

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Micropartículas poliméricas cargadas con nanopartículas magnéticas para estimulación mecánica de células mesenquimales: síntesis y evaluación de la viabilidad celular.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: *Sandra Clara Trujillo*

TUTORA: *Gloria Gallego Ferrer*

COTUTOR: *José Luís Gómez Ribelles*

Curso Académico: 2015/2016

VALENCIA, Julio 2016



Datos personales

Nombre y apellidos del alumno: Sandra Clara Trujillo

Datos del trabajo final de grado

Título: Micropartículas poliméricas cargadas con nanopartículas magnéticas para estimulación mecánica de células mesenquimales: síntesis y evaluación de la viabilidad celular.

Localidad y fecha: Valencia, julio de 2016.

Tutora: Prof. Gloria Gallego Ferrer. **Cotutor:** Prof. José Luís Gómez Ribelles.

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

Tipo de licencia: Creative Commons: *Atribución-NoComercial-SinDerivadas (CC BY-NC-ND)*.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido la preparación, caracterización y estudio de la viabilidad celular de matrices extracelulares sintéticas formadas por micropartículas poliméricas que responden a campos magnéticos en el seno de un hidrogel natural, para la estimulación local de células en aplicaciones de ingeniería tisular. Las micropartículas han sido preparadas de ácido poliláctico y se han cargado de nanopartículas de ferrita para su estimulación magnética. El soporte de hidrogel ha consistido en una matriz de gelatina inyectable, que ha permitido la encapsulación de células y micropartículas en el momento de su entrecruzamiento.

Se ha llevado a cabo la fabricación de las microesferas y se ha analizado su topografía mediante microscopía de barrido de emisión de campo. La incorporación de las nanopartículas magnéticas afecta a la cristalinidad de las microesferas, suponiendo un aumento en la cristalinidad de las mismas. Se ha comprobado que las microesferas presentan dimensiones entorno al tamaño celular y poseen magnetización.

En cuanto al hidrogel, se ha obtenido gelatina modificada con tiramina para posibilitar la reticulación del mismo mediante una reacción enzimática mediada por la adición secuencial de peroxidasa y peróxido de hidrógeno y se ha medido el grado de injerto logrado en el proceso. Mediante el uso de reómetro se ha determinado el tiempo de gelificación de dicha matriz.

Se han llevado a cabo ensayos biológicos con dos líneas celulares, fibroblastos L929 y preosteoblastos MC3T3-E1, con el objetivo de caracterizar la viabilidad y proliferación celular asociada a los materiales desarrollados. Mediante ensayos de LIVE/DEAD se ha observado que los hidrogeles no presentan efectos citotóxicos a corto plazo cuando se emplean para encapsulación celular. Los estudios de proliferación demuestran que hasta 7 días de cultivo *in vitro* se mantiene la viabilidad y existe proliferación. Finalmente, mediante una tinción celular Actina/DAPI se ha podido observar la morfología 3D de células cultivadas en los hidrogeles con microesferas, determinándose que éstas adaptan su citoesqueleto de actina al ser cultivadas en el sistema planteado.

Por todo ello, los hidrogeles con microesferas desarrollados presentan un gran potencial para su uso en el campo de la medicina regenerativa, ya que no comprometen la viabilidad ni la proliferación celular y constituyen un entorno biomimético prometedor para lograr la diferenciación ósea, por su potencial capacidad de transmitir estímulos mecánicos a las células encapsuladas en los mismos.

PALABRAS CLAVE

Micropartículas, nanopartículas magnéticas, hidrogel inyectable, viabilidad celular, ingeniería tisular.

ABSTRACT

The aim of this project has been the preparation, characterization and study of cell viability of extracellular synthetic matrices formed by polymeric microparticles which respond to magnetic fields within a natural hydrogel, for the local stimulation of cells in tissue engineering applications. The microparticles have been prepared of polylactic acid and loaded with ferrite nanoparticles for its magnetic stimulation. The hydrogel support has consisted of a matrix of injectable gelatin, which has allowed cells and microparticles encapsulation in the time of crosslinking.

The production of the microspheres has been carried out and its topography has been analyzed by scanning field emission microscopy. The incorporation of magnetic nanoparticles affects the crystallinity of the microspheres, resulting in an increase of its crystallinity. The microspheres have dimensions around the cell size and have magnetization.

For the hydrogel, gelatin modified with tyramine has been obtained, in order to enable its crosslinking by an enzymatic reaction mediated by the sequential addition of peroxidase and hydrogen peroxide. The degree of grafting achieved in the process has been measured. Using a rheometer, the gelling time of that matrix has been determined.

In vitro cultures have been carried out with two cell lines, fibroblasts L929 and MC3T3-E1 pre-osteoblasts, with the aim of characterizing the cell viability and proliferation associated with the materials developed. LIVE / DEAD essay has shown that hydrogels have no short term cytotoxic effects when used for cell encapsulation. Proliferation studies have demonstrated that up to 7 days of *in vitro* culture, cell viability is maintained and proliferation exists.

Finally, by cell staining Actin / DAPI the 3D morphology of cells cultured within the hydrogels containing microspheres has been observed, being shown that cells adapt their actin cytoskeleton when grown in the proposed system.

Therefore, the developed hydrogels with microspheres have great potential in the field of regenerative medicine, as they do not compromise the viability or cell proliferation. These hydrogels represent a promising environment to achieve biomimetic bone differentiation because of their potential ability to transmit mechanical stimuli to the cells encapsulated in them.

KEY WORDS

Microparticles, magnetic nanoparticles, injectable hydrogel, cell viability, tissue engineering.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mi tutora, Gloria, por su tiempo, su ayuda y sus consejos, especialmente por su confianza y por las experiencias y oportunidades que me ha ofrecido en este tiempo. Así como a mi cotutor, José Luis por sus indicaciones, sus ideas y su cercanía.

A todos los compañeros y compañeras del CBIT por ser tan accesibles desde el primer día, por su ayuda y por su compañía que ha hecho de estos meses una experiencia única. Sobre todo, a Laura, Blanca y Rosa por su ayuda con el trabajo. A Álvaro por compartir todo lo aprendido durante su trabajo, que supuso la base de éste, y a María y a Keila por compartir las semanas más entretenidas y productivas en cultivos, y por formar parte de ellas.

En especial a Esther por compartir los mejores momentos de esta experiencia y los no tan buenos, por su ayuda, su sentido del humor y su paciencia. Y a Carmen María, por su dedicación, su tiempo y su alegría. Gracias Carmen por ser como eres, he aprendido mucho contigo, pero también de ti; espero tu factura...

También a la gente de Braga por su amabilidad y su ayuda en lo que he necesitado, sobre todo a Clarisse por guiarme en esa “*aventura*” de cultivos que hemos compartido y por enseñarme a ver que siempre se puede aprender y avanzar, incluso cuando los resultados no son los esperados.

Al servicio de Microscopía de la Universitat Politècnica de València por su ayuda en la preparación de muestras y en el manejo de los equipos, así como al Instituto de Tecnología de alimentos por permitirnos emplear su espectrofotómetro UV para realizar nuestros ensayos.

A mis biotecs de siempre, por escuchar y por contar, una vez más, por demostrarme por qué compartir es vivir.

A mi familia, a la de siempre y a la que he ido ganando con los años, por ser el ejemplo de que el trabajo y la dedicación siempre traen resultados, por animarme, y enseñarme cada día.

Por último, no quisiera olvidarme del apoyo financiero del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) a través del proyecto MAT2013-46467-C4-1-R, que nos ha permitido realizar este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL TEJIDO ÓSEO Y SUS PATOLOGÍAS, PAPEL DE LA INGENIERÍA TISULAR EN ESTE CAMPO	1
1.2. COMPONENTES CELULARES DEL TEJIDO ÓSEO	2
1.3. ESTRATEGIAS DE INGENIERÍA TISULAR DIRIGIDAS A LA REGENERACIÓN ÓSEA	4
1.4. HIDROGELES EN INGENIERÍA TISULAR: CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN	5
1.4.1. <i>Hidrogeles inyectables</i>	6
1.4.2. <i>La gelatina</i>	7
1.5. EL USO DE MSCs PARA REGENERACIÓN DE DAÑOS EN TEJIDO ÓSEO	7
1.5.1. <i>Estimulación mecánica de MSCs</i>	8
1.5.1.1. <i>Estimulación magnética de MSCs</i>	12
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. MATERIALES Y REACTIVOS.....	14
3.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	15
3.2.1. <i>Microesferas poliméricas</i>	15
3.2.1.1. <i>Obtención de microesferas de PLLA</i>	15
3.2.1.2. <i>Obtención de microesferas de PLLA con MNPs de ferrita</i>	16
3.2.1.3. <i>Distribución de tamaños de las microesferas obtenidas</i>	16
3.2.1.4. <i>Caracterización morfológica mediante microscopia electrónica de barrido</i>	16
3.2.1.5. <i>Evaluación del grado de cristalinidad de las microesferas obtenidas</i>	16
3.2.1.6. <i>Determinación de la magnetización de las microesferas con ferrita</i>	17
3.2.2. <i>Gelatina modificada con tiramina</i>	17
3.2.2.1. <i>Síntesis de la gelatina modificada con tiramina</i>	17
3.2.2.2. <i>Evaluación del grado de injerto de tiramina</i>	18
3.2.2.3. <i>Formación de los hidrogeles y determinación del tiempo de gelificación</i>	18
3.2.3. <i>Esterilización de materiales</i>	19
3.3. CULTIVOS CELULARES	19
3.3.1. <i>Procedimiento de siembra de cultivo celular en hidrogel</i>	20
3.3.2. <i>LIVE/DEAD, ensayo de viabilidad celular</i>	20
3.3.3. <i>MTS, ensayo de proliferación celular</i>	21
3.3.4. <i>Tinción Actina/DAPI, evaluación de la morfología celular</i>	22
3.3.5. <i>Obtención de secciones de los hidrogeles cultivados mediante micrótopo criogénico</i>	23
3.3.6. <i>Microscopia de fluorescencia</i>	23
3.3.7. <i>Microscopia confocal</i>	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. FABRICACIÓN, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	24
4.1.1. <i>Microesferas poliméricas</i>	24
4.1.2. <i>Gelatina modificada con tiramina</i>	29
4.1.3. <i>Generación del entorno biomimético, integración de los materiales</i>	30

4.2. ENSAYOS DE CULTIVOS CELULARES	31
4.2.1. <i>LIVE/DEAD, ensayo de viabilidad celular</i>	31
4.2.2. <i>MTS, ensayo de proliferación celular</i>	33
4.2.3. <i>Tinción Actina/DAPI, evaluación de la morfología celular</i>	34
5. CONCLUSIONES.....	36
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
7. ANEXOS.....	41
7.1. RESULTADOS DEL ENSAYO DE MAGNETIZACIÓN	41
7.2. CÁLCULO DEL GRADO DE INJERTO Y GRADO DE SUSTITUCIÓN DE LA GELATINA-TA	43
7.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE MEDIDAS REOLÓGICAS	45
7.4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE MTS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del tejido óseo.	1
Figura 2. Transiciones celulares de las MSCs (células madre mesenquimales).....	2
Figura 3. Marcadores del proceso de diferenciación osteoblástica	3
Figura 4. Esquema del proceso de remodelado óseo	4
Figura 5. Representación esquemática del proceso de entrecruzamiento in-situ de un hidrogel inyectable de gelatina modificada con tiramina empleando HRP y H ₂ O ₂	7
Figura 6. Proceso de mecanotransducción	9
Figura 7. Representación del proceso de adhesión celular mediado por integrinas	10
Figura 8. Modelo para la regulación de la diferenciación osteogénica	11
Figura 9. Hidrogel gelatina-TA 3% reticulado	19
Figura 10. Imágenes tomadas mediante FESEM de las microesferas poliméricas obtenidas mediante los diferentes protocolos síntesis evaluados.....	24
Figura 11. Imágenes obtenidas mediante FESEM de las microesferas poliméricas	25
Figura 12. Termogramas obtenidos mediante DSC para las esferas de PLLA y para las que contienen nanopartículas	26
Figura 13. Distribución de diámetros de las microesferas poliméricas	28
Figura 14. Espectro de absorbancia de la gelatina-tiramina	28
Figura 15. Representación del módulo de almacenamiento de cizalla de un hidrogel de gelatina-TA3% frente al tiempo obtenido mediante barrido de tiempo en reómetro	30
Figura 16. Hidrogeles de gelatina-tiramina al 2% con microesferas poliméricas de PLLA al 0,5% w/v	31
Figura 17. Imágenes representativas de las imágenes analizadas en el ensayo LIVE/DEAD a tiempo 3 horas	32
Figura 18. Imágenes representativas de las imágenes analizadas en el ensayo LIVE/DEAD a tiempo 24 horas	32
Figura 19. Porcentajes de viabilidad celular asociados a cada una de las condiciones 33ensayadas en el LIVE/DEAD	33
Figura 20. Proliferación celular medida mediante MTS en matrices de gelatina-TA con esferas de PLLA y de gelatina-TA con esferas de PLLA con MNPs a diferentes tiempos de cultivo	33
Figura 21. Fases del proceso de adhesión celular	34
Figura 22. Imágenes de microscopia de confocal correspondientes a la tinción Actina/DAPI realizada sobre los diferentes biomateriales ensayados	35
Figura 23. Imágenes de la tinción Actina/DAPI realizada sobre hidrogeles de gelatina-TA 3% con microesferas poliméricas magnéticas tras 3 horas y 7 días de cultivo	35

Figura 24. Gráfica obtenida mediante el ensayo de VSM para las MNPs de ferrita.....	41
Figura 25. Gráfica obtenida mediante el ensayo de VSM para la primera réplica de microesferas magnéticas	42
Figura 26. Gráfica obtenida mediante el ensayo de VSM para la segunda réplica de microesferas magnéticas	42
Figura 27. Recta de calibrado para la determinación de la concentración de tiramina (mg/mL)	43
Figura 28. Módulo elástico en función del tiempo para un hidrogel de gelatina-TA3% con representación del cálculo del tiempo de gelificación	45
Figura 29. Evolución del módulo complejo en función del strain aplicado a la muestra para un hidrogel de gelatina-TA3%.....	46
Figura 30. Evolución del módulo de almacenamiento (a), del módulo de pérdidas (b) y la tangente de δ (c) en función de la frecuencia, para hidrogeles de gelatina-TA3%.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones clave de un buen biomaterial	5
Tabla 2. Ratios molares de los reactivos empleados en la síntesis de gelatina injertada con TA	17
Tabla 3. Cristalinidad de las micropartículas con ferrita (PLLA + MNPs) y sin ferrita (PLLA) obtenida del primer barrido de DSC.	27
Tabla 4. Estadísticos descriptivos para cada uno de los tipos de esferas	28
Tabla 5. Resultados de los análisis del grado de injerto de tiramina	29
Tabla 6. Cálculos realizados para la obtención del grado de injerto de las muestras de gelatina-TA	44
Tabla 7. Cálculos realizados para la obtención del grado de sustitución de las muestras de gelatina-TA	44
Tabla 8. Parámetros correspondientes a las rectas de ajuste lineal de la Figura 28.	45
Tabla 9 . Módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdidas (G'') y tangente de δ ($\tan \delta$) obtenidos para una frecuencia de 1Hz, aplicando un 1% de strain y a una temperatura de 37° para la gelatina-TA3%.	46
Tabla 10. Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples realizado mediante el software GraphPad Prism 7	48

ABREVIATURAS

ALP: Fosfatasa alcalina.
BMPs: Proteínas morfogénicas óseas.
CF-KRB: Calcium free Krebs ringer buffer.
CLF: Cloroformo.
COOH: Grupos carboxilo.
DAPI: 4'-6-diamidino-2-phenylindole dilactate.
Dkk1: Proteína 1 relacionada con Dickkopf
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium.
DPBS: Dulbecco's phosphate buffered saline.
DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido.
ECM: Matriz extracelular.
EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida.
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
FAK: Kinasa de las adhesiones focales.
FBS: Fetal bovine serum.
FESEM: Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo.
G': Módulo de almacenamiento en cizalla.
G'': Módulo de pérdidas en cizalla.
G*: Módulo complejo en cizalla.
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.
HEPES: Ácido 4-(3-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico.
HRP: Peroxidasa de rábano.
MES: Ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico.
MNPs: Nanopartículas magnéticas.
MSCs: Células madre mesenquimales.
M_s: Magnetización de saturación.
MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium.
NaCl: Cloruro sódico.
NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NHS: N-Hidroxisuccinimida.
OCN: Osteocalcina.
PLA: Ácido poliláctico.
PLLA: Ácido poli-L-láctico.
P/S: Penicilina/estreptomicina.
RANK: Receptor Activador del Factor nuclear κB.
RGD: secuencia aminoacídica Arg-Gly-Asp (Arginina-Glicina-Aspártico).
RhoA: Ras homolog gene family, member A.
ROCK: Proteína kinasa asociada a Rho.
ROS: Especies reactivas de oxígeno.
Runx2: Runt-related transcription factor 2.
Sost: Esclerostina.
TA: Tiramina.
UV: Ultravioleta.
VSM: Magnetómetro de muestra vibrante.
Δh_c: Entalpía específica de cristalización.
Δh_m: Entalpía específica de fusión.

1.INTRODUCCIÓN

1.1. El tejido óseo y sus patologías, papel de la ingeniería tisular en este campo.

El hueso se compone de tejido óseo y médula ósea (en algunos tipos de hueso) rodeado de periostio, el cual consta de una densa capa externa de células formadoras de hueso y de una capa de tejido conectivo vascularizado (Figura 1). Se trata de un órgano único debido a su capacidad de auto-reparación y regeneración. El hueso postnatal mantiene una capacidad inherente de crecimiento controlado que se combina con la capacidad de remodelación en respuesta a estímulos mecánicos, así como con la de regenerar lesiones de tamaño limitado.

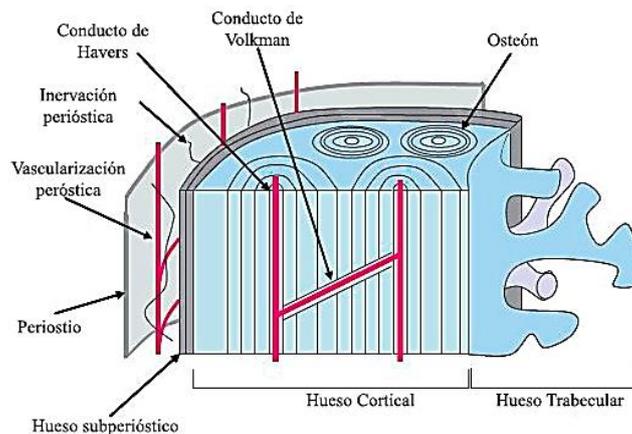


Figura 1. Estructura del tejido óseo. En la figura se observa una representación esquemática de la fisiología de dicho tejido (adaptada de Thomas et al., 2011).

Sin embargo, en casos en los que hay un defecto de tamaño considerable en el tejido óseo esta capacidad de auto-reparación no es suficiente. Las principales causas que pueden llevar a esta situación son un trauma considerable, una enfermedad sistémica, fracturas patológicas (ya sea como consecuencia de una metástasis o de un tumor primario), una infección del hueso o de los tejidos adyacentes, o bien pueden aparecer este tipo de lesiones si se ha visto comprometido el aporte sanguíneo en la zona. Esto resulta en defectos permanentes del hueso que pueden llevar a la pérdida de función del mismo. Además, esta capacidad de regeneración declina a lo largo de la vida del individuo, reflejándose en la aparición de patologías características de dicho tejido como la osteoporosis.

Los avances médicos de los últimos años han llevado a un aumento considerable de la esperanza de vida, y como consecuencia han supuesto un envejecimiento de la población. Por todo ello, existe una necesidad creciente de desarrollar nuevos tratamientos destinados a pacientes con enfermedades musculoesqueléticas, una prueba evidente de ello es que el hueso es el segundo tejido más trasplantado, sólo por detrás de la sangre (Tang et al., 2016; Leach y Mooney, 2004; Oryan et al., 2014). Por todo ello, la investigación relacionada con patologías del tejido óseo y el desarrollo de sistemas que contribuyan a la remodelación del mismo constituye un campo científico en auge en los últimos años.

El concepto de ingeniería tisular fue propuesto por Langer y Vacanti (1993) a principios los 90 del siglo pasado. Se trata de una estrategia dirigida a la regeneración de distintos tejidos, entre ellos el óseo, que generalmente implica la incorporación de las células apropiadas en un soporte que proporciona un microambiente adecuado y sirve como

matriz extracelular (ECM) temporal hasta que las células producen su propia matriz y finalmente el tejido neo-formado reemplaza el soporte, en el caso de que se trate de un soporte biodegradable.

De este modo, la regeneración ósea es uno de los principales campos de trabajo de la ingeniería tisular y en este sentido, la capacidad natural de reparación del propio hueso ha proporcionado un paradigma ayudando al desarrollo de nuevas opciones de tratamiento. Por ello se considera esencial conocer los distintos sistemas celulares que componen este tejido, así como las interacciones entre los mismos que median el proceso de remodelado óseo.

1.2. Componentes celulares del tejido óseo.

Las células madre mesenquimales (MSCs), que se encuentran en el estroma de la médula ósea, tienen capacidad para diferenciarse originando diversos linajes celulares diferenciados. Pueden dar lugar a fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, en función de las distintas señales moleculares que éstas reciban (Figura 2) (Caplan y Bruder, 2001).

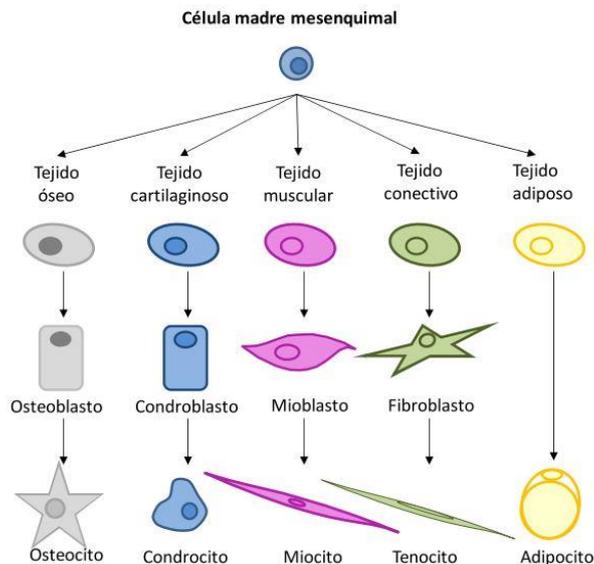


Figura 2. Transiciones celulares de las MSCs (células madre mesenquimales). En el esquema se refleja el avance desde la célula madre mesenquimal hasta los fenotipos diferenciados de los distintos linajes celulares que éstas pueden originar (adaptado de Caplan y Bruder, 2001).

La diferenciación hacia la estirpe osteoblástica está mediada por genes de la familia Hedgehog, cuya expresión está fundamentalmente controlada por factores de transcripción como *Runt-related transcription factor 2* (Runx2) y las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y acaba originando un tipo celular conocido como osteoblastos.

Los **osteoblastos** son las células encargadas de la formación ósea y de mantener la arquitectura característica de dicho tejido, ya que son los principales responsables de la síntesis de la matriz orgánica del tejido óseo, compuesta principalmente por colágenos que constituyen el 90%, y otras proteínas como proteoglicanos o osteocalcina (OCN). Asimismo, también contribuyen a la mineralización de dicha matriz gracias a la fosfatasa alcalina (ALP), enzima que libera el fosfato inorgánico (necesario para la mineralización) a partir de ésteres fosfóricos. Pero, además, también median en los procesos de

resorción o degradación ósea llevados a cabo por los osteoclastos. A medida que las células madre mesenquimales van avanzando en el proceso de diferenciación osteoblástica van expresando una serie de proteínas necesarias para su función que se suelen emplear como marcadores del estadio de diferenciación celular en que se encuentran, en la Figura 3 se pueden observar los principales marcadores asociados a los osteoblastos.

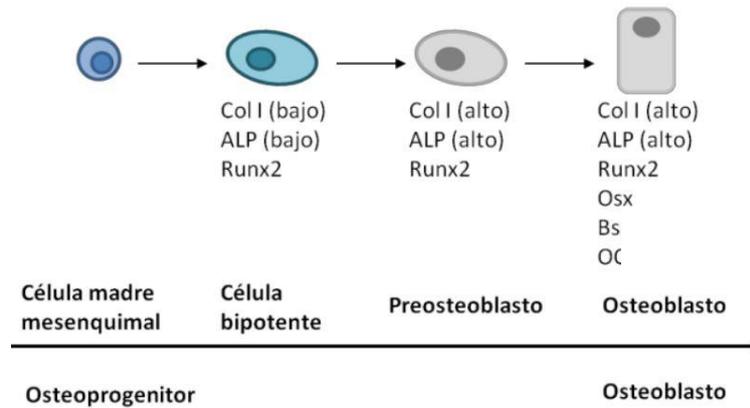


Figura 3. Marcadores del proceso de diferenciación osteoblástica. De forma temprana se expresan el colágeno tipo I (COLI), la fosfatasa alcalina (ALP) y niveles elevados de Runx2. Posteriormente, cuando se inicia la mineralización de la matriz, destaca el aumento de los niveles de expresión de la osteocalcina (OCN) (Lara, 2015).

Cuando los osteoblastos alcanzan su nivel definitivo de madurez pueden desaparecer por procesos de apoptosis o muerte celular programada o bien pueden originar un nuevo tipo celular del tejido óseo: los **osteocitos**. Éstos constituyen el estadio final de diferenciación del linaje osteoblástico por lo que no presentan capacidad de auto-renovación, y suponen el 90% de las células del tejido óseo. Las principales diferencias entre osteocitos y osteoblastos implican que los primeros presentan mayores niveles de expresión en cuanto a genes relacionados con la mineralización de la matriz y una menor capacidad de síntesis de los componentes orgánicos de la misma. De manera que se considera como función principal de los osteocitos la regulación de los procesos de remodelado óseo. Los osteocitos destacan por su capacidad de comunicación con todos los tipos celulares de este tejido, gracias a sus procesos dendríticos citoplasmáticos. De esta manera regulan el remodelado óseo en respuesta a variaciones mecánicas de las cargas, coordinando sobretodo la acción entre los mencionados osteoblastos y el otro tipo celular esencial del tejido óseo: los osteoclastos. Pero cabe mencionar que la coordinación de estos procesos por parte de los osteocitos se ejerce también de manera indirecta mediante la expresión de moléculas, como la proteína 1 relacionada con Dickkopf (Dkk1) o la esclerostina (Sost), que promueven la síntesis de antagonistas de las BMPs y de la vía Wnt, inhibiendo así la diferenciación de osteoblastos y por tanto la formación de nuevo tejido óseo (Tang *et al.*, 2016; Lara, 2015).

Finalmente, los **osteoclastos** son las células encargadas de la reabsorción ósea que permite la degradación tanto de la fase orgánica de la matriz como de la fase mineral. Se trata de células provenientes del linaje hematopoyético que ante una erosión derivan a macrófagos y a su vez, estos macrófagos mediante un proceso de fusión celular, originan los osteoclastos. En este proceso es clave la activación del Receptor Activador del factor nuclear κ B (RANK) para identificar a una población de células

hematopoyéticas como precursoras de osteoclastos. Son células polarizadas, plurinucleadas y móviles que se adhieren mediante prolongaciones al hueso para llevar a cabo su función. Secretan una serie de enzimas proteolíticas (que llevan a cabo la degradación de la fase orgánica del hueso) y compuestos ácidos (que se encargan de degradar la fase mineral constituida por hidroxapatita y pequeñas cantidades de magnesio, sodio, flúor, potasio y manganeso) (Edwards y Mundy, 2011).

El **remodelado óseo** es el proceso que permite la regeneración constante de este tejido (Lara, 2015). Los osteoblastos y los osteoclastos son los principales mediadores del proceso (Figura 4), pero es de destacar el papel regulatorio de los osteocitos para controlar los balances entre resorción y síntesis de tejido, por ejemplo, diversos estudios apuntan a que los osteocitos son los primeros en responder a cambios en las cargas mecánicas a las que está sometido el tejido (Bellido, 2014).

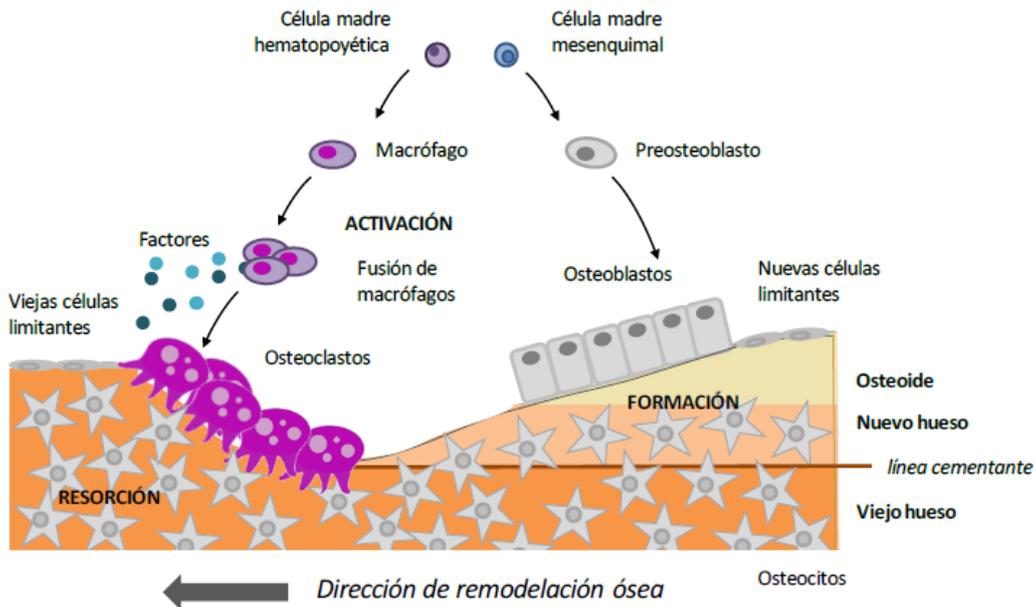


Figura 4. Esquema del proceso de remodelado óseo. Los macrófagos precursores de osteoclastos se activan mediante fusión celular para diferenciarse en osteoclastos que forman un frente de avance de reabsorción ósea, generándose así un valle que posteriormente se reviste por acción de los osteoblastos diferenciados a partir de células madre mesenquimales (Lara, 2015). Es esencial entender que la acción de los osteoclastos, que supone la resorción del hueso, degradando tanto la fase inorgánica como la orgánica de la ECM, permite que quede libre una nueva superficie en la que será posible la formación de hueso, y ésta se iniciará a partir de la diferenciación de MSCs en osteoblastos. Por tanto, en el contexto de la ingeniería tisular en que se pretende regenerar una zona dañada en la que el hueso ya ha sido degradado previamente por diversos factores, el primer paso para iniciar esa regeneración es conseguir la diferenciación de las MSCs en osteoblastos de forma eficiente.

1.3. Estrategias de ingeniería tisular dirigidas a la regeneración ósea.

Para conseguir dicho objetivo, se han empleado hasta la actualidad numerosas estrategias basadas en distintos tipos de soportes, incluyendo scaffolds o hidrogeles. Los scaffolds consisten en una estructura de soporte sólido con una red de poros interconectados, mientras que los hidrogeles son matrices acuosas que contienen

células encapsuladas. Ambas formas deben permitir la colonización, la proliferación, la diferenciación y la migración celular. Además, deben poseer propiedades fisicoquímicas apropiadas (tales como la resistencia, la rigidez, la biodegradabilidad o la superficie química) que son necesarias para la formación de tejido. También han de ser capaces de soportar y responder adecuadamente a la tensión mecánica (Bae *et al.*, 2013).

Actualmente la opción principal para el tratamiento de defectos óseos sigue siendo el injerto óseo, que consiste en un material implantado en la zona de la lesión, utilizado solo o en combinación con otros materiales, y que promueve la curación del hueso consiguiendo llevar a cabo las tres funciones clave que se esperan de un biomaterial (Tabla 1).

Tabla 1. Funciones clave de un buen biomaterial. Concepto de las principales características que se esperan de un biomaterial óptimo para regeneración ósea (adaptado de Lara, 2015).

OSTEOINTEGRACIÓN	Hace referencia al hecho de que se establezca una buena adhesión entre el tejido y el biomaterial, a la conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo ordenado y la superficie del implante sometido a la carga funcional.
OSTEOCONDUCCIÓN	Se refiere a que el implante poroso ha de suponer una vía que permita el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y la migración de células que lleven a cabo la invasión del tejido neoformado.
OSTEOINDUCCIÓN	Implica que el material ha de ser activo, con capacidad para inducir el reclutamiento de células mesenquimales pluripotenciales y para promover su diferenciación a osteoblastos.

No obstante, como se ha comentado, existe una tendencia al desarrollo de nuevas terapias que tratan de inducir el proceso natural de remodelación ósea. Entre estas nuevas opciones de tratamiento se incluyen diversas terapias basadas en la ingeniería de tejidos, como los hidrogeles biodegradables que en algunos casos han permitido la mejora de la osteoconductividad, la osteoinductividad y la osteointegración (Kundu *et al.*, 2014).

1.4. Hidrogeles en Ingeniería Tisular: concepto y clasificación.

Los hidrogeles se utilizan ampliamente como materiales en numerosas aplicaciones biomédicas debido a sus excelentes propiedades. Se trata de estructuras tridimensionales insolubles en agua, pero hidrofílicas, compuestas por cadenas flexibles de polímeros reticulados (de origen natural o sintético) que presentan una alta biocompatibilidad debido a su alto contenido en agua, siendo el ambiente acuoso resultante muy similar al de la ECM. También es de destacar que, la estructura porosa y la gran cantidad de agua que absorbe el hidrogel, facilitan el transporte a través del mismo de los nutrientes y solutos de bajo peso molecular necesarios para la supervivencia y el crecimiento celular, por lo que promueven el crecimiento celular. Finalmente, deben de ser biodegradables para facilitar así su eliminación de forma equilibrada con la formación de tejido sano que debe de acabar ocupando el espacio de la lesión (Van Tomme *et al.*, 2008).

Existen diversos métodos para lograr la implantación de tales hidrogeles. En el primero de ellos, los hidrogeles se forman previamente y se procesan *in vitro* antes de

encapsular los agentes bioactivos o células y la subsiguiente implantación *in vivo*. En otro enfoque disponible, las células pueden ser incorporadas previamente a la reticulación del hidrogel y se resuspenden en los precursores de gel antes de la gelificación del mismo. De este modo, los precursores del gel pueden ser inyectados en el cuerpo como un líquido que formará el gel *in-situ*, siendo necesaria una reacción de gelificación no cito-tóxica (Bae *et al.*, 2013).

1.4.1. Hidrogeles Inyectables

Desde el punto de vista clínico, los hidrogeles de formación *in-situ*, que se conocen comúnmente con el término hidrogeles inyectables, parecen ser más deseables para muchas aplicaciones biomédicas que los hidrogeles preformados (Jin *et al.*, 2007), ya que proporcionan la ventaja de que los precursores del gel, que contienen las células, pueden ser inyectados líquidos en el sitio del defecto a través de pequeñas incisiones y ser posteriormente reticulados. Esto permite obtener una encapsulación homogénea de las células dentro del hidrogel y además permite al hidrogel adquirir cualquier forma, facilitando el llenado de defectos irregulares, que serían mucho más difíciles de tratar mediante cualquier otra aproximación, y sin necesidad de intervenciones quirúrgicas excesivamente invasivas. Otra ventaja es que la polimerización *in-situ* de este tipo de hidrogeles permite una mejor interacción entre el tejido huésped del paciente y el propio hidrogel, lo cual mejora notablemente la osteointegración del implante, siendo especialmente ventajoso cuando se requiere la transmisión de estimulación mecánica a las células a través del gel. En la última década, se han aplicado diferentes métodos para obtener hidrogeles inyectables. Estos métodos pueden ser clasificados en dos categorías:

1. Hidrogeles con reticulación química, que emplean enlaces covalentes para entrecruzar las cadenas de los polímeros. Existen diversas posibilidades, tales como fotorreticulación (Jeon *et al.*, 2009), reacciones de tipo Michael (Jin *et al.*, 2010) o reacciones de formación de bases de Schiff (Cao *et al.*, 2015).

2. Hidrogeles con reticulación física, en los que el entrecruzamiento tiene lugar mediante la formación de enlaces no covalentes, tales como los basados en interacciones iónicas (Kuo y Ma, 2001).

Por lo general, los hidrogeles inyectables pertenecientes al segundo grupo se forman bajo condiciones suaves, lo que proporciona un ambiente muy adecuado para las células y moléculas bioactivas. Sin embargo, suelen tener propiedades mecánicas pobres y son inestables ante cambios en el ambiente externo (por ejemplo, de fuerza iónica, pH o temperatura). Por otra parte, los reticulados químicamente, presentan una resistencia mecánica mejorada y una mayor estabilidad.

Con el fin de obtener este último tipo de hidrogeles, se han desarrollado diversos métodos basados en el uso de aditivos como fotoiniciadores, agentes de reticulación, y/o disolventes orgánicos (Van Tomme *et al.*, 2008). Estos aditivos pueden ser citotóxicos, lo que resulta en un hidrogel no biocompatible. Un enfoque emergente para la formación *in-situ* de los hidrogeles que permite mejorar su biocompatibilidad se basa en reacciones de reticulación catalizadas por enzimas (Jin *et al.*, 2007), lo cual supone una gran ventaja ya que permite que el entrecruzamiento tenga lugar en condiciones fisiológicas suaves, a pH neutro, temperatura moderada y en medio acuoso. Además, la especificidad de la enzima por el sustrato permite un mayor control sobre la reacción

y el tiempo de gelificación y evita reacciones secundarias no deseadas. Por ejemplo, se han obtenido hidrogeles mediante reticulación catalizada por peroxidasa de rábano (HRP) (Sofia *et al.*, 2002; Kurisawa *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2011). La HRP es una hemoproteína formada por una sola cadena de tipo β que cataliza el acoplamiento de derivados del fenol o derivados de anilina a través de la descomposición de peróxido de hidrógeno, compuesto que requiere como sustrato (Kobayashi *et al.*, 2001; Sofia *et al.*, 2002).

1.4.2. La gelatina

La gelatina es un polímero proteico de origen natural, se obtiene a partir de distintos productos animales mediante degradación parcial de fibras de colágeno insolubles en agua. Origina soluciones altamente viscosas y permite obtener hidrogeles y otras matrices que son rápidamente biodegradadas. Se trata de un polímero cuyo uso está ampliamente extendido en aplicaciones biomédicas debido a que posee las siguientes propiedades (Einerson *et al.*, 2003):

- Posibilidad de modificar su estructura a nivel de aminoácidos.
- Bajos niveles de inmunogenicidad y citotoxicidad.
- Está aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para determinadas aplicaciones clínicas, por ejemplo, como agente de coagulación.
- Facilidad a la hora de reticularlo para formar hidrogeles.
- Altamente biodegradable.

En estudios recientes se han obtenido hidrogeles de gelatina injertada con tiramina (TA) mediante entrecruzamiento enzimático utilizando HRP y H_2O_2 (Figura 5). Estos hidrogeles no son citotóxicos y presentan propiedades mecánicas adecuadas para diversas aplicaciones de ingeniería tisular.

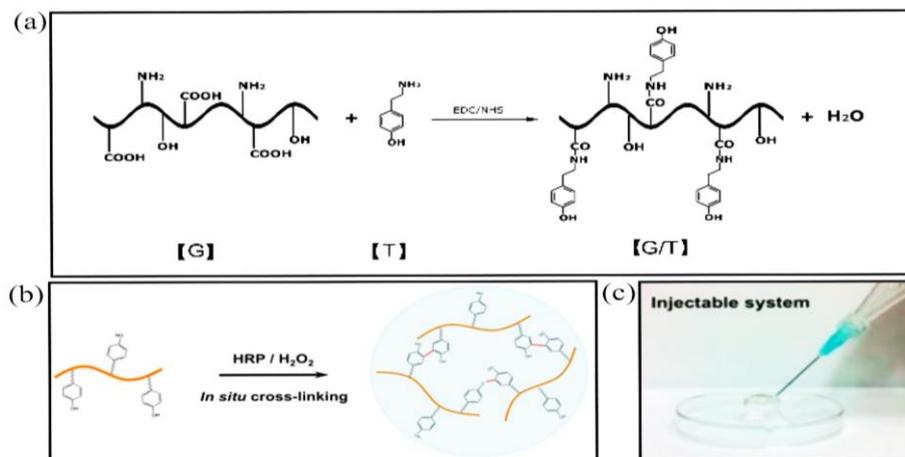


Figura 5. Representación esquemática del proceso de entrecruzamiento in-situ de un hidrogel inyectable de gelatina (G) (b, c) modificada con tiramina (T) (a) empleando HRP y H_2O_2 (adaptado de Lee *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

1.5. El uso de MSCs para regeneración de daños en tejido óseo.

El uso de las MSCs en el ámbito terapéutico constituye una de las aplicaciones más prometedoras de la ingeniería tisular. Como se ha visto, el potencial osteogénico de estas células es elevado dado que son las progenitoras clásicas del tejido esquelético

adulto y que poseen capacidad demostrada para formar tejido óseo y cartilaginoso tanto *in vivo* como *in vitro*. Como consecuencia, estas células han sido ampliamente usadas para promover la regeneración ósea.

Sin embargo, pese a que son capaces de llevar cabo procesos de osteogénesis, su habilidad para la formación de nuevo de tejido óseo es dependiente de la encapsulación de dichas células en un soporte adecuado. En ausencia de dicho soporte, la funcionalidad paracrina de las MSCs domina sobre su capacidad para la diferenciación en tejidos específicos, de manera que éstas se comportan secretando una serie de proteínas que juegan un papel clave en la regulación de procesos inflamatorios y que tienen una función trópica en la estimulación de la regeneración (Almubarak *et al.*, 2016).

Por todo esto, optimizar las condiciones de cultivo para la diferenciación de MSCs es uno de los principales objetivos de la comunidad científica y es el primer paso a conseguir para avanzar hacia procesos que permitan la regeneración ósea inducida artificialmente de forma eficaz. Para ello, se ha trabajado en diversos abordajes, uno de los cuales consiste en el uso de estimulación mecánica (Lima *et al.*, 2015). Los tejidos mesenquimales *in vivo* se encuentran sometidos a estímulos mecánicos y se ha visto que las células del linaje mesenquimal responden a estos estímulos tanto *in vivo* como *in vitro* (Delaine-Smith y Reilly, 2012), lo que hace que esta aproximación pueda constituir un método ideal para controlar su diferenciación.

1.5.1. Estimulación mecánica de MSCs.

Está bien establecido qué señales bioquímicas (como citoquinas o factores de crecimiento y eventos de señalización) pueden controlar la función de las células madre (Tuan *et al.*, 2003), de igual modo que qué factores ambientales (como la superficie, la química o la topografía del material de cultivo) (Reilly y Engler, 2010). Sin embargo, y pese a que se ha demostrado la utilidad de aplicar fuerzas mecánicas para esta finalidad, es aún necesaria una mejor caracterización acerca de cuáles son las condiciones óptimas para transmitir a las células este tipo de impulsos y conseguir así guiarlas hacia el proceso de diferenciación osteogénica (Delaine-Smith y Reilly, 2012).

Hay diversas opciones para proporcionar el estímulo mecánico *in vitro* que se clasifican en función del tipo de fuerza que se aplica y del estrés que se genera; por ejemplo, tensiones de tracción inducidas por estiramiento, tensiones de cizalla inducidas por un flujo de fluido o estímulos magnéticos que generan estrés directamente sobre la membrana celular. Además, cada tipo de estímulo puede aplicarse en cultivo bidimensional o en cultivo tridimensional, existiendo diferencias entre ambos tipos de cultivo en términos de morfología celular, migración, adhesión a matriz o expresión de genes (Delaine-Smith y Reilly, 2012).

Mecanotransducción es el término con el que se conoce el proceso de transducción de señales celulares que permite la conversión del estímulo mecánico, aplicado a nivel extracelular, en un efecto biológico como es la diferenciación celular. En él, el estímulo es percibido a nivel de membrana plasmática gracias a una serie de mecano-receptores y convertido en un proceso de señalización intracelular, que implica a diversas rutas bioquímicas de señalización, y que finalmente se traduce en variaciones a nivel de expresión génica en las células afectadas (Figura 6) (Riancho y Delgado-Calle, 2013).

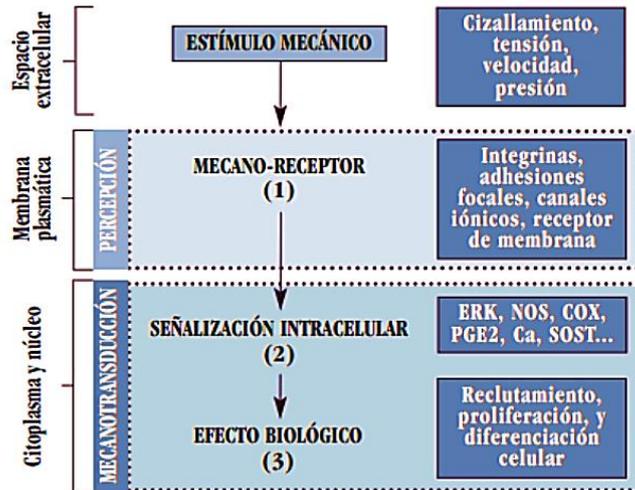


Figura 6. Proceso de mecanotransducción. El esquema muestra las diferentes etapas del proceso de mecanotransducción así como algunos agentes y componentes moleculares implicados en cada uno de sus niveles (Riancho y Delgado-Calle, 2013).

Mecano-receptores

La capacidad de las células óseas de percibir las señales mecánicas en su entorno mineralizado requiere la presencia de mecano-receptores. Estos son moléculas, complejos proteicos o estructuras biológicas cuya función principal es la de conectar la célula con el espacio extracelular permitiéndole así detectar las variaciones de tensión que tienen lugar en la matriz extracelular mineralizada en respuesta a cambios en la presión o en la velocidad del flujo que rodea a estas células, es decir, le permiten detectar los cambios que se dan en la ECM en respuesta a los diferentes estímulos mecánicos que pueden tener lugar.

Entre los elementos que se han postulado como responsables se encuentran diferentes integrinas, adhesiones focales, estructuras ciliares y diferentes proteínas de membrana. En el caso de estructuras que median el anclaje de la célula a la matriz (como integrinas o adhesiones focales), se ha demostrado experimentalmente que son necesarias para percibir los estímulos mecánicos (Batra *et al.*, 2012). Del mismo modo, los canales sensibles a estímulos físicos, como los canales de calcio o las conexinas, juegan también un papel importante en la recepción y posterior transducción de la señal, generalmente permitiendo la entrada o salida de diferentes factores encargados de mediar en la respuesta celular al estrés físico (Zhang *et al.*, 2011). Finalmente, los órganos mecanosensores, como los cilios, están cobrando cada vez más importancia en este campo y parecen ser también esenciales en este tipo de procesos (Malone *et al.*, 2007).

Esto refuerza la idea de que las estructuras celulares relacionadas con procesos de adhesión son los principales mecano-receptores y son, por tanto, esenciales en la comunicación a través de la membrana entre la ECM y el citoesqueleto celular.

Adhesión celular y diferenciación

Considerando entonces que la diferenciación de células madre mesenquimales hacia osteoblastos está regulada por cambios en la adhesión celular y en la tensión intracelular soportada por el citoesqueleto, se torna esencial que los sistemas desarrollados con el objetivo de estimular mecánicamente este tipo celular garanticen la

correcta adhesión de las células al material, para permitir la transmisión del estímulo de forma eficaz.

En el caso de sistemas de hidrogeles inyectables diseñados para el propósito de la regeneración ósea, uno de los abordajes más empleados para salvar este aspecto es la modificación del material para conseguir que éste favorezca la adhesión celular. En trabajos con hidrogeles proteicos sintetizados a partir de gelatina, una modificación común consiste en la inserción de secuencias Arg-Gly-Asp (RGD). Dicho motivo peptídico, que se encuentra de forma natural en la secuencia de este polímero proteico, actúa como ligando de numerosas proteínas, entre ellas las integrinas, favoreciendo la adhesión celular (Figura 7). Por lo que dicha secuencia peptídica y su incorporación de forma artificial en secuencias proteicas o sobre distintas superficies tiene amplias aplicaciones en el campo de la ingeniería tisular (Ruoslahti, 1997). Con estos soportes de hidrogeles modificados para aumentar la presencia de secuencias RGD, se ha visto que, aquellos que tienen una rigidez similar al hueso precalcificado, facilitan que las células establezcan gran cantidad de adhesiones celulares, lo que es esencial para que su citoesqueleto esté capacitado para retener la tensión intracelular cuando se aplica un estímulo mecánico, y eso se traduce en que la diferenciación hacia osteoblastos se ve favorecida (Geiger *et al.*, 2001).

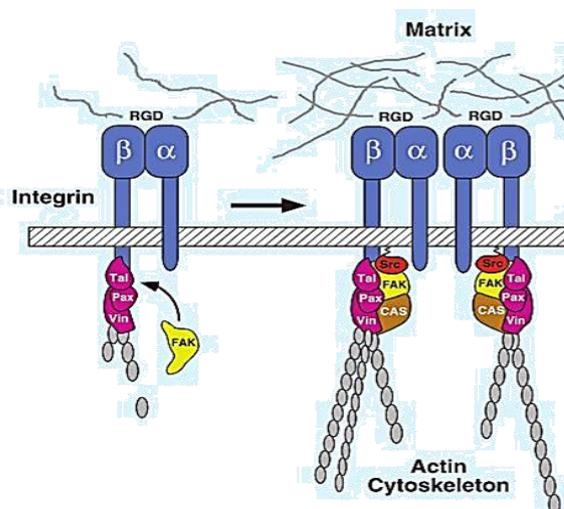


Figura 7. Representación del proceso de adhesión celular mediado por integrinas. Se puede apreciar cómo se produce el ensamblaje de las integrinas que reconocen las secuencias RGD presentes en la matriz celular para originar adhesiones focales (Giancotti y Ruoslahti, 2009).

Conversión del estímulo mecánico en una señal bioquímica

En la formación y la ampliación de las adhesiones celulares, una de las principales respuestas celulares que se dan de forma directa implica el ensamblaje de complejos multimoleculares. Por lo general, los mecano-receptores constan de integrinas que, además de interactuar con la ECM, activan la transducción de señales mediante diversas vías. Para ello se requiere la participación de los llamados interruptores moleculares, que llevan a cabo la conversión de estímulo físico en señal bioquímica. Normalmente lo hacen mediante la modificación covalente de proteínas, o mediante la fosforilación/desfosforilación de proteínas, como en el caso de la activación de la kinasa de las adhesiones focales (FAK) o Src. Sin embargo, otros de estos interruptores funcionan con cambios conformacionales que permiten que sitios críticos, esenciales para el proceso de transducción, que permanecían inaccesibles se expongan; como en el caso de algunas proteínas de la familia Src, la Vinculina o algunas dianas de proteínas

G de la familia Rho como mDia, ROCK o WASP (Geiger *et al.*, 2001). Pero cabe anotar también que, como se ha comentado, además de las integrinas podemos encontrar otras estructuras en este contexto. Estas incluyen canales iónicos activados por estrés (que proporcionan un mecanismo directo para la conversión de una fuerza en una respuesta de señalización) o canales iónicos cerrados mecánicamente que están involucrados en la detección de sonido a través de las células ciliadas del oído interno. Por tanto, se podría decir que este interruptor on/off puede ser mediado por modificación enzimática, moléculas específicas de señalización o por fuerza (por ejemplo, el estiramiento de algunos dominios de la fibronectina).

Señalización intracelular y efecto biológico

Como consecuencia de la activación de dichos interruptores moleculares, gran cantidad de rutas de señalización pueden ser activadas por estímulos mecánicos. Finalmente, estos estímulos mecánicos tienen un efecto en la osteogénesis porque consiguen alterar los niveles de expresión de genes relacionados con dicho proceso. Como, por ejemplo, el gen que codifica para la osteocalcina, hormona peptídica producida por los propios osteoblastos durante la formación ósea, que se incorpora en la matriz del hueso (Khatiwala *et al.*, 2009) y que, como se establecía en la Figura 3, constituye uno de los biomarcadores más estudiados en ensayos que evalúan la diferenciación ósea. Una de las vías más importantes que regulan los niveles de expresión de la OCN es la que implica a la quinasa ROCK, quinasa asociada a la ruta RhoA. RhoA es una proteína G pequeña que participa en la activación de la contracción actina/miosina que tiene lugar en las adhesiones focales (que actuarían como mecano-receptor para la activación de esta ruta). Las células requieren este mecanismo de contracción del citoesqueleto para extenderse y migrar. De manera que, las rutas que implican a RhoA-ROCK contribuyen a modular los niveles de expresión de genes como la osteocalcina. Niveles elevados para RhoA y ROCK (que pueden ser inducidos por estímulos mecánicos gracias a la mediación de las adhesiones focales) se traducen en niveles elevados del factor de transcripción Runx2 y por tanto favorecen la diferenciación osteogénica, tal y como se detalla en la Figura 8 (Khatiwala *et al.*, 2009).

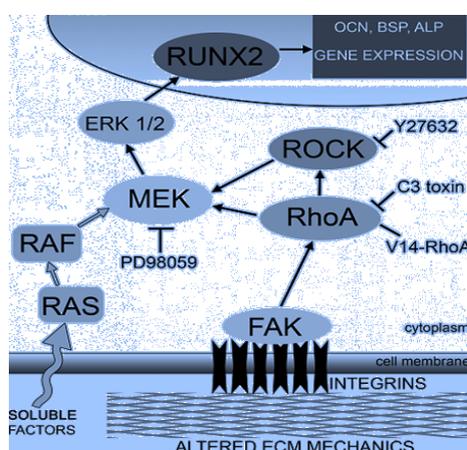


Figura 8. Modelo para la regulación de la diferenciación osteogénica. Se observa cómo los cambios de tensión en la ECM son transducidos por las integrinas que forman parte de las adhesiones focales de la membrana celular, y mediante la participación de proteínas quinasa como FAK acaban desencadenando la activación de la proteína RhoA. Esto aumenta la contracción celular al activar a la proteína ROCK. Finalmente, la comunicación entre ésta y otras rutas induce la expresión del factor de transcripción osteogénico Runx2 que a su vez aumenta los niveles de expresión de proteínas como la osteocalcina (OCN) (Khatiwala *et al.*, 2009).

Se han destacado los anteriores cambios bioquímicos asociados a procesos de mecanotransducción porque son frecuentemente empleados como biomarcadores, para evaluar procesos de diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos en ingeniería tisular. Sin embargo, se han descrito otros muchos cambios bioquímicos, como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o la activación del factor nuclear NF- κ B, que tienen también importancia en estos procesos.

1.5.1.1. Estimulación magnética de MSCs.

El uso de campos magnéticos es una opción para proporcionar dicho estímulo mecánico, por lo que en la actualidad se están planteando diversos sistemas con tal objetivo.

Nikukar *et al.* (2013) han desarrollado un método, bautizado por los propios autores con el término “nanokicking”, consistente en el uso de materiales cerámicos con comportamientos piezoeléctricos. El punto de partida de estos autores se establece en que ha sido ya demostrado que todos aquellos sistemas que estimulan la adhesión celular, y en consecuencia el aumento de la tensión del citoesqueleto, promueven la diferenciación de MSCs en osteoblastos. Teniendo esto en cuenta y considerando que cuando se da esta tensión intracelular elevada se generan una serie de vibraciones dentro de la nanoescala que afectan a la membrana, los autores han trabajado en desarrollar un sistema que no pasa por conseguir mejorar la adhesión, sino por aportar directamente esas vibraciones (que serían la consecuencia última de los procesos de adhesión sobre la membrana celular) y evaluar si esto permite la diferenciación osteogénica. Así, mediante este sistema, han conseguido observar una respuesta osteogénica positiva, dependiente de la vía de señalización RhoA previamente comentada.

Recientemente, Vikingsson *et al.* (n.d.) han llevado a cabo un experimento en el que evaluaron la validez de un sistema capaz de aplicar cargas mecánicas locales a células embebidas en un hidrogel para aplicaciones de ingeniería tisular. Se trata de un sistema que contiene microesferas de ácido poliláctico (PLA) que tienen dispersas en su estructura nanopartículas magnéticas (MNPs) de ferrita. Se probó la capacidad de estas esferas para inducir deformaciones en una matriz de hidrogel en la que fueron dispersadas al aplicar un gradiente de campos magnéticos estáticos y oscilatorios, mediante un estimulador diseñado para tal propósito. Los resultados del experimento abren una vía para la estimulación mecánica de células mesenquimales de cara a mejorar la diferenciación osteoblástica y la regeneración de hueso, mediante la encapsulación de MSCs en un hidrogel inyectable que contenga microesferas de PLA susceptibles al campo magnético, y, por tanto, con capacidad de inducir la deformación del hidrogel.

En este contexto, en el presente trabajo se busca avanzar en la puesta a punto de dicho sistema, mejorando la caracterización de los materiales que lo componen y tratando de emplearlo por primera vez para encapsulación celular. Se pretende también llevar a cabo ensayos de cultivos celulares basados en técnicas establecidas como el LIVE/DEAD, el MTS o tinciones de componentes celulares con el objetivo de evaluar la viabilidad, proliferación y adhesión celular asociadas al sistema respectivamente.

2. OBJETIVOS

Este Trabajo Final de Grado se desarrolla en el marco de un proyecto más amplio que busca la preparación de matrices extracelulares sintéticas capaces de estimular localmente a las células mesenquimales para inducir su diferenciación hacia el linaje osteoblástico en terapias de regeneración ósea. Las matrices seleccionadas para este trabajo han sido micropartículas poliméricas (basadas en el polímero PLLA y con nanopartículas magnéticas dispersas en su estructura) embebidas en una matriz de hidrogel inyectable de gelatina. Se ha perseguido fabricar microesferas de PLLA de tamaño similar al celular que pueden ser inyectadas junto con la disolución acuosa precursora del hidrogel y las células. La ventaja de este sistema es que puede implantarse en el organismo de manera mínimamente invasiva, puesto que entrecruza *in situ* por acción enzimática, y además puede estimular a las células en él encapsuladas si el tejido se somete a un campo magnético variable externo, capaz de mover las micropartículas y deformar el hidrogel.

Para estimular a las células encapsuladas en el hidrogel se requiere:

1. Que el hidrogel de gelatina sea capaz de garantizar la correcta adhesión de las células encapsuladas, sin tener ningún tipo de efecto citotóxico ni afectar a la viabilidad de las mismas, para poder así transmitir el estímulo mecánico.
2. Que las micropartículas poliméricas integren de forma homogénea en su estructura las nanopartículas magnéticas para adquirir así la capacidad de moverse en función del campo magnético aplicado y deformar el hidrogel, proporcionando cargas mecánicas a las células encapsuladas.

En este contexto, el trabajo experimental desarrollado se ha centrado en las etapas iniciales del proyecto, de modo que se ha trabajado para cumplir los objetivos que se detallan a continuación:

1. Optimización del procedimiento de fabricación de las microesferas poliméricas control y de las microesferas cargadas con nanopartículas magnéticas y caracterización de las mismas.
2. Obtención de gelatina injertada con tiramina y evaluación del grado de injerto obtenido en el proceso.
3. Puesta a punto del procedimiento de encapsulación de células en hidrogeles cargados con las microesferas poliméricas.
4. Evaluación de la citotoxicidad a corto plazo del hidrogel inyectable mediante un ensayo LIVE/DEAD, así como de la capacidad del entorno biomimético definido para garantizar la proliferación celular mediante la técnica de MTS.
5. Observación de la morfología celular en los entornos biomiméticos desarrollados mediante tinción celular Actina/DAPI.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y reactivos.

Para la fabricación de las microesferas se empleó ácido poli(L-láctico) de grado médico de Corbion Purac, Purasorb PL-18, poli(vinil alcohol) (Sigma-Aldrich), cloroformo (CLF) (Scharlab), y nanopartículas magnéticas (MNPs) de ferrita (Ferrotec Ferrofluid).

En la síntesis de la gelatina modificada con tiramina se empleó, gelatina de piel de porcino tipo A (Sigma-Aldrich) con un ratio de 80 mmol COOH/100 g de gelatina, ácido 2-N-morfolino-etanosulfónico (MES) >99% (Sigma-Aldrich), clorhidrato de tiramina 98% (Sigma-Aldrich), N-hidroxisuccinimida (NHS) 98% (Sigma-Aldrich), hidrocloreto-3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich) y membrana de diálisis de celulosa 12400 MWCO, retención del 99.99% (Sigma Aldrich).

Una vez sintetizada la gelatina, se disolvió en la disolución tampón Calcium Free Krebs Ringer Buffer (CF-KRB), preparada a partir de 115 mM de cloruro sódico (Sigma-Aldrich), 5 mM de cloruro potásico (Sigma-Aldrich), 1 mM de dihidrógenofosfato de potasio extrapuro (Scharlab) y 25 mM de ácido 4-(3-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) (Sigma-Aldrich).

Posteriormente, para el entrecruzamiento enzimático de los hidrogeles se utilizó, en primer lugar, la enzima horseradish peroxidase (HRP) tipo I (Sigma-Aldrich), y a continuación solución de peróxido de hidrógeno 30% w/w en H₂O (Sigma-Aldrich) y, para la conservación de hidrogeles entrecruzados se empleó Dulbecco's phosphate buffered saline solution 10x w/o Ca, Mg (DPBS) (Sigma-Aldrich) con azida de sodio 99.5%, (ReagentPlus®) al 0.02%.

Durante los procesos de cultivo celular se empleó medio DEMEM Low Glucose (Biowest) suplementado con un 1% de penicilina/streptomina (100unid/mL - 100mg/mL) (Gibco) y FBS (Fetal Bovine Serum Hyclone) (FISHER). Para los procesos de lavado y preparación de disoluciones se utilizó el tampón DPBS- -1x (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified) (Sigma, Cell culture tested). Para llevar a cabo las tripsinizaciones se usó el reactivo Trypsin-EDTA (Solution A, 0.25% Trypsina and EDTA (1:5000) In Puck's Saline A) (Invitrogen).

En los ensayos de viabilidad se empleó el kit Live/Dead cell Viability/Citotoxicity kit for mammalian cells L3224 (Invitrogen), y en los ensayos para evaluar morfología celular los reactivos DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole, dilactate) (Sigma-Aldrich) y Bodipy FL Phalloidin (Invitrogen). Para la determinación de la proliferación celular se recurrió al reactivo MTS (CellTiter 96-Aqueous one solution reagent) (Promega) y se empleó medio sin rojo fenol (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM 1 g/L1 glucose, without Phenol Red) (Gibco).

Otros reactivos empleados fueron DMSO (Sigma-Aldrich), sacarosa (Sigma-Aldrich), paraformaldehído (Formalin solution, neutral buffered 10%)(Sigma-Aldrich), Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) y el medio sintético de montaje OCT (WWR Chemicals).

3.2. Obtención y caracterización de los materiales.

3.2.1. Microesferas poliméricas.

Se ha trabajado en la obtención de dos tipos de microesferas poliméricas, las de control y las cargadas con MNPs susceptibles a campos magnéticos.

3.2.1.1. Obtención de microesferas de PLLA.

Las microesferas de PLLA se obtuvieron por el método de emulsión aceite/agua y evaporación de disolvente, siguiendo el protocolo descrito por Vikingsson *et al.* (n.d.). La fase no acuosa empleada consistió en una disolución de PLLA en cloroformo al 2% w/v, mientras que la fase acuosa o emulsificante fue una solución en agua desionizada de poli(vinilalcohol) (PVA) al 4% w/v. Una vez homogenizadas las disoluciones, se procedió al montaje del equipo de agitación por emulsión (Ika Eurostar, Alemania) y la bomba de inyección de disoluciones (Syringe-Pump NE-1000, New Era Pump Systems Inc., Estados Unidos), para llevar a cabo la obtención de microesferas.

Inicialmente los 20 mL de la solución de PLLA/CLF se añadieron gota a gota a 200 mL de fase acuosa, que debía de encontrarse en agitación constante a 750 rpm en el momento que comenzó el goteo. Para ello se empleó una bomba de jeringa a una velocidad de 1mL/min. Una vez goteada toda la disolución se añadieron 150 mL de agua desionizada para favorecer la evaporación del disolvente de la fase no acuosa. La mezcla permaneció en agitación constante a la misma velocidad durante 24 horas.

Al finalizar el periodo de agitación, las esferas obtenidas se sometieron a cuatro lavados consecutivos con agua desionizada en agitador de vaivén. Pudiéndose cambiar el lavado cuando se observó que las esferas habían precipitado en el fondo del recipiente. Finalmente se tamizó en etanol empleando un tamiz con una luz de 70 μm . Una vez tamizadas, las esferas se dejaron precipitar, se sustituyó el etanol por agua y se retiró la mayor cantidad posible de agua.

Seguidamente, se requirió congelar las esferas para poder liofilizarlas posteriormente. Para ello se realizó un proceso de congelación por fases que permitió evitar la aglomeración de las microesferas, depositando las esferas en congelador de -20°C en primer lugar y, una vez congeladas, se trasladaron al congelador de -80°C . Una vez congeladas se liofilizaron durante 48 horas para eliminar el agua empleando la liofilizadora LyoQuest 85 (TELSTAR, España). Por último, las esferas adheridas al recipiente tras la liofilización se recuperaron empleando una espátula metálica pequeña. Finalmente, con el objetivo de mejorar la hidrofiliicidad y propiedades superficiales de las esferas para facilitar la posterior dispersión de las mismas, éstas se sometieron a un tratamiento de plasma empleando la cámara Piccolo Cámara de Plasma (Plasma Electronic, Alemania). Para ello las muestras se depositaron esparcidas sobre una placa Petri de vidrio que se introdujo en la cámara no tapada, tras realizar un primer tratamiento, se removieron las esferas y se realizó un segundo. Los parámetros del tratamiento aplicado fueron: gas argón, presión inicial de gas 50 Pa, flujo de gas 80%, tiempo homogenización 15 s, potencia del generador 60%, tiempo de tratamiento 600 s.

3.2.1.2. Obtención de microesferas de PLLA con MNPs de ferrita.

Las micropartículas cargadas con MNPs se prepararon siguiendo el método de emulsión y evaporación del disolvente detallado anteriormente, con la única consideración de que la fase no acuosa debía contener las nanopartículas magnéticas. Para ello, las MNPs se dispersaron en la disolución de PLLA en CLF al 2% w/v previamente preparada, a una concentración de 5% w/w de MNPs respecto a la masa de PLLA.

El proceso de carga de disoluciones con nanopartículas magnéticas fue llevado a cabo en una caja hermética de metacrilato para asegurar que no se producían escapes de nanopartículas magnéticas al ambiente. Todo el proceso de fabricación se efectuó bajo campana de extracción y acondicionando la zona con papel húmedo para evitar que se produjeran escapes de MNPs en caso de derrame, trabajando con máscara de partículas.

3.2.1.3. Distribución de tamaños de las microesferas obtenidas.

Con el objetivo de corroborar que las esferas obtenidas se encontraban en el rango de tamaños deseado para los ensayos, alrededor a 50 μm de diámetro, se obtuvo la distribución de tamaños de ambos tipos de esferas. Esto se realizó llevando a cabo un recuento y medición automática de los diámetros de las esferas a partir de imágenes obtenidas mediante lupa binocular (MZ APO, Leica Microsystems, Alemania). Dichas imágenes se procesaron mediante el software de análisis de imágenes ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, Estados Unidos), que mediante la opción *Analyze Particles* permitió obtener los diámetros de las partículas. Se analizaron las esferas obtenidas mediante tres síntesis diferentes para cada uno de los dos tipos, esferas control y magnéticas, llevándose a cabo el recuento de una imagen por síntesis y tipo de esfera, de manera que se midió el diámetro de un total de 278 esferas control y 566 esferas con nanopartículas magnéticas.

3.2.1.4. Caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido.

Las micropartículas se observaron en Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de campo (FESEM) (Ultra 55, Zeiss Auriga Compact, Alemania). Las imágenes fueron tomadas a 2 kV. Para hacer la superficie de las micropartículas conductoras, necesaria para la observación de detalles de su topografía y estructura, las muestras se metalizaron a través de la deposición de platino sobre su superficie en condiciones de vacío, empleando un dispositivo de recubrimiento por bombardeo iónico (JFC 1100, JEOL, Japón).

3.2.1.5. Evaluación del grado de cristalinidad de las microesferas obtenidas.

Para determinar el grado de cristalinidad de los diferentes tipos de microesferas, que tiene un impacto en su velocidad de degradación, se llevaron a cabo ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los ensayos se realizaron utilizando un dispositivo PYRIS-DSC 8000 (Perkin Elmer, Estados Unidos). Se pesaron entre 4 y 7 mg de cada una de las muestras, se colocaron

y cerraron herméticamente en cápsulas de aluminio y se sometieron a ciclos de calentamiento en el equipo con un régimen de temperatura lineal, que fue de 0 a 200°C (a una velocidad de calentamiento de 20°C/min).

3.2.1.6. Determinación de la magnetización de las microesferas con ferrita.

Para determinar cuál era la eficacia del proceso de fabricación en lo que se refiere a la incorporación de las nanopartículas magnéticas en la estructura de PLLA de las microesferas, se recurrió a un magnetómetro de muestra vibrante (VSM).

Este equipo permite conocer la magnetización de distintos materiales mediante la medida del momento magnético de una muestra cuando ésta vibra en presencia de un campo magnético estático. Obteniéndose en el ensayo diversos parámetros que se pueden emplear para caracterizar las propiedades magnéticas del material. En este caso se trabajó con la magnetización de saturación (M_s), que se define como la magnetización que presenta un material ferromagnético cuando mediante la aplicación de un campo externo se ha logrado que todos sus momentos magnéticos se encuentren orientados en la misma dirección.

Así, se llevó a cabo el ensayo a temperatura ambiente utilizando un equipo EZ-VSM (Microsense, Estados Unidos) y empleando muestras de microesferas magnéticas (se midieron dos réplicas pesándose entre 3-4 mg por réplica) y de ferrita pura (una sola réplica), con el objetivo de comparar el parámetro M_s de ambas muestras y poder determinar así la concentración real de ferrita presente en las microesferas.

3.2.2. Gelatina modificada con tiramina.

Por otra parte, se trabajó también en el desarrollo de una matriz que actúe como vehículo para la transmisión del estímulo mecánico proporcionado por las microesferas a las células, esta matriz está constituida por un hidrogel de gelatina modificada.

3.2.2.1. Síntesis de la gelatina modificada con tiramina.

Se siguió el protocolo descrito por Poveda-Reyes *et al.* (2015) que permite injertar los grupos amina de la TA a los grupos carboxilo de la gelatina mediante la formación de enlaces amida. Los ratios molares que se emplearon para la síntesis de la gelatina modificada se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Ratios molares de los reactivos empleados en la síntesis de gelatina injertada con TA. COOH (grupos carboxilo de la gelatina); EDC (N-3-Dimetilaminopropil.N'-etilcarbodiimida); NHS(N-hidroxisuccinimida).

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

En primer lugar, se preparó una disolución de 20 mg/mL de gelatina en 50 mM de MES en agua miliQ, éste último actúa como agente amortiguador del pH. Se preparó un volumen de 20 mL y se dejó disolver en agitación a una temperatura de 60°C durante 30 minutos. Una vez disuelto se dejó enfriar y se añadió el clorhidrato de TA. Atendiendo a los ratios molares de la Tabla 2, y teniendo en cuenta que la gelatina presenta un ratio

de 80 mmol COOH/100g de gelatina, para un volumen de 20 mL de disolución se requirieron 111.13 mg de masa de TA.

Para disolver la tiramina se mantuvo la disolución 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. Una vez disuelta, fue necesario ajustar el pH hasta un valor de 6.

A continuación, se añadió el NHS, que actúa como catalizador, facilitando el transcurso de la reacción y disminuyendo la probabilidad de que ocurran reacciones secundarias inespecíficas. En este caso se añadieron 7.36 g y se disolvieron mediante agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente se añadió la EDC que facilita la activación de los grupos carboxilo de la gelatina promoviendo también la reacción, se requirió una masa de 122.68 mg. Una vez adicionada la EDC, se dejó que transcurriera la reacción de sustitución en agitación a una temperatura de 37°C durante un tiempo de 24 horas.

Tras 24 horas, se transfirió la disolución a una membrana de diálisis previamente acondicionada mediante lavados con agua desionizada. La diálisis se realizó contra agua destilada cambiando el lavado tres veces al día, para eliminar aquellas moléculas que no habían reaccionado durante el proceso (tiramina o catalizadores).

Finalmente, la disolución dializada de gelatina-tiramina se congeló a -80°C y se liofilizó durante 3 días.

3.2.2.2. Evaluación del grado de injerto de tiramina.

La evaluación de la modificación de la gelatina mediante la inserción de tiramina se llevó a cabo mediante medida de la absorbancia a 275 nm en espectrofotómetro (CECIL-CE9200 UV/VIS, Buck Scientific, Estados Unidos), debido a que a dicha longitud de onda tiene lugar la absorción de radiación UV por parte de los grupos fenol de la TA, cuantificando la cantidad de TA mediante una recta de calibrado. Para la obtención de la recta de calibrado se midió la absorbancia a dicha longitud de onda de varias disoluciones de TA de concentraciones conocidas en agua miliQ (0.025, 0.05, 0.1 y 0.125 mg/mL).

Se prepararon disoluciones de gelatina con injerto de TA al 0.1% en agua miliQ. Se obtuvo la medida de absorbancia a 275 nm y un barrido de espectro desde 200 a 400 nm para cada una de las muestras.

3.2.2.3. Formación de los hidrogeles y determinación del tiempo de gelificación.

Para la obtención de hidrogeles de gelatina-TA fue necesaria la reticulación de los mismos mediante entrecruzamiento enzimático, el cual requirió la adición secuencial de HRP y H₂O₂. Para ello, se prepararon disoluciones tanto de H₂O₂ y de HRP como de gelatina con injerto de TA, en los tres casos en la solución tampón CF-KRB. La composición de cada hidrogel respecto a su volumen total, que se consideró para el cálculo de volúmenes necesarios de cada disolución, fue la siguiente:

- Disolución de gelatina: 80% del volumen total de hidrogel.
- Disolución de H₂O₂: 10% del volumen total de hidrogel.
- Disolución de HRP: 10% del volumen total de hidrogel.

En el caso de la gelatina se preparó el volumen necesario de disolución al 3% w/v y se dejó disolver a una temperatura de 37°C durante aproximadamente 30 minutos. Simultáneamente se prepararon alícuotas de HRP (12.5 U/mL) y de H₂O₂ (20 mM). A

continuación, el entrecruzamiento del hidrogel se logró homogenizando el volumen necesario de la disolución de gelatina con el correspondiente volumen de disolución de HRP y depositándolo en el lugar en que se quería llevar a cabo la gelificación. Finalmente se depositó mediante micropipeta el volumen pertinente de la alícuota de H_2O_2 . En un tiempo escaso se pudo observar que se había producido el entrecruzamiento del gel, ya que éste va acompañado de un cambio de color de la disolución transparente de gelatina hacia un color blanquecino en el caso del hidrogel (Figura 9).

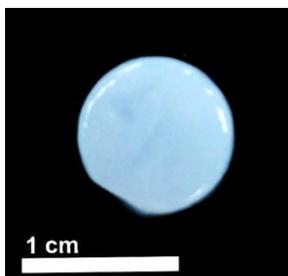


Figura 9. Hidrogel gelatina-TA 3% reticulado. En la imagen se puede apreciar el tono blanquecino que adquiere el hidrogel una vez completa el proceso de gelificación.

Con el objetivo de caracterizar con mayor precisión el tiempo de gelificación se llevaron a cabo medidas reológicas empleando un reómetro DHR Series (TA Instruments, Estados Unidos). Se midieron tres réplicas de hidrogeles de gelatina-TA al 3% de 490 μ L cada uno. Los hidrogeles se reticularon in situ en el propio plato del reómetro. Se trabajó con un gap de 900 μ m y plato de 20 mm de diámetro. Las muestras se sometieron a barridos de tiempo, amplitud y frecuencia y todas las medidas se efectuaron a una temperatura de 37°C.

3.2.3. Esterilización de los materiales.

Las muestras obtenidas, tanto de hidrogeles como de microesferas, sobre las que se realizaron las distintas caracterizaciones de distribución de tamaños, determinación de la carga magnética, determinación del grado de injerto, medida del tiempo de gelificación y caracterizaciones morfológicas no precisaron esterilización y se procesaron en la forma que se requerían en cada uno de estos ensayos/caracterizaciones.

Las microesferas destinadas a los cultivos *in vitro*, tras pasar por el tratamiento de plasma, se embolsaron a vacío y se esterilizaron con radiación gamma a una dosis de 25kGy. La gelatina-TA empleada se esterilizó mediante filtración con filtro de 0.22 μ m bajo campana una vez había sido disuelta y contenía el correspondiente volumen de disolución de HRP.

3.3. Cultivos celulares.

Se realizaron cultivos *in vitro* a corto y largo plazo de las líneas celulares L929 (mouse C34/connective tissue, Sigma Aldrich) y MC3T3-E1 (Riken cell bank, Japan). Tratándose la primera de ellas de una línea celular de fibroblastos provenientes de tejido adiposo de ratón y la segunda de preosteoblastos obtenidos de calvaria de ratón.

Los fibroblastos se cultivaron empleando como medio básico DEMEM Low Glucose (Biowest), suplementado con P/S al 1% y FBS al 10%. Se expandieron en un flascón T-25 hasta alcanzar un 80% de confluencia, tras esto se tripsinizaron y se obtuvo la suspensión celular empleada para la siembra de los cultivos. En el caso de los preosteoblastos, estos se cultivaron y tripsinizaron en condiciones equivalentes a los fibroblastos, e igualmente fue necesaria la descongelación y expansión previa a los cultivos para alcanzar el número de células necesarias. En ambos casos se realizó recuento de densidad celular mediante cámara Neubauer de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Células / mL} = \text{N}^{\circ} \text{ células vivas totales} / 4 \times 10 \text{ (factor de dilución empleada para el recuento en cámara Neubauer)} \times 10^4 \text{ (factor de dilución de la cámara)}.$$

3.3.1. Procedimiento de siembra de cultivo celular en hidrogel.

Se trabajó con hidrogeles de 50 μL . Las microesferas previamente esterilizadas se adicionaron a las disoluciones ya esterilizadas de gelatina-TA-HRP en una concentración de un del 1% w/v respecto al volumen total del hidrogel para ambos tipos de microesferas, es decir, 0.5 mg de esferas por hidrogel de 50 μL . La suspensión resultante se homogenizó y se incorporó a las células que habían sido preparadas de forma paralela. Para la preparación de las células se trasladó el volumen de suspensión celular que contenía las células necesarias para sembrar cada ensayo a un eppendorf y se centrifugó para obtener un pellet. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante de medio y se resuspendió el pellet de células con la disolución de gelatina-TA-HRP (y si era el caso microesferas) previamente preparada.

Una vez se disponía de la disolución que contenía todos los componentes del hidrogel y las células pertinentes, se depositaron 45 μL de dicha disolución sobre la placa de cultivos y a continuación se depositaron los 5 μL de H_2O_2 correspondientes. Seguidamente se esperó 5 minutos para permitir la reticulación del hidrogel antes de adicionar 200 μL de medio de cultivo DEMEM, con antibiótico P/S a una dilución 1:100 y suplementado con FBS al 10% a las distintas muestras. Y finalmente se incubaron estáticamente en atmosfera controlada a 37°C y 5 % de CO_2 (Incubador CO_2 , Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), durante los distintos tiempos de cultivo. El cambio de medio de cultivo se realizó cada 72 horas.

3.3.2. LIVE/DEAD, ensayo de viabilidad celular.

Se planteó la necesidad de verificar la validez de estos hidrogeles como sistema de cultivo celular, puesto que cabe tener en cuenta que uno de los agentes reticulantes, el H_2O_2 , constituye una potencial causa de citotoxicidad debido a su elevada capacidad oxidante. Con el objetivo de demostrar que las bajas concentraciones a las que se emplea el H_2O_2 (2 mM) no implican citotoxicidad, se llevó a cabo un ensayo LIVE/DEAD en un cultivo celular con preosteoblastos encapsulados en hidrogeles de gelatina-TA. Se empleó el kit comercial (Live/Dead cell Viability/Citotoxicity kit for mammalian cells L3224, Invitrogen) que permite distinguir la población de células vivas de la de células muertas gracias a la tinción simultánea con dos marcadores fluorescentes: *calcein-AM* y *ethidium-homidimer1*. La calceína tiñe en verde las células vivas ya que es un

indicador de la actividad del enzima esterasa, mientras que el etidio tiñe de color rojo las células muertas debido a que solo penetra en aquellas que han perdido la integridad de sus membranas celulares.

Para el ensayo se emplearon 4 réplicas de hidrogeles de gelatina-TA de 50 μ L sembrados con 25000 células/hidrogel, 4 réplicas de 25000 células sembradas sobre cubre de vidrio estéril (control negativo) y cuatro réplicas de 25000 células sembradas sobre cubre de vidrio estéril e incubadas durante 1 hora con DMSO al 50% (control positivo), para cada uno de los tiempos ensayados. Todas las muestras con hidrogeles se sembraron como se detalla en el apartado 3.3.1. Se trabajó con dos tiempos de cultivo, 3 y 24 horas, puesto que se pretendía evaluar la citotoxicidad a corto plazo del H₂O₂.

Tras incubar cada una de las muestras el tiempo pertinente en atmósfera controlada a 37°C y 5% de CO₂, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con DPBS \times 1X. Seguidamente se adicionó a cada pocillo 200 μ L de la mezcla *Calceín-AM/Ethidium-homodimer1* (preparado a partir de 1 μ L de calceína, 4 μ L de etidio y enrasado a 2 mL con DPBS \times 1X) y se incubaron las muestras durante 30 minutos a una temperatura de 37°C, y en oscuridad, puesto que los fluoróforos son fotosensibles. Una vez finalizado el período de incubación se lavaron las muestras con DPBS \times 1X y se observaron en el microscopio de fluorescencia (DMI3000b, Leica Microsystems, Alemania).

3.3.3. MTS, ensayo de proliferación celular.

El ensayo de MTS a diferentes tiempos permite medir la proliferación celular de manera indirecta determinando el avance de la densidad celular respecto al tiempo en los cultivos. Se trata de un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium a sales de formazán, debida a la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, que ocurre cuando las células son viables. Concretamente, el reactivo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium) es biorreducido a formazán, un compuesto que se solubiliza en el medio de cultivo y cuya absorbancia se puede medir mediante espectrofotómetro a 490 nm, siendo ésta proporcional al número de células vivas. Por ello, para que el color del medio de cultivo no interfiera en la lectura de las absorbancias resultantes, se emplea medio de cultivo sin rojo fenol.

Se llevó a cabo un cultivo celular con preosteoblastos, en el que se ensayaron 3 tiempos: 1 día, 3 días y 7 días. Se seleccionaron estos tiempos debido a que la fase inicial del desarrollo de estas células, en la que se replican activamente, está establecida de 1 a 9 días (Lara, 2015). Y dos materiales, hidrogeles de gelatina-TA con microesferas de PLLA e hidrogeles de gelatina-TA con microesferas de PLLA con nanopartículas magnéticas. Se ensayaron cuatro réplicas por material y tiempo con células y dos réplicas por material y tiempo sin células, como control de la absorbancia asociada al material. Cada hidrogel contó con un volumen total de 50 μ L, un 1% w/v de microesferas del tipo pertinente y un total de 100000 células.

Una vez finalizado el tiempo de incubación para cada muestra se lavaron los hidrogeles con DPBS \times 1X para eliminar los restos de medio. A continuación, se añadió a cada pocillo 500 μ L de la dilución MTS-medio sin rojo fenol (preparada en proporción 1:5) y se dejó durante 2 horas en incubación a 37°C en oscuridad para que transcurriera la reacción de reducción.

Tras la incubación se pasaron 100 μ L de cada pocillo a una placa P-96 y se leyó la absorbancia a 490/690 nm en el lector de microplacas UV/Vis Synergy-HTX (BioTek, Estados Unidos). Se realizaron dos medidas de cada muestra. La absorbancia obtenida a 490 nm es proporcional al número de células viables mientras que las medidas a 690 nm se realizan para eliminar del dato a 490 nm la absorbancia que se pueda deber a restos de biomaterial, ya que los hidrogeles pueden presentar cierto grado de degradación a los tiempos largos de cultivo ensayados.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis *ANOVA-two ways* de los resultados obtenidos con test de Tukey de comparaciones múltiples empleándose un intervalo de confianza del 95% mediante el software GraphPad Prism versión 7 (GraphPad Software, Estados Unidos).

3.3.4. Tinción Actina/DAPI, evaluación de la morfología celular.

La tinción Actina/DAPI constituye un método de marcaje del citoesqueleto y núcleo respectivamente, que permite observar la morfología celular. El DAPI (4',6-diamino-2-fenilindo) es un marcador fluorescente que tiñe los núcleos celulares y posteriormente emite fluorescencia en la zona azul del espectro visible, gracias a su capacidad para atravesar las membranas celulares y unirse a las regiones ricas en adenina y timina de las cadenas de DNA. Para el marcaje de la proteína estructural actina esta técnica recurre al marcador faloidina, se trata de una micotoxina que posee capacidad para unirse y estabilizar los filamentos de actina, para su uso en el campo de la microscopía se conjuga con un fluorocromo de manera que los citoesqueletos celulares quedan marcados en color verde. El interés de realizar dicho ensayo radica en la posibilidad de observar si se produce algún tipo de adaptación morfológica por parte de las células al ser cultivadas durante determinados periodos de tiempo en el entorno biomimético planteado. Por ello, dicho ensayo se realizó con muestras pertenecientes a dos tiempos de cultivo diferenciados, 3 horas y 7 días de incubación en atmosfera controlada de temperatura, 37° C y 5% de CO₂, realizándoles cambios de medio cada tres días. A su vez, para cada uno de los tiempos ensayados se trabajó con nueve muestras: dos réplicas de cada material que contenían células encapsuladas y una réplica de cada material sin células. Se empleó la línea celular de fibroblastos L929 y se sembró a una densidad de 100000 células/ hidrogel.

Todas las muestras se sembraron, tal y como se detalla en el apartado 3.3.1. Una vez finalizado el tiempo de cultivo para cada muestra, se procedió a la fijación de las mismas. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con DPBS⁻ 1X y se colocaron 200 μ L de paraformaldehído. Se dejó fijar durante 15 minutos. Posteriormente se retiró el paraformaldehído y se realizó un lavado con DPBS⁻ 1X. Una vez alcanzado este punto, fue posible almacenar las muestras en DPBS⁻ 1X con azida de sodio al 0,02% estéril a 4°C, hasta que se procedió a realizar la tinción.

Para llevar a cabo la tinción, se realizó un lavado con DPBS⁻ 1X durante 5 minutos. A continuación, se sustituyó el lavado por el tampón de permeabilización que permite la penetración de los marcadores en el interior celular. Éste se compone de Tritón 100X al 0,1% en DPBS⁻ 1X. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante cinco minutos con tampón de permeabilización. De nuevo, tras retirar la solución permeabilizadora, se realizó un lavado con DPBS⁻, y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con 150 μ L de una disolución DAPI/faloidina en DPBS⁻ 1X (10 μ L de faloidina, 2 μ L de DAPI y enrasar con DPBS⁻ 1X a 1 mL). Cabe tener en cuenta que los

marcadores empleados son fotosensibles por lo que una vez estos se incorporan a las muestras fue conveniente preservarlas en oscuridad. Tras retirarse la disolución de DAPI/faloidina/DPBS⁻ 1X, las muestras se lavaron varias veces con DPBS⁻ 1X. Finalmente, para almacenar las muestras, éstas se incluyeron en el medio de montaje sintético OCT, que requiere almacenar las muestras a -80°C. Para ello, fue necesario una incubación previa durante 24 horas con disolución estéril de sacarosa al 30% a 4°C, que contribuye a la preservación de las muestras en el proceso posterior de congelación.

3.3.5. Obtención de secciones de los hidrogeles cultivados mediante micrótopo criogénico.

Una vez congeladas las muestras incluidas en OCT, se obtuvieron cortes de cada una de ellas mediante micrótopo criogénico (CM1520, Leica, Alemania). Dicho instrumento consta de una cuchilla móvil que avanza mediante un mecanismo de rotación manual en una cámara de temperatura controlada (-30°C). De manera que las muestras, incluidas en OCT, se fijan con unas gotas de OCT sobre el soporte portamuestras y mediante la rotación de la manivela se obtienen secciones de la muestra de espesor controlable que se recogen en un portaobjetos, al que quedan fijadas gracias a que el medio de montaje (OCT) deja de encontrarse en estado sólido debido al cambio de temperatura que experimenta al entrar en contacto con el portaobjetos.

Se obtuvieron secciones de los hidrogeles pertenecientes a las distintas condiciones y diferentes tiempos ensayados en la tinción Actina/DAPI de un espesor de 10 µm.

3.3.6. Microscopia de fluorescencia.

El microscopio de fluorescencia es una variante del microscopio de luz UV, que permite analizar las características celulares mediante el marcaje con fluoróforos. De manera que, como el microscopio dispone de varios filtros para iluminar la muestra con diferentes longitudes de onda según el filtro, se puede marcar la muestra con más de un fluoróforo. Esta técnica se ha empleado para la visualización de las muestras del ensayo Live/Dead, tomándose las imágenes en los canales de fluorescencia verde y rojo. En el canal verde fue posible la observación de las células vivas, marcadas por la calceína, mientras que el rojo mostró las células muertas marcadas por el fluoróforo etidio que había penetrado a través de las membranas celulares degradadas. Se empleó el equipo DMI3000b (Leica Microsystems, Alemania).

3.3.7. Microscopia confocal.

El microscopio confocal de fluorescencia se diferencia del microscopio de fluorescencia, en que su diseño que permite iluminar, con una longitud de onda determinada, un único punto de un plano concreto de una muestra fluorescente, y recoger la fluorescencia emitida únicamente por dicho punto. Esto permite examinar muestras de mayor espesor, proporcionando imágenes con mayor resolución, debido a que se consigue una mejor eliminación del ruido de fondo (Antolinos, 2015). Se empleó esta técnica para observar los cortes pertenecientes a la tinción Actina/DAPI, utilizando un microscopio confocal de fluorescencia montado en un microscopio invertido Zeiss y software Nis-elements (Nikon, Japón)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fabricación, síntesis y caracterización de los materiales.

4.1.1. Microesferas poliméricas.

Las microesferas poliméricas, su protocolo de fabricación y caracterización, constituyen uno de los pilares fundamentales del proyecto, ya que son éstas las que, gracias a la inclusión en su estructura de MNPs de ferrita, poseen la capacidad de ejercer el estímulo mecánico sobre las células en presencia de campos magnéticos.

Por ello se ha trabajado ampliamente en la optimización del protocolo de fabricación de las mismas, hasta llegar al protocolo detallado en el apartado 3.2.1.1, que es el que ha permitido un mejor rendimiento en la obtención de esferas. El principal factor limitante de este procedimiento de fabricación radica en conseguir eliminar los restos de polímero de la disolución emulsificante (PVA-H₂O) de las microesferas. Inicialmente se realizaron lavados estáticos de las microesferas con agua desionizada y etanol, pero al observar las muestras mediante FESEM se observó la presencia de restos de PVA en las mismas (Figura 10, a). Por ello, se estudiaron diferentes métodos para optimizar los lavados, como el agitador de vaivén o realizar centrifugaciones, resultando el primero de ellos el más eficaz puesto que permite obtener una buena limpieza de las muestras (Figura 10, b) y evita la aglomeración de las esferas.

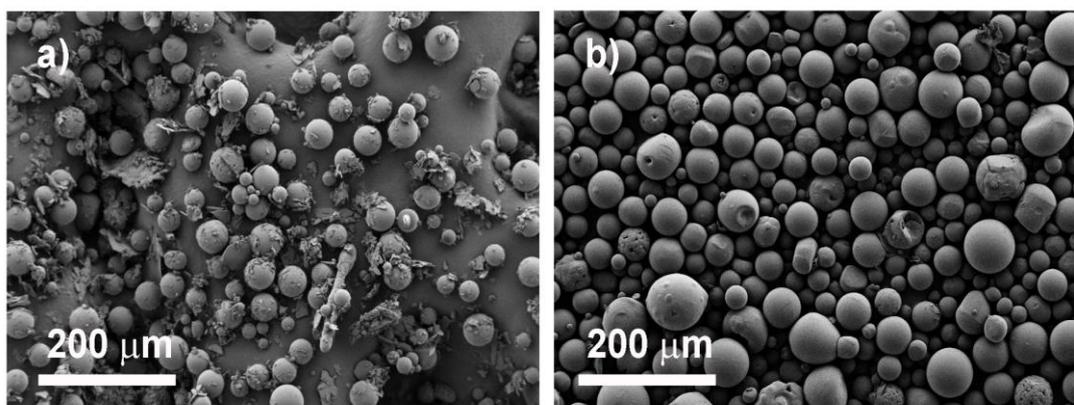


Figura 10. Imágenes tomadas mediante FESEM (Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de campo) (Ultra 55, Zeiss Auriga Compact) de las microesferas poliméricas obtenidas mediante diferentes protocolos de fabricación. (a) Microesferas obtenidas por protocolos con lavados en estático en las que se observan restos de PVA. (b) Esferas obtenidas tras la optimización del proceso de fabricación.

Una vez optimizado el protocolo de fabricación se pasó a la caracterización del material. La visualización de muestras mediante FESEM se llevó a cabo con el objetivo principal de comparar las esferas poliméricas de PLLA con las que incorporan MNPs a nivel superficial, dado que se tenían indicios que la incorporación de las nanopartículas de ferrita podía modificar la superficie del material (Vikingsson *et al.*, n.d.). Tal y como se observa en la Figura 11, existen diferencias a nivel superficial entre ambos tipos de esferas. Mientras que las microesferas control presentan una superficie lisa sin demasiadas imperfecciones (Figura 11, a-c), las esferas con nanopartículas poseen una superficie rugosa, con algunas burbujas (Figura 11, d-f).

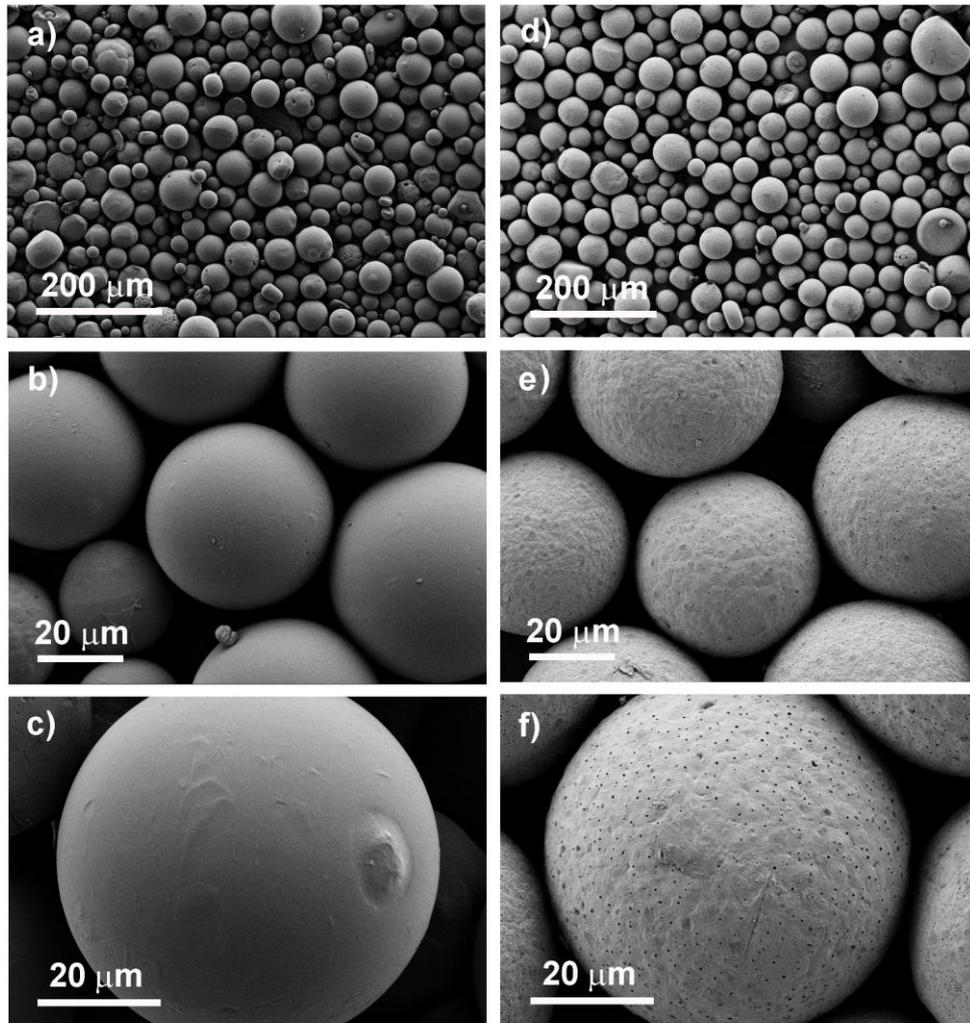


Figura 10. Imágenes obtenidas mediante FESEM de las microsferas poliméricas. Las imágenes, que fueron tomadas a diferentes aumentos (150, 1000 y 1500X respectivamente para cada una de las filas) corresponden a microsferas sin MNPs (a-c) y con MNPs (d-f), ambos tipos observadas después de realizar tratamientos con plasma.

Este cambio en la rugosidad superficial de las esferas puede deberse a la presencia de nanopartículas en su superficie o a la mayor cristalinidad del PLLA por acción de las MNPs actuando como agentes nucleantes de cristalitas. La caracterización de las esferas mediante la técnica de DSC puede arrojar luz en este aspecto. Las imágenes de la Figura 11 permiten también apreciar cierta porosidad en su superficie debida a la evaporación del disolvente de la fase no acuosa de la emulsión (CLF) que se produce mientras la emulsión se encuentra en agitación. Se aprecia también que la porosidad es mayor en el caso de las esferas magnéticas.

Los termogramas resultantes del análisis de DSC, se recogen en la Figura 12. El termograma correspondiente al primer barrido de calentamiento es el que permite caracterizar las condiciones del material tras el proceso de fabricación.

En dicho termograma (Figura12), se puede apreciar el primer pico endotérmico sobre 60°C para ambas muestras. Este pico se corresponde con la temperatura de transición vítrea, por encima de la cual la región amorfa del PLLA adquiere movilidad, es decir, por encima de dicha temperatura las cadenas del polímero se encuentran continuamente cambiando de conformación. Seguidamente, al adquirir movilidad las cadenas, éstas empiezan a plegarse en estructuras ordenadas denominadas cristalitas, ordenamiento

que va acompañado de la liberación de energía y la consecuente aparición de picos exotérmicos de cristalización. En el caso de las esferas de PLLA se observan esos picos entorno a 80°-100°C y a 150°-165°C, obteniéndose un termograma para estas esferas similar al obtenido por Ribeiro *et al.* (2011) para fibras de PLLA. Mientras que en el caso de las esferas de PLLA con nanopartículas dichos no aparecen, siendo esto indicativo de que las esferas que carecen de MNPs en su estructura presentan de partida una estructura más amorfa. Finalmente, se produce la fusión, representada por un pico endotérmico de gran intensidad en ambas muestras.

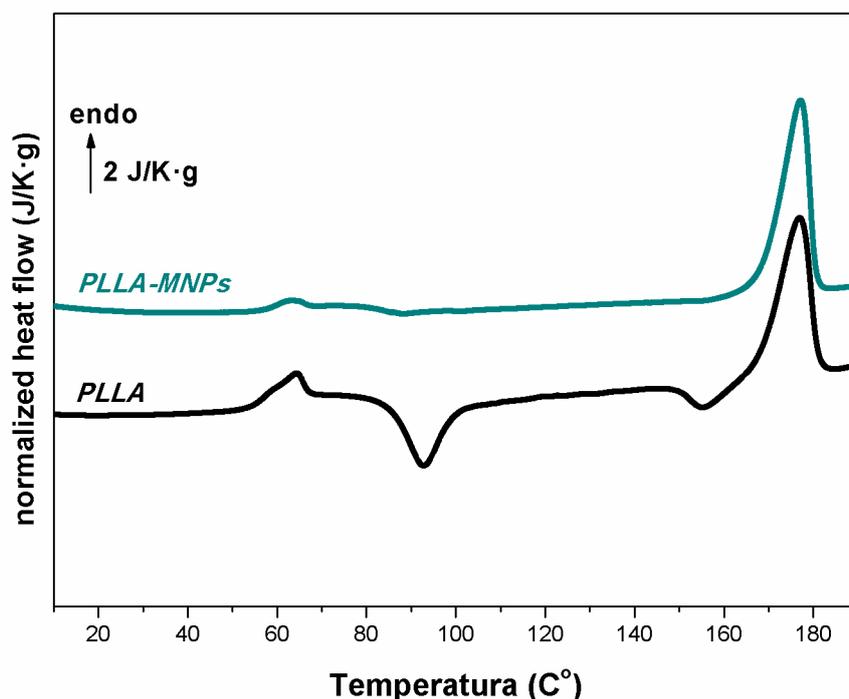


Figura 12. Termogramas obtenidos mediante DSC para las esferas de PLLA (línea negra) y para las que contienen nanopartículas (línea azul). La figura se corresponde con el primer barrido de calentamiento.

El área total de los termogramas empleando una línea base entre 70°C y 195°C grados, permite calcular la cristalinidad (x_c (%)) de las muestras de acuerdo con la siguiente expresión:

$$x_c(\%) = \frac{\Delta h_m - \Delta h_c}{\Delta h_m^0} \times 100$$

donde Δh_m y Δh_c son las entalpías específicas de la fusión y cristalización, respectivamente, obtenidas de la integración de los termogramas y Δh_m^0 es el valor de la entalpía específica de fusión del PLLA totalmente cristalino igual a 93.7J/g (Vikingsson *et al.*, n.d.). Los valores de cristalinidad obtenidos se muestran en la Tabla 3 y aportan información acerca del grado de cristalinidad que presenta una muestra antes de someterla al primer barrido de temperatura. Como se calculan como la diferencia entre el pico o picos de fusión y los picos de cristalización para el primer barrido (normalizados por el PLLA totalmente cristalino), si la muestra era amorfa al empezar el ensayo, todos los cristales formados fundirán y el área resultante será nula. Es decir, cuanto mayor sea el valor obtenido más cristalina será la muestra. Los resultados obtenidos en este caso confirman que la inclusión de las MNPs en la estructura de PLLA de las microesferas supone un aumento en la cristalinidad de las mismas, y justifican también

la presencia de un pico de fusión de gran intensidad en el termograma correspondientes a las microesferas magnéticas pese a la ausencia de picos de cristalización marcados, ya que dicho pico correspondería a la fusión de los cristales preexistentes en las microesferas con motivo de las MNPs, que estarían actuando como agente de nucleación (Vikingsson *et al.*, n.d.).

Tabla 3. Cristalinidad de las micropartículas con ferrita (PLLA + MNPs) y sin ferrita (PLLA) obtenida del primer barrido de DSC. El guión indica valor de cristalinidad de 0.

Muestra	PLLA +MNPs	PLLA
Cristalinidad (x_c %)	34 %	-

Se caracterizó además la distribución de diámetros de ambos tipos de esferas tras su tamizado. Para ello se tomaron 3 imágenes por cada tipo de muestra, y se obtuvieron los histogramas correspondientes a la distribución de diámetros de ambos tipos de esferas que se recogen en la Figura 13.

En ambos casos los diámetros medios obtenidos, 66.4 μm y 36.7 μm (Tabla 4), se encuentran dentro del rango de tamaños celulares, conseguidos con un tamiz de 70 μm de diámetro. Es especialmente interesante que las esferas cargadas con nanopartículas presentan menores diámetros en comparación con las esferas control, la presencia de las nanopartículas en la fase no acuosa cuando se genera la emulsión supone una diferencia en los procesos de fabricación de ambos tipos que podría justificar las diferencias observadas en términos de tamaño. Cabe mencionar también que la desviación estándar obtenida en ambos casos es elevada, por lo que la media probablemente no sea el parámetro estadístico más representativo de la población de esferas. Sin embargo, la distribución de barras o forma del histograma responde a la principal cuestión de este ensayo, ya que se aprecia, especialmente en el caso de las esferas magnéticas (para las que se ha obtenido un histograma acampanado), que presentan los tamaños deseados, la mayor parte entre 5 y 65 μm de diámetro. En el caso de las esferas de PLLA el histograma presenta una forma asimétrica izquierda con mayor concentración de datos en valores altos de diámetro.

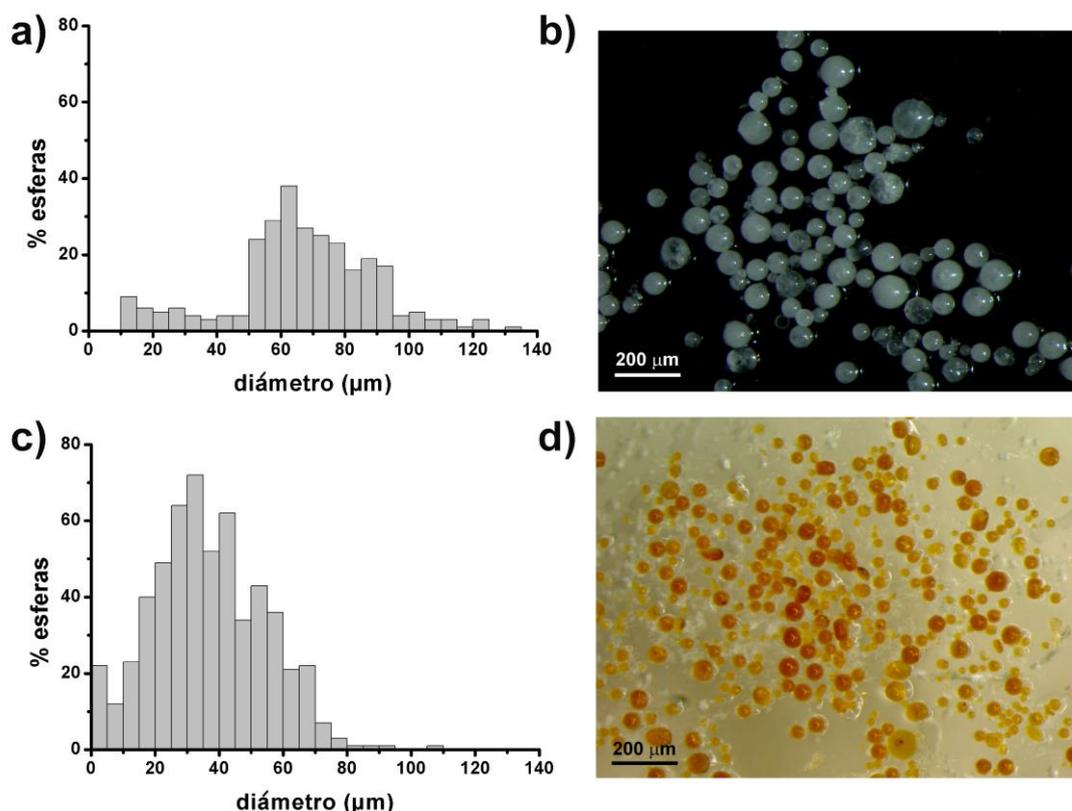


Figura 13. Distribución de diámetros de las microesferas poliméricas. Se representa porcentaje de esferas contabilizadas en cada uno de los intervalos de diámetro. (a) Histograma correspondiente a los diámetros obtenidos para las esferas de PLLA. (b) Imagen tomada con lupa binocular representativa de un total de $n=3$ imágenes empleadas en el recuento de diámetros de las esferas de PLLA. (c) Histograma correspondiente a los diámetros obtenidos para las esferas de PLLA cargadas con MNPs. (d) Imagen tomada con lupa binocular representativa de un total de $n=3$ imágenes empleadas en el recuento de diámetros de las esferas de PLLA con MNPs.

Tabla 4. Estadísticos descriptivos para cada uno de los tipos de esferas. Los parámetros que se recogen en esta tabla se obtuvieron mediante el software de análisis de imagen ImageJ y el software de análisis estadístico Origin Pro 8.0 (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

Muestra	N total	Media (μm)	Desviación Estándar (μm)	Mínimo (μm)	Máximo (μm)	Mediana (μm)
Esferas PLLA	278	66.4	22.8	10.9	130.1	66.3
Esferas PLLA + MNPs	566	36.7	17.5	1.6	106.4	35.1

Finalmente, el ensayo de determinación de la carga magnética de las microesferas de PLLA con MNPs realizado mediante VSM reveló que la eficacia de carga de las nanopartículas en las microesferas durante el proceso de fabricación de las mismas había sido del 47.7%, dado que se determinó que la concentración de ferrita presente en las esferas era del 2.38%, en lugar del 5% que se estaba incorporando en las disoluciones. Por ello, aunque se ha conseguido aumentar el rendimiento de fabricación de microesferas, es necesario tratar de mejorar este aspecto del proceso de obtención de las mismas. En el anexo 7.1 se presentan las gráficas obtenidas en el ensayo, así como los cálculos realizados para obtener los porcentajes que se han detallado.

4.1.2. Gelatina modificada con tiramina.

El resultado de la síntesis es la gelatina liofilizada, cuyo grado de injerto se evaluó mediante medidas espectrofotométricas. En todas las síntesis realizadas se obtuvo un pico de absorbancia en el espectro a una longitud de onda de 275 nm, como se observa en la Figura 14. Dado que los grupos fenol de las moléculas de tiramina presentan un máximo de absorción a 275 nm (Poveda-Reyes *et al.*, 2015) la presencia en el espectro de la gelatina de dicho pico corrobora que se ha conseguido injertar la tiramina.

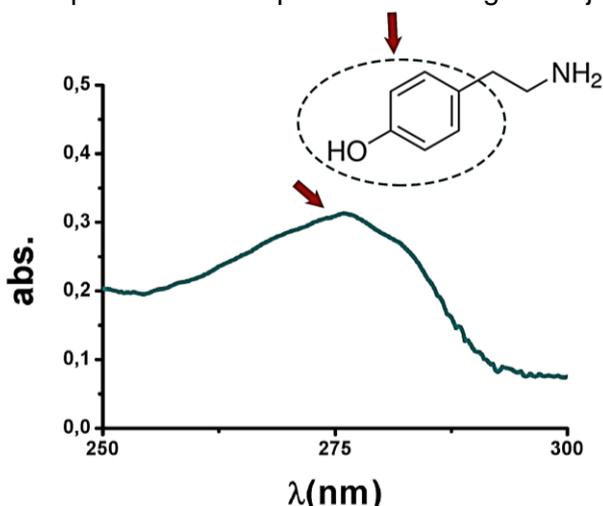


Figura 14. Espectro de absorbancia de la gelatina-tiramina. Obtenido mediante barrido abarcando longitudes de onda desde 200nm a 400nm, se presenta la zona del espectro en la que se aprecia el pico de absorbancia correspondiente al grupo fenol de la tiramina marcado por las flechas rojas.

De igual modo, se estableció la concentración de tiramina presente en cada una de las síntesis realizadas con la ayuda de una recta de calibrado que se presenta en el anexo 7.2, obteniéndose un valor medio de C_{tiramina} de 0.03 mg/mL para todas las síntesis realizadas. Mediante este método es posible establecer el grado de injerto de los grupos tiramina en la gelatina que se ha logrado (estimado como moles de grupos fenol / mg de gelatina), así como el grado de sustitución, que establece el número de grupos COOH de la gelatina que han reaccionado con grupos NH_2 de la tiramina y que han supuesto la incorporación de grupos fenol en la estructura de la gelatina; dicha información se recoge en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de los análisis del grado de injerto de tiramina. Se presentan datos correspondientes a todas las síntesis que se han realizado para obtener los materiales necesarios para el proyecto. En el anexo 7.2 se explican los cálculos realizados para obtener dichos resultados.

Síntesis	Grado de injerto (moles de grupos fenol / mg de gelatina)	Grado de sustitución (%)
1º	$2.18 \cdot 10^{-7}$	27.4
2º	$2.16 \cdot 10^{-7}$	27.0
3º	$2.17 \cdot 10^{-7}$	27.2
Promedio	$2.17 \cdot 10^{-7}$	27.2

Por último, las medidas tomadas con el reómetro permitieron establecer un tiempo de gelificación para los hidrogeles desarrollados de 4.12 min. En la Figura 15 se muestra el gráfico correspondiente al ensayo de barrido de tiempo, en el que se representa el módulo de almacenamiento de cizalla (G') del material en función del tiempo. En el

anexo 7.3 se detallan los cálculos seguidos para obtener al tiempo de gelificación del material a partir de dicha representación, así como los gráficos correspondientes al resto de medidas reológicas realizadas (barridos de amplitud y frecuencia). De dichas medidas cabe también destacar que, en el barrido de frecuencias para una frecuencia de 1Hz y un strain del 1%, se obtuvo un valor de 1132.92 Pa para G' . Este parámetro es importante porque dado que mide la energía que el material almacena cuando se deforma al ser sometido a una fuerza de cizalla, permite obtener información acerca de la rigidez del material (Yan y Pochan, 2010). Y esto debe ser considerado en el campo de la ingeniería tisular ya que en función de ello se puede guiar el proceso de diferenciación celular hacia un u otro linaje (Park *et al.*, 2010). En este caso, el valor obtenido es interesante dado que es cercano al obtenido por Park *et al.* 2010 en un estudio en el que se compararon hidrogeles de gelatina-TA con $G' = 1800$ Pa y $G' = 5900$ Pa, concluyéndose que los segundos presentaban mejor proliferación y adhesión celular cuando se empleaban para encapsular MSCs.

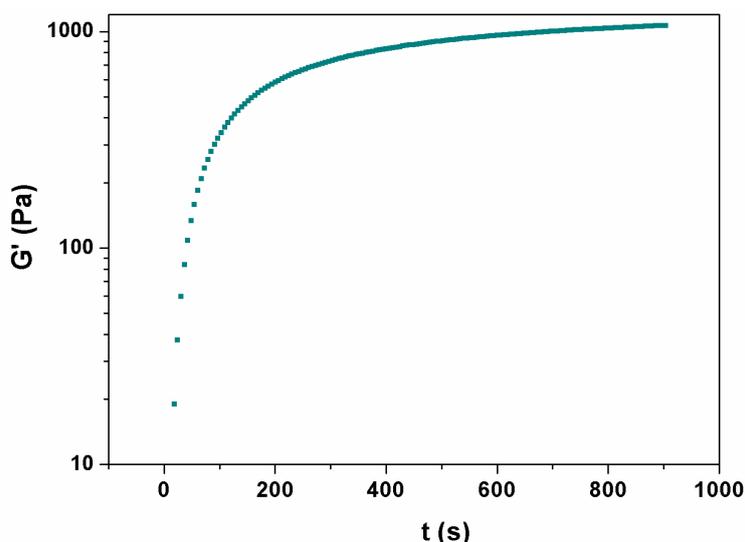


Figura 15. Representación del módulo de almacenamiento de cizalla de un hidrogel de gelatina-TA3% frente al tiempo obtenido mediante barrido de tiempo en reómetro. Se representa la cinética de gelificación del hidrogel como el módulo de almacenamiento de cizalla (G') en función del tiempo (t) de reacción a una frecuencia de 1 Hz y 1% de strain.

4.1.3. Generación del entorno biomimético, integración de los materiales.

Uno de los objetivos de este trabajo ha consistido en emplear por primera vez la combinación de micropartículas y gelatina inyectable para la encapsulación de células. Para ello se ha establecido el procedimiento más adecuado para obtener una dispersión homogénea de esferas en el gel.

Inicialmente se obtuvieron hidrogeles con diferentes concentraciones de microesferas (0.25, 0.5 y 1% w/v respecto al volumen total de hidrogel) y con diferentes concentraciones de gelatina-TA (2, 2.5 y 3% w/v). Tras la observación de los mismos mediante lupa binocular se vio que no se lograba una distribución homogénea de las microesferas en el hidrogel (Figura 16.a). Esto tenía como causa principal la baja hidrofiliidad de las esferas, pero también se debía a que las esferas precipitaban rápidamente en la disolución de gelatina antes de que se logrará reticular el hidrogel.

Por ello, se tomó la decisión de trabajar con una concentración de disolución gelatina-TA del 3%, lo que resultaba en una disolución más viscosa, que ralentizaba la precipitación de las esferas, pero que seguía siendo apta para encapsulamiento celular, puesto que Amini y Nair (2012) establecieron que a concentraciones de 50 mg/mL (5% w/v la densidad de la matriz empezaba a comprometer la viabilidad y la capacidad de adhesión celular. En el caso de la baja hidrofiliicidad de las microesferas se optó por incluir el tratamiento de plasma como parte final del protocolo de síntesis de las esferas. También se consiguió una distribución más homogénea empleando un vórtex para agitar la suspensión de esferas en gelatina (Figura 16.b).

Estos ensayos permitieron además establecer la concentración de esferas que se emplearía en los composites. Se eligió una concentración de microesferas del 1% w/v respecto al volumen del hidrogel, puesto que se observó que dicha concentración permitía tener una cantidad de esferas suficientes como para abarcar de forma homogénea todo el volumen del hidrogel y además facilitaba la preparación de los composites, dado que trabajar a concentraciones más bajas limitaba mucho el pesaje las mismas.

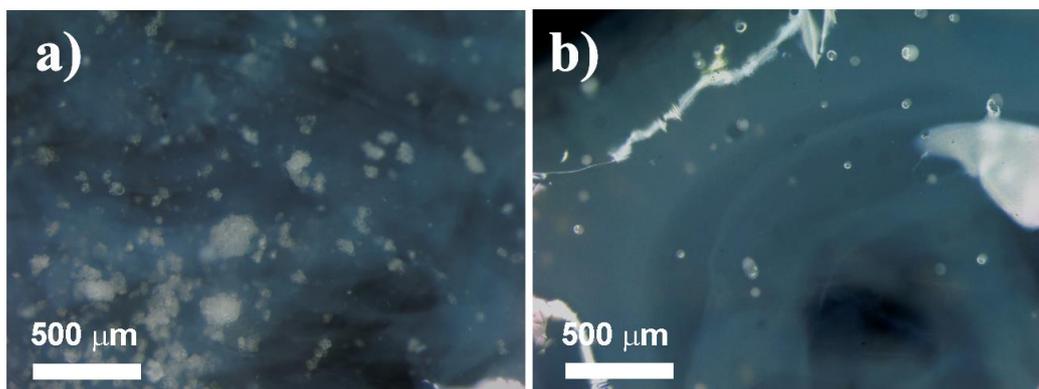


Figura 16. Hidrogeles de gelatina-tiramina al 2% con microesferas poliméricas de PLLA al 0,5% w/v. a) Hidrogel con esferas sin tratamiento de plasma. b) Hidrogel con esferas sometidas a tratamiento de plasma. Imágenes obtenidas mediante lupa binocular.

4.2. Ensayos de cultivos celulares.

4.2.1. LIVE/DEAD, ensayo de viabilidad celular.

El uso de H_2O_2 para la reticulación de los hidrogeles es especialmente crítico, ya que, pese a que es un constituyente fisiológico celular y se origina de forma natural como resultado de diversas vías metabólicas, está considerado como citotóxico. La concentración intracelular del mismo está altamente regulada por diversos sistemas antioxidantes y permanece en condiciones normales a concentraciones de entre 1 y 700 nM. Mientras que concentraciones superiores a 1 μM se considera que causan estrés oxidativo en las células y pueden inducir el arresto del ciclo celular y la consiguiente muerte celular (Gülden *et al.*, 2010). En nuestro sistema, durante la reacción enzimática oxidativa de gelificación del hidrogel, el peróxido de hidrogeno es descompuesto en una molécula de agua por mediación de la HRP, de manera que una vez se produce la reticulación, prácticamente la totalidad de ese H_2O_2 ha sido convertida en agua.

Tras realizar el ensayo de viabilidad celular se obtuvieron resultados positivos, como se aprecia en las imágenes que se muestran en la Figura 17, para el ensayo a 3 horas, y

en la Figura 18 para el ensayo a 24 horas. Tras el recuento de tres zonas diferentes en cada una de las muestras analizadas, habiéndose analizado un total de cuatro muestras por tiempo, se obtuvieron los porcentajes de viabilidad celular que se recogen en la Figura 19. Para el tiempo 3 horas (Figura 19.a), el porcentaje de células viables asociado al material fue del 99.7% frente al 0.3% de células muertas. En el caso de las muestras correspondiente a 24 horas (Figura 19.b), se obtuvo un porcentaje de 98.1% de células vivas frente al 1.8% de células muertas para el material. En ambos casos el % de células vivas se encuentra por encima del 70%, por lo que se cumple el requisito establecido por la normativa *ISO 10993-5 Parte 5: Test for in vitro cytotoxicity* para concluir que no se observó citotoxicidad asociada a la reticulación de la gelatina.

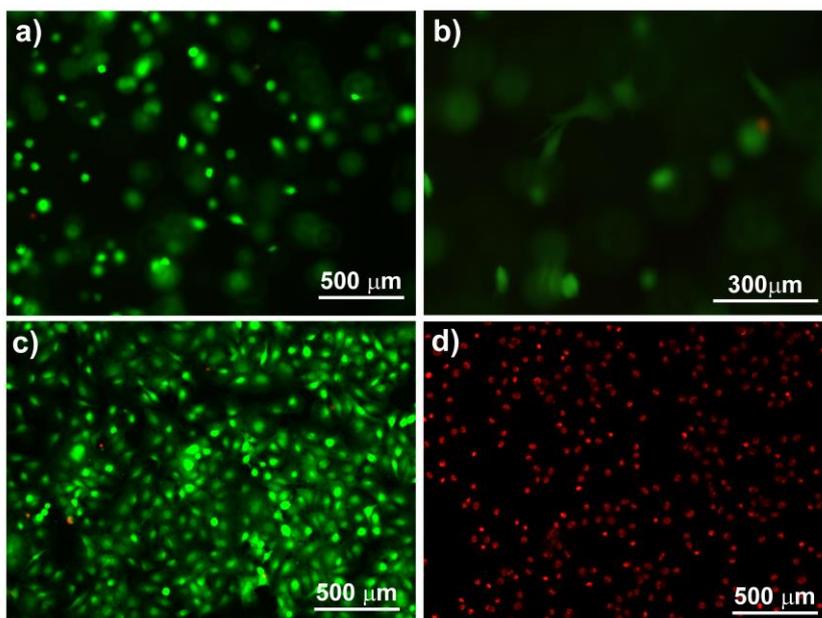


Figura 17. Imágenes representativas de las imágenes analizadas en el ensayo LIVE/DEAD a tiempo 3 horas. a-b) Gelatina-TA3%. c) Control negativo. d) Control positivo. Todas las condiciones se sembraron empleando preosteoblastos MC3T3-E1, con una densidad de 25000 células/muestra.

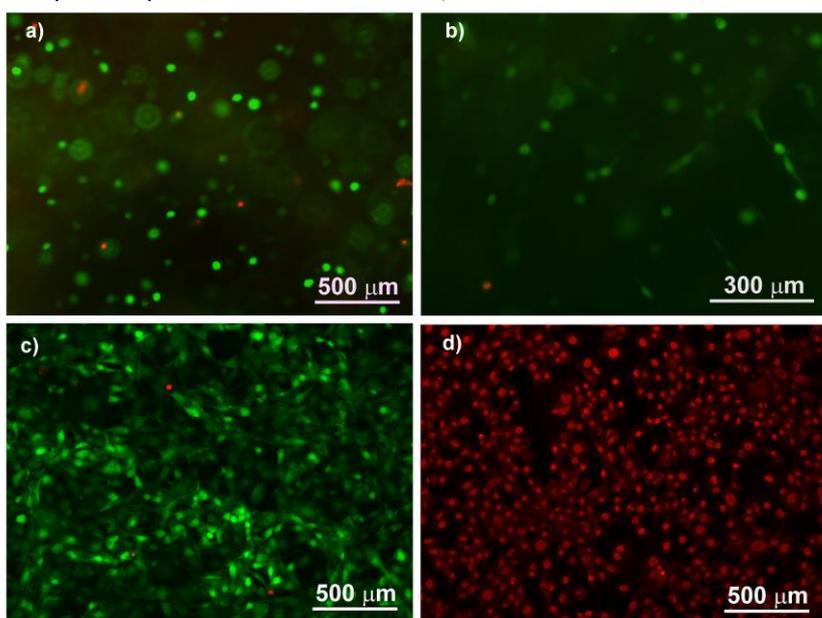


Figura 18. Imágenes representativas de las imágenes analizadas en el ensayo LIVE/DEAD a tiempo 24 horas. a-b) Gelatina-TA3%. c) Control negativo. d) Control positivo. Todas las condiciones se sembraron empleando preosteoblastos MC3T3-E1, con una densidad de 25000 células/muestra.

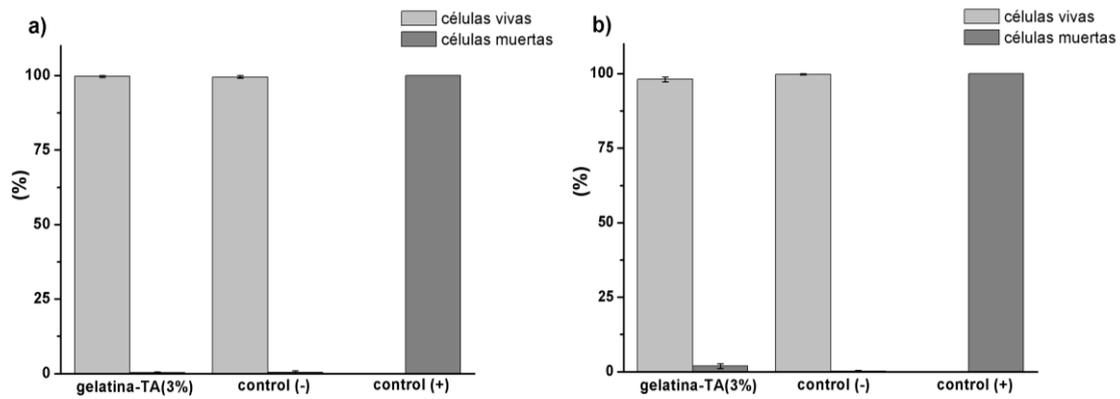


Figura 19. Porcentajes de viabilidad celular asociados a cada una de las condiciones ensayadas en el LIVE/DEAD. a) 3 horas de cultivo y b) 24 horas de cultivo. Las células sembradas fueron preosteoblastos MC3T3-E1 a una densidad de 25000 células/muestra. Los materiales ensayados y representados fueron células encapsuladas en gelatina-TA, células sobre vidrio (control negativo) y células incubadas con DMSO al 50% (control positivo).

4.2.2. MTS, ensayo de proliferación celular.

Este ensayo se llevó a cabo con el objetivo de determinar la proliferación celular asociada a cada una de las matrices (gelatina-TA con microesferas de PLLA y gelatina-TA con microesferas magnéticas). En la Figura 20 se muestran los resultados de absorbancia obtenidos para las dos matrices y los tres tiempos de cultivo ensayados (1, 3 y 7 días). Se puede apreciar un aumento de los valores de absorbancia con el tiempo, lo que implica que las células proliferan en las dos matrices durante los tiempos ensayados. El análisis estadístico (Anexo 7.4) corroboró que no se observan diferencias significativas entre las dos matrices testadas en ninguno de los tiempos, esto confirma que la incorporación de la ferrita en la estructura de las microesferas no tiene consecuencias negativas para la viabilidad celular respecto al control sin ferrita en los tiempos ensayados. Tampoco se aprecia que la incorporación de ferrita estimule la proliferación de forma aumentada respecto a las esferas control, sin embargo, no se esperaba que esto ocurriera dado que se ha trabajado con cultivos en estático.

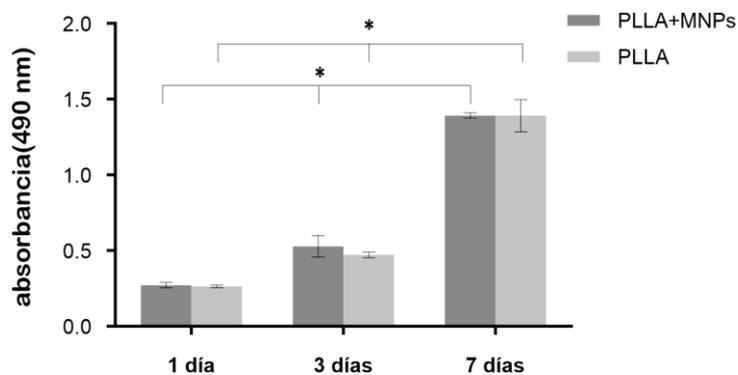


Figura 20. Proliferación celular medida mediante MTS en matrices de gelatina-TA con esferas de PLLA y de gelatina-TA con esferas de PLLA con MNPs a diferentes tiempos de cultivo. Se sembraron preosteoblastos MC3T3-E1 a una densidad de 100000 células/muestra.

4.2.3. Tinción Actina/DAPI, evaluación de la morfología celular.

La finalidad de este ensayo es la de evaluar la morfología de las células al ser cultivadas en los entornos biomiméticos planteados. Este aspecto es de especial importancia porque permite determinar si los sistemas planteados favorecen o no la correcta adhesión celular, lo cual es necesario para que puedan tener aplicación en el campo de la medicina regenerativa y es de especial importancia en este proyecto, en el que el material debe inducir la diferenciación mediante la transmisión de un estímulo mecánico. Existen diferentes técnicas que se pueden emplear con el objetivo de analizar las adhesiones celulares en el área de estudio de los biomateriales, pero teniendo en cuenta que durante los procesos estáticos *in vitro* de adhesión a la matriz las células llevan a cabo alteraciones morfológicas mediadas por la reorganización activa del citoesqueleto de actina (Khalili y Ahmad, 2015), una forma de poder determinar si el biomaterial en cuestión propicia la adhesión celular consiste en realizar esta tinción, que permite marcar las moléculas de actina y evaluar si se o da o no dicha adaptación del citoesqueleto.

Los cambios que tienen lugar durante este proceso han sido caracterizados por diversos autores (Khalili y Ahmad, 2015; Reilly y Engler, 2010), y por lo que se refiere a este ensayo interesa destacar que en el avance del proceso se produce un cambio macroscópico de la célula que pasa de presentar una morfología esférica a una morfología aplanada gracias a que la reorganización de sus filamentos de actina le permite extender el citoesqueleto consiguiendo aplanarse y disminuir su altura para aumentar así el área disponible para establecer adhesiones focales (Figura 21). En el caso de los fibroblastos empleados para el ensayo, la morfología asociada a la extensión del citoesqueleto es una forma estrellada.

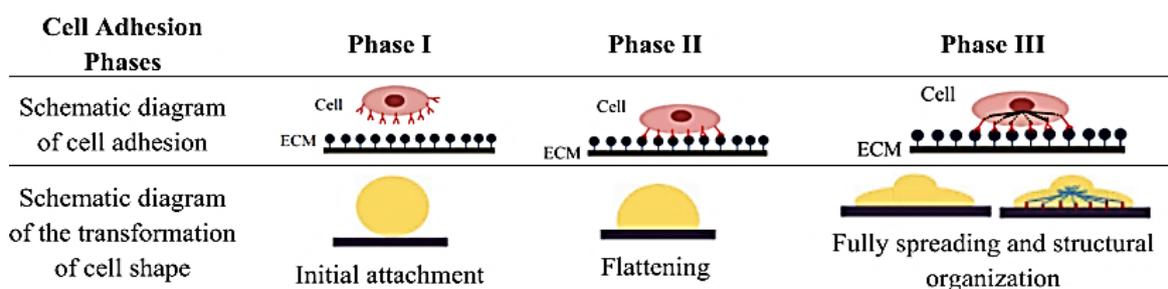


Figura 21. Fases del proceso de adhesión celular. Se muestran las distintas etapas del proceso de adhesión y la morfología celular asociada a cada una de ellas (Khalili y Ahmad, 2015).

Los resultados obtenidos fueron positivos dado que al comparar las imágenes obtenidas a partir de muestras pertenecientes a diferentes tiempos (tiempo 3 horas y tiempo 7 días) se pudieron apreciar cambios significativos en la morfología celular. En los tres materiales evaluados (hidrogeles de gelatina-TA al 3%, hidrogeles de gelatina-TA al 3% con microesferas de PLLA e hidrogeles de gelatina-TA al 3% con microesferas de PLLA que incorporan MNPs en su estructura) se observa que la morfología de los fibroblastos a tiempo 3 horas es esférica, mientras que a tiempo 7 días comienza a observarse el patrón estrellado característico de este tipo celular que se debe a la extensión del citoesqueleto (Figura 22).

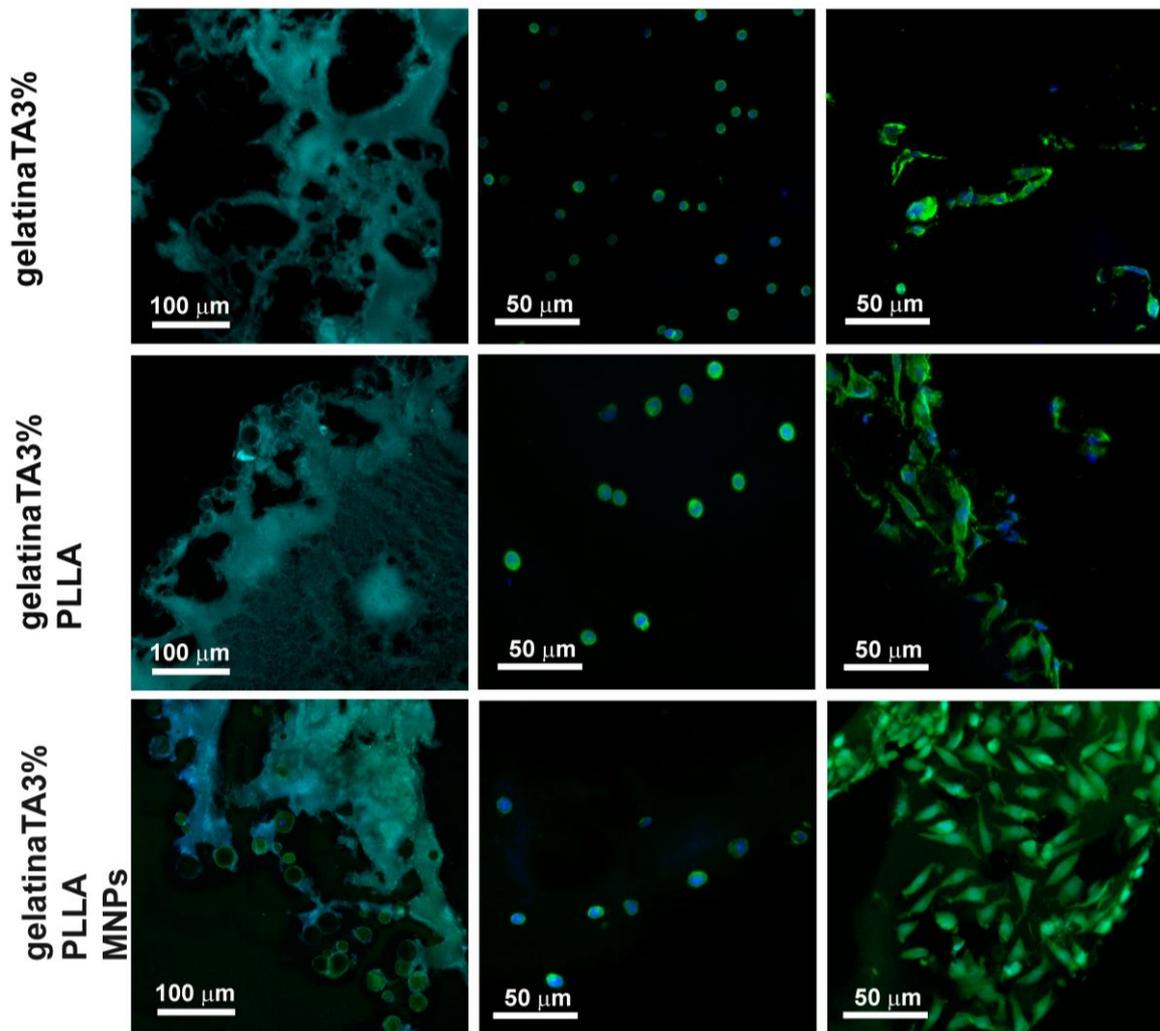


Figura 22. Imágenes de microscopia de confocal correspondientes a la tinción Actina/DAPI realizada sobre los diferentes biomateriales ensayados. Se sembraron fibroblastos L929 a una densidad de 10000 células/muestra. Se muestran los tres materiales ensayados sin células (1º columna) y con células tras 3 horas y 7 días de cultivo (2º y 3º columna respectivamente).

En la Figura 23 se puede apreciar el claro cambio en la morfología celular indicativo de que los fibroblastos se adhieren al hidrogel, esto demuestra que el uso de gelatina con secuencias RGD para la síntesis de dicha matriz es una buena elección en este aspecto (Amini y Nair, 2012). En ambas figuras se puede apreciar no sólo la adaptación del citoesqueleto sino también un aumento de la densidad celular con respecto al tiempo de cultivo en todos los materiales ensayados, como indicaba el MTS.

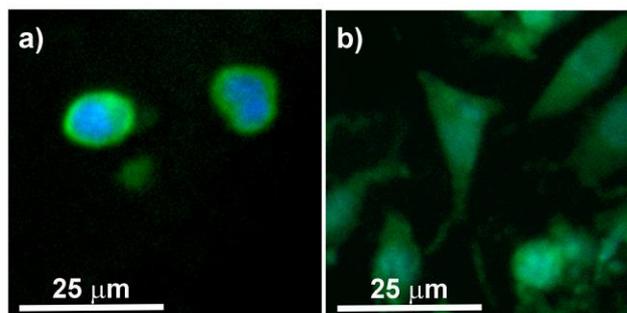


Figura 23. Imágenes de la tinción Actina/DAPI realizada sobre hidrogel de gelatina-TA 3% con microesferas poliméricas magnéticas tras 3 horas (a) y 7 días de cultivo (b). Se sembraron fibroblastos L929 a una densidad de 10000 células/muestra

5. CONCLUSIONES

Finalmente, se recogen en este apartado las conclusiones extraídas de este trabajo final de grado:

1. Se ha conseguido fabricar microesferas de PLLA, así como microesferas de PLLA que incorporan MNPs de ferrita en su estructura consiguiendo que éstas presenten un tamaño celular. Se ha podido observar la topografía de su superficie mediante FESEM y se ha determinado cómo la incorporación de las MNPs aumenta la cristalinidad de las microesferas, siendo esto importante de cara al tiempo de degradación de las mismas. También se ha medido la magnetización de dichas microesferas, estableciéndose que, pese a que se ha logrado mejorar el protocolo de obtención de microesferas, cabe mejorar la eficacia de incorporación de MNPs en la matriz de PLLA de las esferas.
2. Se ha obtenido gelatina modificada con TA con grado de injerto de 2.17×10^{-7} moles de grupos fenol/mg de gelatina. Dicha gelatina se ha empleado para la formación de hidrogeles inyectables al 3% mediante la adición secuencial de HRP y H_2O_2 , cuyo tiempo de gelificación ha sido establecido en 4.12 min mediante medidas reológicas. Mediante ensayos biológicos basados en la técnica LIVE/DEAD se ha logrado establecer que estos hidrogeles constituyen una matriz no citotóxica para encapsulamiento celular en los tiempos ensayados.
3. Se ha logrado emplear el sistema hidrogel con microesferas para encapsulamiento celular, y se ha medido la proliferación asociada al mismo mediante ensayos de MTS. En este ensayo se ha observado que el entorno biomimético planteado, hidrogeles de gelatina-TA3% con microesferas magnéticas, presenta diferencias significativas en cuanto al número de células para los tiempos ensayados, por lo que existe proliferación. Igualmente se ha establecido que dicho sistema no presenta diferencias significativas en términos de proliferación con el sistema equivalente, pero con microesferas de PLLA no magnéticas, que se ha empleado como control en el ensayo; lo que es indicativo de que la incorporación de las MNPs no afecta a la proliferación celular en condiciones de cultivo estáticas (en ausencia de estimulación magnética).
4. Por último, se ha evaluado la morfología tridimensional de células cultivadas en las matrices planteadas mediante tinción celular Actina/DAPI, estableciéndose que, tras 7 días de cultivo, éstas han llevado a cabo un proceso de adaptación del citoesqueleto de actina y han alterado su morfología. Resultado que se puede interpretar como indicador positivo de la adhesión celular asociada al material desarrollado.

Por todo ello, se han cumplido los objetivos establecidos inicialmente, habiéndose logrado la obtención, síntesis y caracterización de los distintos componentes del sistema y la integración de los mismos generando así un entorno biomimético con potencial capacidad para la transmisión de impulsos mecánicos a las células en él cultivadas, que además se ha podido emplear para encapsulamiento celular demostrándose así las posibilidades que presenta dicho sistema para emplearse en el campo de la medicina regenerativa.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMUBARAK, S., NETHERCOTT, H., FREEBERG, M., BEAUDON, C., JHA, A., JACKSON, W., BAHNEY, C. (2016). Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. *Bone*, 83, 197–209.
- AMINI, A. A., & NAIR, L. S. (2012). Enzymatically cross-linked injectable gelatin gel as osteoblast delivery vehicle. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 27(4), 342–355.
- ANTOLINOS TURPÍN, C. M. (2015). Mallas macroporosas bioestables con aplicación en implantes protésicos y trasplante de células. Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València, Valencia (Spain).
- BAE, K. H., WANG, L.-S., & KURISAWA, M. (2013). Injectable biodegradable hydrogels: Progress and challenges. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(40), 5371–5388.
- BATRA, N., BURRA, S., SILLER-JACKSON, A. J., GU, S., XIA, X., WEBER, G. F., JIANG, J. X. (2012). Mechanical stress-activated integrin $\alpha 5 \beta 1$ induces opening of connexin 43 hemichannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(9), 3359–3364.
- BELLIDO, T. (2014). Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcified Tissue International*, 94(1), 25–34.
- CAO, L., CAO, B., LU, C., WANG, G., YU, L., & DING, J. (2015). An injectable hydrogel formed by in situ cross-linking of glycol chitosan and multi-benzaldehyde functionalized PEG analogues for cartilage tissue engineering. *J. Mater. Chem. B*, 3(7), 1268–1280.
- CAPLAN, A. I., & BRUDER, S. P. (2001). Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine*, 7(6), 259–264.
- DELAINE-SMITH, R. M., & REILLY, G. C. (2012). Mesenchymal stem cell responses to mechanical stimuli. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 2(3), 169–80.
- EDWARDS, J. R., & MUNDY, G. R. (2011). Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nature Reviews. Rheumatology*, 7(4), 235–243.
- EINERSON, N. J., STEVENS, K. R., & KAO, W. J. (2003). Synthesis and physicochemical analysis of gelatin-based hydrogels for drug carrier matrices. *Biomaterials*, 24(3), 509–523.
- GEIGER, B., BERSHADSKY, A., PANKOV, R., YAMADA, K. M., & CORRESPONDENCE, B. G. (2001). Transmembrane extracellular matrix–cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(November), 793–805.
- GIANCOTTI, F. G., & RUOSLAHTI, E. (2009). Integrin Signaling. *Science*, 285(1999), 1028–1032.
- GÜLDEN, M., JESS, A., KAMMANN, J., MASER, E., & SEIBERT, H. (2010). Cytotoxic

- potency of H₂O₂ in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(8), 1298–1305.
- JEON, O., BOUHADIR, K. H., MANSOUR, J. M., & ALSBERG, E. (2009). Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials*, 30(14), 2724–2734.
- JIN, R., HIEMSTRA, C., ZHONG, Z., & FEIJEN, J. (2007). Enzyme-mediated fast in situ formation of hydrogels from dextran-tyramine conjugates. *Biomaterials*, 28(18), 2791–2800.
- JIN, R., TEIXEIRA, L. S. M., KROUWELS, A., DIJKSTRA, P. J., VAN BLITTERSWIJK, C. A., KARPERIEN, M., & FEIJEN, J. (2010). Synthesis and characterization of hyaluronic acid-poly(ethylene glycol) hydrogels via Michael addition: An injectable biomaterial for cartilage repair. *Acta Biomaterialia*, 6(6), 1968–1977.
- KHALILI, A. A., & AHMAD, M. R. (2015). A Review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18149–18184.
- KHATIWALA, C. B., KIM, P. D., PEYTON, S. R., & PUTNAM, A. J. (2009). ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 24(5), 886–898.
- KOBAYASHI, S., KOBAYASHI, S., UYAMA, H., UYAMA, H., KIMURA, S., & KIMURA, S. (2001). Enzymatic Polymerization. *Chemical Reviews*, 101(12), 3793–3818.
- KUNDU, J., PATI, F., SHIM, J., & CHO, D. (2014). *Rapid prototyping technology for bone regeneration. Rapid prototyping of biomaterials: Principles and applications.* Woodhead Publishing Limited.
- KUO, C. K., & MA, P. X. (2001). Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 22(6), 511–521.
- KURISAWA, M., CHUNG, J. E., YANG, Y. Y., GAO, S. J., & UYAMA, H. (2005). Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid-tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering. *Chemical Communications*, 0(34), 4312–4314.
- LANGER, R., & VACANTI, J. P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260, 920–926.
- LARA SÁEZ, I. (2015, May 21). *Evaluación biológica de nuevos recubrimientos osteoinductores sintetizados vía sol-gel para aplicación en implantología dental.* Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València, Valencia (Spain).
- LEACH, J. K., & MOONEY, D. J. (2004). Bone engineering by controlled delivery of osteoinductive molecules and cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4(7), 1015–27.
- LEE, Y., BAE, J. W., OH, D. H., PARK, K. M., CHUN, Y. W., SUNG, H.-J., & PARK, K. D. (2013). In situ forming gelatin-based tissue adhesives and their phenolic content-driven properties. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(18), 2407–2414.

- LI, Z; DING, C; QU, T AND LIU, X. (2014). Injectable gelatin derivative hydrogels with sustained vascular endothelial growth factor release for induced angiogenesis. *Acta November*, 75246.
- LIMA, J., GONÇALVES, A. I., RODRIGUES, M. T., REIS, R. L., & GOMES, M. E. (2015). The effect of magnetic stimulation on the osteogenic and chondrogenic differentiation of human stem cells derived from the adipose tissue (hASCs). *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 393, 526–536.
- MALONE, A. M. D., ANDERSON, C. T., TUMMALA, P., KWON, R. Y., JOHNSTON, T. R., STEARNS, T., & JACOBS, C. R. (2007). Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), 13325–13330.
- NIKUKAR, H., REID, S., TSIMBOURI, P. M., RIEHLE, M. O., CURTIS, A. S. G., & DALBY, M. J. (2013). Osteogenesis of mesenchymal stem cells by nanoscale mechanotransduction. *ACS Nano*, 7(3), 2758–2767.
- ORYAN, A., ALIDADI, S., MOSHIRI, A., & MAFFULLI, N. (2014). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 9(1), 18.
- PARK, K. M., KO, K. S., JOUNG, Y. K., SHIN, H., & PARK, K. D. (2011). In situ cross-linkable gelatin–poly(ethylene glycol)–tyramine hydrogel via enzyme-mediated reaction for tissue regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry*, 21(35), 13180.
- POVEDA-REYES, S., MOULISOVA, V., SANMARTÍN-MASIÁ, E., QUINTANILLA-SIERRA, L., SALMERÓN-SÁNCHEZ, M., & GALLEGO-FERRER, G. (2016). Gelatin-Hyaluronic Acid Hydrogels with Tuned Stiffness to Counterbalance Cellular Forces and Promote Cell Differentiation. *Macromolecular Bioscience*, 1–14.
- POVEDA-REYES, S., RODRIGO-NAVARRO, A., GAMBOA-MARTÍNEZ, T. C., RODRÍGUEZ-CABELLO, J. C., QUINTANILLA-SIERRA, L., EDLUND, U., & GALLEGO-FERRER, G. (2015). Injectable composites of loose microfibers and gelatin with improved interfacial interaction for soft tissue engineering. *Polymer (United Kingdom)*, 74, 224–234.
- REILLY, G. C., & ENGLER, A. J. (2010). Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *Journal of Biomechanics*, 43(1), 55–62.
- RIANCHO, J., & DELGADO-CALLE, J. (2013). Mecanobiología celular y molecular del tejido óseo. *Rev Osteoporos Metab Miner*, 5(1), 51–56.
- RIBEIRO, C., SENCADAS, V., COSTA, C.M., GÓMEZ-RIBELLES, J.L. & LANCEROS-MÉNDEZ S. (2011). Tailoring the morphology and cristalinity of poly(L-lactide acid) electrospun membranes. *Sci.Technol. Adv. Mater.* 12(2011)015001(9pp).
- RUOSLAHTI, E. (1997). RGD and other recognition sequences for integrins, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12, 697-715.
- SOFIA, S., SINGH, A., & KAPLAN, D. (2002). PEROXIDASE-CATALYZED CROSSIINKING OF FUNCTIONALIZED POLYASPARTIC ACID POLYMERS. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 39(10), 1151–1181.

- TANG, D., TARE, R. S., YANG, L.-Y., WILLIAMS, D. F., OU, K.-L., & OREFFO, R. O. C. (2016). Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*, 83, 363-382.
- TAVAKOL, M., VASHEGHANI-FARAHANI, E., SOLEIMANI, M., MOHAMMADIFAR, M. A., HASHEMI-NAJAFABADI, S., & HAFIZI, M. (2014). Synthesis and characterization of an enzyme mediated in situ forming hydrogel based on gum tragacanth for biomedical applications. *Iranian Journal of Biotechnology*, 12(1), 1–8.
- THOMAS, T., MARTIN, A., & LAFAGE-PROUST, M.-H. (2011). Fisiología del tejido óseo. *EMC - Podología*, 13(2), 1–17.
- TUAN, R. S., BOLAND, G., & TULI, R. (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research & Therapy*, 5(1), 32–45.
- VAN TOMME, S. R., STORM, G., & HENNINK, W. E. (2008). In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 355(1-2), 1–18.
- VIKINGSSON, L., VINALS-GUITART A., VALERA-MARTÍNEZ A., RIERA J., VIDAURRE A., GALLEGO FERRER G., GÓMEZ-RIBELLES, J.L. (n.d.). Local deformation in a hydrogel induced by an external magnetic field. *Journal of Materials Science (Submitted)*.
- YAN, C., & POCHAN, D. J. (2010). Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. *Chemical Society Reviews*, 39(9), 3528–40.
- ZHANG, Y., PAUL, E. M., SATHYENDRA, V., DAVISON, A., SHARKEY, N., BRONSON, S., DONAHUE, H. J. (2011). Enhanced osteoclastic resorption and responsiveness to mechanical load in gap junction deficient bone. *PLoS ONE*, 6(8).

7. ANEXOS

7.1. Resultados del ensayo de magnetización.

Este ensayo se llevó a cabo para obtener el parámetro M_s tanto en el caso de las nanopartículas magnéticas como en el de las microesferas cargadas con dichas MNPs. En el caso de la medida realizada con las nanopartículas se obtuvo un valor de $M_s = 57.98$ emu/g. La Figura 24 se corresponde con la gráfica de *hysteresis loop* de dicha muestra.

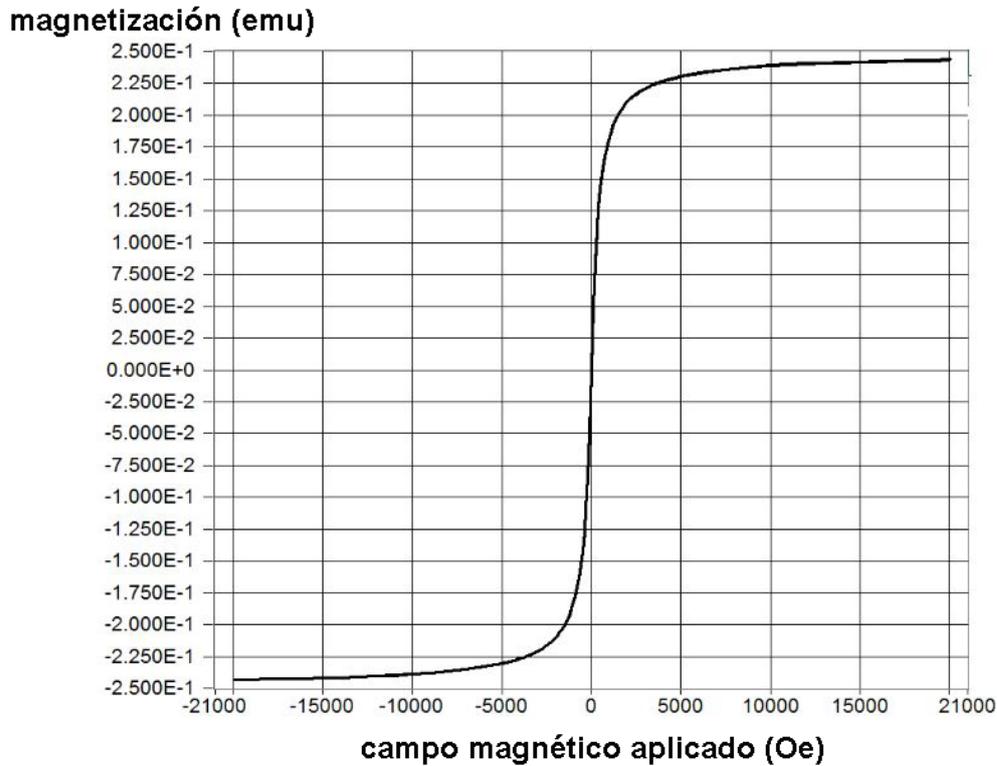


Figura 24. Gráfica obtenida mediante el ensayo de VSM para las MNPs de ferrita.

En cambio, para las microesferas con MNP se obtuvo un valor medio de $M_s = 1.38$ emu/g para las dos medidas realizadas. En las Figuras 25 y 26 se presentan las correspondientes gráficas.

magnetización (emu)

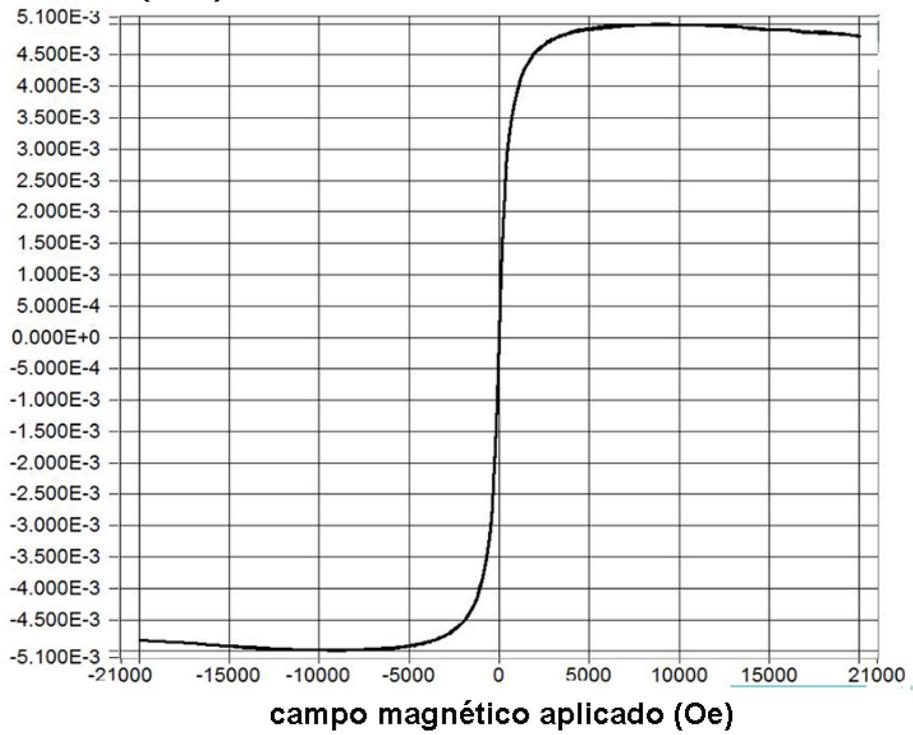


Figura 25. Gráfica obtenida mediante el ensayo de VSM para la primera réplica de microesferas magnéticas.

magnetización (emu)

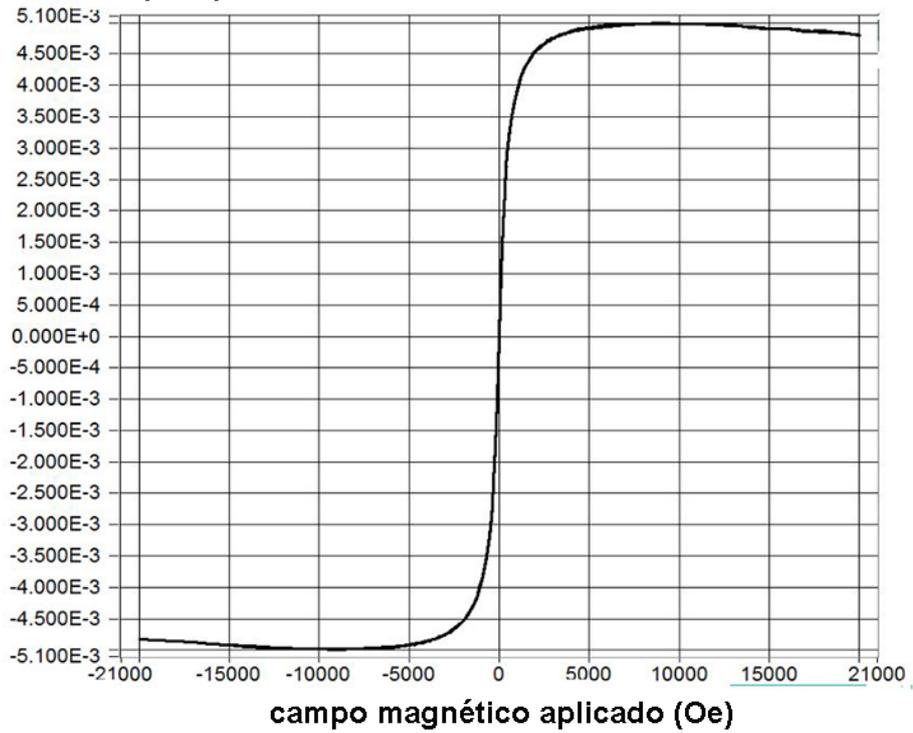


Figura 26. Gráfica obtenida mediante el ensayo de VSM para la segunda réplica de microesferas magnéticas.

Teniendo en cuenta que si la concentración real de nanopartículas en las microesferas fuera del 5% (concentración a la que se prepararon las disoluciones de nanopartículas empleadas para la fabricación de las microesferas) éstas deberían presentar un M_s teórico = 2.9 emu/g; se pudo establecer que la concentración real de ferrita en las microesferas era del 2.38%. Lo que suponía una eficacia en el proceso de carga de las nanopartículas en las microesferas del 47.7%.

7.2. Cálculo del grado de injerto y grado de sustitución de la gelatina-TA.

En este apartado se detallan los cálculos realizados para obtener dichos indicadores.

En el caso del **grado de injerto**, expresado como moles de grupos fenol /mg de gelatina, y que se recoge en la Tabla 5 para cada una de las tres síntesis realizadas, se partió del dato de absorbancia a 275 nm obtenido para cada una de las muestras de gelatina-TA. Empleando dicho dato y empleando la recta de calibrado que se muestra en la Figura 27 se obtuvo la concentración de tiramina (mg/mL) para cada una de las muestras (Tabla 6), cuyo valor promedio, 0.03 mg/mL se presenta en el apartado 4.1.2.

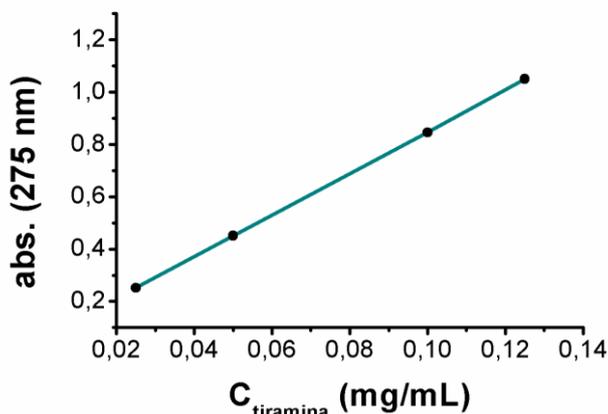


Figura 27. Recta de calibrado para la determinación de la concentración de tiramina (mg/mL). Se representa la absorbancia de las distintas disoluciones patrón de concentración conocida frente a la concentración de tiramina de las mismas. La ecuación de la recta obtenida fue $Y = 8.81X$, y la bondad del ajuste fue $R^2 = 0.99$.

Dado que las disoluciones de gelatina-TA empleadas para obtener dichas medidas tenían una concentración baja, 0.1%, y que fueron preparadas en agua miliQ podemos asumir que la densidad de las mismas es equivalente a la densidad del agua (1 g/mL); de manera que los datos de concentración de tiramina en mg/ml fueron convertidos a mg de tiramina/mg de gelatina empleando dicho valor.

A continuación, empleando el peso molecular de la tiramina que proporciona la ficha del reactivo (137.18 g/mol), se obtuvieron los datos de concentración de tiramina en moles/mg, y teniendo en cuenta que cada molécula de tiramina contiene un único grupo fenol, se puede asumir por tanto que se ha obtenido el valor de concentración de tiramina como moles de grupos fenol / mg de gelatina, que constituye el grado de injerto (Tabla 6).

Tabla 6. Cálculos realizados para la obtención del grado de injerto de las muestras de gelatina-TA.

	1º síntesis	2º síntesis	3º síntesis	Valor promedio	Desviación estándar
Absorbancia a 275nm	0.239	0.236	0.238	0.238	$1.5 \cdot 10^{-4}$
Ctiramina (mg/mL)	0.0298	0.0296	0.0298	0.0297	$1.1 \cdot 10^{-4}$
Ctiramina(moles/mg)	$2.19 \cdot 10^{-7}$	$2.16 \cdot 10^{-7}$	$2.18 \cdot 10^{-7}$	$2.18 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-9}$
Grado de injerto (moles de grupos fenol/mg de gelatina-TA)	$2.19 \cdot 10^{-7}$	$2.16 \cdot 10^{-7}$	$2.18 \cdot 10^{-7}$	$2.18 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-9}$

El **grado de sustitución** en cambio es un porcentaje que representa el número de grupos COOH de la gelatina que han reaccionado con grupos NH₂ de la tiramina respecto al total de grupos COOH que podrían haber reaccionado.

El número de grupos COOH de la gelatina se presenta como dato en la ficha técnica del reactivo, de manera que ésta presenta 80 mmoles de grupos COOH/100g.

Es posible determinar la cantidad de grupos COOH de la gelatina que ha reaccionado gracias a la medida de absorbancia a 275 nm de las muestras de gelatina, ya que es equivalente a la cantidad de grupos fenol que ésta ha incorporado puesto que cada grupo COOH que reacciona incorpora un único grupo fenol, de manera que la última fila de la Tabla 6 recoge este dato.

A continuación, los dos datos obtenidos se cambiaron de unidad a moles de grupos COOH/mg de gelatina y se obtuvo el porcentaje que representaban los moles de grupos COOH que habían reaccionado respecto al total de moles de grupos COOH de la gelatina, tal y como se recoge en la Tabla 7, obteniéndose así los datos de grado de sustitución que se presentan en la Tabla 5 del apartado 4.1.2.

Tabla 7. Cálculos realizados para la obtención del grado de sustitución de las muestras de gelatina-TA.

	1º síntesis	2º síntesis	3º síntesis	Valor promedio	Desviación estándar
Moles de COOH/mg de gelatina-TA	$0.8 \cdot 10^{-6}$	$0.8 \cdot 10^{-6}$	$0.8 \cdot 10^{-6}$	$0.8 \cdot 10^{-6}$	0.0
Moles de COOH que han reaccionado/mg de gelatina-TA	$2.19 \cdot 10^{-7}$	$2.16 \cdot 10^{-7}$	$2.18 \cdot 10^{-7}$	$2.18 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-9}$
Grado de sustitución (%)	27.35	27.00	27.23	27.19	0.17

7.3. Análisis de los resultados obtenidos mediante medidas reológicas.

Como se establece en el apartado 4.1.2, es posible determinar el tiempo de gelificación del hidrogel a partir de la dinámica de gelificación del mismo, representada como el avance del módulo elástico (G') en función del tiempo, dado que el tiempo de gelificación se define como el punto de corte entre la recta que permite obtener un buen ajuste lineal para tiempos cortos del ensayo y la que permite obtener un buen ajuste lineal para tiempos largos (Poveda-Reyes *et al.*, 2016).

En la Figura 28, se muestra dicha representación y se presenta acompañada de los ajustes lineales realizados y del punto de corte obtenido entre ambos. Se recogen también los parámetros de los mismos en la Tabla 8.

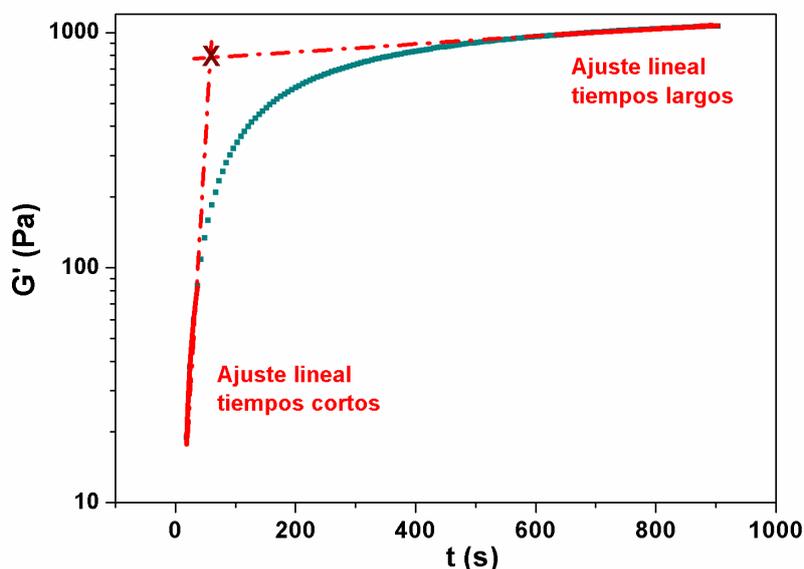


Figura 28. Módulo de almacenamiento en función del tiempo para un hidrogel de gelatina-TA3% con representación del cálculo del tiempo de gelificación. Se muestra el ajuste lineal correspondiente a los tiempos iniciales y finales de la dinámica de gelificación en color rojo, así como el tiempo de gelificación (punto de corte entre ambas rectas) en color granate.

Tabla 8. Parámetros correspondientes a las rectas de ajuste lineal de la Figura 28.

Ajuste lineal a tiempos cortos	Ecuación	$Y = 3.6X - 47.6$
	Bondad del ajuste	$R^2 = 0.99$
Ajuste lineal a tiempos largos	Ecuación	$Y = 0.34X + 766.7$
	Bondad del ajuste	$R^2 = 0.99$
Punto de corte (tiempo de gelificación)		247.07 (s)

Además del ensayo de gelificación, se realizaron barridos de amplitud y barridos de frecuencia.

En el caso del barrido de amplitud se obtuvo la gráfica que se muestra en la Figura 29, en la que se representa el módulo complejo (G^*) del material en función del *strain* aplicado en el ensayo. Dicho módulo es el módulo del vector obtenido como suma de las contribuciones de los módulos de almacenamiento (G'), que está asociado con la energía almacenada en el material, y de pérdidas (G''), asociado con la energía disipada por el material.

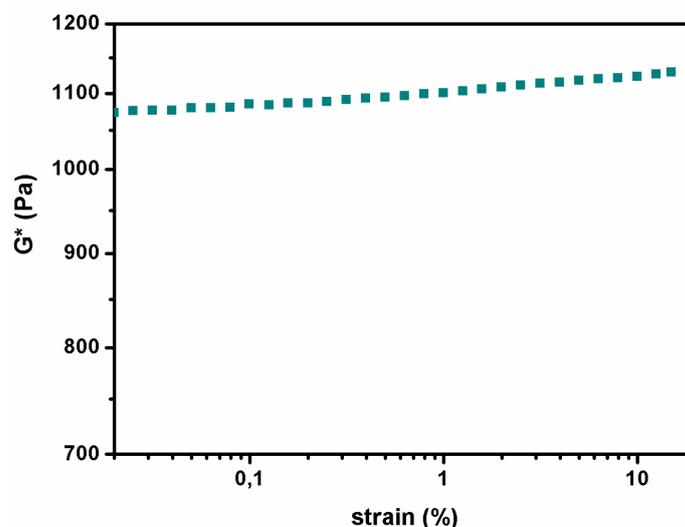


Figura 29. Evolución del módulo complejo en función del *strain* aplicado a la muestra para un hidrogel de gelatina-TA3%.

Por último, en el caso de los barridos de frecuencia, se obtuvieron datos del módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdidas (G'') y la tangente de δ ($\tan \delta$), donde δ representa el desfase entre esfuerzo y deformación, por lo que es un parámetro informativo de la relación entre la energía disipada y la almacenada por el material y de la viscosidad del mismo. Las medidas, representadas en la Figura 30, se realizaron de un intervalo de frecuencia de 0.1 a 10 Hz.

Se puede apreciar como en los tres casos se produce un aumento de la variable dependiente al aumentar la frecuencia, al menos para valores de frecuencia superiores a 2 Hz.

Para un valor dado de frecuencia de 1 Hz, los valores de G' , G'' y $\tan \delta$ se muestran en la Tabla 9. En ella se puede apreciar que la contribución al módulo complejo G^* del módulo de almacenamiento de cizalla es mucho mayor que la del módulo de pérdidas, dado que $G' \gg G''$ lo cual indica que el material presenta un comportamiento elástico, coincidiendo con los resultados obtenidos por Poveda-Reyes *et al.* (2015).

Tabla 9. Módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdidas (G'') y tangente de δ ($\tan \delta$) obtenidos para una frecuencia de 1Hz, aplicando un 1% de *strain* y a una temperatura de 37° para la gelatina-TA3%.

Muestra	G' (Pa)	G'' (Pa)	$\tan(\delta)$
Gelatina-TA3%	1132.92	0.887	$7.74 \cdot 10^{-4}$

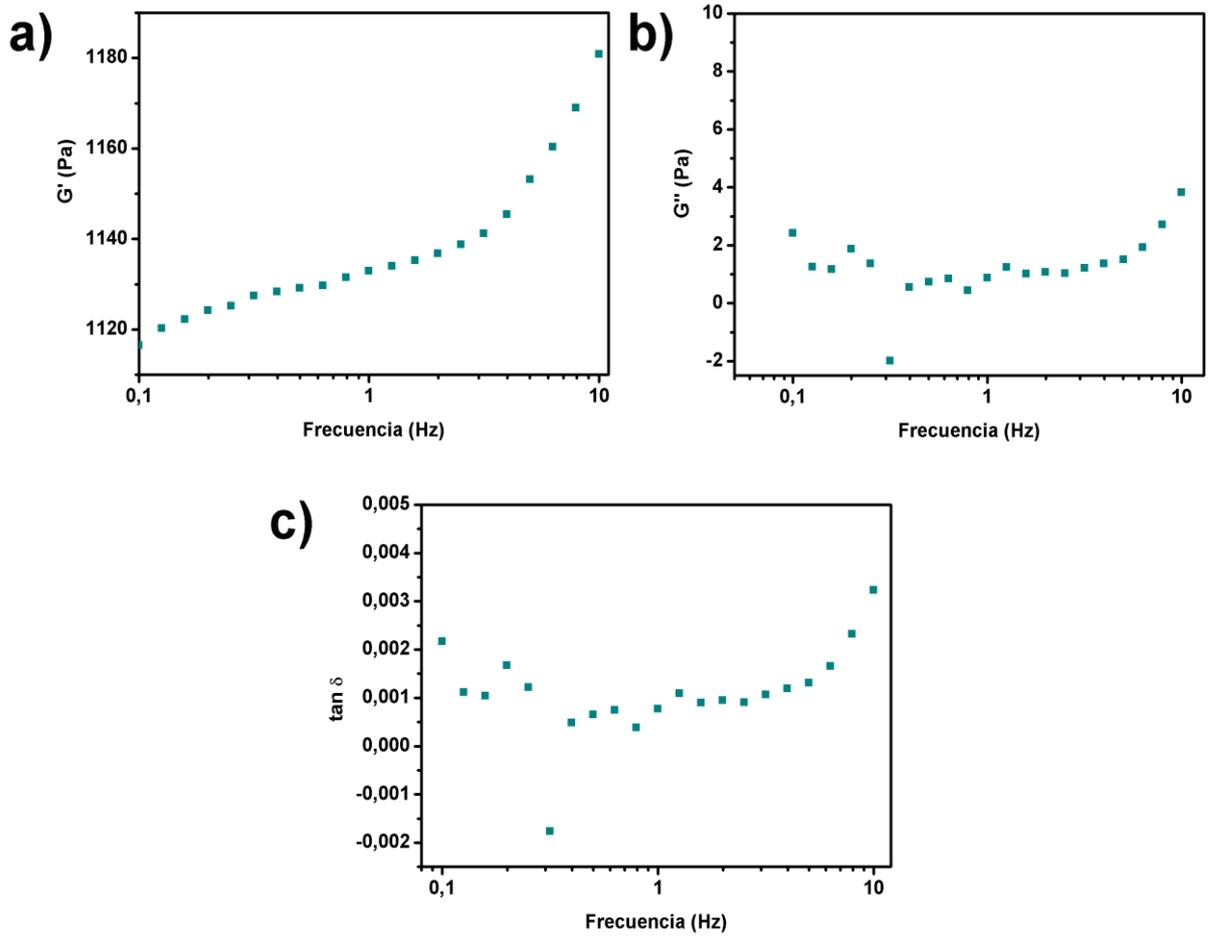


Figura 30. Evolución del módulo de almacenamiento (a), del módulo de pérdidas (b) y la tangente de δ (c) en función de la frecuencia, para hidrogeles de gelatina-TA3%.

7.4. Resultados del análisis estadístico del ensayo de MTS.

Se muestra a continuación la Tabla 10, que recoge los resultados del análisis estadístico realizado con los datos de absorbancia obtenidos en el ensayo de MTS, al que se hace referencia en el apartado 4.2.2.

Tabla 10. Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples realizado mediante el software GraphPad Prism 7. En ella se muestran si existen o no diferencias significativas para cada una de las condiciones y tiempos ensayados. El término Neat particles se refiere a la matriz con esferas control de PLLA, mientras que el término Magnetic Particles hace referencia a la matriz con esferas con MNPs de ferrita.

Number of families	1		
Number of comparisons per family	15		
Alpha	0,05		
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?
Magnetic particles:1 day vs. Magnetic particles:3 days	-0,2564	-0,382 to -0,1308	Yes
Magnetic particles:1 day vs. Magnetic particles:7 days	-1,12	-1,256 to -0,9845	Yes
Magnetic particles:1 day vs. Neat particles:1 day	0,008	-0,1176 to 0,1336	No
Magnetic particles:1 day vs. Neat particles:3 days	-0,2004	-0,326 to -0,07478	Yes
Magnetic particles:1 day vs. Neat particles:7 days	-1,121	-1,246 to -0,9949	Yes
Magnetic particles:3 days vs. Magnetic particles:7 days	-0,8638	-0,9994 to -0,7282	Yes
Magnetic particles:3 days vs. Neat particles:1 day	0,2644	0,1388 to 0,39	Yes
Magnetic particles:3 days vs. Neat particles:3 days	0,056	-0,06959 to 0,1816	No
Magnetic particles:3 days vs. Neat particles:7 days	-0,8641	-0,9897 to -0,7385	Yes
Magnetic particles:7 days vs. Neat particles:1 day	1,128	0,9925 to 1,264	Yes
Magnetic particles:7 days vs. Neat particles:3 days	0,9198	0,7842 to 1,055	Yes
Magnetic particles:7 days vs. Neat particles:7 days	-0,00033	-0,136 to 0,1353	No
Neat particles:1 day vs. Neat particles:3 days	-0,2084	-0,334 to -0,08278	Yes
Neat particles:1 day vs. Neat particles:7 days	-1,129	-1,254 to -1,003	Yes
Neat particles:3 days vs. Neat particles:7 days	-0,9201	-1,046 to -0,7945	Yes