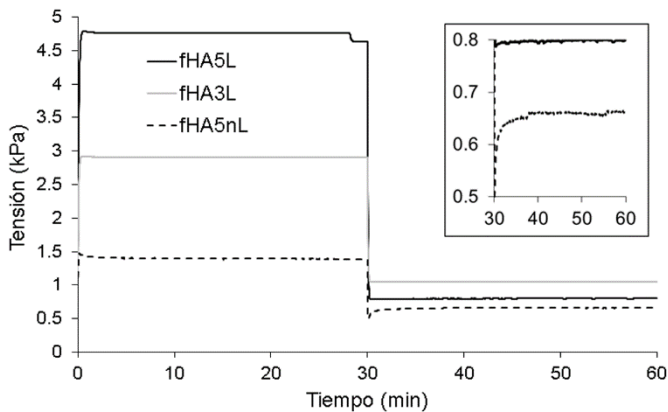


Figura 36. Diagrama de relajación de tensiones durante los ciclos de carga y descarga de films de HA entrecruzado de diferente composición hidratados en agua destilada a 37 °C y sometidos a deformaciones del 5% de la altura original del disco. Los ejes del detalle incrustado tienen las mismas unidades.



En cuanto a los resultados cuantitativos, en la Figura 36 se puede ver la representación de los datos obtenidos a partir del ensayo de relajación de tensiones que se realizó para analizar el comportamiento viscoelástico de los films de HA entrecruzado de diferente composición y sistema de postprocesado. Es evidente que no existe un efecto de deriva apreciable en las muestras liofilizadas, donde la tensión vaya variando a lo largo del tiempo para una deformación constante, ni en la fase de carga ni en la de descarga. Esto representa que los discos fHA5L y fHA3L se comportan como un gel elástico con una fracción viscosa prácticamente inexistente. Es cierto que, los geles “químicos” (caso del HA entrecruzado con DVS) son predominantemente elásticos porque se forman nuevos enlaces covalentes que limitan los grados de libertad de las cadenas poliméricas, a diferencia de geles “físicos” como la gelatina, la acrilamida o el poli(2-hidroxietil metacrilato), que gelifican gracias a interacciones electrostáticas intercatenarias que permiten dislocaciones y movimientos relativos con mayor facilidad. Ahora bien, los geles químicos con grupos muy hidrófilos (los hidrogeles) retienen tal cantidad de agua en su estructura que es habitual que la extrusión de las moléculas de H₂O genere un efecto de viscosidad aparente. En el caso de los discos liofilizados de HA entrecruzado, el denso empaquetamiento de las cadenas de HA en la malla tridimensional, que da lugar a un andamiaje tipo esponja estructuralmente estable, podría facilitar la rápida evacuación del agua a través de las grandes cavidades que son los poros.

Los discos fHA5nL de HA entrecruzado no liofilizado, sin embargo, sí parecen presentar dicho efecto de deriva, seguramente por el impedimento que la matriz tridimensional, más dispersa en este caso, supone para el agua mientras esta está siendo desalojada por efecto de la presión. Ahora bien, a pesar de todo el efecto es muy sutil y difícilmente discernible salvo, por ejemplo, si se comparan individualmente las curvas de descarga de las muestras fHA5L y fHA5nL (ver detalle de Figura 36), por lo que se puede afirmar que los discos fabricados con la formulación fHA5nL son fundamentalmente elásticos, al igual que lo eran los liofilizados.

Respecto a la anomalía detectada en torno a los 29 min en la curva de la muestra fHA5L, así como el hecho de que durante el ciclo de descarga ninguna de las muestras llegasen al valor de tensión de deformación nula a diferencia del resto de muestras, se trata de pequeños errores de medida debidos, sin duda, a ligeros desplazamientos de la probeta (los films en este caso) con respecto de las caras planas del vástago de compresión durante la recaptación de agua, que puede alterar el volumen final hinchado.

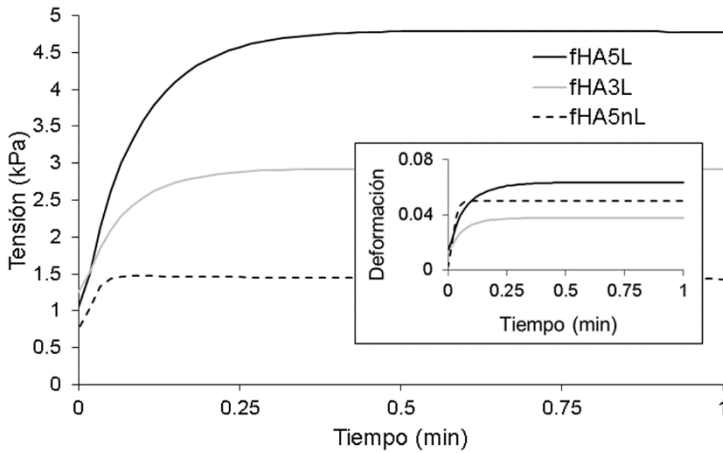


Figura 37. Ampliación de la Figura 36 para los primeros 60 s tras el ciclo de carga. El detalle es el diagrama de deformaciones registradas para el mismo intervalo de tiempo.

Los codos curvos observados en todas las muestras justo tras iniciar tanto el ciclo de carga como el de descarga (0 y 30 min, respectivamente) no deben relacionarse, sin embargo, con defectos durante la medición o fenómenos pseudoviscosos. Si se observa la ampliación del diagrama en uno de esos puntos (p.ej. Figura 37) y se compara con la información registrada por el equipo con respecto a la deformación de la muestra (detalle de la Figura 37), se puede ver que la forma es prácticamente idéntica. Esto, lejos de suponer un mínimo comportamiento viscoso medible para los films de HA entrecruzado, representa simplemente que el instrumento requería cierto retardo de unos 15 - 25 s para alcanzar el valor fijado de deformación.

Sí se puede ver en el detalle de la Figura 37 cómo el valor de deformación de la muestra fHA3L no llegó en realidad a alcanzar una deformación real del 5% de su altura inicial (apenas parece rozar el 4%). En este caso, el desfase pudo deberse a una mala detección automática de la altura original de la muestra por parte del equipo.

De todos modos, dicho desfase no afecta negativamente para poder analizar de qué manera respondieron los films de HA entrecruzado en esos tramos transitorios, esto es, su comportamiento elástico en el diagrama de tensión-deformación (Figura 38). Es más, en dicho intervalo la relación entre la deformación unidimensional de la muestra y el esfuerzo aplicado para lograr esa deformación era prácticamente lineal ($r^2 > 98.8\%$ en todos los casos para ajustes lineales de las curvas), lo que sugiere que efectivamente el efecto de fluencia viscosa en el caso de los films era prácticamente despreciable en ese instante inicial.

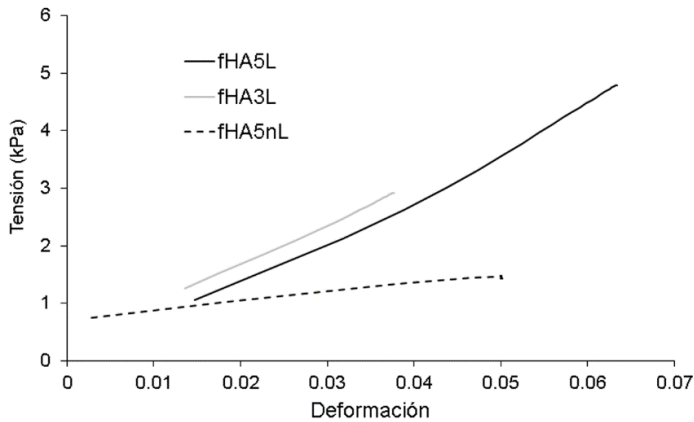


Figura 38. Diagrama tensión-deformación de las muestras de la Figura 37, obtenido a partir de los datos de los dos gráficos de dicha figura para los primeros 45 s.

En cualquier caso, dicho análisis, que en la Figura 38 no tenía más que fines exploratorios, se pudo ampliar con los resultados del análisis termomecánico, representados en la Figura 40 y que además se llevaron a cabo en un entorno más similar al fisiológico. Como se puede ver, el comportamiento de los polímeros hidratados dista mucho del clásico material con un tramo elástico inicial y otro de deformaciones plásticas previo a la rotura, donde las modificaciones estructurales que se suceden son permanentes. Aquí, sin embargo, se aprecian más bien dos tramos razonablemente lineales, uno inicial y otro final, unidos por una fase de transición más o menos larga.

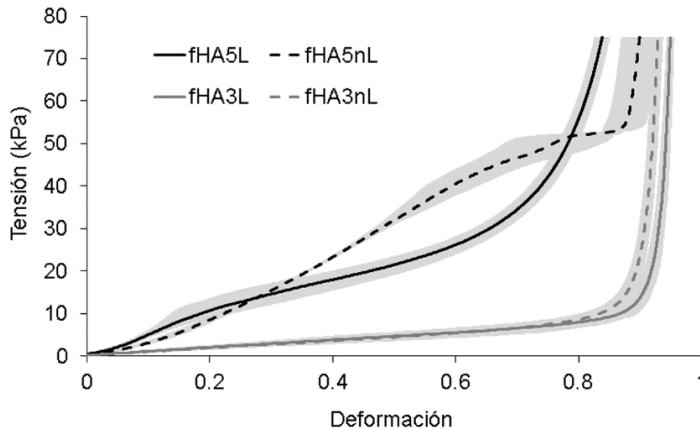


Figura 39. Diagrama tensión-deformación para las muestras fHA5L, fHA5nL, fHA3L y fHA3nL comprimidas de 0 a 1500 mN a 100 mN/min y sumergidas en DBPS a 37 °C. En tono gris claro se muestra el intervalo $\pm \sigma$ de deformación para cada valor de tensión.



Durante el primer sector linealizable, que se corresponde aproximadamente con el 15% de la deformación inicial de las muestras con mezcla madre al 5% (fHA5L y fHA5nL) y con casi el 70% del resto, es la etapa donde, como ya se ha sugerido en el anterior resultado, el medio líquido residente en el interior de los poros sería desalojado por la presión ejercida por el vástago del equipo y donde la red tridimensional de HA entrecruzado no genera un impedimento significativo a la compresión más allá del obstáculo físico o por afinidad química que le supone al agua para ser desplazada. Por el contrario, en el último 2% de deformación (82 ~ 94%, previo a la rotura) las trabéculas o cadenas que forman la matriz porosa ya han cedido por efecto de la fuerza axial y se está prensando el material hidratado, que aún puede soportar mayores cargas deformando ligeramente antes de quebrar. En el tramo intermedio se entiende que se continúa desalojando agua a la vez que las trabéculas van pandeando y colapsando, razón por la cual se puede observar que hay un comportamiento mixto no lineal que, además, cada vez se asemeja más al segundo tramo linealizable.

Aquellos discos producidos a partir de mezcla madre al 3% (fHA3L y fHA3nL) sufrieron mucha deformación ante esfuerzos muy reducidos, lo que representa que la red tridimensional de HA entrecruzado participaba en muy poca medida a la hora de retener el agua para evitar que esta fuera extruida fuera de los discos. Esto es coherente con el hecho de que las muestras fHA3L y fHA3nL tengan una proporción tan baja de polímero con respecto a la gran cantidad de agua que pueden retener (ver resultados de contenido de agua en fracción másica más adelante). Lo que es más sorprendente es que al aumentar la cantidad de HA hasta el 5% en la mezcla madre (discos fHA5L y fHA5nL), se aprecia un aumento proporcionalmente mayor de la tensión que debe ejercer el equipo para lograr expeler el fluido del interior, lo que supone que hay un punto entre el 3% y el 5% de proporción de HA en la mezcla madre que consigue que los materiales sintetizados con dicha formulación obtengan una mejora a la hora de soportar cargas axiales.

También es llamativo que las diferencias entre muestras fHA3L y fHA3nL sean mínimas (como si el efecto de la liofilización fuera despreciable), pero las muestras fHA5L y fHA5nL muestren un comportamiento significativamente distinto entre ellas. Mientras que los discos fHA5nL parecían ofrecer más esfuerzo hasta prácticamente haberse deformado un 90% y luego sufrieron un súbito colapso, los discos fHA5L fueron aumentando de manera gradual la cantidad de esfuerzo que estaba siendo transmitida a la matriz de HA como tal.

Estas diferencias son coherentes con la morfología observada mediante SEM para cada tipo. En la estructura continua, rugosa e irregular de las



muestras no liofilizadas (fHA5nL) el agua se va “exprimiendo” de esta, de modo que el esfuerzo es proporcional a la deformación (comportamiento pseudoelástico) hasta el punto en que ya no hay prácticamente agua que evacuar y la red de HA entrecruzado se ve obligada a soportar de golpe toda la presión. Sin embargo, ante una disposición más regular con celdillas de paredes finas pero compuestas por cadenas de HA densamente empaquetadas, la estructura del material comienza a soportar una fracción de los esfuerzos mucho antes y a almacenar energía como lo hace un muelle. Por tanto, el cociente entre la energía absorbida por el HA entrecruzado y la energía absorbida por el agua siendo desalojada de los discos va aumentando gradualmente conforme el disco se deforma. Incluso puede que el tramo del último 2 - 5% de deformación, que claramente es la región donde las muestras fHA3L, fHA3nL y fHA5nL tienen un tramo lineal, no fuese el verdadero punto previo a la rotura de la muestra y que todavía pudiese soportar esfuerzos mayores.

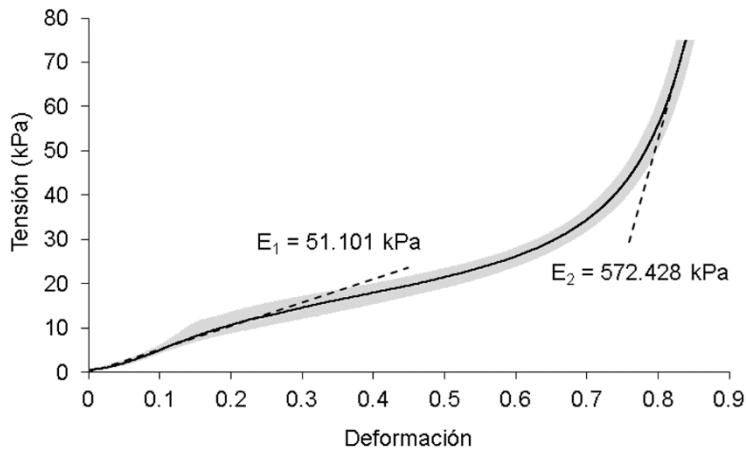


Figura 40. Ejemplo de obtención de módulos de Young aparentes (E) a partir del diagrama tensión-deformación para las muestras fHA5L. En líneas discontinuas se representa el ajuste lineal a partir del cual se obtiene el valor de E del material para el tramo del 15% de deformación inicial (E_1) y el 2% final ensayado (E_2).

Para discutir con mayor objetividad lo expuesto anteriormente, se calculó el módulo elástico aparente de los tramos de bajas y altas deformaciones (E_1 y E_2 , respectivamente) para cada grupo de muestras ensayadas (ejemplo de cálculo en Figura 40). Dicho módulo (Tabla 6) se estimó como la pendiente de la recta de tendencia ajustada para los puntos de < 15% de deformación (E_1) y aquellos en el último 2% de deformación (E_2), ya que por definición el módulo elástico axial o de Young es el cociente entre la tensión aplicada y la deformación resultante ($E = \sigma/\epsilon$) para un material que se encuentre en su región elástica.

Tabla 6. Módulo elástico axial a bajas (E_1) y altas deformaciones (E_2) calculado para cada grupo de muestras de acuerdo al procedimiento de la Figura 40.

Módulo	fHA3nL	fHA3L	fHA5nL	fHA5L
E_1 (kPa)	10.00	11.163	33.31	51.10
E_2 (kPa)	2249.68	2450.10	1039.17	572.43

Es reseñable el hecho de que el módulo E_2 sea uno y hasta dos órdenes de magnitud superior al E_1 en alguno de los casos, lo que implica que el material, aun hidratado, es considerablemente resistente (> 0.5 MPa) para estar compuesto fundamentalmente por cadenas de un polímero natural hidrófilo. Sin embargo, el valor más interesante es el módulo a bajas deformaciones (E_1) debido a que los tejidos del sistema nervioso no suelen sufrir, más que en situaciones de traumas o hemorragias internas, contracciones en su volumen superiores al 2 - 10%, precisamente porque las células que lo componen son muy sensibles a este tipo de estímulos. Y es precisamente en ese intervalo de deformaciones donde los discos presentaron un módulo elástico aparente de entre 9 y 50 kPa, un intervalo muy similar a los registrados en muestras de tejido del sistema nervioso en mamíferos [190,191]. El hecho de que tanto la densidad como el módulo elástico de un biomaterial sean similares a los del tejido en que se van a implantar es crucial, ya que eso supone que los movimientos y esfuerzos que genera un organismo vivo se transmitirán de manera cooperativa a través del material sin generar discontinuidades, uno de los elementos clave para lograr una adecuada integración a medio y largo plazo.

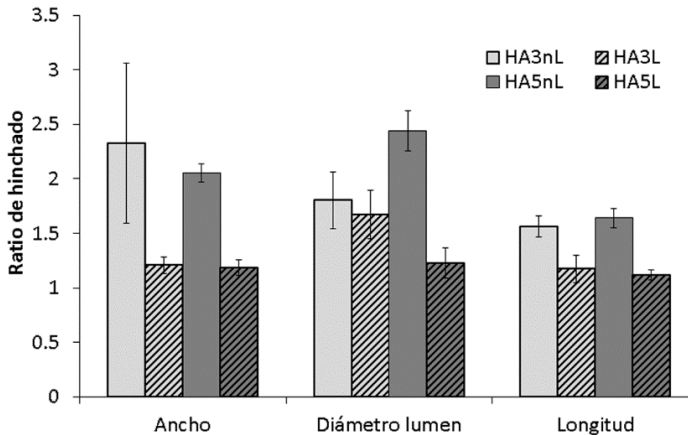


Figura 41. Diagrama del ratio de aspecto (dimensión en hinchado/dimensión en seco) de las tres dimensiones características de los conductos de HA entrecruzado. Las barras representan el valor promedio \pm desviación estándar.



En cuanto a los ensayos que se realizaron para determinar el comportamiento de los conductos con el propósito de usarlos como hidrogeles implantables, las primeras pruebas de que los factores de estudio (composición de los conductos y método de secado) tenían influencia en este sentido se encuentran en la Figura 41, que muestra los resultados de las medidas tomadas en hinchado para las dimensiones características (ancho, diámetro del lumen y longitud) de los diferentes tipos de conductos de HA entrecruzado con respecto a las mismas en seco.

Es evidente que las muestras no liofilizadas (HA3nL y HA5nL) hincharon significativamente más que las liofilizadas, especialmente a lo ancho y el diámetro del lumen en el caso de los conductos HA5nL, algo que ya parecía apreciarse en la Figura 28. También en longitud las muestras secadas al aire son algo más largas, aunque las diferencias son más sutiles. En cuanto a las diferencias entre muestras liofilizadas según la composición, en ambos casos los conductos presentan elongaciones en sus dimensiones de en torno al 20% respecto de su valor en seco, salvo el diámetro del lumen de las muestras HA3L que aumentaron hasta un 60%. Es destacable también que tan solo los conductos HA5L presentó un aumento isotrópico de su tamaño tras la captación de agua en su estructura, ya que no hay diferencias entre los ratios de hinchado de sus tres dimensiones características. Estrictamente, también se podría decir que los conductos HA3nL no presentan diferencias significativas entre sus valores promedio, pero esto se debe a que la dispersión medida en el ancho de dichas muestras fue muy grande (σ representa el 40% del valor), por lo que sería atrevido afirmar que su hinchado fue idéntico en todas sus dimensiones.

La interpretación más probable de estos hechos es que, al estar más compactas las cadenas en las muestras liofilizadas, estas admitieron menor cantidad de moléculas de agua en su estructura y, además, esta encontró mayores restricciones a la hora de difundir a través de las densas trabéculas para reemplazar las interacciones electrostáticas intracatenarias e intercatenarias por puentes de hidrógeno a través del H₂O. De este modo, las muestras no liofilizadas, donde el agua tenía mayor posibilidad de acceso a las cadenas de la matriz tridimensional de HA, aumentaron en mayor medida su tamaño conforme se realojaban las moléculas de agua en los huecos intermoleculares desplazando, así, esas cadenas. Aun así, los conductos HA3nL y HA5nL no hincharon en mayor medida a pesar de estar compuestas por un polímero altamente hidrófilo precisamente porque durante el entrecruzamiento se generan uniones que limitan los grados de libertad sobre los que la malla tridimensional puede rotar y trasladarse.

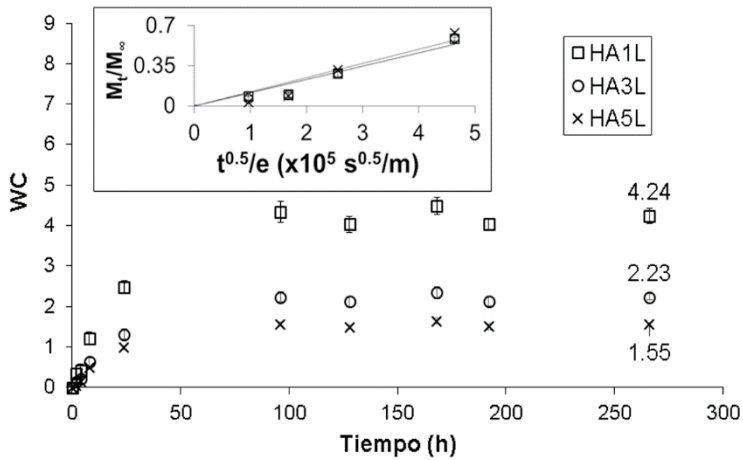


Figura 42. Contenido de agua (WC) de los conductos HA1L, HA3L y HA5L durante la captación de agua ambiental con HR 100%. En los valores a 266 h, considerados de equilibrio, se indica el EWC promedio de cada grupo. El detalle de la esquina superior izquierda representa el cociente M_t/M_∞ de los puntos de cada grupo usados para evaluar el coeficiente de difusión.

Sin embargo, para afirmar convenientemente las anteriores hipótesis, es preferible recurrir a resultados como los de la Figura 42, donde se muestra el contenido de agua (de acuerdo a su definición previa) de los conductos HA1L, HA3L y HA5L a lo largo del tiempo que permanecieron en un ambiente saturado de agua (HR 100%) y sus respectivos valores de equilibrio (EWC). Como se ve, este fue el único ensayo donde se pudo obtener datos de los conductos HA1L, ya que en el resto de experimentos donde se intentó o estaban secos y eran quebradizos o hidratados y no eran manipulables sin deformarse en exceso. No se presentan los datos de HA3nL y HA5nL porque estos retenían una cantidad de agua tal que prácticamente hacían despreciable la masa del propio polímero y el error asociado a las medidas era inasumible (considérese que, de acuerdo a los datos presentados en la Figura 41, la variación de volumen de los conductos no liofilizados es de en torno al 600 – 700% frente al 50 – 60% de los liofilizados).

Los datos presentados se transformaron para obtener el cociente M_t/M_∞ , dividiendo el WC entre el EWC y para transformar las unidades de tiempo (como se aprecia en el detalle de la Figura 42) de modo que se pudiese determinar la constante de proporcionalidad, relacionada con el coeficiente de difusión, D , de acuerdo con la ecuación 8. En la Tabla 7 se muestran los coeficientes de difusión del agua penetrando en la matriz de HA seco (xerogel) para aquellos puntos que cumplieren $M_t/M_\infty < 0.6$.



Tabla 7. Valores de la constante de proporcionalidad, el coeficiente de difusión y el coeficiente de determinación del ajuste lineal a partir de los datos del detalle de la Figura 42.

Variable	HA1L	HA3L	HA5L
K ($\times 10^{-6}$ m/s ^{0.5})	1.155	1.157	1.231
D ($\times 10^{-13}$ m ² /s)	1.479	1.483	1.680
R ²	0.972	0.966	0.946

Aunque los datos de coeficiente de difusión no son exactos, tal y como discuten Ritger y Peppas a la hora de plantear su solución semiempírica [179] por no considerar el problema en coordenadas radiales, sí permiten conocer el valor aproximado de este, así como poder realizar comparaciones entre las diferentes muestras, especialmente si se tiene en cuenta que el ajuste lineal presentaba una bondad superior al 94% en el peor de los casos.

Así, tanto la Tabla 7 como la Figura 42 muestran que la principal diferencia entre la capacidad de captación de agua de los diferentes conductos no radica en la velocidad con la que lo hacen, ya que aún la muestra con el parámetro cinético más alto (HA5L) tan solo era $2 \cdot 10^{-14}$ m²/s más rápido que el resto. Lo que sí es reseñable es el hecho de que la cantidad de agua final que retiene cada muestra parece aumentar conforme se disminuye la cantidad de HA en la mezcla madre.

El hecho de que tanto las muestras no liofilizadas como las HA1L y HA3L absorbiesen más agua que los conductos HA5L está relacionado con el empaquetamiento y densidad de las cadenas entrecruzadas de HA y los tipos de moléculas de agua según su interacción con un polímero.

De acuerdo a lo que se sabe [192], los polímeros, y especialmente aquellos que presentan grupos iónicos o hidrófilos libres, pueden interactuar con moléculas de agua a través de puentes de hidrógeno fundamentalmente de tres modos (Figura 43). Las moléculas de H₂O que generan puentes de hidrógeno más estables al asociarse a grupos químicos iónicos o hidrófilos se conocen como agua de unión primaria o *no congelable* porque no presenta una transición de fase líquido-sólido detectable. Por el contrario, aquellas moléculas que presentan transiciones y vibraciones características del agua pura en experimentos calorimétricos, de espectroscopía dieléctrica y otros se denominan agua libre o *congelable* y se considera que no interacciona con las cadenas de polímero por estar a demasiada distancia de él. Existe un tercer tipo, llamada de unión secundaria (o también de unión *congelable*), que se asocia a agua de unión primaria o a grupos del polímero con los que tiene menos afinidad y, al tener mayor movilidad, presenta transiciones de fase, aunque en regiones desplazadas respecto a las que son características del agua. Es, pues, razonable considerar que el ácido hialurónico se verá afectado por los tres fenómenos, ya que tiene una gran cantidad de grupos hidrófilos (especialmente hidroxilos) y presenta incluso

un enlace electrostático intramolecular que se ve alterado en presencia de moléculas de H₂O [106].

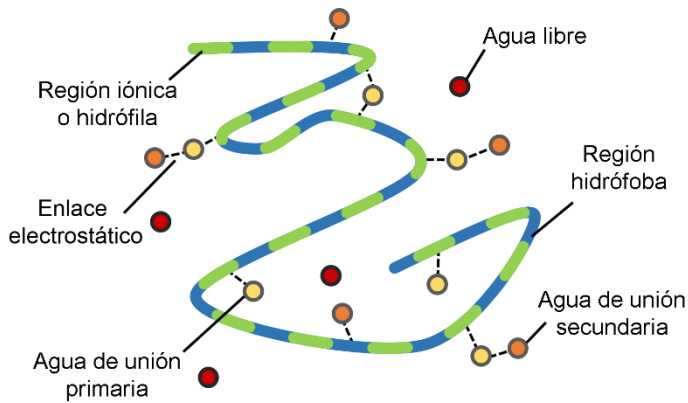


Figura 43. Esquema de los diferentes tipos de interacción molecular del agua con, en este caso, una cadena lineal de polímero con regiones hidrófobas e hidrófilas alternas.

En el caso de los conductos HA5L, puesto que se ha deducido ya que las cadenas entrecruzadas de HA están muy próximas entre ellas y densamente distribuidas en el espacio, es probable que haya menos grupos de interacción disponibles que en el caso de HA3L o HA1L, donde la masa relativa de polímero es menor y, por tanto, el empaquetamiento de las cadenas de la red entrecruzada es menos denso, lo que deja lugar a que haya más regiones de interacción para las moléculas de agua de unión secundaria. En el caso de las muestras no liofilizadas, de las que ya se ha dicho que captaron tanta agua que eran experimentalmente inmanejables, al tener una distribución de la red tridimensional más abierta y homogénea en el espacio pudieron captar muchas más moléculas de agua de unión, ya que tenían mayor movilidad, únicamente restringida por los nudos de la red.

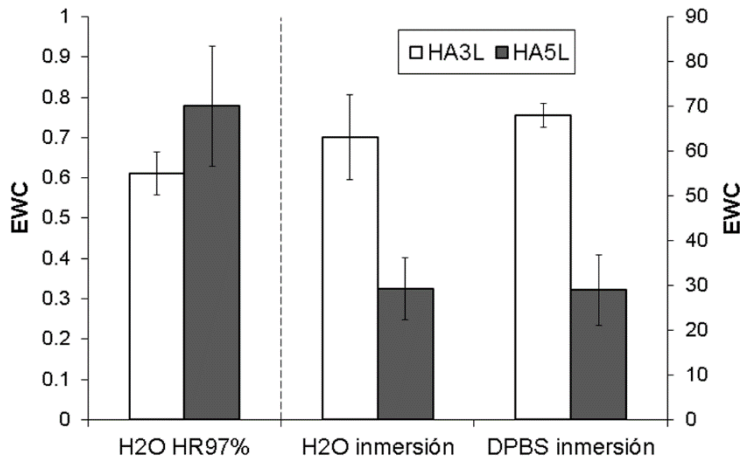


Figura 44. Contenido de agua en equilibrio (EWC) para los conductos HA3L y HA5L hidratados en atmósfera de HR 97% y en inmersión, tanto en H₂O como en DPBS, todos a 37 °C. El eje de ordenadas de la derecha corresponde a las muestras en inmersión. Las barras representan el valor promedio de EWC ± desviación estándar.

En la Figura 44 se muestra, por su parte, el EWC que alcanzaron las muestras HA3L y HA5L tanto en un ambiente de HR 97% como en inmersión en agua y DPBS. Es de especial interés el valor de EWC de los conductos hinchados en ambiente con HR 97% al discutir los resultados de la Figura 42 ya que, como se puede apreciar, en este caso ambos capturaron una proporción equivalente de agua (o no hay diferencias significativas entre ellos) y además dicho valor es entre un 27% (HA3L) y un 51% (HA5L) del obtenido para el hinchado en ambiente saturado de agua. Cuando la actividad del agua, a_w , era de 0.97 (HR 97%), todas las moléculas de agua que se asociaron a las cadenas de polímero hasta alcanzar el equilibrio provenían de agua en fase gaseosa. Sin embargo, en condiciones de $a_w \approx 1$ el equilibrio era inestable y mínimas variaciones locales en las condiciones ambientales (presión, temperatura...) provocaban la condensación y evaporación constante de pequeñas cantidades de agua. Así, se generó un entorno donde moléculas de agua de unión secundaria pudieron asociarse e incluso quizá una fracción de agua libre quedó adsorbida a la superficie específica que dejaba el polímero. Como las cadenas del HA entrecruzado en el conducto HA3L estaban menos empaquetadas que en el HA5L, eso justificaría por qué pudo retener una cantidad mayor de agua de este tipo.

En cuanto a la inmersión, es interesante destacar ante todo la gran diferencia que existe entre estos y los valores de hinchado en atmósfera con alta HR, ya que los primeros son hasta dos órdenes de magnitud superiores. Es decir, pese a que por efecto de la liofilización los conductos HA3L y HA5L retenían una cantidad entre moderada y baja de agua para estar basados en

un polímero hidrófilo, al entrar en contacto con agua en fase líquida, pueden retener entre 29 (HA5L) y 63 – 67 (HA3L) veces más agua que su propio peso seco. Este fenómeno, lejos de ser preocupante, es coherente teniendo en cuenta la altísima porosidad de los conductos, lo que supone que, aunque las cadenas entrecruzadas de HA como tal absorbiesen una pequeña proporción de agua, continuaban soportando una estructura llena de bóvedas de unos 60 μm de diámetro que se podía llenar de líquido, desalojando el aire del interior. De hecho, tomando los valores de la Figura 42 y usando los datos de porosidad y densidad ya mostrados con anterioridad en la Figura 35, se puede calcular fácilmente el EWC hipotético como ~ 10 para el conducto HA5L y ~ 41 para el HA3L que, aunque no es el mismo valor que el calculado, es claramente del mismo orden, lo que corrobora la hipótesis.

El hecho de que haya tal diferencia entre los conductos HA3L y HA5L para ambos medios de inmersión no tiene porqué ser más que una consecuencia del mismo efecto que se registraba entre ambas muestras para el WC en HR 100% acoplado al hecho de que, según la Figura 41, las muestras de HA3L tenían una variación volumétrica algo superior, lo que también daba lugar a poros algo mayores. Por último, es destacable que no haya prácticamente diferencias entre el EWC de ninguna de las muestras en ambos tipos de medios de inmersión, a pesar de que el DPBS tiene una concentración iónica considerable que podría haber afectado a las interacciones electrostáticas entre el agua y el HA. En cualquier caso, ese resultado es muy conveniente porque permite extrapolar a medios fisiológicos tamponados el comportamiento de otros ensayos que se realizaron con las muestras sumergidas en agua y considerarlos equivalentes.

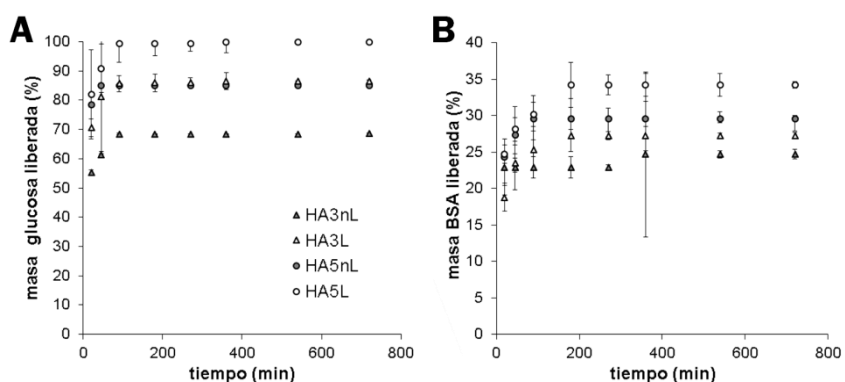


Figura 45. Porcentaje de masa liberada de glucosa (A) y BSA (B) a lo largo del tiempo a través de la pared de conductos HA3nL, HA3L, HA5nL, HA5L sumergidos en agua a 37 °C. La leyenda es común a ambas gráficas.



La Figura 45 muestra la variación (en % respecto de la masa teórica introducida) de la masa de glucosa y BSA (Figura 45A y B, respectivamente) que han atravesado la pared de conductos de HA3nL, HA3L, HA5nL o HA5L y han alcanzado el medio externo. Mientras que en el caso de la glucosa, el grupo que más masa liberó (HA5L) alcanzó el 100% y en cuestión de menos de 80 - 90 min, no se registró BSA en el exterior del conducto más allá del 35% de la masa introducida dentro, aun en el mejor de los casos (HA5L de nuevo), y esta liberación hasta el equilibrio aparente tuvo lugar en unas 3 h. También es interesante destacar que, tanto para la glucosa como para la BSA, el grupo que más permitió la difusión fue el HA5L, seguido del HA5nL y el HA3L, con valores muy similares. Los conductos de HA3nL parecieron retener un 30% de la glucosa suministrada en el lumen de estos y apenas liberaron más allá de 25% de la BSA original.

Tabla 8. Coeficientes de difusión para la glucosa y la BSA a través de la pared de los conductos HA3nL, HA3L, HA5nL y HA5L, determinados a partir del ajuste de la ecuación 10.

Variable	HA3nL	HA3L	HA5nL	HA5L
$D_{glucosa}$ ($\times 10^{-10}$ m ² /s)	4.06	4.50	7.93	4.46
D_{BSA} ($\times 10^{-10}$ m ² /s)	8.20	2.87	4.95	2.75

Tratando los datos de la Figura 45 tal y como se hizo con los resultados de los estudios cinéticos del hinchado, se los pudo ajustar al modelo propuesto por Fu, Hagemer y Moyer (ecuación 10). Mediante una función de ajuste por mínimos cuadrados para minimizar el error, se obtuvo el coeficiente de difusión correspondiente a la glucosa o la BSA ($D_{glucosa}$ o D_{BSA} , respectivamente) y a cada tipo de conducto, como se pueden ver listados en la Tabla 8. Introduciendo estos parámetros en la ecuación 10, y teniendo en cuenta que, de acuerdo a los autores, dicha expresión es válida para todo el rango de valores y no solo en el intervalo $M_t/M_\infty < 0.6$ (como sucedía con el modelo semiempírico de Ritger y Peppas), se pudo comparar el modelo con los datos originales en los que se basa, para observar cualitativamente la bondad del ajuste en la Figura 46. De acuerdo a esta, los ajustes matemáticos basados en la expresión de la ecuación 10 parecen describir adecuadamente el comportamiento de las moléculas de glucosa a través de la pared de los diferentes conductos conforme transcurre el tiempo, no así en el caso de la BSA, donde parecen existir mayores discrepancias, especialmente en los conductos no liofilizados.

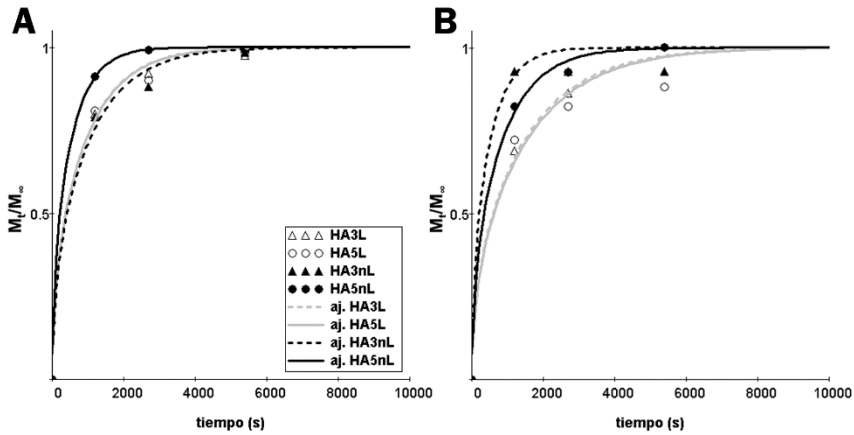


Figura 46. Cociente M/M_{∞} calculado para todos los puntos de la Figura 45 frente al tiempo. Se representan, también, los ajustes matemáticos óptimos de la ecuación 10 (aj.) para cada grupo usando los valores de la Tabla 8. La leyenda es común a ambas gráficas.

El hecho de que haya diferencias significativas entre el valor de equilibrio de las moléculas atravesando la pared de los conductos y que además estas diferencias sean comunes tanto a la glucosa como a la BSA de acuerdo a la Figura 45, supone claramente que la morfología obtenida según el tipo de secado y la cantidad de HA en la mezcla madre con la que se producen los conductos es un factor clave en la determinación de la capacidad de una molécula para atravesar una membrana de HA entrecruzado.

Existe la posibilidad de que el procedimiento de medida dejase de ser suficientemente sensible a partir de cierta concentración límite, lo que supondría que los conductos que parecen llegar al equilibrio a valores inferiores al 100% de la masa liberada en realidad seguirían liberando muy lentamente y las variaciones no habrían podido ser medibles. Sin embargo, como es un fenómeno que afecta a ambos tipos de moléculas (con métodos de detección diferentes), lo más probable es que se trate de algún fenómeno de interacción entre el HA entrecruzado y la glucosa o la BSA, lo que justificaría también el bajo valor ($\sim 35\%$) de BSA en la liberación de equilibrio en el mejor de los casos.

Está descrito que las cadenas de HA sin entrecruzar deben asociarse a algunas proteínas como las *link proteins* (LP) o proteínas de enlace para el normal funcionamiento de las células de un organismo en contacto con la matriz extracelular de alrededor [193]. Además, se tiene bastante certeza acerca de los dominios de enlace de las LP con el HA [194,195], por lo que cualquier proteína con secuencias de aminoácidos similares interaccionará con toda probabilidad con las cadenas de HA (como lo hacen la hialuronidasa, el receptor RHAMM y otros). Esto podría ayudar a explicar por



qué entre el 65 y el 75% de la BSA introducido en el lumen de los conductos no llega a desalojarse al exterior a pesar de la diferencia de concentración entre el conducto y el entorno, ya que alguno de los dominios de la BSA estaría interactuando electrostáticamente con los grupos químicos del HA entrecruzado. Asimismo, este tipo de interacciones podrían haber afectado a los fenómenos de transporte de la BSA a través de la pared de los conductos, por lo que el modelo propuesto ya no respondería a una cinética fickiana y, por tanto, sería impreciso, lo que concuerda con las diferencias entre el modelo y los puntos de referencia, especialmente para los conductos liofilizados.

La glucosa también tiene potencial para interactuar de algún modo con las cadenas de HA, ya que se sabe que determinados oligosacáridos, especialmente los derivados de la glucosa, pueden asociarse a cadenas largas de HA e incluso pueden competir con proteoglicanos por los lugares de unión [196]. Sin embargo, la afinidad de una molécula tan pequeña como un monómero es más reducida y, como se puede apreciar en la Figura 45A, afectaría más considerablemente en las condiciones donde las cadenas de HA entrecruzado estuviesen más dispersas, a saber, cuando la concentración de HA es más baja y cuando el secado de los conductos se realiza por evaporación al aire (HA3nL). Ambos efectos, pues, aumentan la cantidad de glucosa retenida por la matriz de HA entrecruzado, en tanto en cuanto aumentan la superficie de contacto disponible de la red entrecruzada. Como la glucosa es una molécula pequeña, considerada esférica a efectos de difusión en medio acuoso (se usa como referente en muchos casos de este tipo) y la interacción con el material es menor, la difusión descrita por la solución a la ley de Fick es mucho más adecuada, comparada con la BSA. Además de las interacciones entre el HA y otras moléculas, no hay que olvidar que las cadenas de HA en este caso están modificadas químicamente, que no tienen tanta movilidad y que contienen grupos sulfona intercalados que también pueden interactuar con otras moléculas.

Por último, y a pesar de que ya se ha dicho que la BSA no se describe adecuadamente con la ecuación 10 por no tener un comportamiento aparentemente fickiano, se pueden comparar tanto estos valores a modo de estimación como los de glucosa, que sí son precisos, con los de la bibliografía en medios fluidos. Afortunadamente, los coeficientes de difusión calculados en promedio para los cuatro tipos de conductos (ya que entre ellos ofrecían valores bastante similares) demostraron que tanto la glucosa [197] como la BSA [198] tenían una capacidad difusiva ligeramente mayor de lo que se ha registrado en otros experimentos con hidrogeles como PVA o derivados de PEG, ambos entrecruzados. Incluso en estudios con hidrogeles basados en

HA, se obtuvo coeficientes de difusión hasta un orden de magnitud más bajos [199]. Tan eficiente es la difusión a través del HA entrecruzado que, de no ser por las interacciones intermoleculares HA-glucosa y HA-BSA, ambas se desplazarían libremente como si difundiesen a través de agua (ver datos de [199,200]), a pesar de que el contenido de agua es moderado (60 - 70% en masa) en los conductos liofilizados. Este resultado es, pues, muy favorable, puesto que supone que cualquiera de los conductos estudiados es capaz de difundir a través de su pared y sin restricción moléculas como las que necesitan las células nerviosas para nutrirse, modular su comportamiento y comunicarse químicamente con el entorno.

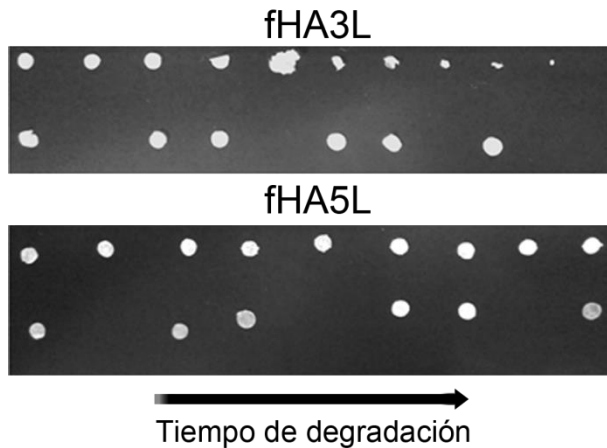


Figura 47. Muestras de fHA3L (arriba) y fHA5L (abajo) usadas en el ensayo de degradación enzimática, ordenadas de menor a mayor tiempo de degradación. En ambas imágenes, los discos de la segunda fila corresponden con muestras control sumergidas en DPBS sin enzima y tras los tiempos equivalentes de incubación.

La Figura 47 muestra el primer resultado del ensayo de degradación que se obtuvo, esto es, el aspecto de los discos fHA3L y fHA5L tras haber sido incubados diferentes tiempos en un medio tamponado con una concentración de enzima del orden de la fisiológica. Concretamente, se tomaron estas muestras pareadas de ejemplo porque eran aquellas entre las que se encontraron mayores diferencias a primera vista. Mientras que las muestras de fHA5L continuaron teniendo un tamaño similar al de los controles sin enzima (alineadas justo debajo de cada grupo) a lo largo del tiempo, los discos fHA3L, o al menos las partes de dichos discos cuyos efectos de la degradación seguían siendo insolubles, prácticamente desaparecieron en 16 días, tiempo correspondiente a la última muestra de la serie de fHA3L.

En cuanto a los discos fHA5L, las micrografías de SEM de la Figura 48 permiten apreciar que, si bien los discos mantenían su integridad estructural

y su forma original aparente, en realidad sí estaba teniendo lugar una erosión progresiva del polímero entrecruzado que provocaba un aumento en el tamaño de los poros producidos durante la liofilización. En este caso, los poros son de un tamaño considerable en origen porque los discos fHA5L no se liofilizaron sobre sustratos poliméricos hidrófobos sino sobre el vidrio de las placas Petri donde se vertió la mezcla madre. Teniendo esto en cuenta, el tamaño de los poros visible en la Figura 48A' se corresponde con el predicho por el experimento presentado en la Figura 34. Aun así, el hecho de que el disco HA5L siga conservando en esencia los mismos límites externos aparentes (a diferencia del HA3L) es muy interesante porque supone que la degradación va ampliando el tamaño de los poros sin fracturar por completo el disco ni descomponer fragmentos relativamente grandes. Desde el punto de vista del implante de un dispositivo basado en biomateriales, este comportamiento es óptimo, ya que la idea es que las células puedan alojarse a medio plazo en los poros y vayan produciendo matriz extracelular a medida que desaparece el material, sin que este se desprenda súbitamente por haber perdido integridad y arruine todas las uniones inmaduras y débiles que las células del huésped pudieran estar formando.

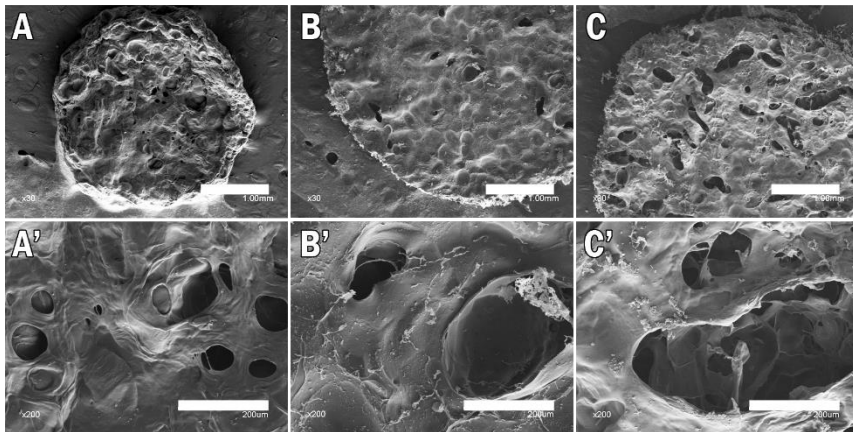


Figura 48. Micrografías de SEM de discos HA5L tras permanecer 0 (A), 16 (B) y 81 días (C) en el medio de degradación enzimática. A', B' y C' son detalles de la estructura porosa de A, B y C, respectivamente. Barras de escala: 1 mm (A, B, C) y 200 μm (A', B', C').

Analizando, además, los resultados expuestos en la Figura 49, se aprecia que la velocidad de degradación de los discos, en pérdida de masa por unidad de tiempo, variaba de manera apreciable y significativa con modificaciones de tan solo 0.5% de la composición de la mezcla madre de la que están producidos, aumentando ésta conforme se reducía la cantidad de HA en proporción. Las muestras fHA3L, fHA35L y fHA4L tardaron aproximadamente 18, 42 y 64 días en degradarse prácticamente por

completo (> 90% de la masa inicial), mientras que los discos fHA45L y fHA5L no degradaron más allá de un 35% y un 18% incluso tras 78 días de degradación.

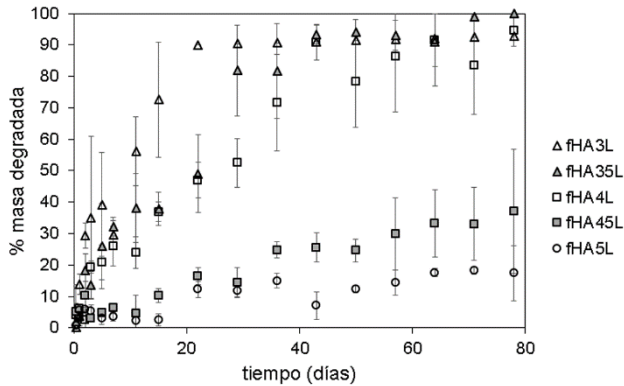


Figura 49. Porcentaje de masa degradada respecto del peso seco frente al tiempo de discos liofilizados de composición en la mezcla madre de entre 3 y 5%, a intervalos de 0.5%.

En realidad, en los sistemas biológicos vivos existen agentes químicos (como las chaperonas) que intervienen en el correcto acoplamiento y desacoplamiento de las enzimas y evitan que estas se saturan (se unan de manera irreversible al sustrato), por lo que es razonable que, al no estar presentes esos agentes secundarios en el medio de degradación enzimático usado, este fenómeno afectase de algún modo a la tasa de degradación, produciendo que esta decayese ligeramente conforme transcurría el tiempo. Sin embargo, este proceso debería afectar a todas las muestras por igual y, por tanto, no permite justificar el hecho de que haya una diferencia mucho mayor entre los discos fHA4L y fHA45L que entre cualquier otro par de muestras consecutivas. Así, parece evidente que hay una concentración de HA en la mezcla madre entre el 4 y el 4.5% que supone un punto crítico por encima del cual los conductos que se produzcan con dicha mezcla tendrán una resistencia considerablemente mayor a la degradación por enzimas de la familia de las hialuronidasas.

Teniendo esto en cuenta, se puede afirmar que se puede modular la velocidad de degradación de los conductos realizados a partir de HA entrecruzado y liofilizados tras gelificar con ligeras modificaciones en la proporción de HA que se usa para obtener el biomaterial final, y que se pueden obtener conductos estables que duren desde dos semanas hasta más de tres meses (probablemente no menos de 8 o 9, analizando la tendencia).

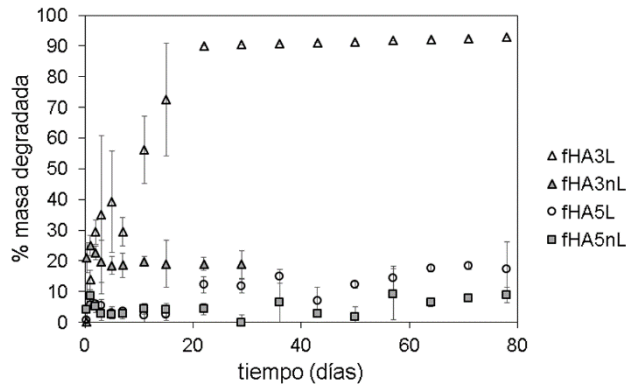


Figura 50. Porcentaje de masa degradada en el tiempo de discos fHA3L, fHA3nL, fHA5L y fHA5nL. De la muestra fHA3nL solo existen datos hasta los 28 días.

Gracias a la Figura 50 también se puede comparar el efecto que tiene el tipo de secado (liofilizado o al aire) sobre la velocidad de degradación, ya que se presentan los 4 tipos de muestras que se han venido estudiando de forma sistemática hasta ahora. Aunque de la Figura 49 se podía inferir que la cantidad de HA en la mezcla madre era un factor crítico, en el caso de los discos no liofilizados (fHA3nL y fHA5nL) este efecto parece no tener lugar o, al menos, estar mucho más atenuado. En apariencia, los primeros dos días las muestras fHA3L y fHA3nL presentaban un comportamiento similar, pero a partir de ese punto, la cantidad de masa degradada del grupo fHA3nL se estanca en un 20% del peso original perdido. Algo similar le sucede a los discos fHA5nL que, a diferencia de los fHA5L que van aumentando muy gradualmente su % de masa degradada, se estanca en valores inferiores al 10% prácticamente desde el comienzo y no presenta cambios que supongan una tendencia ascendente.

Se cree que el hecho de que a las muestras no liofilizadas no les afecte prácticamente el efecto de la concentración de HA en la mezcla madre de síntesis podría deberse al modo en que la enzima del medio produjo el ataque y la rotura de enlaces glucosídicos. En el caso de los discos fHA3nL y fHA5nL, como estos eran poco porosos el material se comportaba como una pieza maciza donde la enzima degrada sobre todo superficialmente el disco, lo que limitó mucho la superficie disponible e hizo que las moléculas de enzima tuvieran que competir por los lugares activos susceptibles de ser degradados, con lo que es normal que la tasa de degradación se estanque si las enzimas que iniciaron el ataque se llegaron a saturar. Puesto que, como ya se ha demostrado, la liofilización dio lugar a discos mucho más porosos, los discos producidos de este modo albergaban mucha más cantidad de solución de degradación en su interior y tenían mucha mayor área en contacto con el medio (alta superficie específica), lo que facilitó que



la enzima atacase las cadenas de HA entrecruzado a la vez en muchos puntos de los discos y que esta no fuera tan sensible a saturarse y restringirle el acceso al resto de moléculas de enzima (degradación generalizada o *bulk*).

Para concluir los resultados de este capítulo, se ha creído conveniente justificar que aunque, como se ha presentado en la Figura 28, se obtuvo satisfactoriamente conductos HA5L-PLLA introduciendo fibras de PLLA en conductos HA5L, no se usaron estos específicamente en el resto de ensayos porque las fibras no estaban asociadas ni física ni químicamente al conducto HA5L (solo estaban retenidas en su interior) y, por tanto, no se preveía que fueran a modificar los resultados de los experimentos. Asimismo, las pruebas mostradas en la Figura 33 se han considerado un argumento suficiente como para evidenciar que los conductos HA5L y oHA5L tenían propiedades equivalentes, ya que ambos se produjeron a partir de mezcla madre al 5% y fueron liofilizados y, por ello, no se han introducido tampoco como variable en la mayoría de los presentes experimentos. En el capítulo siguiente, sin embargo, sí se usarán para corroborar si sus propiedades específicas que los diferencian de los conductos HA5L les suponen una ventaja en cuanto a lo que a respuesta biológica se refiere.



3. Conclusiones

De los datos obtenidos en la primera parte del capítulo y de su correspondiente tratamiento se puede inferir que la reacción de entrecruzamiento de HA con DVS en medio básico y a temperaturas suaves (20 - 35 °C) alcanza en 11 min o menos tasas superiores al 99% de conversión. Aunque eso no significa que todos los grupos del HA susceptibles de reaccionar lo hagan y se haya demostrado que la DVS reacciona en paralelo consigo misma en las mismas condiciones ambientales, lo cierto es que el producto del entrecruzamiento de la mezcla madre al 5% es un gel estable, blando y traslúcido que parece un buen candidato para poder producir los conductos porosos acanalados.

Además, se ha obtenido un modelo matemático que describe con una precisión más que razonable el comportamiento de la reacción de gelificación del HA vía DVS. Gracias a este se ha descubierto que existe cierta preferencia de la DVS a reaccionar con las cadenas libres de HA o con otras moléculas de DVS, y que no genera enlaces covalentes de entrecruzamiento transcatenarios hasta que la reacción está muy avanzada, razón por la cual la viscosidad aumenta súbitamente a partir de cierto punto.

En cuanto a la caracterización de los diferentes tipos de conductos formados a partir de HA entrecruzado vía DVS una vez estos han sido sintetizados, se debe concluir, en primer lugar, que los dispositivos y moldes usados para tal fin permiten la elaboración de conductos blandos y porosos, de aspecto blanquecino, que tienen un conducto interno pasante a lo largo y de pequeñas dimensiones: de entre 1 y 2 mm de ancho y de longitud variable, de hasta 2 cm o algo más. También se corrobora que es posible introducir en el interior del conducto filamentos de PLLA sin que esto afecte a la estructura de los conductos y, además, que se pueden producir en otro tipo de moldes que les confieren forma cilíndrica, en lugar de la de conducto de sección cuadrada, la más convencional y cómoda para los ensayos de caracterización.

De acuerdo con dichos ensayos de caracterización, liofilizar los conductos en contacto con polímeros hidrófobos tras el entrecruzamiento de las cadenas de HA genera una estructura que se ha denominado pared porosa tricapa, ya que produce cavidades interconectadas de varias decenas de micras en el interior y dos estratos con poros de un tamaño menor en el estrato en contacto con la parte interna y externa del conducto, como si recubriesen el interior. Este fenómeno es característico del proceso de liofilización porque no ha sido identificado en conductos secados al aire donde, además, se obtiene como resultado una estructura más continua y



rugosa, con una porosidad menor y, por tanto, con menor compactación de las cadenas de polímero que componen la red tridimensional entrecruzada.

Asimismo, aumentar la concentración de HA en la mezcla madre hasta un 5% produce conductos con capacidad para soportar cargas de mayor magnitud a bajas deformaciones y para retener menos proporción de agua al hinchar que sus homólogos sintetizados a partir de mezcla madre al 3%, si bien es cierto que es el proceso de liofilización el que evita que la captación de agua se traduzca en un aumento considerable de tamaño de los conductos, ya que genera conductos más estables y resistentes.

A pesar de captar menor cantidad de agua, la pared de los conductos liofilizados no supone ningún obstáculo para la difusión de nutrientes celulares y moléculas bioactivas a su través gracias a su altísima porosidad, aunque el origen natural del compuesto principal de la red tridimensional, el HA, hace que esta pueda interactuar con proteínas y otras macromoléculas, tal y como lo hace el mismo HA en el organismo. Todos los conductos estudiados permiten, sin embargo, el paso de dichas sustancias a una velocidad del orden de la que las mismas difunden en algunos líquidos como disoluciones acuosas.

El entrecruzamiento químico de las cadenas de HA, aunque modifica parcialmente la composición y genera nuevos enlaces estables, no afecta al hecho de que los conductos sean biodegradables, como lo son también las cadenas de HA autólogas del organismo. Sólo los conductos liofilizados tienen la capacidad de modular su velocidad de degradación en ambiente fisiológico entre 16 días y bastante más de 3 meses con pequeñas variaciones en su composición en HA, aunque por debajo de 4.5% la degradación podría actuar de modo que los conductos pierdan demasiado rápido su integridad estructural y su forma.

Todos los resultados apuntan, pues, a que los conductos producidos a partir de concentraciones de HA en la mezcla madre más elevadas poseen las propiedades óptimas de entre los factores estudiados, sobre todo aquellos que se liofilizan en contacto con polímeros hidrófobos como el PTFE y la PCL, de acuerdo al uso último que se le quiere dar al conducto como dispositivo biodegradable implantable en el organismo. Ahora bien, precisamente porque el objetivo está relacionado con la regeneración de tejidos, los resultados del siguiente capítulo, relacionados con la respuesta conducto-células, podrían tener un peso decisivo a la hora de determinar qué factores se deben utilizar para maximizar el impacto de los conductos porosos.





CAPÍTULO IV
OBTENCIÓN DE VAINA DE
CÉLULAS DE SCHWANN





1. Resumen

El presente capítulo presenta para su discusión los resultados de los experimentos con cultivos celulares *in vitro* que se han llevado a cabo con células de Schwann como modelo de células neurales, para analizar su respuesta en contacto con los conductos desarrollados en este trabajo desde el punto de vista del tipo de interacciones bioquímicas que desarrolla con estos y de su pronóstico a medio y largo plazo.

Más concretamente, se usan para ello los ensayos que determinan qué factores de síntesis de los conductos son óptimos para la viabilidad y el destino celular de las SC en el interior de estos, si los residuos de degradación suponen un estímulo (positivo o negativo) para sus procesos metabólicos y la permeabilidad de la pared del conducto de HA5L, para evaluar si la pared porosa tricapa permite retener las SC en el lumen y evitar provisionalmente que células del exterior invadan el conducto. También se incluyen los experimentos que tienen como fin caracterizar la formación de la macrovaina de SC, así como sus dimensiones, sus propiedades, su composición, si es un manto continuo a lo largo de todo el conducto y el fenotipo de las células que lo componen.

En los apartados 4 y 5 del Capítulo II: Materiales y métodos se puede consultar la descripción detallada de los procedimientos de las dos partes en las que se han dividido los experimentos, respectivamente.





2. Resultados y discusión

Previamente a desarrollar experimentos complejos de caracterización biológica, se analizó los resultados del ensayo MTS de viabilidad celular de SC cultivadas en el interior de conductos HA3L, HA3nL, HA5L y HA5nL de la Figura 51 para discriminar los factores más favorables para las células y seleccionar el grupo o grupos de conductos que pudiesen suponer un nicho amigable para las SC a corto y medio plazo.

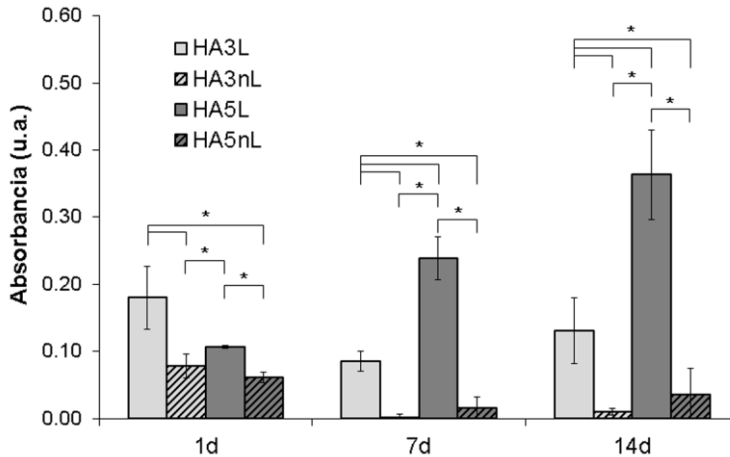


Figura 51. Ensayo MTS de viabilidad de SC cultivadas 1, 7 y 14 días en el interior de conductos HA3L, HA3nL, HA5L y HA5nL. Las barras representan el valor promedio de absorbancia (unidades arbitrarias) \pm desviación típica. Los pares de datos con diferencias estadísticamente significativas se indican con un asterisco.

Tras 24 h de la siembra, la densidad celular en el interior de los diferentes tipos de conductos era bastante similar. Si acaso, los conductos HA3L destacaron con un número de células algo mayor, lo que podría deberse a que estos debían poseer una topografía en su lumen que evitaba que las células recién sembradas, de morfología redondeada y poca capacidad de anclaje, desbordasen del interior del conducto, cosa que quizá sí pudo suceder tras añadir medio fresco tras la siembra en el resto de muestras.

Sin embargo, a partir del siguiente tiempo de estudio, tras 7 días de cultivo, las diferencias se acentuaron radicalmente y se puede ver cómo las únicas SC que realmente presentaban una tasa de proliferación positiva eran aquellas sembradas en los conductos HA5L, situación que se extendía hasta los 14 días de manera más o menos proporcional. Las muestras HA3L lograron, si acaso, mantener una densidad celular similar a la inicial, pero sin tener un pronóstico especialmente favorable. En cuanto a los conductos HA5nL y HA3nL, la viabilidad celular de las SC sembradas en su interior

decaió hasta menos de la mitad en el primer caso y hasta prácticamente 0 en el segundo, y esta situación parecía mantenerse en el tiempo a medio plazo.

De manera paralela, el ensayo LIVE/DEAD realizado sobre SC cultivadas 14 días en el interior de los mismos tipos de conductos que en el anterior, mostró resultados equivalentes (Figura 52). Mientras que apenas se observaron células (ni vivas ni muertas) en el interior de los conductos HA3nL o HA5nL, y algunas de las que se veían aparecían muertas en rojo (Figura 52A y C), ambos conductos liofilizados presentaban una cantidad muchísimo mayor de núcleos con el citoplasma destacado en verde (células vivas y viables). A pesar de eso, también existían diferencias entre estos dos, ya que las células en el lumen de los conductos HA3L parecían estar agrupadas en cúmulos algo más discontinuos y una pequeña fracción de las células aparecían rojas (Figura 52B), mientras que en el caso de los HA5L las células parecían cubrir por completo el lumen y era difícil distinguir alguna traza de marcas del homodímero de etidio en rojo (Figura 52D).

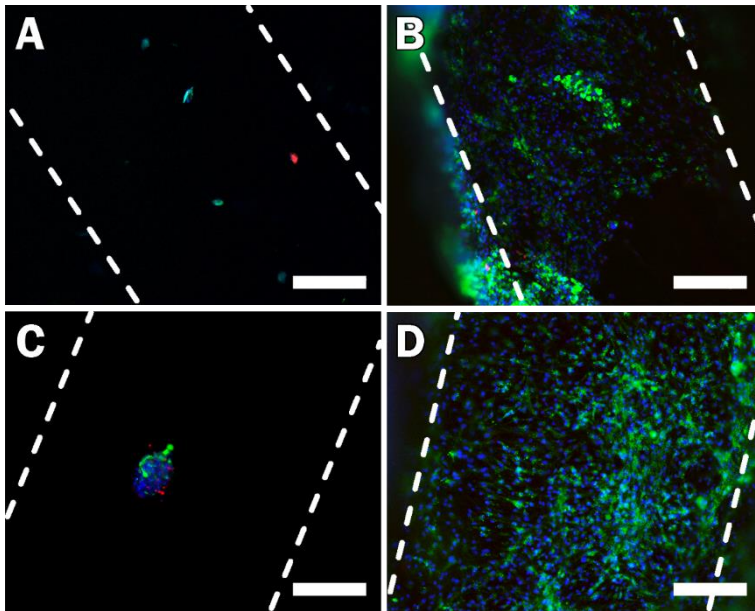


Figura 52. Imágenes de microscopía de fluorescencia de SC cultivadas durante 14 días en el interior de conductos HA3nL (A), HA3L (B), HA5nL (C) o HA5L (D), y teñidas con calceína AM (verde) y homodímero de etidio (rojo). Los núcleos celulares también se teñieron con DAPI (azul). Las líneas discontinuas delimitan los contornos del lumen. Barra de escala: 200 μ m.

Aunque es cierto que de la Figura 51 y la Figura 52 se puede inferir un cierto efecto positivo de la concentración de mezcla madre del 5% en cuanto a viabilidad celular, en detrimento de los conductos con menor contenido de



HA, lo más destacable de dichos resultados es el espectacular incremento que sufren las células en su población al liofilizar los conductos en el interior de los cuales se van a cultivar, sobre todo teniendo en cuenta que parecen no llegar al interior del conducto, una de las principales diferencias estructurales entre ambos tipos de conducto. Aun así, y aunque los conductos HA3L parecen mantener la densidad de siembra a lo largo del tiempo, lo que es un resultado razonablemente positivo, la proporción del 5% de HA en la mezcla madre unida al proceso de liofilización parece conferirle a los conductos HA5L, o al menos a su superficie interna, unas propiedades especiales que incitan a las células a reproducirse y asociarse entre ellas, al igual que tienden a hacerlo en un organismo vivo cuando intenta reparar tejido dañado.

En realidad, al realizar los primeros experimentos *in vitro* con las SC se guardaba cierto recelo con respecto a la capacidad que tendrían las células para anclarse y reconocer el HA entrecruzado como un sustrato amigable sobre el que sustentarse e iniciar las funciones metabólicas normales. Por una parte, ya se ha alegado anteriormente que el HA sin entrecruzar podría ser utilizado por el organismo para limitar las adhesiones celulares en determinados procesos [113], razón por la cual ha sido usado en tratamientos clínicos para prevenir la formación de tejido cicatricial y evitar que se formen uniones entre órganos tras una intervención invasiva [122]. Pero además, se sospecha que las modificaciones químicas del entrecruzamiento de HA podrían alterar algunas de las rutas metabólicas en las que este interviene y que presentan la gran mayor parte de las células en los mamíferos. En la actualidad se sabe [201,202] que de los aminoácidos que componen las isoformas del receptor transmembrana CD44 hay dos secuencias arginina-tirosina (la Arg41-Tyr42 y la Arg78-Tyr79) que son esenciales para generar el sitio de unión HA-CD44 y otros sectores (Lys38, Tyr105, Arg150...) que no intervienen en la unión pero actúan de señal transmembrana (Tabla 9). Aunque no se conocen con exactitud las conformaciones relativas entre las secuencias fundamentales de unión y las cadenas de HA de mínima energía (y estudiarlo requeriría software bioinformático de dinámica molecular muy potente), sí se puede comprobar fácilmente que tanto la arginina como la tirosina tienen ramificaciones laterales relativamente largas y apolares con el extremo polar. Como el grupo metilol (bastante polar) de las cadenas de HA es el más susceptible de ser atacado por los vinilos de la DVS y, por tanto, se transforma químicamente en un enlace tipo éter, es razonable pensar que el HA entrecruzado vía DVS puede no interactuar del mismo modo con el CD44 de las células de las inmediaciones.



Tabla 9. Tabla resumen de secuencias residuales de la región extracelular del receptor CD44 y sus correspondientes funciones predichas. En el residuo Arg-41 hay una errata del autor. Extraída de [188].

Residue	HA binding	Three-dimensional structure	Not important
Phe-34		X	
Lys-38	X		
Ang-41	X		
Tyr-42	XX		
Arg-46			X
Lys-54			X
Gln-65		X	
Lys-68	X		
Arg-78	XX		
Tyr-79	XX		
Asn-100	X		
Asn-101	X		
Tyr-105	X		
Ser-112			X
Tyr-114			X
Phe-119		X	

Todas estas consideraciones podrían ser la causa de que las SC apenas se adhiriesen y proliferasen en el interior de conductos HA3nL y HA5nL (Figura 51 y Figura 52), que *a priori* no proporcionaban más que un sustrato continuo y rugoso, hidrófilo, y con grupos químicos expuestos de baja afinidad para ellas. El hecho de que, por el contrario, las células se hayan adaptado razonablemente bien al lumen de los conductos liofilizados, llegando a crecer a una velocidad más que aceptable en el caso de los HA5L, parece indicar que la especial topología microporosa obtenida de este modo era favorable para que las SC encontrasen, de algún modo, anclaje suficiente para desempeñar adecuadamente sus funciones basales.

En la Figura 53 se muestra el resultado obtenido en el experimento de citotoxicidad de los residuos de degradación enzimática del HA entrecruzado, que se consideró, junto con la proliferación celular en el interior de los conductos, una etapa clave para desvelar si la respuesta de las SC en contacto con los conductos de HA entrecruzado sería suficientemente favorable como para poder plantearlos como una estrategia realista para su uso en ingeniería tisular.

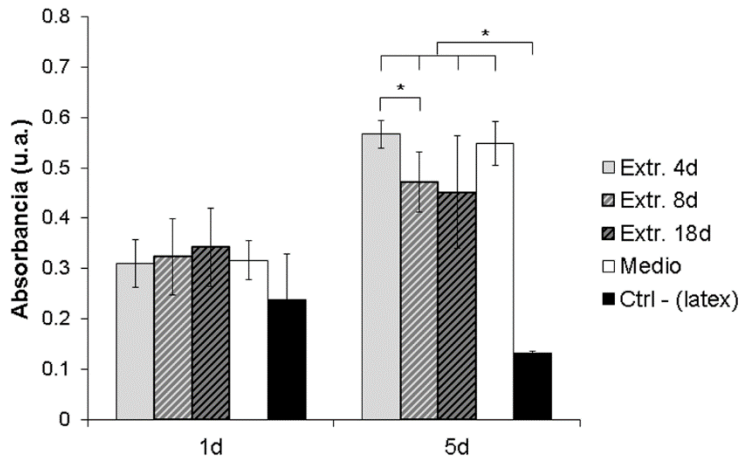


Figura 53. Ensayo de citotoxicidad indirecta con SC cultivadas 1 y 5 días con diluciones 1:5 de extractos (Extr.) del medio de degradación enzimática de discos fHA3L tras 4, 8 y 18 días, de DPBS en contacto con látex (Ctrl -) y de DPBS solo (Medio). Las barras representan el valor promedio de absorbancia (unidades arbitrarias) \pm desviación típica. Los pares de datos con diferencias estadísticamente significativas se indican con un asterisco.

En ella se puede diferenciar claramente el grupo de las SC que fueron cultivadas con una dilución 1:5 de DPBS con extracto de látex en medio de cultivo de células de Schwann del resto, aunque tales diferencias se magnifican considerablemente a los 5 días. Las SC cultivadas de este modo (usadas como control negativo) fueron las únicas que redujeron su población en el intervalo estudiado, ya que el resto de grupos experimentó un aumento de entre el 50 y el 100% en absorbancia, aunque no se pudo determinar la significancia estadística del aumento entre 1 y 5 días en el caso del medio que contenía extracto de solución de degradación enzimática tras 18 días de degradación. En cualquier caso, tras 5 días de cultivo todas las SC cultivadas con medio con extracto del experimento de degradación ofrecieron un resultado muy similar al control positivo, constituido únicamente por DPBS y medio de cultivo de células de Schwann. De ello se puede deducir que los residuos de degradación enzimática mediada por hialuronidasas del HA entrecruzado vía DVS no producen ningún efecto significativo sobre la proliferación de las SC. Cabe destacar que, si bien al repasar el estado del arte se ha enunciado que el propio organismo utiliza los residuos de degradación de HA para autorregular algunas funciones, como se han entrecruzado las cadenas de HA había que ser especialmente cautelosos con los residuos predichos, ya que estos probablemente no estimularían las mismas rutas metabólicas y además contendrían grupos químicos, como la sulfona, que provienen de un reactivo tóxico de base, como lo es la DVS [203]. Por tanto, se considera este un resultado

especialmente favorable para la integración de los conductos a medio y largo plazo.

Todos estos resultados, junto con los que ya se han discutido en el punto 2.2. *Caracterización de los conductos acanalados porosos* del Capítulo III, llevó a seleccionar los conductos HA5L como los sistemas con los parámetros óptimos para realizar ensayos más específicos sobre sistemas optimizados (como el HA5L-PLLA) que intentasen mejorar aún más la capacidad proliferativa de las células y, sobre todo, guiar su migración y crecimiento de modo que, en último término, las neuronas puedan elongar eficientemente sus axones a lo largo del interior de los conductos de manera protegida.

Los resultados del primero de estos ensayos, el de viabilidad de SC sobre sustratos de HA entrecruzado y PLLA con diferentes morfologías tras 1, 5 y 10 días, se muestran en la Figura 54. Previamente al análisis de la figura, cabe recordar que el film de HA se produjo de manera muy similar a las muestras fHA5nL, que el film de PLLA se fabricó por *solvent casting*, que las fibras de PLLA son las mismas que las introducidas en el conducto HA5L-PLLA y que el control era un cubreobjetos de vidrio, un sistema muy utilizado como control positivo para proliferación celular.

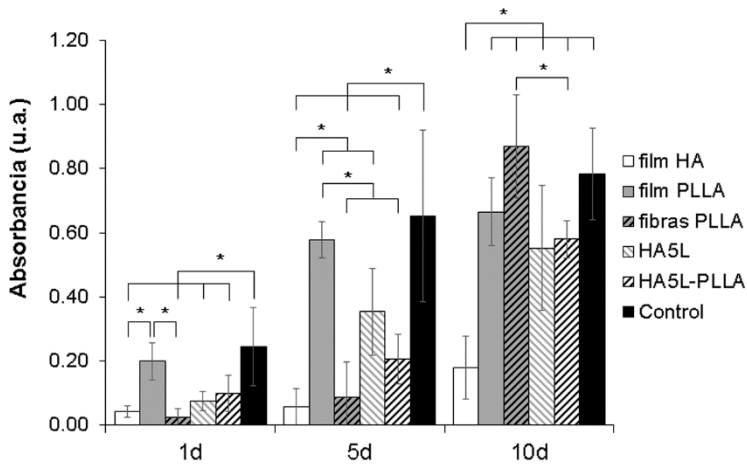


Figura 54. Ensayo MTS de viabilidad de SC cultivadas 1, 5 y 10 días sobre films de HA y PLLA, sobre fibras de PLLA, sobre un cubreobjetos (Control) y en el interior de conductos HA5L y HA5L-PLLA. Las barras representan el valor promedio de absorbancia (unidades arbitrarias) \pm desviación típica. Los pares de datos con diferencias estadísticamente significativas se indican con un asterisco.



En primer lugar llama la atención la diferencia que aparece a lo largo de los días entre la viabilidad de las SC cultivadas en los films, ambos sustratos bidimensionales. Mientras que el film de PLLA es el único grupo que mantuvo una densidad celular similar al control en todos los tiempos, las células sobre el film de HA apenas alcanzaron a proliferar marginalmente hasta un valor de absorbancia 4 veces inferior a los otros a los 10 días. Sin embargo, los conductos HA5L y HA5L-PLLA sí llegaron a alcanzar niveles de viabilidad celular del mismo orden que el control positivo, a los 5 días en el caso de los conductos HA5L y a los 10 días para las muestras HA5L-PLLA (o, al menos, las diferencias entre los grupos no eran estadísticamente significativas). Esto supone que, aunque efectivamente el HA entrecruzado no es un biomaterial sobre el que las células se sientan atraídas a adherirse y proliferar, al modificar la estructura de este y crear un entorno cerrado y cilíndrico con microporos, las SC alojadas pueden crecer de manera similar a cómo lo hacen en sustratos como el vidrio o el PLLA, ambos considerados amigables para las células en general. Estos resultados vienen a apoyar las hipótesis antes deducidas al discutir los datos de la Figura 51.

Es también reseñable el aumento en la población que experimentan las células sobre las fibras de PLLA ya que, aunque a los 5 días la lectura tan solo fue de en torno a 0.1 unidades de absorbancia, solo 5 días después consiguen alcanzar un valor (promedio) incluso superior al del control positivo. En este caso, al igual que en el del film y los conductos de HA entrecruzado, puede que la baja densidad inicial no sea efecto de una mala respuesta en la proliferación inicial o una alta tasa de muerte en las primeras horas, sino más bien de la mala adhesión de los sistemas sobre los que se siembra. En el caso del HA entrecruzado, puesto que ya se ha visto que la adhesión celular no se ve precisamente favorecida ni acelerada, es probable que una fracción de las células sembradas se vieran desplazadas, por ejemplo, por los flujos de corriente de la adición de medio al pocillo de la placa de cultivo y acabasen fuera del material incluso antes de poder anclarse. Las fibras de PLLA podrían haber sufrido un sino similar, aunque en este caso no por la baja adhesión (que, como se aprecia, es buena) sino por la forma de las fibras, ya que es muy complejo que las SC, que son pseudoesféricas al sembrarlas, se asienten adecuadamente sobre una superficie curva como lo son las fibras cilíndricas. La prueba de que podría tratarse de este fenómeno está en que, las SC que sí logran adherirse entre los días 1 y 5 sufren finalmente un espectacular aumento en su población.

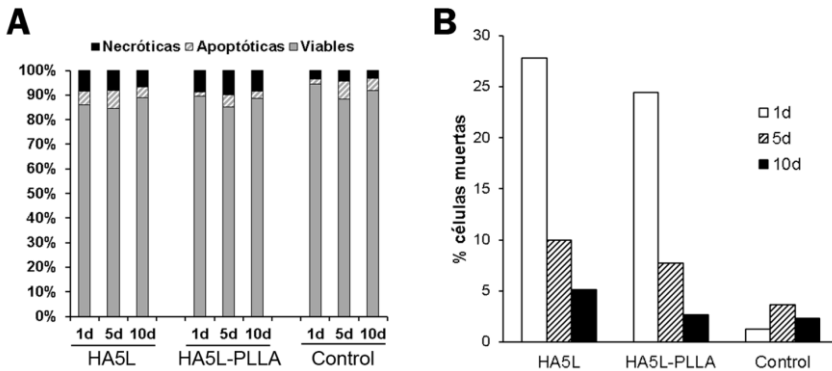


Figura 55. Resultados cuantitativos de los análisis por citometría de flujo de las SC teñidas de Anexina V FITC y Yoduro de propidio (A) y de homodímero de etidio (B) tras ser cultivadas 1, 5 y 10 días en el interior de conductos HA5L y HA5L-PLLA y sobre cubreobjetos de vidrio (Control). A es un diagrama de barras apiladas y carece de rótulo del eje de ordenadas.

En la Figura 55 se presentan los datos obtenidos a partir de los diagramas de los dos ensayos de citometría de flujo que se llevaron a cabo con SC cultivadas en el interior de conductos HA5L y HA5L-PLLA y sobre cubreobjetos de vidrio como control positivo. En la primera (Figura 55A), se puede ver la proporción de células, de entre las consideradas “vivas”, si bien las apoptóticas y necróticas tienen un pronóstico más desfavorable, las primeras porque han activado sus mecanismos de muerte celular programada y las segundas porque contienen algún defecto en la membrana prácticamente irreversible. De todos modos, el porcentaje de SC necróticas y apoptóticas se mantiene a lo largo del tiempo en el intervalo del 4 - 9% y del 2 - 6%, respectivamente, para todos los grupos ensayados, aunque las SC cultivadas sobre el cubreobjetos parecen tener un porcentaje de células necróticas sutilmente menor que los conductos. En cuanto a la proporción de células consideradas muertas (Figura 55B), los conductos parecían contener en torno a una cuarta parte de las SC de su interior en este estado, aunque con el transcurso de los días dicha proporción iba disminuyendo hasta alcanzar prácticamente una proporción de células como la que mantienen de manera casi constante las SC sobre el control positivo, inferior al 5%.

Para evitar incurrir en un error de interpretación, se deben plantear varias consideraciones en este punto. Por una parte, aunque el homodímero de etidio y el yoduro de propidio son ambos agentes intercalantes de ácidos nucleicos como el DNA, existen diferencias razonables entre la estructura química de ambos y cómo responden ante luz fluorescente [204]. Además, el primero es un dímero y, por tanto, bastante más grande que el PI, por lo que, al igual que sucede al usar un intercalante de DNA con diferente isomería [205], los mecanismos de transferencia y acople son más



complejas en los compuestos de mayor peso molecular. Se cree, por tanto, que el PI podría acceder con mayor facilidad al interior de la membrana celular y acoplarse más fácilmente a ácidos nucleicos aún con conformación tridimensional compleja, por lo que podría revelar estadios iniciales de necrosis. El homodímero de etidio, en contraste, parece requerir que la membrana se encuentre seriamente dañada y que el DNA haya perdido parcialmente su estructura de doble hélice para emitir la intensidad de fluorescencia suficiente, por lo que se le asocia con etapas más tardías de la necrosis o incluso la apoptosis celular, donde la célula pierde su integridad y se considera muerta porque ninguna de sus partes es capaz de realizar las funciones metabólicas basales.

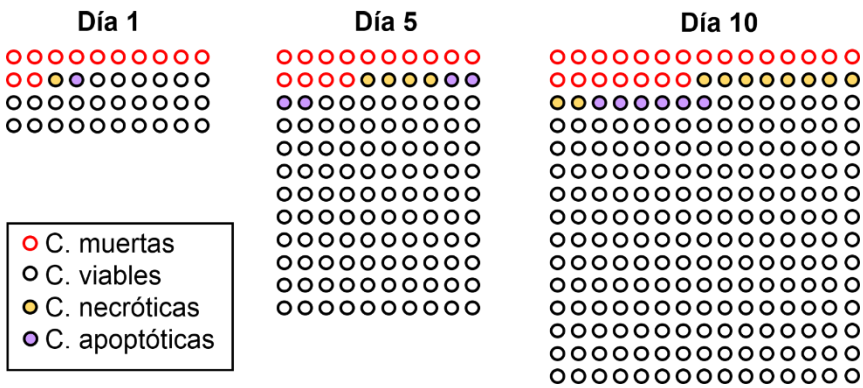


Figura 56. Representación esquemática de las proporciones de SC consideradas muertas, viables, necróticas o muertas a los 1, 5 y 10 días en el interior de un conducto HA5L intentando respetar los datos obtenidos en los ensayos de viabilidad MTS y de citometría de flujo. Se consideran “vivas” las células viables, necróticas o apoptóticas.

Por otro lado, ateniéndose a los resultados de la Figura 54 y la Figura 55, podría parecer que se llega en algunos casos a contradicciones. Pero cabe recordar que en el ensayo de viabilidad MTS las células muertas no son consideradas, al igual que tampoco lo son al tñirlas con Anexina V FITC y PI, ya que se discriminan estas de los diagramas obtenidos como resultado de la citometría (en la Figura 55A, el 100% no recoge a todas las células presentes, sino a todas las células vivas con marcaje fluorescente). Para justificar mejor que todos los resultados son coherentes entre sí, se representa en la Figura 56 un esquema equivalente del número de células presentes en un conducto HA5L tras 1, 5 y 10 días que respeta razonablemente bien las proporciones encontradas en los ensayos a los que se ha referido.

Como se ve, en un primer momento coexisten células muertas con células vivas en una proporción de en torno al 30%, pero dicha tasa se va reduciendo hasta un valor inferior al 10% al cabo de 10 días, no necesariamente porque

desaparezcan las células muertas, sino también porque aumenta la población de vivas en un orden de magnitud. Además, una parte de las células necróticas y apoptóticas, cuyo destino a corto plazo es convertirse en células muertas, parecen hacerlo, de modo que aumenta un tanto el número absoluto de células de este tipo, de acuerdo con el diagrama (Figura 56).

En cuanto al hecho de que aparezcan inicialmente (día 1) tantas células “no vivas” en el interior de ambos tipos de conductos a pesar de que parecen favorecer la viabilidad y proliferación celular, podría deberse en realidad a que dichas SC (o una parte de ellas) estuvieran en realidad muertas en el momento de la siembra debido a procesos de acción mecánica como la centrifugación o la resuspensión del *pellet*. Obviamente, también existiría dicha proporción durante la siembra de los cubreobjetos usados como control positivo, pero las SC muertas, como no tienen capacidad para generar asociaciones célula-material a través de sus integrinas, se suspenderían en el medio de cultivo. Una parte grande de las SC muertas sembradas en el interior de los conductos, sin embargo, podrían haber quedado retenidas en el lumen por ser este cilíndrico y alargado y no verse especialmente afectado, por ejemplo, por las corrientes de fluido producidas por el cambio de los medios de cultivo. Así, aún aparecerían como células muertas en los ensayos de citometría de flujo.

Uno de los objetivos que se pretendía lograr mediante el diseño y producción de este tipo de conductos de HA entrecruzado era lograr una estructura que aislase físicamente el interior del exterior (salvo por los extremos del canal interno) para evitar que células gliales implantadas y los axones que pudiesen crecer dentro se vieran afectados por la respuesta inmunoinflamatoria de la microglía, los astrocitos reactivos y otras células del huésped. Por tanto, el resultado de los ensayos *in vitro* que se hizo para validar la impermeabilidad celular de la pared de los conductos, a pesar de ser sencillo de llevar a cabo, tenía gran interés.

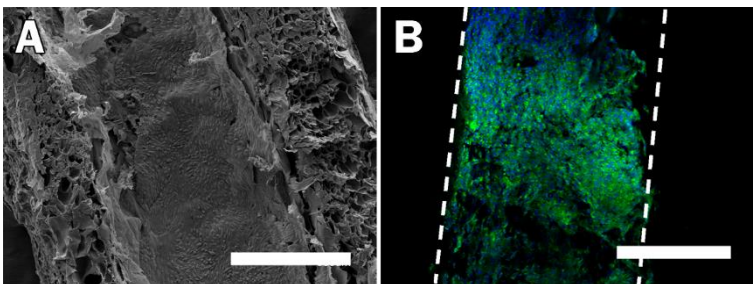


Figura 57. Imágenes de SEM (A) y microscopía CLSM (B) de cortes longitudinales de conductos HA5L con SC cultivadas 10 días en su lumen, teñidas con DAPI y falacidina. Las líneas discontinuas delimitan el contorno del lumen del conducto. Barras de escala: 200 μm .



De las imágenes que se tomaron mediante SEM y CLSM de cortes longitudinales de conductos HA5L con SC sembradas y cultivadas en el interior durante 10 días (Figura 57), se pudo deducir que el crecimiento y migración de las SC se restringía a los límites del lumen de los conductos (la capa interna de la pared porosa tricapa), ya que en ninguno de los cortes longitudinales realizados se observó ninguna célula que hubiese penetrado a la matriz interna, de cavidades mucho mayores (la capa intermedia), a pesar de que en la tinción de DAPI y falacidina revelaba con mucha facilidad la presencia de células por ofrecer luz fluorescente sobre un fondo negro.

Lo que en la Figura 57B puede parecer una discontinuidad en la capa de células que recubría el lumen del conducto (que iría en contra de resultados como la Figura 52D), no era en realidad más que una parte del manto de SC que se desplazó durante la manipulación y el corte y se plegó cayendo sobre el resto de SC. Aunque se dispone de otras imágenes similares donde sí se aprecia el recubrimiento celular completo (la misma Figura 57A), con la Figura 57B se ha querido representar un fenómeno que se identificó en más de una ocasión durante la manipulación de los conductos con células cultivadas y cortados, cómo si las células hubiesen formado una capa densa entre sí pero hubiesen mantenido uniones célula-material débiles y fáciles de deshacer, las suficientes para permanecer adheridas al sustrato.

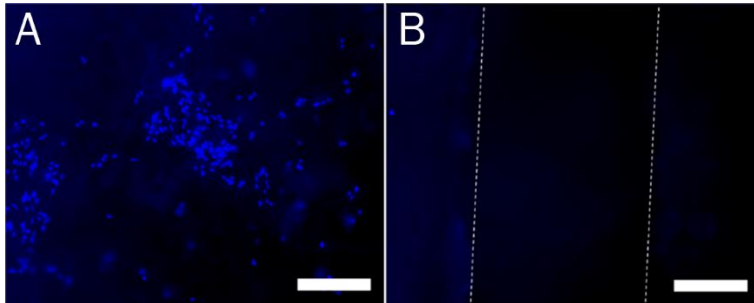


Figura 58. Imágenes de microscopía de fluorescencia de SC cultivadas 5 días en el exterior de un conducto HA5L y teñidas con DAPI (A) y corte transversal de dicho conducto. Las líneas discontinuas demarcan los límites del lumen. Barra de escala: 200 μ m.

La Figura 58 presenta las imágenes de microscopía de fluorescencia de la segunda parte de la prueba de la impermeabilidad celular, aquella que se llevó a cabo para intentar determinar si las SC sembradas en el exterior del conducto (capa externa) podían migrar y penetrar a través de la pared y alcanzar el interior del conducto. Aunque, tras 5 días de cultivo, las SC habían crecido bastante en el exterior del conducto (multitud de núcleos presentes en la Figura 58A), tan solo se identificó, en 1 de los 3 cortes longitudinales de conductos HA5L sobre los que se llevó a cabo el ensayo, un núcleo celular



marcado con DAPI a unas 200 μm del lumen (margen izquierdo de la Figura 58B).

Por tanto, se puede razonar a tenor de las imágenes descritas que, tanto la capa interna como la capa externa de la estructura denominada pared porosa tricapa, formada como ya se ha visto por efecto de la suficiente cantidad de HA en la mezcla madre y por liofilizar los conductos una vez gelificados, sirven de barrera física para evitar el tránsito de células a través de la pared del conducto al menos durante los primeros días, a pesar de tener microporos en su estructura, si bien estos son menores que el tamaño promedio de una SC de rata como las cultivadas.

Precisamente a raíz de experiencias durante el manejo de las muestras como los de la Figura 57B, se llegó a la conclusión de que las SC podían estar formando una estructura singular y de considerables dimensiones. Los experimentos que se realizaron con el fin de identificar el modo en que se formaba lo que se denominó “macrovaína” o “vaína de SC”, así como la caracterización biológica de las SC que la forman, constituyen la segunda parte de este capítulo.

El primero de los ensayos llevados a cabo fue el de la formación de la vaína de SC, cuyos resultados se encuentran en la secuencia temporal de la Figura 59. En ella, se pueden ver destacados los núcleos de las SC en azul (DAPI) y su citoplasma en verde (falacidina), así como los trazos de las regiones donde las SC estaban en contacto con la pared interna del conducto (líneas discontinuas blancas). Estos contactos célula-material se determinaron gracias a las imágenes de luz blanca que también se tomaron de los cortes transversales y que permitían ver los contornos del conducto, disponibles en el conjunto de imágenes originales, pero no presentadas en la Figura 59 porque dificultaban la interpretación. Gracias al trazado de dichos conductos se pudo cuantificar la proporción de área del lumen cubierta por las células (% del perímetro de la superficie interna con contactos célula-material).

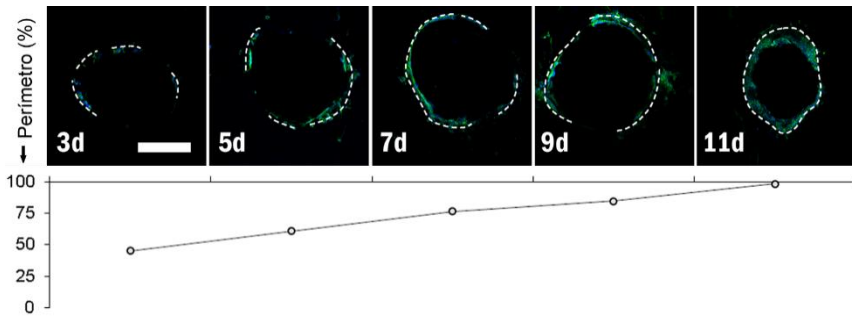


Figura 59. Secuencia temporal de imágenes de CLSM de cortes transversales de conductos HA5L con SC cultivadas 3, 5, 7, 9 y 11 días en su lumen y teñidas con falacidina (verde) y DAPI (azul). Las líneas discontinuas blancas definen las zonas donde se identificó contactos entre las SC y el lumen del conducto. El diagrama inferior representa el perímetro del lumen con contactos célula-material (en %). Barra de escala: 200 μ m.

Como se puede deducir de la proporción de perímetro de lumen cubierto por las células (diagrama inferior de la Figura 59), las SC van ocupando una sección cada vez mayor de la superficie disponible para expandirse y proliferar con el transcurso del tiempo. Durante los primeros días se limitan a formar pequeños cúmulos aislados, que se entiende que serían más frecuentes allí donde las células sembradas precipitaban por gravedad. A los días 7 y 9 se puede observar cómo los grupos aislados han entrado en contacto y comienza a formarse una capa de células aparentemente más gruesa y con las células más extendidas (mayor cantidad de verde, lo que supone que las células han expandido su citoesqueleto). Entre los 9 y los 11 días la formación de una capa de SC que cubre todo el perímetro del lumen tiene lugar y el espesor de la vaina parece aumentar aún más.

Por su parte, tanto la morfología como el fenotipo de las SC que componían la macrovaina formada en el lumen de los conductos HA5L se puede estudiar en detalle gracias a los resultados que se exponen en la Figura 60 y la Figura 61. En la primera, se muestra, mediante microfotografías de SEM, la morfología de las SC cuando estas proliferan sobre un cubreobjetos de vidrio, sobre el lumen de conductos HA5L o HA5L-PLLA (Figura 60B o C, respectivamente) o sobre las fibras de PLLA de un conducto HA5L-PLLA, todas ellas tras 10 días de cultivo en las mismas condiciones.

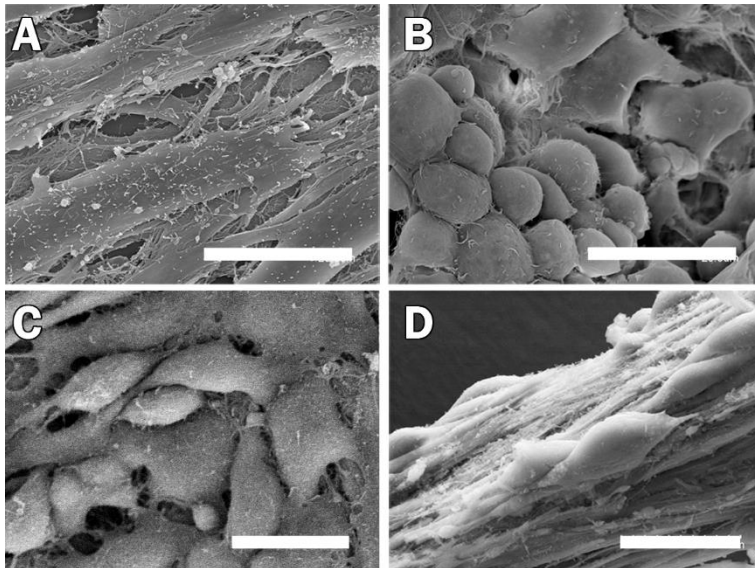


Figura 60. Micrografías de SEM de SC cultivadas 10 días sobre un cubreobjetos de vidrio (A), en el lumen de un conducto HA5L (B), en el lumen de un conducto HA5L-PLLA (C) o sobre una fibra de un conducto HA5L-PLLA (D). Barras de escala: 20 μ m.

Teniendo en cuenta que la barra de escala de todas las imágenes de la Figura 60 es de la misma magnitud, se evidencian con claridad las diferencias entre los entornos 2D y 3D para la morfología de una célula proliferativa, a pesar de que en este caso los sustratos “tridimensionales” no aportan estrictamente un contexto idéntico en todas las direcciones del espacio, sino simplemente cierta curvatura, rugosidad y microporos. Las SC que crecieron sobre un cubreobjetos plano (Figura 60A), aparecían aplanadas y con el citoesqueleto muy extendido para llegar a cubrir una gran extensión. En esta situación, las células tienen mucha superficie para establecer contactos entre ellas y es habitual que acaben formando monocapas que restringen el acceso a nutrientes a las células inferiores. Sin embargo, sobre el lumen de los conductos (Figura 60B y C) las SC crecieron más abombadas y voluminosas, cubriendo menos área, afirmación que se puede extender a las que proliferaron sobre fibras de PLLA en el interior del lumen (Figura 60D). El hecho de que apareciesen más redondeadas, sin embargo, no es signo indicativo de un entorno nocivo, como podría parecer, ya que se aprecian multitud de procesos celulares que se emiten desde las SC para descansar sobre otras células o sobre el material. Es también destacable el hecho de que no había diferencias importantes entre las SC cultivadas en el lumen de conductos HA5L o HA5L-PLLA a pesar de la presencia de las fibras y de que las SC que crecieron sobre dichas fibras parecían elongar sus somas preferentemente en la misma dirección que la longitud de estas.

Es un hecho ampliamente conocido en la ingeniería tisular que los estudios que se realizan *in vitro* sobre sustratos bidimensionales no presentan la misma morfología ni la misma expresión génica que las mismas células en un entorno natural y que esta diferencia se debe al contexto espacial [206]. También se ha demostrado que la topografía, la dureza y otros parámetros físicos del entorno sobre el que se asientan las células tienen una importancia crucial en este sentido [207], al mismo nivel incluso que las moléculas bioactivas que actúan como estímulos quimiotácticos [208]. Precisamente por ello, desde un primer momento se consideró que la estrategia regenerativa a desarrollar debía tener cierta forma tubular y servir de andamiaje poroso. El hecho de que las SC se comporten como si ya se encontrasen en un entorno tridimensional a pesar de no haber atravesado la capa interna de la pared del conducto, es, pues, particularmente beneficioso porque lleva a pensar que las SC de la vaina podrían interactuar con otras células (como neuronas) de modo similar a como lo hacen en el sistema nervioso.

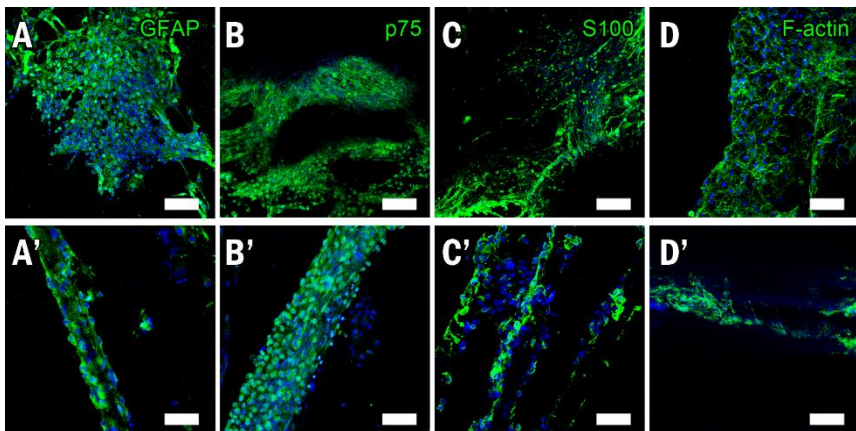


Figura 61. Imágenes de CLSM de las SC cultivadas 10 días en el interior del lumen de un conducto HA5L (A – D) o sobre las fibras de un conducto HA5L-PLLA (A' – D'), sometidas a una inmunocitoquímica para revelar GFAP (A, A'), p75 (B, B') y S100 (C, C') o teñidas con falacidina para observar su citoesqueleto (D, D'). Los núcleos están teñidos con DAPI (azul) en todos los casos. Barras de escala: 200 μm .

Además de desde el punto de vista morfológico, a las células en contacto con entornos bidimensionales se les atribuye una menor cantidad de integrinas activas y una peor retroalimentación con la matriz extracelular, en cuanto a comunicación y remodelación de esta [209]. Sin embargo, observando la Figura 61 se aprecia fácilmente que en todas las imágenes aparece señal verde intensa y distribuida por todos los puntos donde hay núcleos celulares. En el caso de la falacidina (Figura 61D y D') era de esperar un marcaje abundante, puesto que tiñe la F-actina del citoesqueleto (y ya se han visto imágenes similares como la Figura 57B o la Figura 58), pero aun

así se usó como control de intensidad para compararlo con las tinciones inmunocitoquímicas. De estas se puede decir que las SC, tanto las cultivadas en el lumen de conductos HA5L como sobre las fibras de PLLA en el interior de conductos HA5L-PLLA, expresaban abundantemente GFAP, p75 y S100. Aunque los tres se asocian de algún modo a procesos regenerativos o del crecimiento de partes del sistema nervioso, lo más llamativo es que su sobreexpresión está implicada con el fenotipo activado de astrocitos y otras células de neuroglía [210–212], a pesar de que el HA se ha descrito como agente para mantener en estado quiescente a este tipo de células [7,120,167]. Cabe destacar que la nomenclatura S100 se ha usado en este caso para describir la presencia de S100 β , que es concretamente el miembro de esa familia de proteínas que está presente de manera natural en las SC y que se sobreexpresa, como se ha dicho, ante una lesión o daño que produce que la glía dinamice su metabolismo para proteger las neuronas y su degeneración.

Para determinar con más rigor si la aparente activación de las SC (por la abundante expresión de GFAP, p75 y S100 β) se debía a fenómenos ambientales que estas pudieran identificar como nocivos o más bien a una simple estimulación en favor de una situación propensa para la regeneración axonal (como si las SC se estuviesen preparando porque el entorno les es propicio), se analizó también las imágenes tomadas de los conductos HA5L y HA5L-PLLA con SC cultivadas 1 o 10 días en su interior y sobre las que se llevó a cabo un procedimiento inmunocitoquímico para revelar proteína p0, la proteína fundamental de la mielina, y que aparecen en la Figura 62. Durante mucho tiempo se pensó que dicha proteína solo era expresada por SC u oligodendrocitos cuando estos estaban en contacto con neuronas o precursores de estas y, aunque en la actualidad se sabe que pueden expresarla de manera constitutiva [213], para que se sintetice se tienen que dar unas condiciones favorables [213,214].

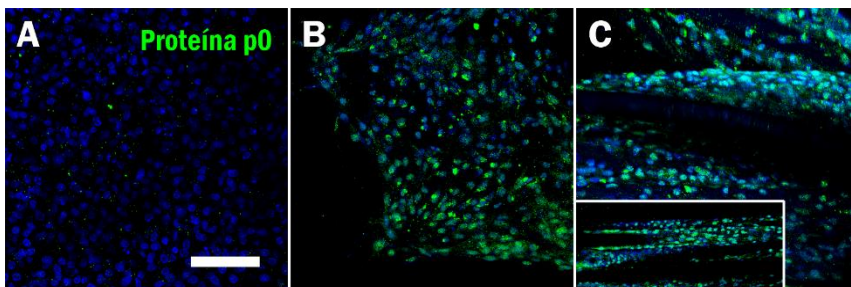


Figura 62. Imágenes de CLSM de SC cultivadas 1 (A) y 10 (B, C) días en el interior del lumen de un conducto HA5L (A, B), en el lumen de un conducto HA5L-PLLA (C) o sobre las fibras de dicho conducto (detalle en C), sometidas a una inmunocitoquímica para revelar proteína p0 (verde). Los núcleos están teñidos con DAPI (azul) en todos los casos. Barra de escala: 50 μ m.

Como se puede observar, durante la expansión de las SC en frascos de cultivo de 75 cm² y las primeras 24 h tras la siembra (Figura 62A), apenas se detectó una cantidad ínfima de proteína p0 (en verde), distribuida además en pequeños grumos extracelulares. Sin embargo, a los 10 días la situación es bastante diferente, ya que se ve marca de p0 en el entorno perinuclear de casi todas las SC sembradas en el lumen, tanto de conductos HA5L como en el de HA5L-PLLA (Figura 62B y C, respectivamente). Fuera cual fuese el factor estimulante de la expresión de p0 (la topografía del material, productos de degradación, comunicación intercelular...), también conllevó que las SC que proliferaron sobre las fibras de PLLA en conductos HA5L-PLLA sintetizasen la proteína en cantidades cualitativamente similares (detalle en Figura 62C), que además se acumulaba sobre la superficie de las fibras.

De acuerdo con hallazgos relativos a la manipulación de algunas propiedades de las células a través de la forma del sustrato de cultivo y la formación de mielina por parte de la neuroglía, es probable que tanto la curvatura de los materiales (el lumen o las fibras) como la microporosidad de la superficie interna de los conductos o las propiedades del HA entrecruzado estuviesen induciendo a las SC a formar una estructura colectiva tubular densa y organizada [215,216], quizá similar a los estímulos que estas mismas células reciben ante una lesión en el SNP con pronóstico regenerativo favorable.

Centrando la atención en este macrosistema formado por la unión de las SC más que en las propiedades y el comportamiento de cada una de ellas por separado, la Figura 63 muestra imágenes muy similares a la Figura 57 pero donde, además, se pudo identificar con más claridad un fenómeno que ya se ha descrito con anterioridad: las SC de la vaina parecían estar densamente empaquetadas y unidas entre sí, pero mucho menos asociadas al lumen del conducto de HA entrecruzado.

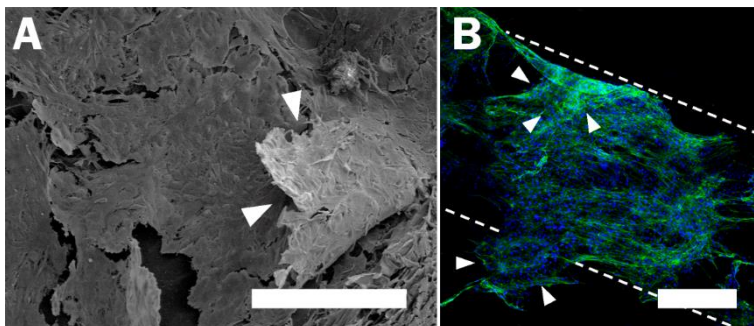


Figura 63. Imágenes de SEM (A) y microscopía CLSM (B) de cortes longitudinales de conductos HA5L con la vaina de SC formada a los 10 días, teñida con DAPI y falacidina. Las líneas discontinuas delimitan el contorno del lumen del conducto. Las puntas de flecha indican los límites de fragmentos de la vaina de SC despegados del lumen o plegados sobre sí mismos. Barras de escala: 200 (B) y 100 μ m (A).

En la parte derecha de la Figura 63A se puede observar claramente cómo durante la manipulación y el corte longitudinal del conducto de HA5L observado mediante SEM, un segmento de la vaina interna de SC se despegó de la superficie interna de este. También en el caso de las muestras observadas mediante microscopía confocal se identificaron partes de la vaina que habían perdido su adhesión entre las células y el biomaterial, pero que seguían firmemente unidas al resto de ella (Figura 63B).

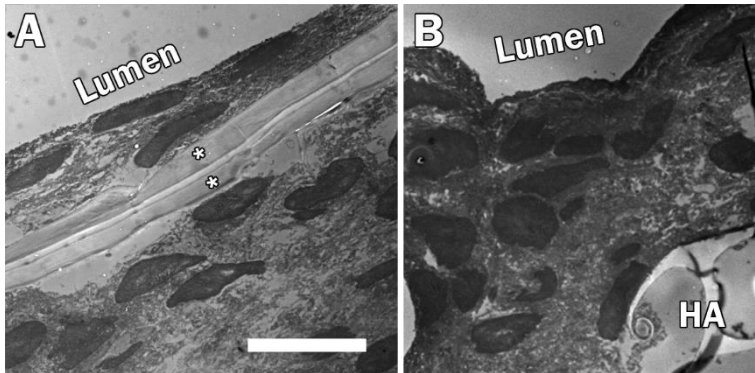


Figura 64. Micrografías de TEM de la vaina de SC en cortes longitudinales (A) o transversales (B) de conductos HA5L tras 10 días de cultivo celular. Se indican con rótulos la cara interna (Lumen) y externa (HA) de la vaina de SC. Las vetas de resina de inclusión histológica se han indicado con *. La barra de escala es común a ambas imágenes. Barra de escala: 10 μ m.

En la Figura 64 se pueden ver detalles de microscopía de transmisión a gran magnificación de cortes longitudinales y transversales de la vaina cilíndrica de SC, para obtener más información de la unión célula-material y entre las propias células. Efectivamente, los resultados parecen congruentes con todos los anteriores, ya que se puede ver que las SC están muy próximas entre sí y es prácticamente imposible determinar los contornos de cada una de ellas (tan solo los núcleos, en gris oscuro, son fácilmente distinguibles). Sorprende también lo densa que es la vaina, ya que se aprecian varios núcleos para unos escasos 20 – 30 μ m de espesor, y lo poco asociada que se encuentra a la superficie del conducto, puesto que en la Figura 64B no se distinguen prolongaciones celulares que se internen en la pared de HA entrecruzado. Aunque es un indicio cualitativo y no está apoyado con datos objetivos, sí parece que exista cierta tendencia de las SC a elongarse en la misma dirección que la longitud del conducto, ya que en los cortes longitudinales los núcleos de las SC parecen achatados (Figura 64A), mientras que en los cortes transversales es complejo determinar una dirección preferente, pues los núcleos son más circulares (Figura 64B). Destacar, por último, que no se debe confundir las dos láminas alargadas de la Figura 64A, identificadas mediante asteriscos, con estructuras orgánicas que formasen parte del material o la vaina. De acuerdo con el criterio del



técnico especialista en TEM, se trata de dos vetas de la resina en la que se incluyen las muestras antes de realizar las secciones ultrafinas (0.2 – 1 μm de espesor). Probablemente, durante la deshidratación previa de los conductos con SC, una capa más interna de la vaina debió separarse ligeramente del resto, lo que permitió a la resina alojarse posteriormente en el espacio remanente de modo que formó una discontinuidad en la muestra.

De las dos últimas figuras presentadas parece razonable inferir que, a los 10 días, las SC han logrado proliferar y asociarse entre sí hasta lograr producir una estructura cilíndrica muy fina que cubre el interior del lumen de los conductos. A pesar de que la vaina producida resulta ser muy densa y con las SC unidas mediante asociaciones moderadamente fuertes, las uniones entre la vaina y la superficie de contacto con la superficie del conducto parecen ser muy débiles. Parece como si las células no se hubieran sentido especialmente tentadas de formar enlaces estables con el HA entrecruzado, lo que es razonable teniendo en cuenta que, aunque se ha justificado que el HA tiene capacidad para asociarse con determinadas proteínas, lo cierto es que es muy usado en cirugía clínica para prevenir adhesiones de tejidos por su baja adsorción de proteínas de enlace [57,102,108,217,218]. Como la forma del lumen impide en gran medida que las SC puedan huir del interior del conducto en cualquier caso, habrían usado el lumen como un andamio provisional sobre el que formar un sistema orgánico complejo que les permitiese proliferar y desarrollar un fenotipo adaptado al contexto.

Las imágenes tomadas mediante microscopía óptica de los cortes transversales realizados a conductos HA5L con SC cultivadas 10 días en su interior que posteriormente fueron teñidas con agentes reveladores de componentes de la matriz extracelular se encuentran expuestas en la Figura 65. En el centro de esta (Figura 65A), se muestra un corte a bajos aumentos donde se puede discriminar con facilidad la vaina de SC de la estructura trabecular de la capa interna de los conductos liofilizados de HA entrecruzado. El HA entrecruzado se encuentra teñido con azul alcian, aunque el tono parece considerablemente más intenso en las proximidades de la vaina y se atenúa conforme aumenta la distancia respecto del centro del conducto. Se esperaba que la tinción de la pared de HA entrecruzado tuviese lugar porque el azul alcian tiene afinidad por polisacáridos, especialmente por los GAG. Se cree que la diferencia de tonalidad en el HA entrecruzado puede deberse a que las SC formaron de manera autónoma HA, por lo que habría mayor concentración del polímero natural cerca de las SC.

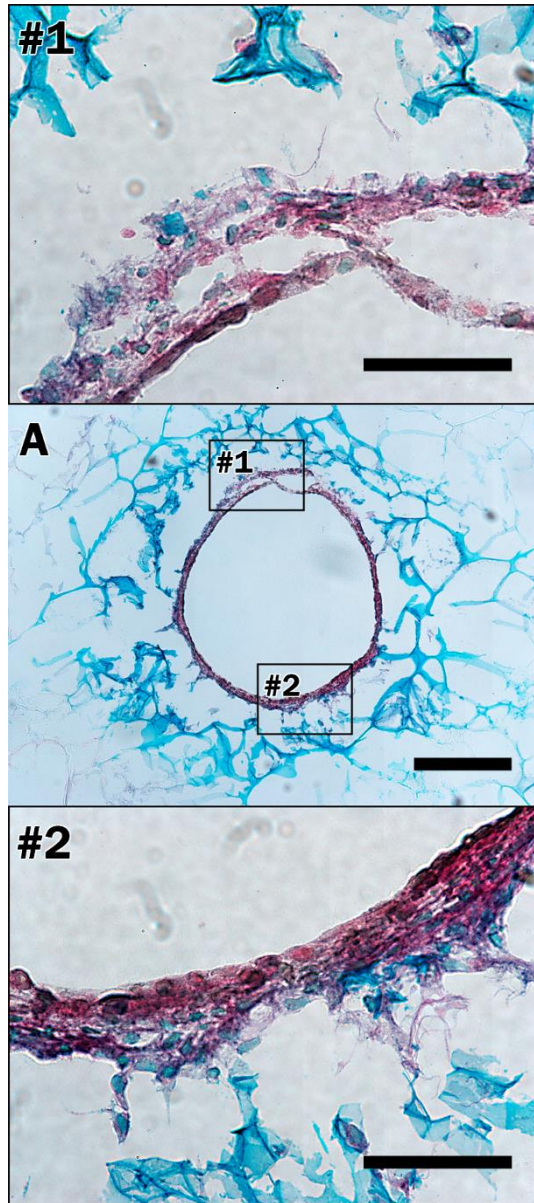


Figura 65. Imágenes de microscopía óptica del corte transversal de un conducto HA5L con la vaina de SC cultivada 10 días en su lumen, teñida con hematoxilina (azul intenso), rojo picosirio (granate) y azul alcian (celeste). (#1) y (#2) son los detalles que se indican en (A). Barras de escala: 200 (A) y 50 μm (#1, #2).



En los detalles #1 y #2 se distingue gran cantidad de núcleos (óvalos de azul intenso), marcados con hematoxilina. Esta tinción en general suele proporcionar un color violeta oscuro o morado azulado, pero la larga exposición al ácido acético de lavado y el pH del medio de montaje (Eukitt; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, EE.UU.) pudieron aclarar y virar de algún modo el tono. Aunque desafortunadamente el color azul obtenido es muy similar al de la matriz de HA entrecruzado que está presente cerca de la vaina de SC y que se tiñó con azul alcíán, se pueden observar sutiles diferencias, además de que carece de sentido que aparezcan cúmulos circulares de mucopolisacáridos, pero no núcleos celulares. Estos virajes en diferentes formulaciones de hematoxilina son relativamente frecuentes, especialmente en tinciones tricrómicas (como la de Masson) o cuando se contratiñen secciones histológicas que previamente han requerido un agente de tinción básico, pero lo habitual es que los colores se puedan diferenciar suficientemente bien. En este caso, se probaron diferentes soluciones alternativas como usar otros agentes de tinción de núcleos (nuclear fast red, verde de metilo) o modificar el orden de las tinciones, pero no se obtuvo resultados satisfactorios en el primer caso y teñir con hematoxilina de Harris en último lugar impedía ver el azul alcíán de la matriz de HA entrecruzado, ya que teñía la misma de un violeta oscuro.

Lo que sí pudo diferenciarse con claridad son las fibras de colágeno I y III, reveladas por el rojo picosirio, y que eran omnipresentes en toda la sección de la vaina de SC, salvo donde había núcleos. Se nota también su naturaleza fibrosa y que se distribuyen en la imagen como estratos, por lo que da poco lugar a dudas. Sin lugar a dudas, la vaina de SC debe su coherencia y su considerable resistencia (a pesar de ser tan fina) al colágeno. Además, y a diferencia de los quistes fibrosos que forman los fibroblastos en el organismo ante daños severos en un tejido (y que constan fundamentalmente de colágeno I, III y IV), la vaina está muy celularizada. En el detalle #2 de la Figura 65 se aprecia también que las SC parecen utilizar las fibras de colágeno para anclarse a los poros del lumen de los conductos.

El último experimento de esta serie se llevó a cabo para determinar si la vaina de SC tenía continuidad a lo largo de todo el conducto para evaluar si, a pesar de haber demostrado que el conducto es muy permeable a nutrientes y moléculas bioactivas, pudiera darse la situación de que las SC del interior proliferasen con mayores dificultades o estuviesen sometidas a estrés metabólico. Como resultados de dicho experimento (Figura 66) se obtuvo un diagrama de intensidad promedio de luz para cada una de las secciones transversales de cada conducto (se recomienda consultar 5.4. *Análisis informático de la continuidad de la vaina* para comprender adecuadamente la rutina que siguió el programa informático para el cálculo



de los puntos de las gráficas), puesto que se dedujo que la intensidad de fluorescencia del canal interno del conducto estaba directamente relacionada con la población de células de cada uno de los tramos de este.

Como se aprecia, el valor promedio de intensidad relativa a lo largo de todo el conducto se mantiene relativamente constante a lo largo de todo el conducto HA5L (Figura 66A), en el intervalo 0.2 - 0.3 y, aunque pueda parecer que existe cierta disminución en el centro del conducto respecto a los extremos, lo cierto es que las diferencias no son estadísticamente significativas en ningún punto. Lo mismo sucede con las SC en el interior del conducto HA5L-PLLA (Figura 66B). Aunque los valores fluctúan en un rango algo superior y más amplio (0.2 - 0.4), no se registraron diferencias suficientes entre dos puntos de la longitud del conducto, lo que supone que no hay razones para pensar que hubiera diferencias en la población de SC entre el centro y los extremos del canal interno. Tampoco las había entre los diferentes tipos de conductos, de lo que se deduce que las fibras no influían considerablemente a tal efecto, algo que concuerda con los resultados de viabilidad y proliferación de la Figura 54.

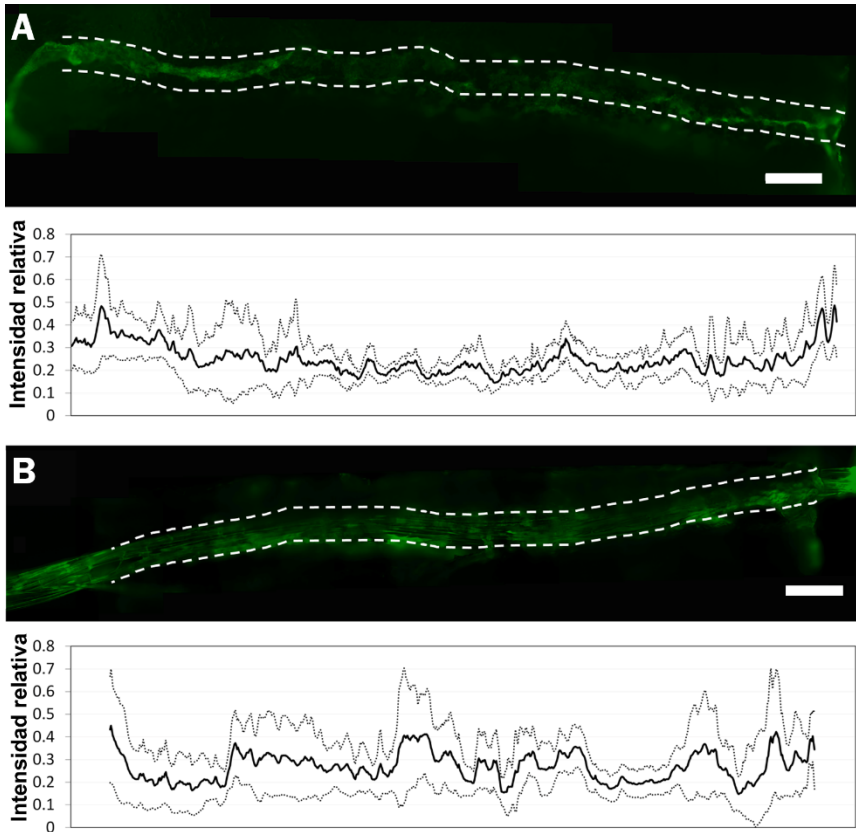


Figura 66. Reconstrucción de imágenes de microscopía de fluorescencia de cortes longitudinales de conductos HA5L (A) o HA5L-PLLA (B) de extremo a extremo sembrados durante 10 días con SC en su lumen y luego teñidas con falacidina. En el diagrama inferior de cada imagen se presenta la intensidad de gris normalizada (curva negra) para cada punto del conducto a lo largo \pm la desviación estándar (líneas discontinuas). Barras de escala: 500 μ m.





3. Conclusiones

Como compendio de los resultados obtenidos en los que se comparaba el desempeño de los conductos según su diferente composición de HA en la mezcla madre y su método de secado tras la gelificación, se llegó a la conclusión de que la concentración de mezcla madre 5% y la liofilización eran las condiciones que permitían producir los conductos óptimos en cuestión de variación dimensional en el hinchado, estructura regular organizada, resistencia mecánica y otros.

Como, además, los conductos HA5L también demostraron ser la única solución de las ensayadas que garantizaba la viabilidad y un crecimiento estable de células de Schwann en su lumen a lo largo del tiempo y, además, no se encontró ninguna contraindicación para su uso, se optó por elegirlos como la solución con mejor pronóstico para lograr su objetivo en contacto con células vivas y otros sistemas orgánicos. Se incluye un compendio de los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos como apoyo visual para defender mejor esta decisión (Tabla 10), valorando los resultados de cada uno de las muestras ensayadas de menor (-) a mayor (+++) adecuación a los valores ideales.

Tabla 10. Evaluación global de los resultados obtenidos en todos los parámetros de estudio en los que se han incluido conductos HA3nL, HA3L, HA5nL, HA5L o sus equivalentes en disco. La valoración de cada parámetro, de menor a mayor calidad, es: -, +, ++ y +++.

Parámetro	HA3nL	HA3L	HA5nL	HA5L
Apariencia, manipulabilidad	+	++	++	+++
Microestructura	+	+++	+	+++
Porosidad	-	+++	-	++
Respuesta mecánica	++	++	+++	+++
Deformación en hinchado	+	++	+	+++
Absorción de agua	-	++	-	+++
Permeabilidad molecular	+++	+++	+++	+++
Degradabilidad enzimática	+	+++	+	+++
Viabilidad celular <i>in vitro</i>	-	+	-	+++

Los conductos de HA5L y HA5L-PLLA probaron ser al menos tan buenos para la proliferación, la viabilidad y el destino celular de las SC como lo son los cubreobjetos de vidrio o el ácido poli-L-láctico, sustratos de referencia en ingeniería tisular y cultivos celulares *in vitro*, y mucho más amigables para estas que films de la misma composición que los conductos. La ventaja que suponen los conductos radica en la estructura tubular acanalada y la microporosidad de las capas interna y externa de su pared. Dicha porosidad, además, permitió retener a las SC en el interior del lumen de los conductos



durante al menos 10 días y evitó que células sembradas fuera pudiesen acceder al interior.

Además, los residuos de degradación enzimática de los conductos de HA entrecruzado probaron no tener efectos nocivos ni beneficiosos sobre la supervivencia y la proliferación de las SC a corto plazo, lo que debería limitar la reacción a cuerpo extraño del conducto en caso de su implante.

Las SC requirieron entre 9 y 11 días para formar una macroestructura compleja, tubular y de bajo espesor que cubría el lumen de los conductos HA5L de extremo a extremo. Dicha macroestructura, denominada vaina de SC, se caracterizaba por estar compuesta por una densa masa de fibras de tejido conectivo que le confería bastante integridad. Sin embargo, las uniones formadas entre la vaina y la superficie interna del conducto mostraron ser muy débiles y sensibles a cambios físicos o químicos del entorno.

Dicha vaina de SC se pudo formar indistintamente en conductos HA5L o HA5L-PLLA a pesar de la presencia de las fibras de PLLA en el segundo caso. La única diferencia entre ellos radicó en la morfología que adoptaron las SC al crecer sobre las fibras de PLLA, pues se elongaron a lo largo de estas. Aun así, las SC en ambos casos conservaron un fenotipo muy activo, probablemente debido a la necesidad de generar grandes cantidades de matriz extracelular para obtener la estructura de la vaina.

La vaina de SC es, por tanto, un sistema biológico producido en condiciones muy específicas y que, aunque no se encuentra en el organismo humano como tal, podría ayudar a lograr que neuronas situadas en uno de los extremos proyecten sus neuritas a través de ella, puesto que está compuesta de células de apoyo neural y, además, tiene similitudes con las estructuras fasciculares de los nervios, la médula espinal y otras partes del sistema nervioso.





CAPÍTULO V
COCULTIVOS NEURONALES





1. Resumen

Como último capítulo, se muestran y discuten aquí los resultados *in vitro* con cocultivos celulares que incluían neuronas o explantes de tejido vivo, además de todos los ensayos de carácter preclínico que constituyen un paso en paralelo para poder implantar los conductos acanalados porosos en modelos animales o, en segundo término, en humanos.

Por ello, se exponen los datos obtenidos en experimentos de cocultivo de SC y neuronas DRG en el lumen de conductos oHA5L para determinar su comportamiento en contacto con células, así como los cultivos de explantes sobre conductos HA5L para estudiar el efecto de la presencia de SC o fibras de PLLA en el lumen. De entre los test de validación preclínica, que son el ensayo de citotoxicidad *in vitro* de dispositivos médicos ISO 10993-5, el de detección de endotoxinas y el de aberraciones cromosómicas por análisis de micronúcleo, se presentan los resultados de los informes elaborados a partir de estos.

El apartado 6 del Capítulo II describe con detalle todos los procedimientos que han dado lugar a estos resultados, por lo que se debe recurrir a él en caso de duda.



2. Resultados y discusión

La Figura 67 corresponde a las imágenes obtenidas en el primer experimento llevado a cabo con cocultivos de células neurales, donde se presembró el lumen de conductos oHA5L con SC durante 11 días y posteriormente se sembró neuronas DRG por uno de los extremos para cocultivarlas 14 días más. Después de fijadas, las células se sometieron a una inmunocitoquímica para poder diferenciar el linaje original de cada una de ellas, revelándolos con luz fluorescente a diferente longitud de onda.

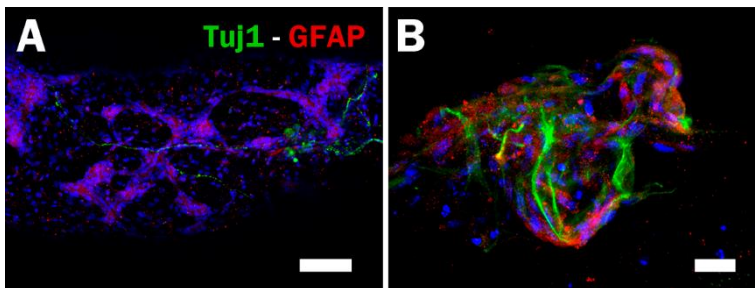


Figura 67. Imagen y detalle de CLSM de SC cultivadas 11 días y cocultivadas 14 días con neuronas DRG en el interior de conductos oHA5L y tratadas mediante una inmunocitoquímica para revelar Tuj1 (verde) y GFAP (rojo). Los núcleos están teñidos con DAPI (azul). Barras de escala: 100 (A) y 20 μm (B).

A pesar de que las neuronas DRG son elementos muy sensibles para el cultivo celular *in vitro* y requieren condiciones muy especiales, se detectó que había una cantidad razonable de estas y que, además, solían encontrarse elongadas, como se puede ver en verde en la Figura 67A. Este estiramiento de sus neuritas, junto con el hecho de que sus somas solían encontrarse en zonas donde interaccionaban con SC que expresaban GFAP (Figura 67B), resulta una evidencia a favor de la capacidad de los conductos oHA5L para permitir la extensión de axones a su través, sobre todo teniendo en cuenta que las neuronas DRG provenían de animales embrionarios E18, por lo que su capacidad proliferativa era muy escasa.

La vaina de SC de la que se tiene evidencia de su formación a los 11 días de cultivo, en este caso no aparecía continua, sino más bien con las células de neuroglía agrupadas en cúmulos interconectados. Se cree que este fenómeno podría haberse producido por la modificación de las condiciones del entorno al modificar el medio de cultivo por uno más adecuado para la supervivencia y el crecimiento de neuronas, más que porque los conductos oHA5L actuaran en detrimento de la vaina de SC, ya que todas las evidencias anteriores han sugerido que no hay diferencias entre los conductos HA5L y oHA5L. Las SC, por tanto, habrían alterado su macroestructura ordenada en

forma de vaina cilíndrica probablemente al reducirse la concentración de alguno de los factores de crecimiento que promovían esta conducta entre ellas. Aunque se trató de obtener la formulación del *Schwann Cell Medium* de la compañía Innoprot (que actúa, en realidad, de representante en España de ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, EE.UU.) para poder evaluar qué factores participaban en la formación de la vaina, no fue posible por ser la composición del medio de conocimiento privado (*know how*) y no estar siquiera basada en algún documento científico. Se optó, pues, por proceder en futuros experimentos con el mismo medio de cocultivo que el usado en este caso en detrimento de la óptima respuesta de las SC. La alternativa se consideró más desfavorable puesto que habría supuesto usar el *Schwann Cell Medium* como medio para cultivar las neuronas DRG también, y es muy probable que este carezca de las neurotrofinas adecuadas.

Aunque el remodelado estructural de las SC no permite defender adecuadamente el papel de la vaina de SC para lograr la regeneración de axones, sí es cierto que las células de glía podían seguir constituyendo un apoyo para las neuronas, tanto desde el punto de vista físico, por la matriz extracelular que generaban, como químico, por las moléculas bioactivas que las SC sintetizaban.

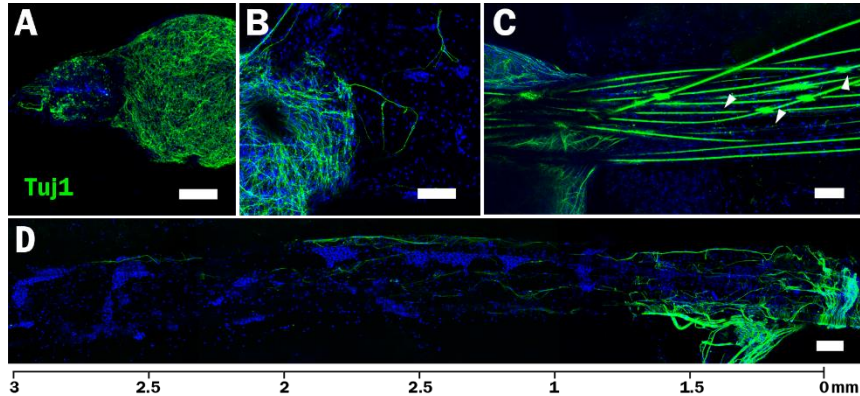


Figura 68. Imágenes de CLSM de conductos HA5L (A, B) y HA5L-PLLA (C, D) cultivados durante 11 días con SC en el lumen y cocultivadas durante 14 días más con un eDRG (B, D) o solo cultivadas solo 14 días con el eDRG (A, C), y tratadas mediante una inmunocitoquímica para revelar Tuj1 (verde). Los núcleos están teñidos con DAPI (azul). En la imagen (C) se apoya la visualización de Tuj1 mediante puntas de flecha. Barras de escala: 100 µm. Se incluye una escala auxiliar asociada a la imagen (D).

Con respecto al cultivo de explantes de DRG en un extremo de conductos HA5L o HA5L-PLLA con o sin SC presembradas durante 11 días, la Figura 68 muestra las imágenes obtenidas mediante CLSM de los cortes longitudinales de los conductos con células en su lumen tras la inmunocitoquímica. Aunque



no se muestra el marcaje de GFAP en ninguna imagen de la Figura 68 porque dificultaba la identificación clara de la señal de Tuj1, este estaba presente de manera omnipresente allí donde se aprecian núcleos (DAPI), especialmente en la zona del explante, donde el GFAP se veía en rojo especialmente intenso.

Los eDRG que se dispusieron directamente sobre uno de los extremos de un conducto HA5L (Figura 68A) apenas lograron anclarse y presentaron una morfología prácticamente esférica, con un pequeño cono de proyección hacia el interior del lumen del conducto en el mejor de los casos. Las neuronas presentes tenían mucha interconectividad entre ellas en el explante, pero las neuritas eran de corto alcance ($< 100 \mu\text{m}$). Tampoco las células de glía que contenía el explante encontraron en el lumen un sustrato favorable para migrar más allá de los puntos de anclaje. En los conductos HA5L donde se precltivó SC durante 11 días antes de sembrar el eDRG, sin embargo, la situación es bastante diferente, puesto que la adhesión del explante fue considerablemente más firme, lo que provocó que la morfología de este fuese menos esférica tras 14 días de cultivo. Es más, las células de glía presentes en el interior del conducto debieron crear un entorno más amigable, porque se observó que algunas neuronas elongaban sus neuritas varios cientos de micras hacia el interior de los conductos. Las prolongaciones neuronales no parecían tener, sin embargo, una dirección preferente de crecimiento.

El caso de los eDRG sembrados en conductos HA5L-PLLA aportó una mejora sustancial al guiado de las neuritas. Aunque por algún efecto de refringencia (similar al que usan las vainas de fibra óptica para transmitir luz) el núcleo de las fibras de PLLA destacaba intensamente prácticamente en todas las longitudes de onda del espectro visible y eso dificultó observar las células reveladas por Tuj1, sí se puede ver claramente (Figura 68C) cómo las neuronas del explante tenían cierta predisposición a estirarse en la misma dirección que las fibras. También se han destacado con puntas de flecha algunos de los puntos donde se identificó los extremos de neuronas en crecimiento (que eran muchísimo más delgadas que las fibras). Dichas extensiones de las neuronas parecían hallarse en contacto estricto con las fibras de PLLA y crecían en una dirección promedio.

En la Figura 68D se puede ver, por último, el resultado de utilizar conductos HA5L-PLLA con SC precltivadas 11 días para intentar elongar los axones de neuronas de eDRG. Es evidente que una cantidad llamativa de axones consiguieron crecer a través del interior del conducto de HA5L-PLLA y que además el explante está íntimamente asociado a las fibras de PLLA. En la Tabla 11 se muestra una comparación entre los valores medidos de

elongación máxima de células neurales tomando como origen el eDRG. Se puede ver claramente que el efecto del apoyo fisicoquímico de las SC junto con las fibras de PLLA es sinérgico y logra el guiado efectivo de una cantidad importante de axones. Como además en este caso las fibras de PLLA no presentaron ese fenómeno de luz refringente, la visualización de dichos axones se puede ver más claramente, junto con el resto de núcleos de las células adyacentes pegadas a la pared de los conductos o a las fibras de PLLA. En la Figura 69 se puede ver, además, un detalle del modo en que los axones rodeaban las fibras y crecían predominantemente en la longitud de estas.

Tabla 11. Distancia máxima registrada de crecimiento axonal desde un eDRG sembrado en el extremo de conductos HA5L o HA5L-PLLA con o sin SC precultivadas, tras 14 días de cultivo.

HA5L	HA5L+ SC	HA5L-PLLA	HA5L-PLLA + SC
< 100 μm	350 μm	650 μm	2700 μm

Como ya se observó en la Figura 67, la vaina de SC que había sido formada tras los 11 días de precultivo en el interior de los conductos HA5L o HA5L-PLLA perdió su integridad característica, probablemente por la modificación en la composición del medio de cultivo a partir del comienzo del cocultivo con eDRG. Sin embargo, es muy destacable que las SC precultivadas parecieron tener un efecto llamada sobre la glía del explante, ya que tras los 14 días de cocultivo una gran parte de las células encontradas en el interior expresaban GFP (Figura 69B y C), que es la proteína fluorescente con que estaban transfectadas las células originarias del eDRG. Como se ve en el detalle de la Figura 69C, las SC coexistían con diferentes tipos de glía que, a diferencia de las neuronas, sí podía migrar y proliferar en el interior del conducto. Cabe destacar que en las imágenes se ha modificado el tono natural de la GFP por el rojo para poder diferenciarlo del marcaje del Tuj1.

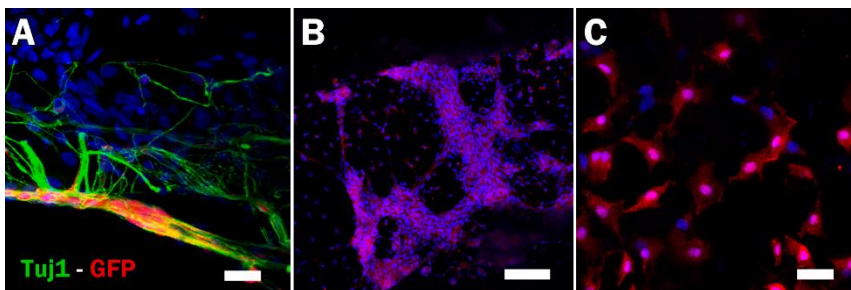


Figura 69. Detalles de CLSM del interior de conductos HA5L (B, C) y HA5L-PLLA (A) con SC precultivadas 11 días en el lumen y eDRG cultivados en un extremo de los conductos durante 14 días. Las células están tratadas mediante inmunocitoquímica para revelar Tuj1 (verde), sus núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y expresaban constitutivamente GFP (rojo). Barras de escala: 100 (B) y 20 μm (A, C).



De estas imágenes parece claro que las SC atraen a otras células neurales ubicadas en los extremos de los conductos, que además aportan un contexto más favorable para la integración de tejido nativo al lumen de estos, que las fibras de PLLA permiten guiar de manera eficiente a los axones en la dirección longitudinal de estas y que el efecto combinatorio de todos estos fenómenos es mayor que la suma de las partes, por lo que el conjunto HA5L-PLLA con SC presembradas 11 días para formar la vaina de SC ya caracterizada en detalle podría constituir un dispositivo biohíbrido con capacidad eficiente de regeneración de tractos del sistema nervioso.

Por último y, aunque no todos los axones de las muestras como la de la Figura 68D crecieron en la misma medida ni el número de réplicas del ensayo (2 en este caso) era suficiente para realizar una cuantificación realista, existe al menos un axón que en 14 días creció hasta los 2700 μm . La información de que se dispone acerca de la velocidad de regeneración del sistema nervioso sugiere tasas de crecimiento axonal de hasta 4 mm/día [219] en SNP de mamíferos, que disminuyen hasta la mitad o menos si se analizan tractos proximales o directamente del SNC [220,221]. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que la tasa disminuye con la edad y que en humanos es bastante menor [222,223], que dichos resultados se obtienen ante lesiones por compresión o con autoinjertos y que los dispositivos médicos implantables más eficientes para regeneración funcional en la actualidad no superan tasas de 0.5 – 1 mm/día [224]. Si a eso se le suma que la traslación a un entorno *in vitro* es muy poco extrapolable [225] y los valores a este respecto son mucho más reducidos en este ámbito para neuronas tipo DRG (130 – 300 $\mu\text{m}/\text{día}$), se puede plantear que, de ser reproducible el resultado, el sistema biohíbrido de conducto HA5L-PLLA con la vaina de SC podría ser un implante médico competente, con una tasa de regeneración axonal *in vitro* de hasta 190 $\mu\text{m}/\text{día}$.

En cuanto a los ensayos de carácter preclínico que se llevaron a cabo en paralelo a los cocultivos, los resultados del primero de ellos, el ensayo de citotoxicidad para dispositivos médicos de acuerdo a la norma ISO 10993-5, aparecen en la Figura 70. A diferencia del ensayo de citotoxicidad indirecta de los residuos de degradación, que se ha presentado con anterioridad (Figura 53) y que también estaba basado (aunque no seguía las pautas tan rigurosamente como en este caso) en la misma norma ISO, no se muestran las unidades de absorbancia sino de absorbancia relativa, esto es, de cociente porcentual entre el valor medido en cada experimento y el dato obtenido para el control positivo (Ctrl+). Se presenta, también, el valor del control negativo (Ctrl -), un requisito indispensable para poder garantizar que el procedimiento ha sido satisfactorio.

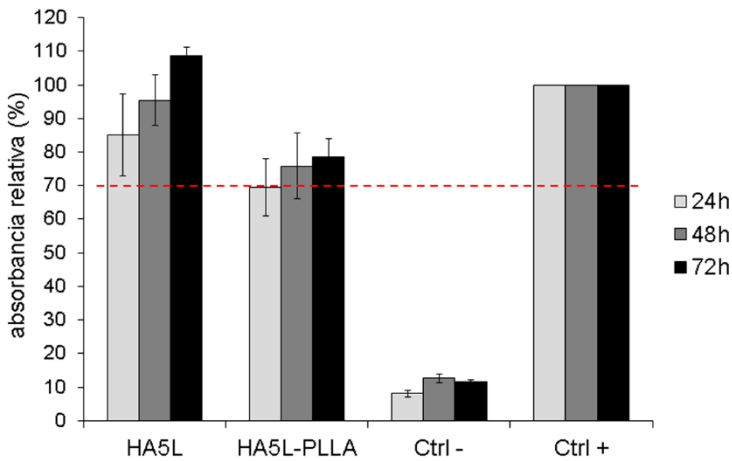


Figura 70. Resultado del ensayo de citotoxicidad in vitro de conductos HA5L y HA5L-PLLA de acuerdo a la norma ISO 10993-5. Los datos se presentan en absorbancia relativa al valor del control positivo (Ctrl +) en cada día. La línea discontinua roja marca el límite de citotoxicidad.

Puesto que tanto los conductos HA5L como los conductos HA5L-PLLA presentaron un valor de absorbancia superior al 70% del valor del Ctrl + tras 72 h de cultivo celular, llegando en el caso del HA5L a superar incluso el 100%, se puede afirmar que ninguna de las estrategias es citotóxica por contacto indirecto con las células. Aunque ya había ciertos indicios al respecto que se desprendían de los ensayos con SC realizados con anterioridad, este riguroso ensayo es un estándar de garantía para, por ejemplo, poder obtener la autorización de un comité de bioética de cara a implantar los conductos en modelos animales.

De acuerdo a los resultados del test de aberraciones cromosómicas, la proporción de eritrocitos policromáticos que presentaron micronúcleo estaba por debajo del límite permitido en el fluido en contacto con conductos HA5L y HA5L-PLLA, por lo que ninguno de los dos ni sus productos de degradación primaria se deben considerar factores genotóxicos.

El resultado del informe del test de endotoxinas de un conducto HA5L también ofreció una detección negativa, con una concentración inferior a 0.03 UE/ml tras 1 h de incubación a 37 °C. Este valor es incluso inferior al requisito para implantes que vayan a estar en contacto con el sistema nervioso central de humanos, ya que se exige un valor inferior a 0.06 EU/ml o 2.15 EU/dispositivo para aquellos en contacto con líquido cerebroespinal, según el texto de consulta. Estos resultados fueron incluso mejores que los obtenidos en anteriores ensayos con geles de composición parecida [226], lo que probablemente se debe a la rigurosidad y las condiciones ambientales limpias del protocolo de síntesis. Puesto que el PLLA ya ha sido usado por



varios grupos de investigación y centros médicos en intervenciones quirúrgicas en humanos (hilo de sutura, implante óseo, membranas dérmicas...), se consideró que las fibras de PLLA no suponían un impedimento a este respecto siempre y cuando se le hiciese constar al fabricante acerca del uso que se le pretende dar, por lo que no se realizó este ensayo sobre ellas.





3. Conclusiones

A juzgar por los resultados mostrados en el presente capítulo, se puede concluir ante todo que tanto las células de Schwann integradas en forma de macrovaina en el interior de conductos HA5L como las fibras de PLLA, suponen un factor beneficioso para el crecimiento axonal de neuronas en explantes de ganglios de la raíz dorsal de ratas. Además, y lo que es más importante aún, el efecto de la combinación de esos dos factores es multiplicativo, ya que en presencia de fibras de PLLA en el interior del lumen de un conducto HA5L donde se ha formado una vaina de SC, los axones se elongan hasta 4 veces más que considerando el efecto de cualquiera de los dos sistemas por separado, llegando a crecer hasta 2.7 mm en el interior de los conductos. Los conductos sirven, por tanto, de estructura soporte para el crecimiento de la vaina de SC y para contener las fibras de PLLA y, aunque ellos mismos no constituyen a priori un beneficio para la regeneración axonal, son un elemento integrador fundamental que, además, debería aportar un elemento protector extra al usar el biohíbrido HA5L + vaina de SC + fibras de PLLA como implante en un modelo *in vivo*.

También se ha detectado un efecto quimiotáctico por parte de las SC del interior del conducto que favorece considerablemente la migración y proliferación de las células gliales del explante hacia el lumen, lo que podría ser una parte clave que justifique el efecto sinérgico de combinar las fibras de PLLA con las SC.

Se ha observado que, al modificar el medio de cultivo para favorecer la elongación axonal tras los 11 días de precultivo de SC, estas células reaccionan descomponiendo la macrovaina formada durante los siguientes 14 días y agrupándose en cúmulos interconectados de estas. Se cree que ese fenómeno se debe a la ausencia de algún factor bioquímico que es fundamental para la integridad de la vaina de SC.

Además, se ha determinado con neuronas de origen similar a los explantes y sin células de apoyo que los conductos oHA5L son capaces de lograr que células neuronales se elonguen en su interior e interaccionen con SC presembradas para formar la vaina. Se puede, por tanto, modificar hasta cierto punto la morfología de los conductos HA5L para adaptarlo a otras necesidades que requieran diferentes tamaños o formas y seguir manteniendo sus propiedades básicas y las particularidades que hacen del conducto un dispositivo novedoso, como la pared porosa tricapa.

Por último, y gracias a tres ensayos preclínicos muy usados como estándar cuando se trabaja con dispositivos biomédicos, se ha podido determinar que



los conductos HA5L y HA5L-PLLA no son citotóxicos ni pirogénicos y se pueden producir mediante un protocolo GMP de tal modo que sus niveles de endotoxinas sean tales como para ser usados incluso como implantes del sistema nervioso central. Estos resultados son muy interesantes desde el punto de vista de que constituyen un hito que sugiere que, al trasladar los conductos a modelos animales *in vivo*, la respuesta biológica debería ser razonablemente favorable o, al menos, no será perjudicial para el organismo en el que se introduzca, más allá de la lesión que genere la intervención quirúrgica del implante.





CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES FINALES





1. Conclusiones finales

A raíz de todo lo explicado anteriormente, de los resultados presentados en los capítulos III, IV y V y especialmente de las consideraciones hechas en los apartados de conclusiones de esos mismos capítulos, en el transcurso de la realización de la siguiente tesis doctoral se ha llegado a las siguientes conclusiones generales:

- Las mezclas de ácido hialurónico con divinil sulfona en una proporción molar 9:10 disueltos ambos en hidróxido sódico 0.2M permiten obtener un gel hidrófilo, constituido por una malla entrecruzada químicamente, en cuestión de varios minutos incluso a temperaturas suaves.

- Dichas mezclas pueden verterse en moldes mientras aún son líquidas y obtener, de este modo, conductos acanalados porosos de 6 mm de longitud, 1.5 mm de lado y 450 μm de diámetro interno. Los conductos producidos a concentraciones de ácido hialurónico entre 3 y 5% wt/wt son estables y conservan su forma después de que gelifique la mezcla de síntesis. Los conductos pueden secarse al aire o bien pueden liofilizarse para obtener en ellos una estructura trabecular con celdillas interconectadas entre sí.

- La liofilización de los conductos en contacto con sustratos poliméricos hidrófobos produce, además, una estructura singular de tres capas cuyos estratos más externos presentan una porosidad considerablemente menor. Esta pared porosa tricapa es totalmente permeable a nutrientes y moléculas bioactivas, pero impermeable al tránsito de células a su través.

- Es posible modular la velocidad de degradación de los conductos en un medio enzimático variando ligeramente su composición en ácido hialurónico, aunque solo son capaces de hacerlo si son previamente liofilizados tras la gelificación.

- Los conductos producidos a partir de ácido hialurónico al 5% wt/wt y liofilizados suponen una ventaja respecto a las otras alternativas en cuanto a módulo mecánico, variaciones durante la hidratación y viabilidad de células de Schwann en su lumen. Se considera que estas son, por tanto, las condiciones de síntesis óptimas para un conducto poroso que pretenda implantarse en un organismo.

- La buena viabilidad celular de células de Schwann cultivadas en el lumen de los conductos óptimos se debe a la estructura tridimensional tubular que las confina y a la porosidad de la capa interna de los conductos, ya que el



ácido hialurónico entrecruzado con divinil sulfona, de por sí, no admite que las células se integren adecuadamente a su superficie.

- Las células de Schwann cultivadas en el lumen de los conductos óptimos tienden a formar una estructura cilíndrica llamada vaina de células de Schwann, formada por una fina y densa capa de estas, que se unen gracias a la matriz extracelular de tipo conjuntivo que generan. Las uniones que desarrollan con respecto a la pared del conducto son, sin embargo, considerablemente más débiles.

- La vaina de células de Schwann ayuda al anclaje de trozos de tejidos o explantes al extremo de los conductos de ácido hialurónico entrecruzado y actúa también como estímulo atrayente para la migración y proliferación de células de glía, aunque no consigue orientar eficientemente el crecimiento de neuronas.

- Incorporar un haz de fibras de ácido poli-L-láctico en el interior del lumen de conductos de 5% wt/wt de ácido hialurónico liofilizados no tiene mucho efecto en la formación de la vaina de células de Schwann, pero sí sirve para guiar neuritas a lo largo de los conductos. El sistema biohíbrido formado por el conjunto de los conductos óptimos, la vaina de células de Schwann y las fibras de PLLA apoya el crecimiento de axones mucho mejor que cualquiera de los tres elementos por separado, permitiendo que puedan crecer a velocidades de más de 190 $\mu\text{m}/\text{día}$.

- Es posible introducir algunas modificaciones en el procedimiento de síntesis que permiten variar la forma y las dimensiones de los conductos óptimos para adecuarlos a diferentes usos, sin provocar con ello que estos pierdan las propiedades singulares que hacen de ellos un dispositivo implantable novedoso.

2. Trabajo en curso, futuro y publicaciones derivadas

En la actualidad, y teniendo en cuenta que se dispone de varios ensayos que apoyan la biocompatibilidad de los conductos acanalados porosos de ácido hialurónico al 5% wt/wt y liofilizados, se ha iniciado la planificación de la siguiente etapa para poder utilizar estos conductos como dispositivo biomédico para regenerar tractos del sistema nervioso.

En concreto, en colaboración con el grupo del Dr. Juan Antonio Barcia del Instituto de Neurociencias del Hospital Universitario Clínico San Carlos (Madrid, España) se ha comenzado a introducir conductos óptimos como implantes subcutáneos en ratas para evaluar la respuesta inmunitaria de un organismo ante estos. Se han realizado, también, defectos donde no se ha introducido ningún conducto como control y otros donde se han dispuesto segmentos prismáticos de PTFE para inducir una leve respuesta inmune y comparar el comportamiento de los tejidos adyacentes cuando están en contacto con un material no biodegradable.

Por otra parte, se han realizado intervenciones quirúrgicas exploratorias en modelos de rata parkinsoniana inducida mediante 6-hidroxidopamina, donde se ha introducido un conducto oHA5L en su tracto nigroestriatal mediante un equipo de cirugía estereotáctica (Figura 71).

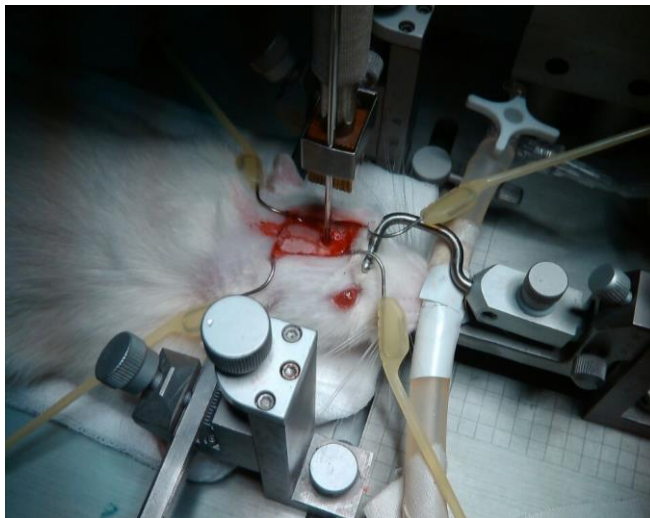


Figura 71. Fotografía de una ratona durante una intervención quirúrgica en la que se le introduce un conducto oHA5L en su tracto nigroestriatal mediante una cánula acoplada a un montaje estereotáctico.



Se espera que en los próximos meses se planifique y lleve a cabo el injerto de conductos con la vaina de SC en su interior y también fibras de PLLA, además de operar aquellos animales que sean necesarios para su uso como control positivo de regeneración neuronal.

Se está trabajando en paralelo para intentar determinar las moléculas bioactivas responsables de que las células de Schwann formen y mantengan la estructura de la macrovaina cilíndrica a lo largo del tiempo, aunque es una tarea que puede requerir bastante tiempo y esfuerzo debido a que la composición del *Schwann Cell Medium* utilizado para su cultivo es desconocida, como ya se ha indicado.

Por último, se han realizado algunos ensayos preliminares para usar los conductos de ácido hialurónico entrecruzado como dispositivos de liberación de fármacos. Puesto que ya se ha demostrado que la matriz porosa permite el flujo casi libre de moléculas bioactivas, en la actualidad se está estudiando la inclusión de micropartículas cargadas con fármacos antiinflamatorios y neuroprotectores, de modo que se produzca su liberación gradual conforme las partículas se degradan.



El trabajo realizado para la realización de la presente tesis doctoral ha dado lugar, además, a las siguientes publicaciones de índole técnica y científica:

Publicaciones en revistas científicas internacionales

1. Vallés-Lluch A, Arnal-Pastor M, Martínez-Ramos C, Vilariño-Feltrer G, Vikingsson L, Castells-Sala C, Semino CE, Monleón Pradas M. Combining self-assembling peptide gels with three-dimensional elastomer scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 2013; 9(12):9451-60.
2. Conejero-García Á, 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. *Eur Polym J*. 2015; 70:331-41.
3. Vilariño-Feltrer G, Martínez-Ramos C, Monleón-de-la-Fuente A, Vallés-Lluch A, Moratal D, Barcia Albacar JA, Monleón Pradas M. Schwann-cell cylinders grown inside hyaluronic-acid tubular scaffolds with gradient porosity. *Acta Biomaterialia*. 2015; Available online (doi: 10.1016/j.actbio.2015.10.040).
4. Ortuño-Lizarán I, Vilariño-Feltrer G, Martínez-Ramos C, Monleón Pradas M, Vallés-Lluch A. Optimization of synthesis factors in hyaluronic acid hydrogels for its use as nerve conduits. 2015. Still unpublished.
5. Mullor-Ruiz I, Vilariño-Feltrer G, Mnatsakanyan H, Vallés-Lluch A, Monleón Pradas M. Use of embedded nanoparticles to improve the performance of hyaluronic acid-based scaffolds in nervous tissue regeneration. 2015. Still unpublished.

Patentes

1. Monleón Pradas M, Vallés Lluch A, Martínez Ramos C, Vilariño Feltrer G, Barcia Albacar JA, Gómez Pinedo U. Biohíbrido para su uso en la regeneración de tractos neurales. OEPM ref. P201431855. 16 diciembre 2014.



Presentación en congresos científicos internacionales

1. Vallés-Lluch A, Arnal-Pastor M, Martínez-Ramos C, Vilariño-Feltrer G, Vikingsson L, Monleón Pradas M. Grid polymeric scaffolds with polypeptide gel filling as patches for infarcted tissue regeneration. 35th Annual International Conference of the IEEE EMBS. Osaka (Japan), 3 – 7 July 2013.
2. Vilariño-Feltrer G, Conejero-García Á, Martínez-Ramos C, Monleón Pradas M, Vallés-Lluch A. Composite tubular structures to promote neural cells guidance and proliferation. 25th European Conference on Biomaterials. Madrid (Spain), 8 – 12 September 2013.
3. Martínez-Ramos C, Pérez Garnés M, Arnal-Pastor M, Vilariño-Feltrer G, Vallés-Lluch A, Monleón Pradas M. Cell seeding conditions of composite elastomer-gel membranes. 25th European Conference on Biomaterials. Madrid (Spain), 8 – 12 September 2013.



3. Bibliografía

1. Carmen J, Magnus T, Cassiani-Ingoni R, Sherman L, Rao MS, Mattson MP. Revisiting the astrocyte-oligodendrocyte relationship in the adult CNS. *Prog Neurobiol.* 2007;82:151–62.
2. Magrassi L, Leto K, Rossi F. Lifespan of neurons is uncoupled from organismal lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013;110(11):4374–9.
3. Young JZ, Oxford MA, Holmes W, Oxford BA, Sanders FK. Nerve regeneration. Importance of the peripheral stump and the value of nerve grafts. *Lancet.* 1940;236:128–30.
4. Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst.* 2002;7:13–27.
5. Makwana M, Raivich G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS J.* 2005;272:2628–38.
6. Huang YC, Huang YY. Biomaterials and strategies for nerve regeneration. *Artif Organs.* 2006;30(7):514–22.
7. Marty S, Dusart I, Peschanski M. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS. I. Microglia/macrophages. *Neuroscience.* 1991;45(3):529–39.
8. Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci.* 1999;11:3648–58.
9. Busch S a., Silver J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17:120–7.
10. Paixão S, Klein R. Neuron-astrocyte communication and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 2010;20:466–73.
11. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965;124:319–35.



12. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 1969;137:433–57.
13. Ramón y Cajal S. Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Moya H de N, editor. Madrid; 1913.
14. Reynolds B a., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (80-) [Internet].* 1992;255(5052):1707–10.
15. Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 1992;89(September):8591–5.
16. Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 1997;8:389–404.
17. Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson a C, et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci.* 1996;16(23):7599–609.
18. Wieloch T, Nikolich K. Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Curr Opin Neurobiol.* 2006;16:258–64.
19. Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol.* 2008;209:294–301.
20. Huang DW, McKerracher L, Braun PE, David S. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron.* 1999;24:639–47.
21. Bandtlow CE. Regeneration in the central nervous system. *Exp Gerontol.* 2003;38:79–86.
22. Xie F, Zheng B. White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. *Exp Neurol.* 2008;209:302–12.
23. Yoshioka N, Hisanaga SI, Kawano H. Suppression of fibrotic scar formation promotes axonal regeneration without disturbing blood-



brain barrier repair and withdrawal of leukocytes after traumatic brain Injury. *J Comp Neurol*. 2010;518:3867–81.

24. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*. 1998;395:451–2.
25. Walsh RA, Lynch T, Fahn S. Parkinson's disease. In: Hardiman O, Doherty CP, editors. *Neurodegenerative disorders A clinical guide*. 1st ed. London: Springer-Verlag; 2011. p. 77–114.
26. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*. 2003. p. 889–909.
27. Ives NJ, Stowe RL, Marro J, Counsell C, Macleod A, Clarke CE, et al. Monoamine oxidase type B inhibitors in early Parkinson's disease: meta-analysis of 17 randomised trials involving 3525 patients. *BMJ*. 2004;329(August):593.
28. Charles D, Konrad PE, Neimat JS, Molinari AL, Tramontana MG, Finder SG, et al. Subthalamic nucleus deep brain stimulation in early stage Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;20(7):731–7.
29. Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy: prospects for clinical diagnosis and treatment. *Neurology*. 1998;51:690–4.
30. Thanvi BR, Sprigg N, Munshi SK. Advances in spontaneous intracerebral haemorrhage. *Int J Clin Pract* [Internet]. 2012;66(June):556–64.
31. Schröder JM. Proliferation of epineurial capillaries and smooth muscle cells in angiopathic peripheral neuropathy. *Acta Neuropathol*. 1986;72:29–37.
32. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260:920–6.
33. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone* [Internet]. The Authors; 2014;70:93–101.



34. L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N Engl J Med.* 2007;357:1451–3.
35. Cervantes TM, Bassett EK, Tseng A, Kimura A, Roscioli N, Randolph M a, et al. Design of composite scaffolds and three-dimensional shape analysis for tissue-engineered ear. *J R Soc Interface* [Internet]. 2013;10:20130413.
36. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz D a, Peck a B, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med.* 2000;6(3):278–82.
37. Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo a J. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature.* 1980;284(5753):264–5.
38. Gómez-Pinedo U, Vidueira S, Sancho FJ, García-Verdugo JM, Matías-Guiu J, Barcia J a. Olfactory ensheathing glia enhances reentry of axons into the brain from peripheral nerve grafts bridging the substantia nigra with the striatum. *Neurosci Lett.* 2011;494:104–8.
39. Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng* [Internet]. 2003 [cited 2012 Mar 9];5:293–347.
40. Tang S, Zhu J, Xu Y, Xiang AP, Jiang MH, Quan D. The effects of gradients of nerve growth factor immobilized PCL scaffolds on neurite outgrowth invitro and peripheral nerve regeneration in rats. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;34(29):7086–96.
41. Niu Y, Chen KC, He T, Yu W, Huang S, Xu K. Scaffolds from block polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(ethylene glycol) (PEG) for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;35:4266–77.
42. Daly WT, Knight AM, Wang H, de Boer R, Giusti G, Dadsetan M, et al. Comparison and characterization of multiple biomaterial conduits for peripheral nerve repair. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;34(34):8630–9.
43. Alberti K a., Hopkins AM, Tang-Schomer MD, Kaplan DL, Xu Q. The behavior of neuronal cells on tendon-derived collagen sheets as potential substrates for nerve regeneration. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;35:3551–7.



44. Yang XN, Jin YQ, Bi H, Wei W, Cheng J, Liu ZY, et al. Peripheral nerve repair with epimysium conduit. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;34(22):5606–16.
45. Crapo PM, Medberry CJ, Reing JE, Tottey S, van der Merwe Y, Jones KE, et al. Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33(13):3539–47.
46. Bellamkonda R, Ranieri JP, Bouche N, Aebischer P. Hydrogel-based three-dimensional matrix for neural cells. *J Biomed Mater Res*. 1995;29:663–71.
47. Irons HR, Cullen DK, Shapiro NP, Lambert N a, Lee RH, Laplaca MC. Three-dimensional neural constructs: a novel platform for neurophysiological investigation. *J Neural Eng*. 2008;5:333–41.
48. Chen K, Sahoo S, He P, Ng KS, Toh SL, Goh JCH. A Hybrid Silk/RADA-Based Fibrous Scaffold with Triple Hierarchy for Ligament Regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:1399–409.
49. Yan S, Zhang Q, Wang J, Liu Y, Lu S, Li M, et al. Silk fibroin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid ternary scaffolds for dermal tissue reconstruction. *Acta Biomater* [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2013;9(6):6771–82.
50. Mironov V, Kasyanov V, Xiao ZS, Eisenberg C, Eisenberg L, Gonda S, et al. Fabrication of tubular tissue constructs by centrifugal casting of cells suspended in an in situ crosslinkable hyaluronan-gelatin hydrogel. *Biomaterials*. 2005;26:7628–35.
51. Bozkurt A, Brook G a, Moellers S, Lassner F, Sellhaus B, Weis J, et al. In vitro assessment of axonal growth using dorsal root ganglia explants in a novel three-dimensional collagen matrix. *Tissue Eng*. 2007;13(12):2971–9.
52. Cooke MJ, Zahir T, Phillips SR, Shah DSH, Athey D, Lakey JH, et al. Neural differentiation regulated by biomimetic surfaces presenting motifs of extracellular matrix proteins. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2010;93:824–32.
53. Hammer J, Han L-H, Tong X, Yang F. A facile method to fabricate hydrogels with microchannel-like porosity for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* [Internet]. 2014;20(2):169–76.



54. Bettinger CJ, Bruggeman JP, Misra A, Borenstein JT, Langer R. Biocompatibility of biodegradable semiconducting melanin films for nerve tissue engineering. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;30(17):3050–7.
55. Shadforth AM a, George K a., Kwan AS, Chirila T V., Harkin DG. The cultivation of human retinal pigment epithelial cells on Bombyx mori silk fibroin. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33(16):4110–7.
56. Mammadov B, Mammadov R, Guler MO, Tekinay AB. Cooperative effect of heparan sulfate and laminin mimetic peptide nanofibers on the promotion of neurite outgrowth. *Acta Biomater* [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2012;8(6):2077–86.
57. Austin JW, Kang CE, Baumann MD, DiDiodato L, Satkunendrarajah K, Wilson JR, et al. The effects of intrathecal injection of a hyaluronan-based hydrogel on inflammation, scarring and neurobehavioural outcomes in a rat model of severe spinal cord injury associated with arachnoiditis. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33(18):4555–64.
58. Holmes TC, de Lacalle S, Su X, Liu G, Rich a, Zhang S. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:6728–33.
59. Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Iwata H. Self-assembling chimeric protein for the construction of biodegradable hydrogels capable of interaction with integrins expressed on neural stem/progenitor cells. *Biomacromolecules*. 2008;9:1411–6.
60. McGrath AM, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg M. BD™ PuraMatrix™ peptide hydrogel seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Brain Res Bull* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;83:207–13.
61. Liu Y, Ye H, Satkunendrarajah K, Yao GS, Bayon Y, Fehlings MG. A self-assembling peptide reduces glial scarring, attenuates post-traumatic inflammation and promotes neurological recovery following spinal cord injury. *Acta Biomater* [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2013;9(9):8075–88.
62. Wong DY, Krebsbach PH, Hollister SJ. Brain cortex regeneration affected by scaffold architectures. *J Neurosurg*. 2008;109(October):715–22.



63. Nisbet DR, Rodda AE, Horne MK, Forsythe JS, Finkelstein DI. Neurite infiltration and cellular response to electrospun polycaprolactone scaffolds implanted into the brain. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;30(27):4573–80.
64. Silva N a., Sousa R a., Pires AO, Sousa N, Salgado AJ, Reis RL. Interactions between Schwann and olfactory ensheathing cells with a starch/polycaprolactone scaffold aimed at spinal cord injury repair. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2012;100 A:470–6.
65. Hurtado A, Cregg JM, Wang HB, Wendell DF, Oudega M, Gilbert RJ, et al. Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-L-lactic acid microfibers. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;32(26):6068–79.
66. Binan L, Tendey C, De Crescenzo G, El Ayoubi R, Ajji A, Jolicoeur M. Differentiation of neuronal stem cells into motor neurons using electrospun poly-L-lactic acid/gelatin scaffold. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;35(2):664–74.
67. Olson HE, Rooney GE, Gross L, Nesbitt JJ, Galvin KE, Knight A, et al. Neural stem cell- and Schwann cell-loaded biodegradable polymer scaffolds support axonal regeneration in the transected spinal cord. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(00):1797–805.
68. Moore MJ, Friedman J a., Lewellyn EB, Mantila SM, Krych AJ, Ameenuddin S, et al. Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration. *Biomaterials*. 2006;27:419–29.
69. Sinis N, Schaller H-E, Schulte-Eversum C, Schlosshauer B, Doser M, Dietz K, et al. Nerve regeneration across a 2-cm gap in the rat median nerve using a resorbable nerve conduit filled with Schwann cells. *J Neurosurg*. 2005;103:1067–76.
70. Soria JM, Martínez Ramos C, Bahamonde O, García Cruz DM, Salmerón Sánchez M, García Esparza MA, et al. Influence of the substrate's hydrophilicity on the in vitro Schwann cells viability. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2007;83:463–70.
71. Srinivasan A, Tahilramani M, Bentley JT, Gore RK, Millard DC, Mukhatyar VJ, et al. Microchannel-based regenerative scaffold for chronic peripheral nerve interfacing in amputees. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;41:151–65.



72. Lee M, Dunn JCY, Wu BM. Scaffold fabrication by indirect three-dimensional printing. *Biomaterials*. 2005;26:4281–9.
73. Matsumoto K, Ohnishi K, Kiyotani T, Sekine T, Ueda H, Nakamura T, et al. Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: A histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res*. 2000;868:315–28.
74. Huang JH, Zager EL, Zhang J, Groff RF, Pfister BJ, Cohen AS, et al. Harvested human neurons engineered as live nervous tissue constructs: implications for transplantation. *Laboratory investigation*. *J Neurosurg*. 2008;108(February):343–7.
75. Shoichet MS, Winn SR. Cell delivery to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;42:81–102.
76. Rooney GE, McMahon SS, Ritter T, Garcia Y, Moran C, Madigan NN, et al. Neurotrophic factor-expressing mesenchymal stem cells survive transplantation into the contused spinal cord without differentiating into neural cells. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(10):3049–59.
77. Lindvall O, Kokaia Z. Recovery and rehabilitation in stroke: Stem cells. *Stroke*. 2004;35:2691–4.
78. Koch P, Kokaia Z, Lindvall O, Brüstle O. Emerging concepts in neural stem cell research: autologous repair and cell-based disease modelling. *Lancet Neurol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;8(9):819–29.
79. Hicks AU, Lappalainen RS, Narkilahti S, Suuronen R, Corbett D, Sivenius J, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural precursor cells and enriched environment after cortical stroke in rats: Cell survival and functional recovery. *Eur J Neurosci*. 2009;29(November 2008):562–74.
80. Kallur T, Darsalia V, Lindvall O, Kokaia Z. Human fetal cortical and striatal neural stem cells generate region-specific neurons in vitro and differentiate extensively to neurons after intrastriatal transplantation in neonatal rats. *J Neurosci Res*. 2006;84(October):1630–44.
81. Blum B, Benvenisty N. The Tumorigenicity of Human Embryonic Stem Cells. *Adv Cancer Res*. 2008;100(08):133–58.



82. Bellin M, Marchetto MC, Gage FH, Mummery CL. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;13(October):713–26.
83. Takahashi K, Yamanaka S. Supplemental Data Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Reactions* [Internet]. 2006;126:663–76.
84. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448(July):313–7.
85. Krum JM, Khaibullina A. Inhibition of endogenous VEGF impedes revascularization and astroglial proliferation: Roles for VEGF in brain repair. *Exp Neurol*. 2003;181:241–57.
86. Liu S, Guo Y, Huang R, Li J, Huang S, Kuang Y, et al. Gene and doxorubicin co-delivery system for targeting therapy of glioma. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33(19):4907–16.
87. Rosenstein JM, Mani N, Silverman WF, Krum JM. Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(June):7086–91.
88. Xiong Y, Zhu JX, Fang ZY, Zeng CG, Zhang C, Qi GL, et al. Coseeded Schwann cells myelinate neurites from differentiated neural stem cells in neurotrophin-3-loaded PLGA carriers. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1977–89.
89. Wang A, Tang Z, Park I-H, Zhu Y, Patel S, Daley GQ, et al. Induced pluripotent stem cells for neural tissue engineering. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;32(22):5023–32.
90. Ma W, Tavakoli T, Chen S, Maric D, Liu JL, O'Shaughnessy TJ, et al. Reconstruction of functional cortical-like tissues from neural stem and progenitor cells. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(10):1673–86.
91. Kang KN, Kim DY, Yoon SM, Lee JY, Lee BN, Kwon JS, et al. Tissue engineered regeneration of completely transected spinal cord using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33(19):4828–35.



92. Cheng TY, Chen MH, Chang WH, Huang MY, Wang TW. Neural stem cells encapsulated in a functionalized self-assembling peptide hydrogel for brain tissue engineering. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;34(8):2005–16.
93. Guan J, Tong W, Ding W, Du S, Xiao Z, Han Q, et al. Neuronal regeneration and protection by collagen-binding BDNF in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33(5):1386–95.
94. Madduri S, Feldman K, Tervoort T, Papaloizos M, Gander B. Collagen nerve conduits releasing the neurotrophic factors GDNF and NGF. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;143(2):168–74.
95. Ren H, Han M, Zhou J, Zheng ZF, Lu P, Wang JJ, et al. Repair of spinal cord injury by inhibition of astrocyte growth and inflammatory factor synthesis through local delivery of flavopiridol in PLGA nanoparticles. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;35(24):6585–94.
96. Mittal G, Carswell H, Brett R, Currie S, Kumar MNVR. Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;150(2):220–8.
97. Xin H, Sha X, Jiang X, Chen L, Law K, Gu J, et al. The brain targeting mechanism of Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-copoly(eopen)-caprolactone nanoparticles. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33(5):1673–81.
98. Patel NB, Poo MM. Perturbation of the direction of neurite growth by pulsed and focal electric fields. *J Neurosci.* 1984;4(12):2939–47.
99. Tian B, Liu J, Dvir T, Jin L, Tsui JH, Qing Q, et al. Macroporous nanowire nanoelectronic scaffolds for synthetic tissues. *Nat Mater* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 [cited 2012 Aug 13];11(9):1–9.
100. Kameswaran N, Cullen DK, Pfister BJ, Ranalli NJ, Huang JH, Zager EL, et al. A novel neuroprosthetic interface with the peripheral nervous system using artificially engineered axonal tracts. *Neurol Res.* 2008;30:1063–7.
101. Meyer, Karl and W. Palmer J. Article : the Polysaccharide of the Vitreous Humor. *J Biol Chem.* 1934;629–34.



102. Ogston AG, Stanier JE. The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties. *J Physiol.* 1953;119(2-3):244-52.
103. Laurent TC. Studies on Hyaluronic Acid in the Vitreous Body. *J Biol Chem.* 1955;216:263-71.
104. Balazs EA, Laurent TC. Viscosity function of hyaluronic acid as a polyelectrolyte. *J Polym Sci [Internet].* 1951;6(5):665-7.
105. Ogston AG. Some thermodynamic relationships in ternary systems, with special reference to the properties of systems containing hyaluronic acid and protein. *Arch Biochem Biophys.* 1962;Suppl 1:39-51.
106. Heatley F, Scott JE. A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan. *Biochem J.* 1988;254:489-93.
107. Almond A, Sheehan JK, Brass A. Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution. *Glycobiology.* 1997;7:597-604.
108. Gribbon P, Heng BC, Hardingham TE. The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain-chain association. *Biochem J.* 2000;350 Pt 1:329-35.
109. DeAngelis PL, Papaconstantinou J, Weigel PH. Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. *J Biol Chem.* 1993;268(15):14568-71.
110. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem.* 1997;272(20):13997-4000.
111. Itano N, Kimata K. Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. *J Biol Chem.* 1996;271:9875-8.
112. Di Ferrante N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *J Biol Chem.* 1956;220:303-6.



113. Brecht M, Mayer U, Schlosser E, Prehm P. Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *Biochem J.* 1986;239:445–50.
114. Khaing ZZ, Milman BD, Vanscoy JE, Seidlits SK, Grill RJ, Schmidt CE. High molecular weight hyaluronic acid limits astrocyte activation and scar formation after spinal cord injury. *J Neural Eng.* 2011;8:046033.
115. Lin CM, Lin JW, Chen YC, Shen HH, Wei L, Yeh YS, et al. Hyaluronic acid inhibits the glial scar formation after brain damage with tissue loss in rats. *Surg Neurol [Internet]. Elsevier Inc.;* 2009;72:S50–4.
116. Hardingham TE, Muir H. Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *Biochem J.* 1974;139:565–81.
117. Bignami a, Hosley M, Dahl D. Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anat Embryol (Berl).* 1993;188:419–33.
118. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J [Internet].* 1992;6:2397–404.
119. West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science.* 1985;228(November):1324–6.
120. Struve J, Maher PC, Li YQ, Kinney S, Fehlings MG, Kuntz IV C, et al. Disruption of the hyaluronan-based extracellular matrix in spinal cord promotes astrocyte proliferation. *Glia.* 2005;52(May):16–24.
121. Oksala O, Salo T, Tammi R, Häkkinen L, Jalkanen M, Inki P, et al. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem.* 1995;43(2):125–35.
122. Reijnen MMPJ, Bleichrodt RP, Van Goor H. Pathophysiology of intra-abdominal adhesion and abscess formation, and the effect of hyaluronan. *Br J Surg.* 2003;90:533–41.
123. Jin J, Limburg S, Joshi SK, Landman R, Park M, Zhang Q, et al. Peripheral nerve repair in rats using composite hydrogel-filled aligned nanofiber conduits with incorporated nerve growth factor. *Tissue Eng Part A [Internet].* 2013;19:2138–46.



124. Lam J, Truong NF, Segura T. Design of cell-matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds. *Acta Biomater* [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2014;10(4):1571–80.
125. Schanté CE, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydr Polym*. 2011;85:469–89.
126. Hahn SK, Jelacic S, Maier R V, Stayton PS, Hoffman AS. Anti-inflammatory drug delivery from hyaluronic acid hydrogels. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2004;15(March 2015):1111–9.
127. Zhang F, He C, Cao L, Feng W, Wang H, Mo X, et al. Fabrication of gelatin-hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering. *Int J Biol Macromol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;48(3):474–81.
128. Her GJ, Wu HC, Chen MH, Chen MY, Chang SC, Wang TW. Control of three-dimensional substrate stiffness to manipulate mesenchymal stem cell fate toward neuronal or glial lineages. *Acta Biomater* [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2013;9(2):5170–80.
129. Arnal-Pastor M, Martínez Ramos C, Pérez Garnés M, Monleón Pradas M, Vallés Lluch a. Electrospun adherent-antiadherent bilayered membranes based on cross-linked hyaluronic acid for advanced tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;33(7):4086–93.
130. Šimkovic I, Hricovíni M, Šoltés L, Mendichi R, Cosentino C. Preparation of water-soluble/insoluble derivatives of hyaluronic acid by cross-linking with epichlorohydrin in aqueous NaOH/NH₄OH solution. *Carbohydr Polym*. 2000;41:9–14.
131. Collins MN, Birkinshaw C. Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications. *J Appl Polym Sci*. 2007;104:3183–91.
132. Suri S, Han L-H, Zhang W, Singh A, Chen S, Schmidt CE. Solid freeform fabrication of designer scaffolds of hyaluronic acid for nerve tissue engineering. *Biomed Microdevices*. 2011;13:983–93.
133. Sakai Y, Matsuyama Y, Takahashi K, Sato T, Hattori T, Nakashima S, et al. New artificial nerve conduits made with photocrosslinked



- hyaluronic acid for peripheral nerve regeneration. *Biomed Mater Eng.* 2007;17:191–7.
134. Palumbo FS, Pitarresi G, Mandracchia D, Tripodo G, Giammona G. New graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: Synthesis and characterization. *Carbohydr Polym.* 2006;66:379–85.
 135. Tian WM, Hou SP, Ma J, Zhang CL, Xu QY, Lee IS, et al. Hyaluronic acid-poly-D-lysine-based three-dimensional hydrogel for traumatic brain injury. *Tissue Eng.* 2005;11(3):513–25.
 136. Yamada T, Sawada R, Tsuchiya T. The effect of sulfated hyaluronan on the morphological transformation and activity of cultured human astrocytes. *Biomaterials.* 2008;29:3503–13.
 137. Hou S, Xu Q, Tian W, Cui F, Cai Q, Ma J, et al. The repair of brain lesion by implantation of hyaluronic acid hydrogels modified with laminin. *J Neurosci Methods.* 2005;148:60–70.
 138. Ananthanarayanan B, Kim Y, Kumar S. Elucidating the mechanobiology of malignant brain tumors using a brain matrix-mimetic hyaluronic acid hydrogel platform. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;32(31):7913–23.
 139. Cui FZ, Tian WM, Hou SP, Xu QY, Lee IS. Hyaluronic acid hydrogel immobilized with RGD peptides for brain tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17:1393–401.
 140. Cai S, Liu Y, Zheng Shu X, Prestwich GD. Injectable glycosaminoglycan hydrogels for controlled release of human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials.* 2005;26:6054–67.
 141. Ekaputra AK, Prestwich GD, Cool SM, Hutmacher DW. The three-dimensional vascularization of growth factor-releasing hybrid scaffold of poly (ϵ -caprolactone)/collagen fibers and hyaluronic acid hydrogel. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;32(32):8108–17.
 142. Gelain F, Panseri S, Antonini S, Cunha C, Donega M, Lowery J, et al. Transplantation of Nanostructured Composite Scaffolds Results in the Spinal Cords. *Acta Nano.* 2011;5(1):227–36.



143. Elias PZ, Spector M. Implantation of a collagen scaffold seeded with adult rat hippocampal progenitors in a rat model of penetrating brain injury. *J Neurosci Methods* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;209(1):199–211.
144. Heinrich C, Spagnoli FM, Berninger B. In vivo reprogramming for tissue repair. *Nat Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;17(3):204–11.
145. Bozkurt A, Lassner F, O'Dey D, Deumens R, Böcker A, Schwendt T, et al. The role of microstructured and interconnected pore channels in a collagen-based nerve guide on axonal regeneration in peripheral nerves. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33(5):1363–75.
146. Wang S, Yaszemski MJ, Knight AM, Gruetzmacher J a., Windebank AJ, Lu L. Photo-crosslinked poly(ϵ -caprolactone fumarate) networks for guided peripheral nerve regeneration: Material properties and preliminary biological evaluations. *Acta Biomater* [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2009;5(5):1531–42.
147. Chang C-J. The effect of pulse-released nerve growth factor from genipin-crosslinked gelatin in schwann cell-seeded polycaprolactone conduits on large-gap peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(3):547–57.
148. Ngo TTB, Waggoner PJ, Romero A a, Nelson KD, Eberhart RC, Smith GM. Poly(L-lactide) microfilaments enhance peripheral nerve regeneration across extended nerve lesions. *J Neurosci Res*. 2003;72(August 2002):227–38.
149. Lietz M, Dreesmann L, Hoss M, Oberhoffner S, Schlosshauer B. Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types. *Biomaterials*. 2006;27:1425–36.
150. Gu X, Ding F, Williams DF. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;35(24):6143–56.
151. Colin W, Donoff RB. Nerve regeneration through collagen tubes. *J Dent Res*. 1984;63:987–93.
152. Zhang N, Yan H, Wen X. Tissue-engineering approaches for axonal guidance. *Brain Res Rev*. 2005;49:48–64.



153. De Ruiter GCW, Malessy MJ a, Yaszemski MJ, Windebank AJ, Spinner RJ. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus*. 2009;26(February):E5.
154. Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *J Biomed Sci*. 2009;16:108.
155. Nectow AR, Marra KG, Kaplan DL. Biomaterials for the Development of Peripheral Nerve Guidance Conduits. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012;18(1):40–50.
156. Harley B a., Hastings AZ, Yannas I V., Sannino A. Fabricating tubular scaffolds with a radial pore size gradient by a spinning technique. *Biomaterials*. 2006;27:866–74.
157. Oh SH, Kim JR, Kwon GB, Namgung U, Song KS, Lee JH. Effect of Surface Pore Structure of Nerve Guide Conduit on Peripheral Nerve Regeneration. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;19(3):120913061739004.
158. Norman JJ, Desai T a. Methods for fabrication of nanoscale topography for tissue engineering scaffolds. *Ann Biomed Eng [Internet]*. 2006 [cited 2012 Mar 27];34(1):89–101.
159. Meng F, Hlady V, Tresco P a. Inducing alignment in astrocyte tissue constructs by surface ligands patterned on biomaterials. *Biomaterials [Internet]*. Elsevier Ltd; 2012;33(5):1323–35.
160. Sevšek U, Brus J, Jeřábek K, Krajnc P. Post polymerisation hypercrosslinking of styrene/divinylbenzene poly(HIPE)s: Creating micropores within macroporous polymer. *Polym (United Kingdom)*. 2014;55:410–5.
161. Cai J, Peng X, Nelson KD, Eberhart R, Smith GM. Permeable guidance channels containing microfilament scaffolds enhance axon growth and maturation. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2005;75:374–86.
162. Clements IP, Kim YT, English AW, Lu X, Chung A, Bellamkonda R V. Thin-film enhanced nerve guidance channels for peripheral nerve repair. *Biomaterials [Internet]*. Elsevier Ltd; 2009;30(23-24):3834–46.



163. Uto K, Muroya T, Okamoto M, Tanaka H, Murase T, Ebara M, et al. Design of super-elastic biodegradable scaffolds with longitudinally oriented microchannels and optimization of the channel size for Schwann cell migration. *Sci Technol Adv Mater* [Internet]. 2012;13:064207.
164. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*. 2008. p. 86–100.
165. Chalfoun CT, Wirth G a., Evans GRD. Tissue engineered nerve constructs: Where do we stand? *J Cell Mol Med*. 2006;10:309–17.
166. Krych AJ, Rooney GE, Chen B, Schermerhorn TC, Ameenuddin S, Gross L, et al. Relationship between scaffold channel diameter and number of regenerating axons in the transected rat spinal cord. *Acta Biomater* [Internet]. *Acta Materialia Inc.*; 2009;5(7):2551–9.
167. Placone AL, Mcguiggan PM, Bergles DE, Searson PC, Guerrero-cazares H, Qui A. Biomaterials Human astrocytes develop physiological morphology and remain quiescent in a novel 3D matrix. 2015;42:134–43.
168. Aguayo a J, David S, Bray GM. Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol*. 1981;95:231–40.
169. David S, Aguayo a J. Axonal elongation into peripheral nervous system “bridges” after central nervous system injury in adult rats. *Science*. 1981;214:931–3.
170. Flynn JH, Wall LA. A quick, direct method for the determination of activation energy from thermogravimetric data. *J Polym Sci Part B Polym Lett* [Internet]. 1966;4(5):323–8.
171. Ozawa T. Kinetic analysis of derivative curves in thermal analysis. *J Therm Anal* [Internet]. 1970;2(3):301–24.
172. Flynn JH. A general differential technique for the determination of parameters for $d(\alpha)/dt=f(\alpha)A \exp(-E/RT)$. *J Therm Anal* [Internet]. 1991;37(2):293–305.
173. Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem*. 1962;4:330–4.



174. Cesaretti M, Luppi E, Maccari F, Volpi N. A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydr Polym.* 2003;54:59–61.
175. Gómez-Pinedo U, Félez MC, Sancho-Bielsa FJ, Vidueira S, Cabanes C, Soriano M, et al. Improved technique for stereotactic placement of nerve grafts between two locations inside the rat brain. *J Neurosci Methods.* 2008;174:194–201.
176. Yu F, Zhang F, Luan T, Zhang Z, Zhang H. Rheological studies of hyaluronan solutions based on the scaling law and constitutive models. *Polymer (Guildf)* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;55(1):295–301.
177. Collins MN, Birkinshaw C. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(11):3335–43.
178. Panagopoulou A, Molina JV, Kyritsis A, Pradas MM, Lluch AV, Ferrer GG, et al. Glass Transition and Water Dynamics in Hyaluronic Acid Hydrogels. *Food Biophys.* 2013;8(3):192–202.
179. Ritger PL, Peppas N a. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J Control Release.* 1987;5(1):23–36.
180. Pandis C, Spanoudaki A, Kyritsis A, Pissis P, Hernández JCR, Gómez Ribelles JL, et al. Water sorption characteristics of poly(2-hydroxyethyl acrylate)/silica nanocomposite hydrogels. *J Polym Sci Part B Polym Phys.* 2011;49(9):657–68.
181. Greenspan L. Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. *J Res Natl Bur Stand Chem* [Internet]. 1977;81A(1):89–96.
182. Hua Z, Zhou S, Zhao M. Fabrication of a surface imprinted hydrogel shell over silica microspheres using bovine serum albumin as a model protein template. *Biosens Bioelectron.* 2009;25(3):615–22.
183. Barham D, Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst.* 1972;97(151):142–5.



184. Fu JC, Hagemer C, Moyer DL. A unified mathematical model for diffusion from drug-polymer composite tablets. *J Biomed Mater Res.* 1976;10(5):743–58.
185. Ignjatović N, Tomić S, Dakić M, Miljković M, Plavšić M, Uskoković D. Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials. *Biomaterials.* 1999;20(9):809–16.
186. Yang F, Murugan R, Ramakrishna S, Wang X, Ma YX, Wang S. Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials.* 2004;25(10):1891–900.
187. Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle J a. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res Genet Toxicol* [Internet]. 1990;239(1):29–80.
188. Soh SK, Sundberg DC. Diffusion-controlled vinyl polymerization. I. The gel effect. *J Polym Sci Polym Chem Ed* [Internet]. 1982;20(5):1299–313.
189. Barber TW, Brockway J a, Higgins LS. The density of tissues in and about the head. *Acta Neurol Scand.* 1970;46(1):85–92.
190. Galford JE, McElhaney JH. A viscoelastic study of scalp, brain, and dura. *J Biomech.* 1970;3(2):211–21.
191. Tunturi a R. Elasticity of the spinal cord, pia, and denticulate ligament in the dog. *J Neurosurg.* 1978;48(6):975–9.
192. Hatakeyama H, Hatakeyama T. Interaction between water and hydrophilic polymers. *Thermochim Acta.* 1998;308(1-2):3–22.
193. Binette F, Cravens J, Kahoussi B, Haudenschild DR, Goetinck PF. Link protein is ubiquitously expressed in non-cartilaginous tissues where it enhances and stabilizes the interaction of proteoglycans with hyaluronic acid. *J Biol Chem.* 1994;269(29):19116–22.
194. Seyfried NT, McVey GF, Almond A, Mahoney DJ, Dudhia J, Day AJ. Expression and purification of functionally active hyaluronan-binding domains from human cartilage link protein, aggrecan and versican: Formation of ternary complexes with defined hyaluronan oligosaccharides. *J Biol Chem.* 2005;280(7):5435–48.



195. Goetinck PF, Stirpe NS, Tsonis PA, Carlone D. The tandemly repeated sequences of cartilage link protein contain the sites for interaction with hyaluronic acid. *J Cell Biol* [Internet]. 1987;105(5):2403-8.
196. Hascall VC, Heinegard D. Aggregation of cartilage proteoglycans. II. Oligosaccharide competitors of the proteoglycan hyaluronic acid interaction. *J Biol Chem*. 1974;249(13):4242-9.
197. Van Stroe-Biezen S a M, Everaerts FM, Janssen LJJ, Tacken R a. Diffusion coefficients of oxygen, hydrogen peroxide and glucose in a hydrogel. *Anal Chim Acta*. 1993;273(1-2):553-60.
198. Mellott MB, Searcy K, Pishko M V. Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly(ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization. *Biomaterials*. 2001;22(9):929-41.
199. Leach JB, Schmidt CE. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26(2):125-35.
200. Uedaira H, Uedaira H. Sugar-water interaction from diffusion measurements. *J Solution Chem* [Internet]. 1985;14(1):27-34.
201. Bajorath J, Greenfield B, Munro SB, Day AJ, Aruffo A. Identification of CD44 residues important for hyaluronan binding and delineation of the binding site. *J Biol Chem*. 1998;273(1):338-43.
202. Peach RJ, Hollenbaugh D, Stamenkovic I, Aruffo a. Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J Cell Biol*. 1993;122(1):257-64.
203. West JD, Stamm CE, Brown H a., Justice SL, Morano K a. Enhanced toxicity of the protein cross-linkers divinyl sulfone and diethyl acetylenedicarboxylate in comparison to related monofunctional electrophiles. *Chem Res Toxicol*. 2011;24(9):1457-9.
204. Cui HH, Valdez JG, Steinkamp J a, Crissman H a. Fluorescence lifetime-based discrimination and quantification of cellular DNA and RNA with phase-sensitive flow cytometry. *Cytometry A*. 2003;52(1):46-55.
205. Larsson A, Carlsson C, Jonsson M, Albinsson B. Characterization of the binding of the fluorescent dyes YO and YOYO to DNA by



- polarized light spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 1994;116(19):8459–65.
206. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2009;103(4):655–63.
207. Ross AM, Jiang Z, Bastmeyer M, Lahann J. Physical aspects of cell culture substrates: Topography, roughness, and elasticity. *Small.* 2012;8(3):336–55.
208. Charest JL, Eliason MT, García AJ, King WP. Combined microscale mechanical topography and chemical patterns on polymer cell culture substrates. *Biomaterials.* 2006;27(11):2487–94.
209. Larsen M, Artym V V., Green JA, Yamada KM. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(5):463–71.
210. Zhou XF, Rush R a, McLachlan EM. Differential expression of the p75 nerve growth factor receptor in glia and neurons of the rat dorsal root ganglia after peripheral nerve transection. *J Neurosci.* 1996;16(9):2901–11.
211. Brenner M. Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett [Internet]. Elsevier Ireland Ltd;* 2014;565:7–13.
212. Villarreal A, Aviles Reyes RX, Angelo MF, Reines AG, Ramos AJ. S100B alters neuronal survival and dendrite extension via RAGE-mediated NF- κ B signaling. *J Neurochem [Internet].* 2011;117(2):321–32.
213. Cheng L, Mudge AW. Cultured Schwann cells constitutively express the myelin protein P0. *Neuron.* 1996;16:309–19.
214. Fernandez-Valle C, Fregien N, Wood PM, Bunge MB. Expression of the protein zero myelin gene in axon-related Schwann cells is linked to basal lamina formation. *Development.* 1993;119(3):867–80.
215. Menichella DM, Arroyo EJ, Awatramani R, Xu T, Baron P, Vallat JM, et al. Protein zero is necessary for E-cadherin-mediated adherens junction formation in Schwann cells. *Mol Cell Neurosci.* 2001;18(6):606–18.



216. Radhakrishnan J, Kuppuswamy AA, Sethuraman S, Subramanian A. Topographic Cue from Electrospun Scaffolds Regulate Myelin-Related Gene Expressions in Schwann Cells. *J Biomed Nanotechnol* [Internet]. 2015;11(3):512–21.
217. Park YD, Tirelli N, Hubbell J a. Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks. *Biomaterials* [Internet]. 2003;24(6):893–900.
218. Ramadan MH, Prata JE, Karácsony O, Dunér G, Washburn NR. Reducing protein adsorption with polymer-grafted hyaluronic acid coatings. *Langmuir*. 2014;30(25):7485–95.
219. Gutmann E, Guttman L, Medawar PB, Young JZ. The rate of regeneration of nerve. *J Exp Biol* [Internet]. 1942;19:14–44.
220. Schreyer DJ, Jones EG. Growth and target finding by axons of the corticospinal tract in prenatal and postnatal rats. *Neuroscience* [Internet]. 1982;7(8):1837–53.
221. Richardson PM, Verge VMK. Axonal regeneration in dorsal spinal roots is accelerated by peripheral axonal transection. *Brain Res* [Internet]. 1987;411(2):406–8.
222. Seddon HJ, Medawar PB, Smith H. Rate of regeneration of peripheral nerves in man. *J Physiol* [Internet]. 1943;102(2):191–215.
223. Black MM, Lasek RJ. Slowing of the rate of axonal regeneration during growth and maturation. *Exp Neurol* [Internet]. 1979;63(1):108–19.
224. Nakamura T, Inada Y, Fukuda S, Yoshitani M, Nakada A, Itoi SI, et al. Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Res*. 2004;1027(1-2):18–29.
225. Balgude a. P, Yu X, Szymanski a., Bellamkonda R V. Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures. *Biomaterials*. 2001;22(10):1077–84.
226. Kim J, Choi J, Lee D. Pyrogenicity of hyaluronic acid hydrogel crosslinked by divinyl sulfone for soft tissue augmentation. *Nat Sci* [Internet]. 2010;02(07):764–8.