INTERNATIONAL DOCTORAL
SCHOOL OF THE USC

Brenda
Velasco Rodríguez

PhD Thesis

DESARROLLO DE HIDROGELES POLIMÉRICOS Y SU APLICACIÓN EN MEDICINA REGENERATIVA

Santiago de Compostela, 2021

Doctoral Programme in Materials Science

TESIS DE DOCTORADO

DESARROLLO DE HIDROGELES POLIMÉRICOS Y SU APLICACIÓN EN MEDICINA REGENERATIVA

Brenda Velasco Rodríguez.

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE MATERIALES

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2021

DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

D./Dna. **Brenda Velasco Rodríguez**

Título da tese: **Desarrollo de hidrogeles poliméricos y su aplicación en medicina regenerativa**

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
4) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide a versión impresa coa presentada en formato electrónico

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En **Santiago de Compostela**, **30 de Xuño de 2021**.

Sinatura electrónica

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

Desarrollo de hidrogeles poliméricos y su aplicación en medicina regenerativa

D. Pablo Taboada Antelo

INFORMA/N:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dna. Brenda Velasco Rodríguez , baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

De acordo co indicado no Regulamento de Estudos de Doutoramento, declara tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de Monográfica con reproducción de publicaciones, nos que a participación do/a doutorando/a foi decisiva para a súa elaboración e as publicacións se axustan ao Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela., 30 de xuño de 2021

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

Desarrollo de hidrogeles poliméricos y su aplicación en medicina regenerativa

D. J. F. Armando Soltero Martínez

INFORMA/N:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dna. Brenda Velasco Rodríguez , baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

De acordo co indicado no Regulamento de Estudos de Doutoramento, declara tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de Monográfica con reproducción de publicaciones, nos que a participación do/a doutorando/a foi decisiva para a súa elaboración e as publicacións se axustan ao Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela., 5 de xullo de 2021

Índice

ÍNDICE ..... **IV**

LISTA DE PUBLICACIONES ..... **VIII**

LISTA DE ABREVIATURAS ..... **IX**

LISTA DE FIGURAS ..... **XII**

LISTA DE TABLAS ..... **XXII**

AGRADECIMIENTOS ..... **XXIII**

RESUMEN ..... **XXV**

RESUMO ..... **XXX**

1 INTRODUCCIÓN **1**

1.1 HIDROGELES 3

1.1.1 Clasificación de los hidrogeles *5*

1.1.1.1 Según la temperatura (hidrogeles termosensibles) 5

1.1.1.1.1 Hidrogeles termosensibles positivos 6

1.1.1.1.2 Hidrogeles termosensibles negativos 6

1.1.1.2 Según el entrecruzamiento 6

1.1.1.1.3 Entrecruzamiento físico 7

1.1.1.1.4 Entrecruzamiento químico 9

1.1.1.3 Según el origen 12

1.1.1.1.5 Hidrogeles sintéticos 12

1.1.1.1.6 Hidrogeles naturales 14

1.1.1.1.7 Hidrogeles híbridos 20

1.2 INGENIERÍA DE TEJIDOS: ANDAMIOS SOMETIDOS A ESTUDIO 24

1.3 INGENIERÍA DE TEJIDOS: CAPACIDAD DE ADHESIÓN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LOS ANDAMIOS SOMETIDOS A ESTUDIO 28

1.3.1 Nps poliméricas de ácido poli(láctico-co-glicólico), PLGA *31*

1.4 INGENIERÍA DE TEJIDOS: MICRO Y NANOESTRUCTURACIÓN DE LOS ANDAMIOS SOMETIDOS A ESTUDIO EN PRESENCIA DE NPS MAGNÉTICAS (MNPS) 33

1.4.1 Nanopartículas superparamagnéticas (MNPs) *38*

1.5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 43

1.6 REFERENCIAS 45

2 METODOLOGÍA **65**

2.1 MATERIALES 65

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2 PROCESOS SINTÉTICOS 66
2.2.1 Preparación de hidrogeles 66
2.2.1.1 Hidrogeles basados en quitosano 66
2.2.2 Metacrilación de la gelatina y el ácido hialurónico 67
2.2.2.1 Hidrogeles basados en GelMA y HAMA 68
2.2.3 Síntesis de partículas de PLGA 69
2.2.4 Síntesis de las MNPs 70
2.2.5 Preparación de partículas de PLGA con dexametasona o con respuesta magnética 71
2.2.6 Preparación de microfibras de PCL con respuesta magnética 72
2.2.7 Preparación de hidrogeles de gelatina cargados con microfibras/partículas híbridas y aplicación de campos magnéticos externos 73
2.2.8 Generación de campos magnéticos 74
2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS Y LAS PARTÍCULAS ORGÁNICAS E INORGÁNICAS 75
2.3.1 Fracción de Gel 75
2.3.2 Densidad aparente 76
2.3.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier 76
2.3.4 Análisis térmico 76
2.3.5 Medidas de reología oscilatoria 77
2.3.6 Pruebas de compresión mecánica 78
2.3.7 Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo 78
2.3.8 Estudio de la porosidad de los hidrogeles 78
2.3.8.1 Porosimetría por el método del desplazamiento de líquido 78
2.3.8.2 Porosimetría de inmersión de mercurio 79
2.3.9 Microtomografía computacional 79
2.3.10 Hinchamiento 79
2.3.11 Degradación in vitro de los hidrogeles 80
2.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS ORGÁNICAS E INORGÁNICAS 81
2.4.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) 81
2.4.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM) 81
2.4.3 Dispersión dinámica de luz (DLS) 81
2.4.3.1 Microscopía óptica y confocal 82
2.4.4 Distribuciones estadísticas de tamaño 82
2.4.5 Difracción de rayos X 82
2.4.6 Análisis termogravimétrico (TGA) 83
2.4.7 Espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) 83
2.4.8 Caracterización magnética 83
2.4.9 Estudios de la liberación de dexametasona 84
2.5 ESTUDIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* CON HIDROGELES 86
2.5.1 Células de cultivo 86

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.5.2 Esterilización de los andamios basados en CS ... 87
2.5.3 Esterilización de los andamios híbridos de GelMA-HAMA ... 87
2.5.4 Ensayos de viabilidad celular ... 87
2.5.5 Imagen celular de andamios basados en CS ... 89
2.5.6 Diferenciación de células MSC a osteoblastos ... 89
2.6 REFERENCIAS ... 91

3 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES HÍBRIDOS BASADOS EN QUITOSANO PARA REGENERACIÓN TISULAR ... 93

3.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y TERMODINÁMICA DE LOS ANDAMIOS ... 94
3.2 EFECTO DEL PESO MOLECULAR Y LA CONCENTRACIÓN DEL QUITOSANO ... 95
3.2.1 Caracterización térmica ... 97
3.2.2 Caracterización reológica y morfológica ... 100
3.2.3 Grado de hinchamiento y degradación ... 106
3.3 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y EL PESO MOLECULAR DEL HA ... 108
3.4 EFECTO DE LA INCORPORACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE COLÁGENO ... 110
3.5 EVALUACIÓN BIOLÓGICA ... 112
3.6 CONCLUSIONES ... 115
3.7 REFERENCIAS ... 116

4 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES FOTOPOLIMERIZABLES HÍBRIDOS PARA REGENERACIÓN TISULAR ... 121

4.1 GRADO DE METACRILACIÓN DE GELMA-HAMA ... 122
4.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA ... 123
4.3 CARACTERIZACIÓN TÉRMICA ... 128
4.4 PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LOS ANDAMIOS ... 131
4.5 ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA DE LOS ANDAMIOS ... 138
4.6 GRADO DE HINCHAMIENTO ... 140
4.7 BIODEGRADACIÓN *IN VITRO* ... 143
4.8 CONCLUSIONES ... 144
4.9 REFERENCIAS ... 145

5 EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE HIDROGELES FOTOPOLIMERIZABLES ... 149

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA-DEX ... 151
5.2 NPS DE PLGA-DEX ENCAPSULADAS EN HIDROGELES POLIMÉRICOS ... 155
5.3 CITOCOMPATIBILIDAD Y ACTIVIDAD OSTEOGÉNICA ... 160
5.4 CONCLUSIONES ... 164
5.5 REFERENCIAS ... 165

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6 INDUCCIÓN DE ANISOTROPÍA EN LA ESTRUCTURA DE HIDROGELES PARA REGENERACIÓN TISULAR 169

6.1 INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES SINTÉTICAS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MNPS 170

6.2 DISEÑO DE MICROFIBRAS ELECTROHILADAS CON RESPUESTA MAGNÉTICA 176

6.3 DISEÑO DE PARTÍCULAS DE PLGA MODIFICADAS CON MNPS 185

6.4 GENERACIÓN DE HIDROGELES ANISÓTROPOS A TRAVÉS DE LA INCORPORACIÓN Y ALINEAMIENTO REMOTO DE ESTRUCTURAS HÍBRIDAS CON RESPUESTA MAGNÉTICA 191

6.4.1 Alineamiento remoto de microfibras electrohiladas de PCL-MNPs 191

6.4.1.1 Efecto de la densidad de microfibras magnéticas en los hidrogeles 198

6.4.2 Alineamiento remoto de partículas de PLGA con respuesta magnética 202

6.4.2.1 Efecto de la concentración de nanopartículas híbridas magnéticas en los hidrogeles 204

6.4.2.2 Fabricación de hidrogeles de doble capa con anisotropía ortogonal 207

6.5 CONCLUSIONES 209

6.6 REFERENCIAS 211

7 CONCLUSIONES 213

ANEXOS 216

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lista de publicaciones

Esta Tesis Doctoral ha dado lugar a la siguiente publicación:

1. **Velasco-Rodriguez, B**., Diaz-vidal, T., Rosales-rivera, L. C., García-gonzález, C. A., Alvarez-lorenzo, C., Al-modlej, A., Domínguez-arca, V., Prieto, G., Barbosa, S., Soltero Martínez, J. F.A., Taboada, P. Hybrid Methacrylated Gelatin and Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds. Preparation and Systematic Characterization for Prospective Tissue Engineering Applications. Int. J. Mol. Sci. 22, 6758 (2021).

Publicación en la cual la doctoranda ha realizado la síntesis y caracterización físico-química de los hidrogeles puros e híbridos de GelMA-HAMA, el análisis de datos experimentales, y ha colaborado en la discusión de los resultados.

Congresos:

1. **B. Velasco Rodríguez**, L. C. Rosales Rivera, J. F. A. Soltero Martinez, L. G. Arellano, A. V. Marcos, M. Navarro, J. Fernández-Vega, B. H. Leal, A. Almedlej, S. Barbosa, P. Taboada. Development of polymeric gels for their application in regenerative medicine. 8th Iberian Meeting on Colloids and Interfaces (RICI8) (Julio 2019, Aveiro,Portugal).

2. **Brenda Velasco Rodríguez**, Luis Carlos Rosales Rivera, J. Félix Armando Soltero Martinez, Valeria Figueroa Velarde, Alberto Pardo Montero, Silvia Barbosa Fernández, Pablo Taboada Antelo. Characterization of Hydrogels for Their Application in Tissue Regeneration. 2nd International Online-Conference on Nanomaterials (Noviembre 2020, Online).

3. **Brenda. Velasco Rodríguez,** Luis Carlos Rosales Rivera, J. Félix Armando Soltero Martinez, Vicente Domínguez-Arca, Silvia Barbosa, Pablo Taboada. **Hidrogeles de HAMA-Gelma para regeneración tisular.** VIII Encontro da Mocidade Investigadora (Mayo 2021, Santiago de Compostela, España).

4. **B. Velasco Rodríguez,** L. C. Rosales Rivera, J. F. A. Soltero Martinez, V. Domínguez-Arca, S. Barbosa, P. Taboada. Characterization of HAMA and GelMA hydrogels for tissue regeneration. 4th Spanish Conference on Biomedical Applications of Nanomaterials (Junio 2021, Online).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lista de abreviaturas

3D	Tres dimensiones
%γ	Deformación aplicada
$\%\gamma_c$	Deformación crítica
~	Aproximadamente
^{1}H RMN	Resonancia magnética nuclear con protón
2D	Dos dimensiones
AAm	Acrilamida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATR-FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier reflectante atenuada
Ba	Bario
BMP-2	Proteína morfogenética de hueso
Ca	Calcio
CD44	Clúster de diferenciación 44
CMC	Carboximetilcelulosa
Co	Cobalto
Coll	Colágeno
CS	Quitosano
D	Diámetro
D%	Porcentaje de degradación
D_2O	Óxido de deuterio
DCM	Diclorometano
DDBA	Didodecildimetilamonio
DEX	Dexametasona
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
E	Módulo de Young
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
Fe	Hiero
Fe_3O_4	Magnetita
FGFs	Fibroblastos
γ-Fe_2O_3	Maghemita
G´	Módulo elástico
GAG	Gliosaminoglicano
Gel	Gelatina
GelMA	Gelatina metacrilada
GM	Grado de metacrilación
H	Grosor del hidrogel

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
HA	Ácido hialurónico
H_C	Campos coercitivos
HCl	Ácido clorhídrico
HCS	Quitosano alto peso molecular
HEMA	Metacrilato de 2-hidroxietilo
HHA	Ácido hialurónico de alto peso molecular
HPLC	Cromatografía de líquidos
HPMA	Metacrilato de 2-hidroxipropilo
ICAM-1	Molécula-1
IGF-1	Factores de crecimiento de insulina
iPS	Células madre pluripotentes inducidas
Irgacure 2959	2-hidroxi-1-[4-(hidroxiethoxi)phenil]-2-methil-1-propanona
IT	Ingeniería de tejidos
k	Constante
Ka	Constante anisótropa magnética
kDa	Kilodalton
LCS	Quitosano bajo peso molecular
LCST	Temperatura crítica baja de disolución
LHA	Ácido hialurónico de bajo peso molecular
MA	Anhídrido metacrílico
MCS	Quitosano medio peso molecular
MEC	Matriz extracelular
min.	Minutos
MIP	Porosimetría de intrusión de mercurio
Mn	Manganeso
MNPs	Nanopartículas magnéticas
M_R	Magnetización remanente
M_S	Magnetización de saturación
MSC	Células madres mesenquimales
mT	Militeslas
n	Difusión por difusión del disolvente
NaOH	Hidróxido de Sodio
nm	Nanómetros
Nps	Nanopartículas
NSCs	Células madre neuronales
^oC	Grados Celsius
OCT	Temperatura de corte óptima
P	Porosidad
PBS	Disolución salina tampón fosfato
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PCPP	Poli- [dicarboxilato fenoxi) fosfaceno
PDI	Índice de polidispersidad

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PDMAEMA	Poli(metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo)
PECs	Polielectrólitos
PEG	Poli (etilenglicol)
PEO	Poli (óxido de etileno)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PHEMA	Poli (2-hydroxietil metacrilato)
PI	Fotoiniciador
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
$PMEO_2MA$	Poli(dietilen glicol metil éter metacrilato)
PNIPAM	Poli(N-isopropilacrilamida)
poli (AA-co-AAm-co-BMA)	Poli (metacrilato de acrilamida-co-butilo)
poli(AAm-co-BMA)	Poli (acrilamida-co-butil metacrilato-co-ácido acrílico)
PPO	Poli (óxido de propileno)
PVA	Poli (vinil alcohol)
PVCL	Poli(N-vinilcaprolactona)
PVP	Poli(vinil pirrolidona)
ρ	Densidad aparente
RGD	Secuencias de arginina-glicina-aspartato
RHAMM	Motilidad mediada por HA
rpm	Revoluciones por minuto
r_{SP}	Radio superparamagnético
s	Segundos
SBMA	Sulfobetaína metacrilato
S_{Deq}	Grado de hinchamiento en el equilibrio
S_{Dt}	Grado de hinchamiento en el tiempo
SPIONs	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro
t	Tiempo
TGA	Análisis termogravimétrico
UCST	Temperatura crítica superior de disolución
VEGFs	Endoteliales vasculares
Vp	Volumen total de poro
vs	Versus
w	Peso del hidrogel
ω	Frecuencia
W_A	Peso del hidrogel antes de la degradación enzimática
W_H	Peso de hidrogel húmedo
W_S	Peso de hidrogel seco
Wt	Peso del hidrogel después de la degradación enzimática
Zn	Zinc
α-Fe_2O_3	Hematita
μm	Micrómetros

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lista de Figuras

Figura 1.1.- Ejemplo de aplicaciones de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. Imagen modificada reproducida de la referencia 8 Copyright (2020) con permiso de MPDI..... 1

Figura 1.2.- Variables básicas de un andamio para ingeniería de tejidos. Imagen reproducida de la referencia 15 Copyright (2021) con permiso de MPDI. 2

Figura 1.3.- Trabajos publicados por año usando hidrogeles como andamios para ingeniería de tejidos. Referencia 22 (www.scopus.com: "hydrogels for tissue ingeneering"). 3

Figura 1.4.-Principales clasificaciones de los hidrogeles. 5

Figura 1.5.- Diagrama de fases para polímeros termosensibles. 6

Figura 1.6.- Tipos de entrecruzamientos en la síntesis de hidrogeles: a) entrecruzamiento por condensación térmica, b) autoagregación moléculas, c) entrecruzamiento iónico, d) entrecruzamiento electrostático y e) entrecruzamiento químico. Imagen reproducida de la referencia 36 Copyright (2020) con permiso de MPDI. 9

Figura 1.7.- Etapas de fotopolimerización. 11

Figura 1.8-Estructura de la gelatina..... 16

Figura 1.9.-Estructura del ácido hialurónico 17

Figura 1.10.- Estructura del quitosano. Imagen reproducida de la referencia 105 Copyright (2018) con permiso de Elsevier. 20

Figura 1.11.- Representación esquemática de los mecanismos de liberación de agentes bioactivos encapsulados en partículas poliméricas embebidas en matrices de hidrogel: a) liberación del fármaco dentro de la matriz de hidrogel y posterior difusión y b) liberación de las partículas cargadas con el fármaco a través de la matriz de hidrogel y posterior liberación por degradación de las partículas. Imagen reproducida de la referencia de 196 Copyright (2016) con permiso de American Chemical Society. 30

Figura 1.12.- Estructura química de los dímeros, polímeros y reacción de copolimerización del PLGA. Imagen reproducida con permiso de la referencia 197 Copyright (2015) con permiso de Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology. 32

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 1.13.- Esquema mostrando los principales tipos de materiales utilizados para la fabricación de andamios magnéticos con arquitectura anisótropa. Imagen reproducida de la referencia 217 Copyright (2021) con permiso de American Chemical Society. 34
Figura 1.14.- Imágenes de microscopía de hidrogeles anisótropos preparados mediante la incorporación de materiales sensibles a estímulos magnéticos y la consiguiente aplicación de campos magnéticos externos. Las imágenes superiores son de las muestras en condiciones estáticas mientras que las inferiores son de las muestras bajo el efecto de un campo magnético. a) Imágenes de TEM crioseccionadas de hidrogeles de poli(oligoetilenglicol) metacrilado con nanocristales de celulosa diamagnéticos incorporados en condiciones estáticas y expuestos a un campo magnético de 1.2 T durante el proceso de gelificación (Escala = 1 mm). Reproducido de referencia 224 Copyright (2017) con permiso de la American Chemical Society; b) Imágenes de "time-lapse" de filamnetos de MNPs de maghemita en disoluciones de gelatina metacrilada bajo la acción de un campo magnetostático. Inicialmente, las MNPs están dispersas al azar, y se ensamblan a lo largo de las líneas del campo magnético cuando este se aplica (Escala = 500 mm). Imagen adaptada de la referencia 229 Copyright (2018) con permiso de Wiley-VCH; c) Imágenes de microscopía óptica de microgeles de forma elongada de poli(óxido de etileno)-stat-poli(óxido de propileno) modificados con MNPs en condiciones estáticas y bajo un campo magnético de 100 mT (Escala = 50 mm). Imagen adaptada de la referencia 241 Copyright (2017) con permiso de la American Chemical Society; d) Imágenes de fibras magnéticas de PLGA obtenidas por electrohilado en el interior de hidrogeles de fibrina en condiciones estáticas y en presencia de un campo magnético aplicado de 100 mT. (Escala = 100 mm). Imagen reproducida de la referencia 237 Copyright (2017) con permiso de Wiley-VCH. 35
Figura 1.15.- Esquema de la orientación del momento magnético de diferentes materiales: a) paramagnético, b) ferromagnético y c) ferrimagnético..... 39
Figura 1.16.- Ciclos de histéresis para materiales ferro/ferimagnéticos, superparamagnéticos, paramagnéticos y diamagnéticos. Imagen reproducida con permiso de la referencia 217 Copyright (2021) con permiso de American Chemical Society. 40
Figura 1.17.- Variación del campo coercitivo de las nanopartículas magnéticas en función de su tamaño. Imagen reproducida de la referencia 217 Copyright (2021) con permiso de American Chemical Society. 42
Figura 2.1.- Esquema de metacrilación de la gelatina. 84

USC DE COMPOSTELA

Figura 2.2.- Esquema de la metacrilación de HA. 85
Figura 2.3.- Esquema de entrecruzamiento de hidrogeles de GelMA-HAMA. 86
Figura 2.4.- Imagen del montaje experimental empleado para la síntesis de MNPs. Imagen reproducida de la referencia 263 Tesis doctoral de Alberto Pardo Montero (2018). 87
Figura 2.5.- Fotografía del equipo de electrohilado usado para la producción de microfibras poliméricas con respuesta magnética. 90
Figura 2.6.- Representación gráfica de la densidad de flujo magnético entre los imanes paralelos en función inter-distancia entre los mismos. 92
Figura 2.7.- Curva de calibración para el calculo de la concentración de la DEX. 101
Figura 3.1.- Espectros FTIR de hidrogeles puros 3%HCS (––), 3% LCS (––), 1% HHA (––), 3% y de hidrogeles híbridos 3%HCS-1%HHA(––), 4%HCS-1%HHA(––), 3%HCS-2%HHA(––), 3%HCS-2%HHA-1%Coll (––) y 3%HCS-2%HHA-1%Coll (––). 113
Figura 3.2.- a) Pérdida de peso y b) primera derivada de la pérdida de peso para los hidrogeles puros 3% HCS (—), 3% MCS (—), 3% LCS (—) y 1% HHA(—); c) Datos de TGA para 3% HCS-1% HHA (—), 4% HCS-1% HHA (—), 3%HCS-1%MHA (—), 3% HCS-1% LHA (—); d) Datos de TGA de hidrogeles híbridos con distintas composiciones; e) primera derivada de las curvas de TGA para diferentes hidrogeles híbridos; f) ejemplos de curvas de DSC correspondientes a diferentes andamios de hidrogeles híbridos 3% HCS-2% HHA (—), 3% HCS-2% LHA (—), 3% HCS-2% HA-1% Coll (—), and 3% HCS-2% HHA-2% Coll (—). 115
Figura 3.3.- Módulo de almacenamiento (*G´*) en función de a) la deformacion y b) la frecuencia para los andamios híbridos 3% HCS (•), 3% HCS-1% HHA (♦), 4% HCS-1% HHA (▼), 3% MCS-1% HHA (■) y 3% LCS-1% HHA (▲). Módulo de pérdida (*G´´*) de 3% HCS-1% HHA (⁕); Módulo de almacenamiento (*G´*) en función de c) la deformación y d) la frecuencia para los andamios híbridos 3% HCS-2% HHA (■), 3% HCS-2% LHA (♦), 3% MCS-2% HHA-1% Coll (▲) and 3% HCS-2% HHA-2% Coll (▼); e) Pruebas de compresión para andamios basados en CH para diferentes composiciones. Las concentraciones y composiciones están indicadas en la imagen. 117
Fi**gura 3.4.-** Imagen SEM de los andamos híbridos a) 3%HCS, b) 1% HHA, c) 3% HCS-1% HHA, d) 3% MCS-1% HHA, e) 3% LCS-1% HHA, f) 4% HCS-1% HHA, g) 3%

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HCS-2% HHA, h) 3% HCS-2% LHA, i) 3% HCS-2% HHA-1% Coll y k) 3% HCS-2% HHA-1% Coll. j) es la magnificación de un área en el andamio i). 122

Figura 3.5.- Imágenes reconstruidas 3D de microtomografía computacional y distribución de tamaño de poro para a,b) 3%HCS-1%HHA; c,d) 4%HCS-1%HHA y e,f) 3%HCS-2%HHA-2%Coll, respectivamente. 123

Figura 3.6.- a) Grado de hinchamiento en el equilibrio para diferentes hidrogeles basados en CS; b) Degradación de los hidrogeles híbridos después de 28 días en presencia y ausencia de lisozima. 125

Figura 3.7.- Citotoxicidad de diferetnes andamios híbridos basados en CS después de 24 y 72 horas para a) fibroblastos de ratón BALB-3T3 y b) keratinicitos humanos HaCAT. 131

Figura 3.8.- Imágenes de microscopía óptica de proliferación de fibroblastos de ratón BALB 3T3 después de a) 3 y b) 7 días de incubación. Imágenes de epiflorescencia de experimentos célula viva/muerta para ilustrar la proliferación de keratinocitos humanos HaCAT después de c) 3 y d) 7 días. e) y f) Imágenes de SEM que muestran la infiltración de células HaCAT dentro de un andamio híbrido 3%HCS-1%HHA. 132

Figura 4.1.- Espectros RMN de a) Gel (—), GelMA (—), y b) HA (—), HAMA (—). En a) y b) los rectángulos punteados indican la presencia del pico metacrilo después de la modificación química. En a) el rectángulo gris a ca. 7.1-7.5 denota los picos de fenilalanina y a 3.0-3.3 ppm corresponde a los grupos de lisina. En b), el rectángulo gris indica los grupos metilo de HA a ac. 2.0 ppm y la apariencia de protones metilo de metacrilato a ca. 1.9 ppm, respectivamente. 137

Figura 4.2.- a) Espectros FTIR de hidrogeles de HAMA puros, GelMA puros e híbridos de GelMA-HAMA a diferentes concentraciones. Composición topográfica superficial obtenida por imagen Raman confocal 3D de hidrogeles híbridos b) 2% GelMA(verde) -1%HAMA (rojo) y c) 10% GelMA(rojo)-1% HAMA (verde). HAMA se detectó usando bandas a ~1380 y 1410 cm^{-1} mientras que para GelMA se utilizó a ~1455 cm^{-1}. d) Imágenes Raman en profundidad de hidrogeles 2% GelMA-1%HAMA. El color brillante azul-verde indica la mezcla perfecta de HAMA y GelMA en el hidrogel. 141

Figura 4.3.- Medidas de TGA para a) hidrogeles puros de HA y HAMA b) hidrogeles puros de Gel y GelMA y c) hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA a diferentes concentraciones como ejemplo; d) primera derivada de los datos de TGA para distintos hidrogeles puros e híbridos; e) ejemplos de curvas de DSC correspondientes a Gel puro, HA puro, GelMA puro, HAMA puro y algunos hidrogeles híbridos GelMA-HAMA; f)

USC DE COMPOSTELA

representación de los datos de TGA y DSC de hidrogeles híbridos 2% GelMA-1% HAMA y 10% GelMA-5% HAMA para su comparación. 145
Figura 4.4.- Módulo elástico (G') en función del % de deformación (%c) para hidrogeles puros de GelMA y HAMA e hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA. 146
Figura 4.5.- Módulo elástico (G') en función del tiempo de reticulacion para diferentes concentraciones de: a) HAMA; b) GelMA; c) 1%HAMA-X% GelMA y d) 5% HAMA-X% GelMA. 148
Figura 4.6.- Módulo elástico en función de la frecuencia a) concentración de HAMA; b) concentración de GelMA; c) 1%HAMA-X% GelMA y d) 5% HAMA-X% GelMA. Experimentos realizados a una deformación dentro de la LVR a 37ºC. 150
Figura 4.7.- Módulos de almacenamiento y pérdida en función de las concentraciones de HAMA y GelMA. a) HAMA y GelMA puros y b-c) hidrogeles híbridos a 37ºC a una frecuencia de 6.28 rad/s. Las líneas discontinuas representan los limites de los valores de G' para el uso del hidrogel como andamios para diferentes tipos de tejidos. 151
Figura 4.8.- Medidas de compresión de hidrogeles puros a) GelMA, b) HAMA y c) hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA de diferentes composiciones..... 152
Figura 4.9.- Micrografías de SEM de a) 1%, b) 3%, c) y 5% HAMA; d) 2% y e) 10% GelMA; f) 1% HAMA-2% GelMA, g) 5% HAMA-2% GelMA, h) 1% HAMA-10% GelMA, y i) 5% HAMA-10% GelMA. 154
Figura 4.10.- Datos de cinética de hinchamiento para a) hidrogeles puros HAMA de (●) 1, (■) 3, y (▲) 5%; b) hidrogeles puros de GelMA de (●) 2, (■) 6, y (▲) 10%; hidrogeles híbridos HAMA-GelMA de c) (●) 1-2, (■) 3-2, y (▲) 5-2%; y d) (●) 5-2, (■) 5-6, y (▲) 5-10%, respectivamente. e) Degradación de andamios por ataque enzimático a las 24h de incubación. 157
Figura 5.1.- a) Distribuciones de tamaño en intensidad de NPs de PLGA vacías (—) y de PLGA-DEX (—); imágenes de SEM de b) Nps de PLGA vacías y de c) Nps de PLGA-DEX; d) perfiles de liberación de la DEX desde las Nps poliméricas con pesos moleculares de PLGA 38-54 kDa (■) y 24-38 kDa(●) at pH 7.4 and 37 ºC. 164
Figura 5.2.- G' en función de la frecuencia y temperatura para hidrogeles sin y con Nps de PLGA. 168
Figura 5.3.- a) Espectros de FTIR de los andamios de 10% GelMA-1% HAMA y 10% GelMA-5% HAMA sin (—, —) y con (—, —) NPs de PLGA en su interior; b) Curvas de TGA de NPs de PLGA (—) y del hidrogel con composición 10% GelMA-5% HAMA

sin (—) y con NPs de PLGA incorporadas (—); c) perfiles de liberación del fármaco en capsulado en NPs de PLGA en el interior de hidrogeles de 10% GelMA-1% HAMA (●) y 10% GelMA-5% HAMA (■)..... 169

Figura 5.4.- Viabilidad celular de MSCs incubadas a) en presencia de lixiviados provenientes de la degradación de los hidrogeles y b) depositadas sobre superficie de los andamios; c) actividad de la enzima ALP producida por las MSCs incubadas con los andamios. Diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos mediante ANOVA y test de múltiple comparación; $p < 0.05$; n=4). 174

Figura 5.5.- Teñido con Rojo de Alizarina S de las MSCs incubadas durante 28 días a) en ausencia y b) presencia de medio de diferenciación osteogénico; c) después de la administración de NPs de PLGA-DEX400; en scaffolds de 10%GelMA-5% HAMA que incorporan d) NPs de PLGA-DEX100 y e) NPs de PLGA-DEX400..... 176

Figura 6.1.- a-b) Imágenes TEM con diferentes magnificaciones, y c) histograma de la distribución estadística de tamaños de las MNPs de óxido de hierro esféricas resultantes de una síntesis típica. 180

Figura 6.2.- a) Difractograma de rayos X de las MNPs de óxido de hierro esféricas resultantes de una síntesis típica. b) Posiciones típicas de los picos en los espectros de XRD de diferentes formas de óxido de hierro: maghemita, magnetita y hematita. 181

Figura 6.3.- Imágenes TEM e histogramas de las distribuciones estadísticas de tamaños de a-b) MNPs de óxido de hierro sintetizadas usando una concentración de $Fe(acac)_3$ de 300 mM y c-d) MNPs de óxido de hierro dopadas con zinc de composición $Zn_{0.3}Fe_{2.7}O_4$. 182

Figura 6.4.- Ciclos de histéresis magnética a 300 K de a) MNPs de óxido de hierro de ~9 nm, b) MNPs de óxido de hierro de ~13.2 nm y c) MNPs de composición $Zn_{0.3}Fe_{2.7}O_4$ de ~9 nm. 183

Figura 6.5.- Imágenes de una disolución de MNPs de composición Zn0.3Fe2.7O4 en presencia de un imán de neodimio. Las sucesivas imágenes se tomaron cada 3 s, demostrándose la alta potencia magnética de las partículas. 185

Figura 6.6.- Muestra obtenida mediante un proceso de electrohilado utilizando una disolución de PCL con un 5% (p/p) de MNPs bajo una diferencia de potencial entre punta y colector de 11 kV (condición previamente optimizada para obtener membranas fibrosas de PCL sin MNPs). El proceso de electrohilado fue discontinuo, formándose gotas de disolución precursora en el colector, y siendo necesario incrementar el voltaje a 13.1 kV para solucionar este problema. 186

Figura 6.7.- Fotografías de las membranas de PCL electrohiladas incorporando diferentes cantidades de MNPs. El color de las membranas es más oscuro cuando la concentración de partículas en las mismas es mayor. 187
Figura 6.8.- Imágenes de microscopía óptica obtenidas a diferentes magnificaciones de las membranas fibrosas de PCL con una concentración de MNPs de a-b) 0%, c-d) 1%, e-f) 5% y g-h) 10% (p/p). 188
Figura 6.9.- Imágenes de microscopía confocal de fibras de PCL - 5% (p/p) MNPs electrohiladas modificadas con a) fluoresceinamina (verde) y b) rodamina (rojo). Se observa una mejor incorporación de este último compuesto en la estructura interna de las microestructuras magnéticas. 189
Figura 6.10.- a) Ciclos de histéresis magnética a 300 K de las fibras de PCL electrohiladas con diferentes concentraciones de MNPs: 1% (curva negra), 5% (curva roja) y 10% (p/p) (curva azul). c) Comparativa de los ciclos de histéresis de las fibras magnéticas con el de las MNPs previamente a su incorporación en la estructura de las fibras poliméricas (curva verde). 190
Figura 6.11.- Distribuciones estadísticas de las longitudes de las fibras de PCL obtenidas bajo espesores de corte en el micrótomo-criostato de a) 50 µm y b) 20 µm. El alto grado de polidispersidad de las fibras cortadas a 20 µm se corrobora al observar la elevada anchura de la distribución estadística, lo que da lugar a una muy alta desviación estándar del valor de longitud promedio. 192
Figura 6.12.- Imágenes de microscopía óptica de las fibras de PCL tras los procesos de microcorte y redispersión aplicando espesores de corte en el micrótomo-criostato de a-b) 50 µm y c-d) 20 µm. 192
Figura 6.13.- Distribuciones estadísticas de las longitudes de las fibras magnéticas cortadas a 50 µm en el micrótomo con concentraciones de MNPs de a) 1%, b) 5% y c) 10% p/p. 193
Figura 6.14.- Imágenes de microscopía óptica a diferentes magnificaciones de las fibras magnéticas tras los procesos de microcorte a 50 µm y redispersión; a-b) fibras PCL-1% MNPs, c-d) fibras PCL-5% MNPs y e-f) fibras PCL-10% MNPs. 193
Figura 6.15.- Distribuciones estadísticas de los diámetros de las partículas de PLGA con cantidades relativas de MNPs incorporadas de a) 5%, b) 10%, c) 25 y d) 50% p/p. ... 195
Figura 6.16.- Imágenes de SEM a diferentes magnificaciones de las partículas de PLGA con cantidades relativas de MNPs incorporadas de a) 5%, b) 10%, c) 25 y d) 50% p/p. 195

USC DE COMPOSTELA

Figura 6.17.- Distribución estadística de los tamaños hidrodinámicos de las partículas híbridas de PLGA con un 10% (p/p) de MNPs, como ejemplo, determinada mediante medidas de DLS..... 196

Figura 6.18.- a) Curvas de TGA de MNPs (—), NPs de PLGA (—), NPs MNPs@PLGA (—) y NPs MNPs@PLGA introducidas en hidrogel de gelatina (—), con una carga inicial de MNPs del 50% (w/w). Imágenes de TEM de las partículas de PLGA con cantidades relativas iniciales de MNPs incorporadas de b) 5%, c) 10%, d) 25 y e) 50% (p/p). 198

Figura 6.19.- a) Ciclos de histéresis magnética a 300 K partículas de PLGA con diferentes cantidades relativas de MNPs incorporadas: 5% (curva negra), 10% (curva roja), 25% (curva azul) y 50% p/p (curva rosa). 200

Figura 6.20.- a) Imagen de microscopía óptica de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de un hidrogel de gelatina en ausencia de campo magnético aplicado; y b) distribución estadística de la orientación angular de las fibras. 202

Figura 6.21.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de hidrogeles de gelatina, y distribución estadística de la orientación angular de las fibras (0º: orientadas según la dirección del campo, vertical en las imágenes) bajo estímulos magnéticos aplicados de a-b) 208 ± 9 mT-5 min, c-d) 126 ± 6 mT-5 min, e-f) 66 ± 7 mT-5 min, y g-h) 66 ± 7 mT-1 min. 203

Figura 6.22.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de hidrogeles de gelatina, y distribución estadística de la orientación angular de las fibras (0º: orientadas según la dirección del campo, vertical en las imágenes) bajo estímulos magnéticos aplicados de a-b) 40 ± 4 mT-30 s, c-d) 24 ± 3 mT-2 min, e-f) 24 ± 3 mT-1 min y g-h) 24 ± 3 mT-30 s. 204

Figura 6.23.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de hidrogeles de gelatina, y distribución estadística de la orientación angular de las fibras (0º: orientadas según la dirección del campo, vertical en las imágenes) bajo estímulos magnéticos aplicados de a-b) 24 ± 3 mT-10 s y c-d) 24 ± 3 mT-5 s..... 205

Figura 6.24.- a-b) Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de hidrogeles de gelatina entrecruzados con transglutaminasa bajo la aplicación de un campo magnético externo de 24 ± 3 mT, y c) distribución estadística de la orientación angular de las fibras (0º: orientadas según la dirección del campo, vertical en las imágenes)..... 207

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 6.25.- Imágenes de microscopía óptica de las disoluciones de fibras magnéticas con concentración a) 0.04 mg·mL^{-1}, 0.30 mg·mL^{-1}, c) 0.80 mg·mL^{-1} y d) 1.50 mg·mL^{-1}. 208

Figura 6.26.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de hidrogeles de gelatina entrecruzados bajo la aplicación de un campo magnético externo de 24±3 mT con concentraciones de fibras de a) 0.02 mg·ml^{-1}, 0.15 mg·ml^{-1}, c) 0.40 mg·ml^{-1} y d) 0.75 mg·ml^{-1}. 209

Figura 6.27.- Imágenes de microscopía óptica de alta magnificación de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de hidrogeles de gelatina entrecruzados bajo la aplicación de un campo magnético externo de 24±3 mT con concentraciones de fibras de a) 0.02 mg·ml^{-1}, 0.15 mg·ml^{-1}, c) 0.40 mg·ml^{-1} y d) 0.75 mg·ml^{-1}. 209

Figura 6.28.- Representación gráfica de la inter-distancia entre las fibras magnéticas alineadas en los hidrogeles de gelatina en función de la concentración de aquellas 210

Figura 6.29.- Distribuciones estadísticas de la interdistancia entre las microfibras magnéticas alineadas en el seno de hidrogeles de gelatina con concentraciones de fibras de a) 0.02 mg·ml^{-1}, 0.15 mg·ml^{-1}, c) 0.40 mg·ml^{-1} y d) 0.75 mg·ml^{-1}. 210

Figura 6.30.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las partículas de PLGA con a) 5%, b) 10%, c) 25% y d) 50% p/p MNPs en el seno de hidrogeles de gelatina entrecruzados bajo la aplicación de un campo magnético externo de 126±6 mT. 212

Figura 6.31.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las partículas de PLGA-MNPs con concentración a) 0.25 mg·ml^{-1}, b) 0.50 mg·ml^{-1}, c) 1.00 mg·ml^{-1} y d) 2.00 mg·ml^{-1} en el seno de hidrogeles de gelatina entrecruzados bajo la aplicación de un campo magnético externo de 81±5 mT. 214

Figura 6.32.- Imágenes de microscopía óptica de a mayor magnificación de la distribución de las partículas de PLGA-MNPs con concentración a) 0.25 mg·ml^{-1}, b) 0.50 mg·ml^{-1}, c) 1.00 mg·ml^{-1} y d) 2.00 mg·ml^{-1} en el seno de hidrogeles de gelatina entrecruzados bajo la aplicación de un campo magnético externo de 81±5 mT. 215

Figura 6.33.- Distribuciones estadísticas de la interdistancia entre las partículas de PLGA-MNPs alineadas en el seno de hidrogeles de gelatina con concentraciones de partículas de a) 2.00 mg·ml^{-1}, b) 1.00 mg·ml^{-1}, c) 0.50 mg·ml^{-1} y d) 0.25 mg·ml^{-1}. ... 216

Figura 6.34.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las partículas de PLGA-MNPs en a) la primera capa y b) la segunda capa de un hidrogel de gelatina, habiendo sido entrecruzadas separadamente bajo la aplicación de campos magnéticos externos de dirección ortogonal entre sí. 218

USC DE COMPOSTELA

Figura 6.35.- Imagen de microscopía óptica de la distribución de las partículas de PLGA-MNPs en el hidrogel de gelatina multicapa. Se observan claramente las partículas de la primera capa ordenadas magnéticamente en la dirección horizontal de la imagen, viéndose de forma menos nítida las de la segunda capa ordenadas de forma ortogonal (dirección vertical en la imagen, marcadas con líneas rojas). 218

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lista de tablas

Tabla 2.1.- Parámetros de los procesos de electrohilado aplicados para preparar microfibras de PCL modificadas con distintas cantidades de MNPs. 73

Tabla 2.2.- Medidas de la densidad de flujo magnético en el punto central entre los imanes paralelos a diferentes inter-distancias entre los mismos. Se efectuaron seis mediciones a cada distancia para determinar un valor promedio. 75

Tabla 2.3.- Protocolo de variación del campo magnético para la obtención de los ciclos de histéresis de las muestras magnéticas (1 T = 10000 Oe).....84

Tabla 3.1.- Resumen de las composiciones y propiedades físico-químicas de los andamios. 103

Tabla 4.1.-Resumen de la composición y propiedades de los andamios.....125

Tabla 4.2.- Tiempo de gelificación (t_{gel}) para hidrogeles puros de HAMA, GelMA e hidrogeles híbridos HAMA-GelMA obtenidos desde el inicio del proceso de gelificación. 133

Tabla 4.3.- Datos de ajuste cinético de hinchamiento de andamios puros e híbridos de acuerdo con la Ecuación (2.8). 143

Tabla 5.1.- Ajustes de los distintos modelos de los perfiles de liberación de la DEX. 154

Tabla 5.2.- Propiedades físicas de los hidrogeles sin y con Nps de PLGA. 156

Tabla 5.3.- Ajustes de los distintos modelos de los perfiles de liberación de la DEX embebidas en los hidrogeles. 159

Tabla 6.1.- Magnetizaciones de saturación (M_S), magnetizaciones remanentes (M_R) y campos coercitivos (H_C) de los tres sistemas de MNPs sintetizados obtenidos de sus ciclos de histéresis magnéticos.....174

Tabla 6.2.- Magnetizaciones de saturación (M_S), magnetizaciones remanentes (M_R) y campos coercitivos (H_C) de las fibras de PCL electrohiladas con diferentes concentraciones de MNPs, obtenidos de sus ciclos de histéresis magnéticos. 181

Tabla 6.3.- Magnetizaciones de saturación (M_S), magnetizaciones remanentes (M_R) y campos coercitivos (H_C) de las partículas de PLGA con diferentes cantidades relativas de MNPs incorporadas, obtenidos de sus ciclos de histéresis magnéticos. 191

Tabla 6.4.- Compilación de los ensayos efectuados de alineamiento de las fibras magnéticas dentro de hidrogeles de gelatina bajo diferentes condiciones de campo magnético aplicado (0º: fibras orientadas según la dirección del campo). 197

USC
DE COMPOSTELA

Agradecimientos

Han pasado cuatro años desde que comencé esta Tesis Doctoral y sería muy complicado incluir en un par de páginas a todas las personas que me han ayudado tanto profesional como personalmente. Aún así intentare que ninguna persona se me escape.

A mi director de Tesis, el Dr. J. Félix Armando Soltero Martínez por haberme brindado la oportunidad de participar en este proyecto, por apoyo y tiempo en la realización de este proyecto. Gracias por apoyarme en que esta Tesis se realizará en cotutela con la Universidade de Santiago de Compostela. y la ayuda incondicional para la realización de esta Tesis.

A mi director de Tesis, el Dr. Pablo Taboada Antelo por su dirección, sus conocimientos y apoyo brindados en esta Tesis. Gracias por brindarme la oportunidad de trabajar en sus laboratorios y la confianza que tuvo en mi para la realización de este proyecto. Por la oportunidad de iniciar mi carrera investigadora en su grupo y abrirme las puertas del mundo *bio*.

A mi co-director de Tesis, el Dr. Luis Carlos Rosales Rivera por su orientación, dedicación, esfuerzo y por siempre motivarme. Gracias por la ayuda incondicional y por enseñarme que todo es más fácil de lo que nosotros creemos.

Mi más grande agradecimiento y reconocimiento a la Dra. Silvia Barbosa Fernández, muchas gracias por todo el apoyo, las platicas, los consejos y la confianza que ha tenido en mi a lo largo de este tiempo. Gracias por enseñarme que todo se debe de pensar en positivo, que las cosas no son un error sino un aprendizaje, aunque sé que un simple "Gracias" no le hace justicia a todo lo que me ha dado.

A mis padres, Fernando y Teresa, gracias por todo el apoyo y la educación que me han brindado. Cada paso y experiencia que viví a su lado forjaron a la persona que soy hoy, espero se sientan orgullosos. Este proyecto también es de ustedes.

A mis hermanas, Lina, Faby y Sandy, por siempre apoyarme en mis locuras, orientarme, ayudarme. Son las que me hacen creer en misma con la motivación de superarme día a día.

A mis sobrinos, Chuy, Mayra, Omar y Aarón que sin saberlo me han motivado a no darme por vencida cada que vez que sentía que no podía más. Gracias por todos los momentos vividos.

A Javier Fernández Vega, por los buenos ratos, pero sobre todo por aguantar los malos. Gracias por cada una de las experiencias vividas y por demostrarme que puede haber alguien en este mundo que me quiera incondicionalmente tal como soy, con todos mis demonios. Gracias por hacerme parte de tu familia.

USC UNIVERSIDADE

Gracias a Altair Victoria, por las palabras de aliento que siempre tenias para mí cuando más lo necesitaba, por tu apoyo y amistad. Por las risas y porque hacías que las horas interminables del laboratorio fueran más amenas. Gracias por todas las aventuras Bonita.

A Valeria Figueroa por todo tu apoyo y ayuda. Por escucharme siempre aun estando cansada, por los consejos y las risas. Por ser parte de esta aventura.

A Sandra Robla por tu amistad, apoyo y comprensión en cada momento. Por las risas, los consejos, los viajes y las cañas. Muchas gracias.

A Lilia Arellano por su amistad y apoyo. Gracias por siempre estar ahí dándome ánimos.

Gracias a María (pérdida) por su amistad y siempre apoyarme. Por siempre estar dispuesta a ayudarme.

A Vicente y Gerardo por todo el apoyo incondicional y la ayuda en la realización de esta Tesis.

A los de farmacia por los conocimientos compartidos.

A todos mis compañeros del Grupo de Física de la Universidade de Santiago de Compostela, por siempre estar dispuestos a ayudar, por los conocimientos compartidos, las buenas platicas y los momentos gratos que viví, que hicieron que esta etapa de mi vida fuera más llevadera.

A mis amigos de posgrado y del laboratorio de reología por su amistad y apoyo. No nombro a cada uno por no omitir a alguno, pero gracias a todos ustedes.

A mis amigos gallegos, Aure y Pilar por la ayuda y las anécdotas, por siempre hacerme sentir en familia y enseñarle su Galicia querida.

A la Universidad de Guadalajara por darme la oportunidad de adquirir los conocimientos implementados en la realización de esta tesis.

A la Universidade de Santiago de Compostela por permitirme realizar esta Tesis Doctoral.

A CONACyT, por mi beca otorgada para realizar esta investigación.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Resumen

El ser humano, a lo largo de la historia, ha buscado la generación artificial de tejidos, órganos o incluso organismos vivos complejos, pareciendo un deseo inalcanzable antes del siglo XX. A finales del siglo XX, los científicos Joseph Vacanti y Robert Langer demostraron que era posible la generación de nuevos tejidos u órganos con imágenes del *"auriculosaurus"*, un ratón con una oreja humana en su espalda. De este modo, la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa son áreas que han experimentado un gran auge en los últimos años, ya que son campos interdisciplinares que tienen como objetivo combinar andamios mecánicos, células y moléculas bioactivas de modo que puedan crear tejidos funcionales. En la actualidad, ya se han implantado vejigas, pequeñas arterias, injertos de piel y cartílago y se han recreado de manera exitosa en el laboratorio tejidos de órganos complejos como corazón, pulmón e hígado, aunque todavía no han llegado a implantarse en pacientes.

Para poder crear los andamios adecuados para regeneración tisular, la ingeniería de tejidos recurre a biomateriales que permiten mimetizar las estructuras y condiciones biológicas de los diferentes tejidos u órganos. Así, los biomateriales, para aplicación en ingeniería de tejido, deben posibilitar el suministro de células y moléculas bioactivas a zonas lesionadas, de tal manera, que se promueva y restaure la función del tejido u órgano dañado. Por ejemplo, la piel y los cartílagos artificiales han sido aprobados por la Agencia de la comida y los fármacos americana (FDA), sin embargo, el uso en pacientes humanos aún es limitado debido a la gran complejidad del sistema final.

Un tipo de biomaterial muy utilizado en ingeniería de tejidos es el basado en hidrogeles de biopolímeros naturales a partir de los cuales se pueden crear andamios que imitan la matriz extracelular (MEC) de las células, que es una red macromolecular anisótropa que sirve de andamio para los constituyentes celulares y como estación repetidora para las moléculas de señalización necesarias para el desarrollo, crecimiento y diferenciación celular. Por ello, los hidrogeles deben proporcionar el espacio, estabilidad, estabilidad mecánica y microentorno adecuado en términos de transporte de nutrientes y señalizaciones bioquímicas para la formación y/o reparación de células/tejidos.

USC UNIVERSIDADE

La presente Tesis Doctoral pretender aportar un avance en el conocimiento de la síntesis, caracterización y aplicación de hidrogeles de biopolímeros naturales para regeneración de tejidos. De este modo, la Tesis consta de siete Capítulos en los que el primero comenta el estado del arte en la ingeniería de tejidos, particularizando en el uso de hidrogeles para la obtención de andamios 3D biocompatibles. El segundo se adentra en los materiales, métodos sintéticos y técnicas de caracterización de los sistemas obtenidos. Los Capítulos 3, 4 y 5 muestran los resultados de síntesis y caracterización físico-química y termodinámica, así como estudios *in vitro* de andamios formados por diferentes biopolímeros para su potencial aplicación en medicina regenerativa y el Capítulo 6 muestra los resultados de la estructuración de los andamios a partir del uso de nanopartículas magnéticas. Finalmente, el Capítulo 7 recoge las principales conclusiones que se alcanzan en el trabajo de investigación.

Más en concreto, el Capítulo 1, muestra el estado del arte de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, ahondando en la importancia de estos campos para la superación de muchas limitaciones que existen en la actualidad respecto a la pérdida de funcionalidades de los órganos/tejidos por la edad, enfermedades o traumas. Así, este Capítulo se centra en el uso de hidrogeles como andamios mecánicos para ingeniería de tejidos, ya que presentan propiedades similares a la MEC, una alta biocompatibilidad y biodegradabilidad y bajas respuestas inmunológicas. A lo largo del Capítulo se comenta la clasificación de los hidrogeles en función de su origen, termosensibilidad y tipo de entrecruzamiento. En este Capítulo también se incluirán los biopolímeros sometidos a estudios con una detallada descripción de sus propiedades y motivación de uso. En concreto quitosano, CS, ácido hialurónico, HA, colágeno, Coll y gelatina, Gel. Por otro lado, esos andamios también se utilizarán en Capítulos posteriores como soportes para la inclusión de partículas poliméricas cargadas con fármaco o nanopartículas inorgánicas para su estudio en regeneración/organización anisótropa de lo andamios. Por ello, en este Capítulo también se introducirán las propiedades más importantes de partículas poliméricas de poli(ácido láctico-co- ácido glicólico), PLGA, y nanopartículas superparamagneticas, SPIONs. Finalmente, en este Capítulo se expondrá el estado del arte de la aplicación de este tipo de andamios poliméricos para la formación de estructuras biocompatibles 3D en presencia de SPIONs.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el capitulo 2, se mencionan todos lo materiales utilizados en esta Tesis Doctoral y se describe de manera detallada la metodología para la obtención de los hidrogeles poliméricos con distinta estructura y composición, tanto puros como híbridos, esto es, mezclas de biopolímeros. En concreto, se presenta la síntesis de hidrogeles basados en CS/HA/Coll y Gel/HA. Más en detalle, los hidrogeles de CS/HA/Coll se obtuvieron por autoensamblaje mediante el entrecruzamiento físico de los biopolímeros, mientras que los basados en Gel y HA se obtuvieron, previa metacrilación de los componentes (GelMA, HAMA), por el método químico de fotopolimerización dando lugar a andamios GelMA-HAMA. También se describe la metodología utilizada para la síntesis de las partículas de PLGA, las SPIONs, las partículas de PLGA con el fármaco antiinflamatario, dexametasona, y las SPIONs en su interior, el proceso sintético de embeber las partículas de PLGA cargadas en la matriz polimérica y finalmente el proceso sintético para la obtención de microfibras poliméricas electrohiladas de policaprolactona (PLC). Dentro de las técnicas de caracterización físico-químicas y termodinámicas se incluirá la descripción, entre otras, de las siguientes: gravimetría, densidad aparente, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría diferencia de barrido (DSC), reología, microscopía de electrónica de transmisión y de barrido (TEM y SEM, respectivamente), porosimetría, microtomografía computacional, dispersión dinámica de luz (DLS), medidas electroforéticas, difracción de Rayos X y magnetometría. Finalmente, al final de este Capítulo se describirán los procedimientos para los estudios *in vitro*.

En el capitulo 3, se muestran los resultados obtenidos de la caracterización de hidrogeles puros e híbridos basado en quitosano, colágeno y ácido hialurónico sintetizados por entrecruzamiento físico. En este Capítulo se muestran las propiedades mecánicas, térmicas y biológicas de estos hidrogeles variando el peso molecular y la composición de cada uno de los biopolímeros obtenidos a partir, entre otras, de medidas de FTIR, TGA, reología, SEM, microtomografía computacional o grado de hinchamiento. Las propiedades mecánicas se caracterizaron mediante mediciones de compresión y reología obteniéndose módulos elásticos similares la MEC. También se realizaron estudios de porosidad, grado de hinchamiento y degradación enzimática obteniéndose andamios altamente porosos. Además, se presentan estudios *in vitro* obteniéndose una buena biocompatibilidad y capacidad de adhesión y proliferación celular.

USC DE COMPOSTELA

En el capitulo 4, se muestran los resultados obtenidos de la caracterización de hidrogeles puros e híbridos de GelMA y HAMA obtenidos mediante fotopolimerización. A través de la adición de grupos metacrilo en las cadenas de gelatina y ácido hialurónico se obtuvieron hidrogeles con mejores propiedades mecánicas, térmicas y biológicas, respecto a los no modificados. A lo largo de este Capítulo se discuten las propiedades térmicas obtenidas a partir de medidas de TGA y DSC demostrándose que estas mejoran con la adición de los grupos metacrilo, así como sus propiedades mecánicas, por reología, que muestran aumentos de los módulos elásticos conforme se incrementa la concentración de cada uno de los componentes. Sin embargo, los hidrogeles más a atractivos para la regeneración tisular son los hidrogeles híbridos GelMA-HAMA puesto que presentan unas mejores propiedades mecánicas. En este tipo de hidrogeles, se observó que, mediante medidas de SEM y porosimetría, que la porosidad disminuye conforme la concentración de los componentes aumenta. Se presentan también los resultados de su caracterización térmica y grado de hinchamiento y degradación enzimática.

En el capitulo 5, se muestra la caracterización de partículas de PLGA mediante DLS y micrografías de SEM, obteniéndose un tamaño de alrededor de 200 nm, altamente hidrófobas y estables en medio acuoso. Se presentan también los resultados de sus propiedades físico-químicas después de la encapsulación del fármaco dexametasona. A lo largo de Capítulo también se muestran las cinéticas de liberación del fármaco. Finalmente, en este Capítulo se presenta un estudio de la biocompatibilidad de los hidrogeles GelMA-HAMA para posteriormente hacer un estudio de prueba de concepto para la diferenciación de células mesenquimales (MSC) en osteoblastos en presencia de partículas de PLGA cargadas con el fármaco y embebidas andamios de GelMA-HAMA con las propiedades físico-químicas adecuadas, previamente obtenidas.

En el Capítulo 6, se presenta la caracterización de las nanopartículas magnéticas basadas en óxido de hierro, tanto puras como dopadas con Zinc mediante medidas de TEM, Rayos X y magnetometría. Posteriormente se procede a mostrar la caracterización de las microfibras electrohiladas de policaprolactona (PLC) con respuesta magnética y las partículas de PLGA con SPIONs en su interior. Finalmente, en este Capítulo se muestran los resultados de la generación de hidrogeles anisótropos por dos vías diferentes, una a través de la incorporación de las microfibras electrohiladas magnéticas y otra con la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

incorporación de las partículas de PLGA magnéticas en hidrogeles de gelatina. Con la aplicación de un campo magnético externo basado en un sistema de imanes de neodimio colocados en paralelo, se procedió al alineamiento de las SPIONs.

En el Capítulo 7, por último, se exponen los principales resultados/conclusiones que se alcanzaron en cada uno de los Capítulos presentados en esta Tesis Doctoral.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Resumo

O ser humano, ao longo da historia, buscou a xeración artificial de tecidos, órganos ou mesmo organismos vivos complexos, parecendo un desexo inalcanzable antes do século XX. A finais do século XX, os científicos Joseph Vacanti e Robert Langer demostraron que era posible a xeración de novos tecidos ou órganos con imaxes do *"auriculosaurus"*, un rato cunha orella humana nas súas costas. Deste xeito, a enxeñaría de tecidos e a medicina rexenerativa son áreas que experimentaron un gran auxe nos últimos anos, xa que son campos interdisciplinares que teñen como obxectivo combinar andamios mecánicos, células e moléculas bioactivas de modo que poidan crear tecidos funcionais. Na actualidade, xa se implantaron vexigas, pequenas arterias, enxertos de pel e cartílago e recreáronse de maneira exitosa no laboratorio tecidos de órganos complexos como corazón, pulmón e fígado, aínda que aínda non chegaron a implantarse en pacientes.

Para poder crear os andamios adecuados para rexeneración tisular, a enxeñaría de tecidos recorre a biomateriais que permiten mimetizar as estruturas e condicións biolóxicas dos diferentes tecidos ou órganos. Así, os biomateriais, para aplicación en enxeñaría de tecido, deben posibilitar a subministración de células e moléculas bioactivas a zonas lesionadas, de tal maneira, que se promova e restaure a función do tecido ou órgano danado. Por exemplo, a pel e os cartílagos artificiais foron aprobados pola Axencia da comida e os fármacos americana (FDA), con todo, o uso en pacientes humanos aínda é limitado debido á gran complexidade do sistema final.

Un tipo de biomaterial moi utilizado en enxeñaría de tecidos é o baseado en hidroxeles de biopolímeros naturais a partir dos cales pódense crear andamios que imitan a matriz extracelular (MEC) das células, que é unha rede macromolecular anisótropa que serve de andmio para os constituíntes celulares e como estación repetidora para as moléculas de sinalización necesarias para o desenvolvemento, crecemento e diferenciación celular. Por iso, os hidroxeles deben proporcionar o espazo, estabilidade, estabilidade mecánica e microentorno adecuado en termos de transporte de nutrientes e sinalizacións bioquímicas para a formación e/ou reparación de células/tecidos.

A presente Tese de Doutoramento pretender achegar un avance no coñecemento da síntese, caracterización e aplicación de hidroxeles de biopolímeros naturais para

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

rexeneración de tecidos. Deste xeito, a Tese consta de sete Capítulos nos que o primeiro comenta o estado da arte na enxeñaría de tecidos, particularizando no uso de hidroxeles para a obtención de andamios 3D biocompatibles. No segundo penétrase nos materiais, métodos sintéticos e técnicas de caracterización dos sistemas obtidos. Os Capítulos 3, 4 e 5 mostran os resultados de sínteses e caracterización físico-química e termodinámica, así como estudos *in vitro* de andamios formadas por diferentes biopolímeros para a súa potencial aplicación en medicina rexenerativa e o Capítulo 6 mostra os resultados da estructuración das andamios a partir do uso de nanopartículas magnéticas. Finalmente, o Capítulo 7 recolle as principais conclusións que se acadaron no traballo de investigación.

Máis en concreto, o Capítulo 1, mostra o estado da arte da enxeñaría de tecidos e medicina rexenerativa, profundando na importancia destes campos para a superación de moitas limitacións que existen na actualidade respecto da perda de funcionalidades dos órganos/tecidos pola idade, enfermidades ou traumas. Así, este Capítulo céntrase no uso de hidroxeles como andamios mecánicos para enxeñaría de tecidos, xa que presentan propiedades similares á MEC, unha alta biocompatibilidad e biodegradabilidad e baixas respostas inmunolóxicas. Ao longo do Capítulo coméntase a clasificación dos hidroxeles en función da súa orixe, termosensibilidad e tipo de entrecruzamiento. Neste Capítulo tamén se incluirán os biopolímeros sometidos a estudo cunha detallada descrición das súas propiedades e motivación de uso. En concreto quitosano, CS, ácido hialurónico, HA, coláxeno, Coll e xelatina, Gel. Doutra banda, eses andamios tamén se utilizarán en Capítulos posteriores como soportes para a inclusión de partículas poliméricas cargadas con fármaco ou nanopartículas inorgánicas para o seu estudo en rexeneración/organización anisótropa do andamios. Por iso, neste Capítulo tamén se introducirán as propiedades máis importantes de partículas poliméricas de poli(ácido láctico-co- acedo glicólico), PLGA, e nanopartículas superparamagnéticas, SPIONs. Finalmente, neste Capítulo exporase o estado da arte da aplicación deste tipo de andamios poliméricos para a formación de estruturas biocompatibles 3D en presenza de SPIONs.

No Capítulo 2, menciónanse todos o materiais utilizados nesta Tese de Doutoramento e descríbese de maneira detallada a metodoloxía para a obtención dos hidroxeles poliméricos con distinta estrutura e composición, tanto puros como híbridos, isto é, mesturas de biopolímeros. En concreto, preséntase a síntese de hidroxeles baseados en CS/HA/Coll e Gel/HA. Máis en detalle, os hidroxeles de CS/HA/Coll obtivéronse por autoensamblaje mediante o entrecruzamiento físico dos biopolímeros, mentres que os

USC DE COMPOSTELA

baseados en Gel e HA obtivéronse, previa metacrilación dos compoñentes (GelMA, HAMA), polo método químico de fotopolimerización dando lugar a andamios GelMA-HAMA. Tamén descríbese a metodoloxía utilizada para a síntese das partículas de PLGA, as SPIONs, as partículas de PLGA co fármaco antiinflamatario, dexametasona, e as SPIONs no seu interior, o proceso sintético de embeber as partículas de PLGA cargadas na matriz polimérica e finalmente o proceso sintético para a obtención de microfibras poliméricas electrohiladas de policaprolactona (PLC). Dentro das técnicas de caracterización físico-químicas e termodinámicas incluirase a descrición, entre outras, das seguintes: gravimetría, densidade aparente, espectroscopía infravermella por transformada de Fourier (FTIR), análise termogavimétrico (TGA), calorimetría diferencial de varrido (DSC), reoloxía, microscopía de electrónica de transmisión e de varrido (TEM e SEM, respectivamente), porosimetría, microtomografía computacional, dispersión dinámica de luz (DLS), medidas electroforéticas, difracción de RAIOS X e magnetometría. Finalmente, ao final deste Capítulo describiranse os procedementos para os estudos *in vitro*.

No Capítulo 3, móstranse os resultados obtidos da caracterización de hidroxeles puros e híbridos baseados en quitosano, coláxeno e ácido hialurónico sintetizados por entrecruzamiento físico. Neste Capítulo móstranse as propiedades mecánicas, térmicas e biolóxicas destes hidroxeles variando o peso molecular e a composición de cada un dos biopolímeros obtidos a partir, entre outras, de medidas de FTIR, TGA, reoloxía, SEM, microtomografía computacional ou grao de inchamiento. As propiedades mecánicas caracterízanse mediante medicións de compresión e reoloxía obténdose módulos elásticos similares a MEC. Tamén realizáronse estudos de porosidade, grao de inchamiento e degradación encimática obténdose andamios altamente porosos. Ademáis, preséntanse estudos *in vitro* obténdose unha boa biocompatibilidad e capacidade de adhesión e proliferación celular.

No Capítulo 4, móstranse os resultados obtidos da caracterización de hidroxeles puros e híbridos de GelMA e HAMA obtidos mediante fotopolimerización. A través da adición de grupos metacrilo nas cadeas de xelatina e ácido hialurónico obtivéronse hidroxeles con mellores propiedades mecánicas, térmicas e biolóxicas, respecto dos non modificados. Ao longo deste Capítulo discútense as propiedades térmicas obtidas a partir de medidas de TGA e DSC demostrándose que estas melloran coa adición dos grupos metacrilo, así como as súas propiedades mecánicas, por reoloxía, que mostran aumentos dos módulos

USC DE COMPOSTELA

elásticos conforme increméntase a concentración de cada un dos compoñentes. Con todo, os hidroxeles máis a atractivos para a rexeneración tisular son os hidroxeles híbridos GelMA-HAMA posto que presentan unhas mellores propiedades mecánicas. Neste tipo de hidroxeles, observouse que, mediante medidas de SEM e porosimetría, que a porosidade diminúe conforme a concentración dos compoñentes aumenta. Preséntanse tamén os resultados da súa caracterización térmica e grao de inchamiento e degradación enzimática.

No Capítulo 5, móstrase a caracterización de partículas de PLGA mediante DLS e micrografías de SEM, obténdose un tamaño de ao redor de 200 nm, altamente hidrófobas e estables no medio acuoso. Preséntanse tamén os resultados das súas propiedades físico-químicas despois da encapsulación do fármaco dexametasona. Ao longo de Capítulo tamén móstranse as cinéticas de liberación do fármaco. Finalmente, neste Capítulo preséntase un estudo da biocompatibilidad dos hidroxeles GelMA-HAMA para posteriormente facer un estudo de proba de concepto para a diferenciación de células mesenquimales (MSC) en osteoblastos en presenza de partículas de PLGA cargadas co fármaco e embebidas nos andamios de GelMA-HAMA coas propiedades físico-químicas adecuadas, previamente obtidas.

No Capítulo 6, preséntase a caracterización das nanopartículas magnéticas baseadas en óxido de ferro, tanto puras como dopadas con Zinc mediante medidas de TEM, RAIOS X e magnetometría. Posteriormente procédese a mostrar a caracterización das microfibras electrohiladas de policaprolactona (PLC) con resposta magnética e as partículas de PLGA con SPIONs no seu interior. Finalmente, neste Capítulo móstranse os resultados da xeración de hidroxeles anisótropos por dúas vías diferentes, unha a través da incorporación das microfibras electrohiladas magnéticas e outra coa incorporación das partículas de PLGA magnéticas en hidroxeles de xelatina. Coa aplicación dun campo magnético externo baseado nun sistema de imáns de neodimio colocados en paralelo, procedeuse ao aliñamento das SPIONs.

No Capítulo 7, por último, expón os principais resultados/conclusións que se acadaron en cada un dos Capítulos presentados nesta Tese de Doutoramento.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1 Introducción

Los órganos y los tejidos disminuyen e, incluso, pierden sus funcionalidades con la edad del individuo, la aparición de enfermedades o la existencia de traumas, por lo que, típicamente, estas funcionalidades se intentan recuperar con el uso de, por ejemplo, fármacos y otras moléculas bioactivas, prótesis o, en último caso, el trasplante del órgano o tejido dañado/afectado. Sin embargo, esta aproximación terapéutica no siempre es óptima ya que puede provocar daños colaterales en otros órganos o siempre está presente la escasez de órganos bajo demanda. La ingeniería de tejidos (IT) y la medicina regenerativa[1–4] son campos interdisciplinares que surgieron en la década de los 80 y que han experimentado un gran auge en los últimos años debido a que posibilitan el suministro de células y agentes bioactivos a zonas lesionadas de tal manera que se promueva y restaure la función del tejido dañado[5], incluso para llegar a disponer de órganos o tejidos para los pacientes que los necesitan para mejorar de su dolencia y restaurar plenamente su calidad de vida[6,7] y cuyo esquema de funcionamiento se esquematiza en la Figura 1.1[8].

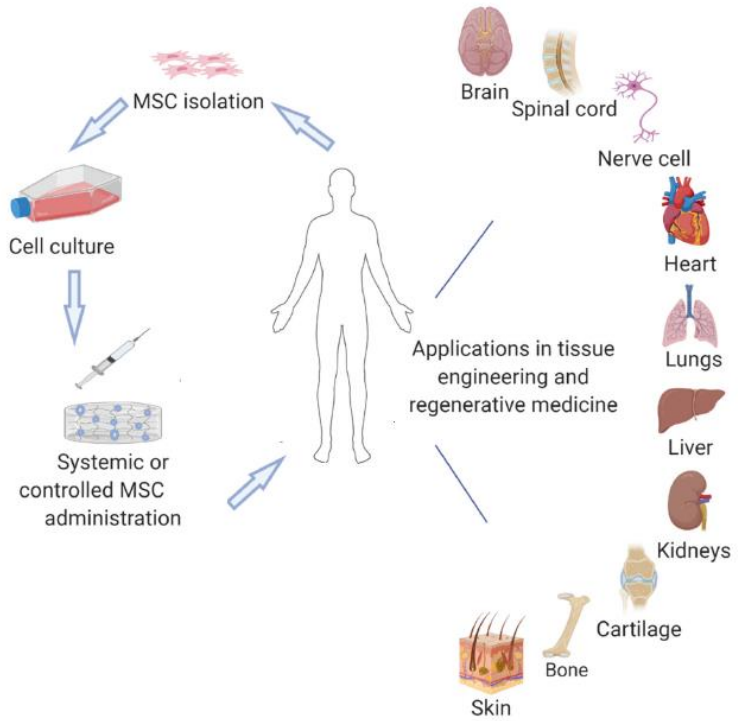


Figura 1.1.- Ejemplo de aplicaciones de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. Imagen modificada reproducida de la referencia 8 Copyright (2020) con permiso de MPDI.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estas alternativas "sintéticas" para la regeneración tisular se pueden conseguir a través de una amplia combinación de diferentes materiales capaces de proporcionar un *andamio mecánico* que sirva de apoyo a la adhesión celular con interacciones favorables célula-célula creando un entorno adecuado para su proliferación, organización y, consecuentemente, que permita la reparación o regeneración del tejido u órgano dañado[9,10]. Es decir, el objetivo último de la IT es el diseño de esos *andamios* cuya función será crear una estructura funcional o de soporte para reparar, preservar o mejorar los tejidos u órganos dañados e implementar una mejora en la calidad de vida de las personas, tal y como busca la Organización Mundial de la Salud[11,12].

Para asegurar las funciones del tejido dañado, estos andamios tienen que tener la capacidad de eliminar el defecto/mal funcionamiento a la vez que mimeticen la estructura y composición de los órganos o las estructuras tisulares tridimensionales que van a sustituir o que van a promover[13,14]. Además, deben de cumplir una serie de requisitos como son la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, poseer unas características/propiedades mecánicas y de dureza adecuadas, y una porosidad y tamaño de poro adecuados, entre otras, para conseguir/inducir la actividad biológica deseada tal y como se resume en la Figura 1.2[15].

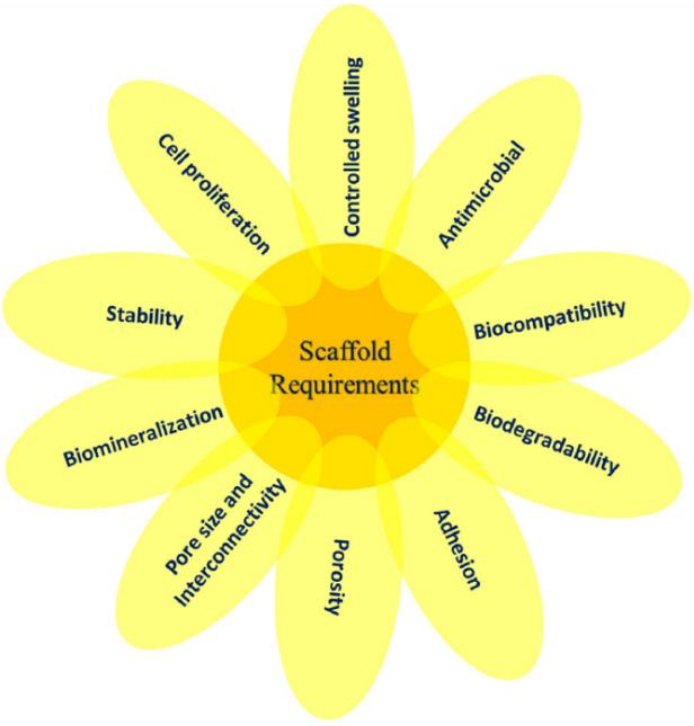


Figura 1.2.- Variables básicas de un andamio para ingeniería de tejidos. Imagen reproducida de la referencia 15 Copyright (2021) con permiso de MPDI.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por otra parte, una vez introducidos en el cuerpo humano, los andamios deben desempeñar unas funciones básicas que satisfagan las necesidades biológicas y mecánicas para la regeneración de tejidos como son i) permitir la adhesión, proliferación y diferenciación celular, ii) crear un entorno biomecánico que permita la regeneración de los tejidos, iii) permitir la diseminación de nutrientes y iv) permitir la encapsulación y liberación de factores de crecimiento[15,16].

Entre los diferentes tipos de materiales utilizados para construir andamios para ingeniería de tejidos, los hidrogeles poliméricos juegan un papel muy importante tal y como muestra el gran número de trabajos publicados en los últimos años[17–21] cuya tendencia exponencial creciente se puede observar en la Figura 1.3[22].

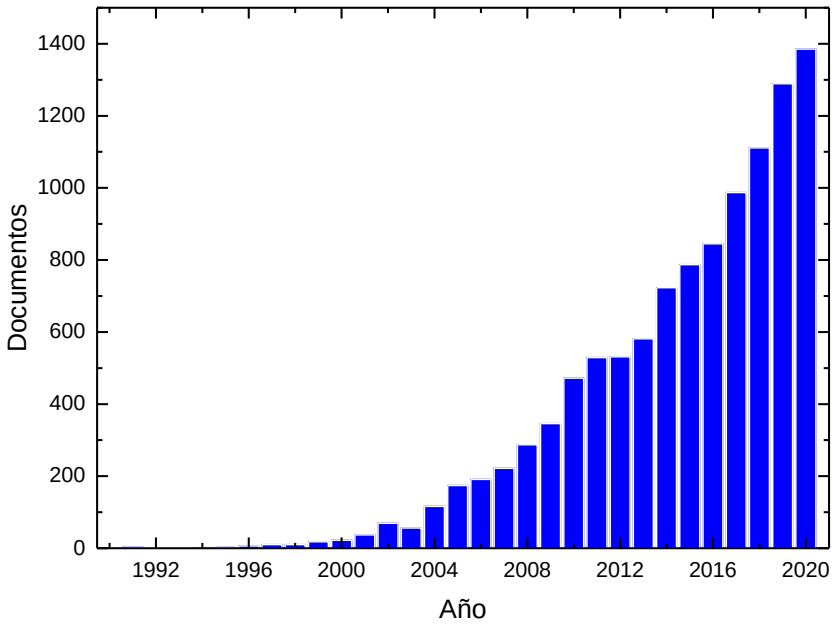


Figura 1.3.- Trabajos publicados por año usando hidrogeles como andamios para ingeniería de tejidos. Referencia 22 (www.scopus.com: "hydrogels for tissue ingeneering").

1.1 Hidrogeles

Los hidrogeles son redes poliméricas de origen natural o sintético entrecruzadas que forman andamios en tres dimensiones (3D). Una de las características más importantes de estas redes es su carácter hidrófilo, debido a que en su estructura están presentes grupos químicos como -OH, -CONH, -COOH, $-SO_3H$ y $-NH_2$, por lo que en un ambiente acuoso tienen la capacidad de absorber y retener agua dentro de su estructura sin disolverse[23]. Además, muchas de las características de los hidrogeles poliméricos se pueden modificar

y/o controlar, por ejemplo, a través de la metodología de síntesis/producción, composición, grado de reticulación y microestructura con el fin de controlar sus propiedades mecánicas y estructurales, su capacidad de retención de agua y citocompatibilidad para, con ello, poder imitar la matriz extracelular (MEC) de muchos tejidos humanos.

La MEC es una red macromolecular de estructura generalmente anisótropa presente en todos los tejidos y órganos, que sirve de andamio físico para los constituyentes celulares y que inicia las señales bioquímicas y biomecánicas necesarias para el desarrollo, crecimiento y diferenciación celular. La MEC de los tejidos está constituida, de forma general, por agua, proteínas (proteoglicanos y proteínas fibrosas) y polisacáridos, presentando cada tejido, además, una composición y topología específica que le confiere su función particular. De este modo, las propiedades bioquímicas, biomecánicas, de protección y de organización de la MEC varían de manera importante de unos tejidos a otros, incluso dentro del mismo tejido (corteza renal *vs* médula renal) o bien de unos estados fisiológicos a otros (célula sana *vs* célula cancerosa). Además, la MEC sirve de depósito de citoquinas y nutrientes para las células y promueve la organización morfológica y la función fisiológica de los tejidos a través de factores de crecimiento como, por ejemplo, de los fibroblastos (FGFs) o los endoteliales vasculares (VEGFs) que se unen al sulfato de heparina y de heparano, componente de muchos proteoglicanos de las MEC. En este sentido, el sulfato de heparano actúa como un depósito de factores de crecimiento y permite el establecimiento de gradientes estables de factores de crecimiento unidos a la MEC. Por otro lado, los factores de crecimiento también se pueden liberar por la degradación de las proteínas de la MEC o los componentes de los proteoglicanos[24,25].

De este modo, los hidrogeles al mimetizar la MEC deben proporcionan el espacio, la estabilidad mecánica y el microentorno adecuado en términos de transporte de nutrientes y señalizaciones bioquímicas para la formación y/o reparación de células/tejidos[26]. En concreto, la composición y las propiedades mecánicas de los hidrogeles influyen en gran medida en las respuestas biológicas de las células tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, puesto que las células "sienten" la nano/microtopografía y los "puntos de anclaje" o receptores presentes en la matriz tridimensional biopolimérica. Por ello, en primer lugar, la adhesión celular se verá influenciada por la rigidez/flacidez de la matriz polimérica modulando, de este modo, su motilidad, proliferación, diferenciación y apoptosis[27].

USC DE COMPOSTELA

1.1.1 Clasificación de los hidrogeles

Los hidrogeles pueden ser clasificados en función de su termosensibilidad, nivel de entrecruzamiento, origen de los materiales del que están formados y carga iónica, entre otras[28]. Las principales clasificaciones se muestran en la Figura 1.4.

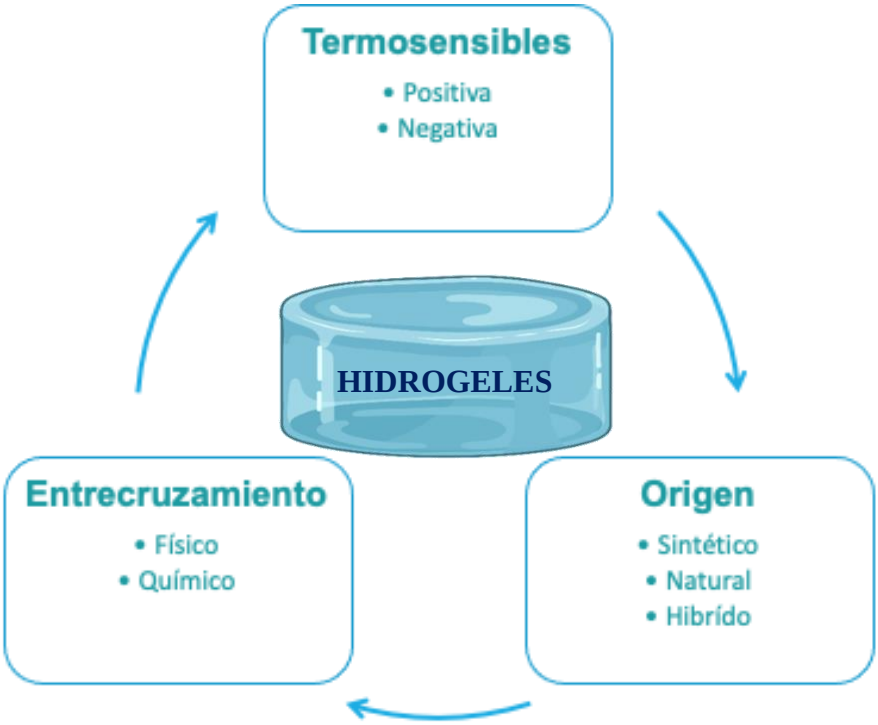


Figura 1.4.-Principales clasificaciones de los hidrogeles.

1.1.1.1 Según la temperatura (hidrogeles termosensibles)

Este tipo de hidrogeles son de gran interés para aplicaciones médicas, ya que presentan un fenómeno de transición de fase disolución-gel cuando se experimenta una variación de la temperatura del disolvente en un determinado intervalo, como muestra el diagrama de fases de la Figura 1.5. Esta transición es de especial interés cuando tiene lugar en condiciones/temperaturas fisiológicas, ya que provee a la estructura con una capacidad de respuesta ante este estímulo externo que tiene por ejemplo, aplicación en el campo de la administración controlada de fármacos[29,30]. Estos hidrogeles termosensibles pueden clasificarse en dos tipos:

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

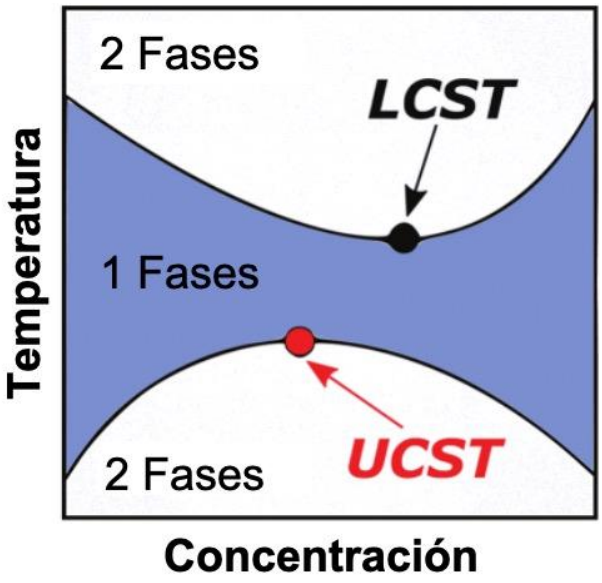


Figura 1.5.- Diagrama de fases para polímeros termosensibles.

1.1.1.1.1 Hidrogeles termosensibles positivos

Los hidrogeles termosensibles de temperatura positiva, son conocidos como hidrogeles de temperatura crítica superior de disolución (UCST, por sus siglas en inglés). Estos hidrogeles se encuentran en estado sol por encima de cierta temperatura y al enfriarlos y alcanzar la UCST gelifican. Algunos de los polímeros que poseen/proveen de esta propiedad son, por ejemplo, el poli (metacrilato de acrilamida-co-butilo) (poli(AAm-co-BMA)), gel de copolímero aleatorio, poli (acrilamida-co-butil metacrilato-co-ácido acrílico) (poli (AA-co-AAm-co-BMA)), sulfobetaína metacrilato (SBMA), entre otros[31].

1.1.1.1.2 Hidrogeles termosensibles negativos

Los hidrogeles termosensibles negativos son aquellos que por debajo de cierta temperatura se presentan en estado sol, y en el proceso de calentamiento por encima de una cierta temperatura conocida como temperatura baja de disolución (LCST, por sus siglas en inglés), gelifican[30]. Los polímeros más estudiados de esta categoría son la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM), el poli(dietilen glicol metil éter metacrilato) ($PMEO_2MA$), la poli(N-vinilcaprolactona) (PVCL), el poli(metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo) (PDMAEMA)[32].

1.1.1.2 Según el entrecruzamiento

El entrecruzamiento o reticulación es el proceso por el cual se unen entre sí las cadenas poliméricas para formar una red tridimensional. Este proceso puede ser de carácter físico

o químico. El tipo y grado de entrecruzamiento influye en las propiedades del hidrogel como son el hinchamiento, el módulo elástico, porosidad y transporte de moléculas[33].

1.1.1.1.3 Entrecruzamiento físico

Los geles reticulados por métodos físicos tienen la particularidad de ser reversibles debido a que este proceso depende de condiciones externas de carácter físico como son el pH, la fuerza iónica, los cambios conformacionales del polímero de partida, entre otras. El reticulado tiene lugar a través de interacciones físicas de carácter atractivo, aunque las repulsivas también juegan un papel clave de carácter modulador que permiten controlar el grado de entrecruzamiento y, por tanto, las propiedades físicas del hidrogel resultante. Además, este tipo de geles/hidrogeles son especialmente atractivos ya que no es necesario la adición de ningún agente químico, el cual podría provocar que la generación de la estructura tridimensional polimérica fuese potencialmente tóxica[29]. Sin embargo, estos hidrogeles son heterogéneos debido a los clústers de enredamientos moleculares a través de los que se forma la estructura tridimensional, esto es, pueden dar lugar a variaciones entre distintas síntesis y presentan, además, algunas otras desventajas como inestabilidad, deficientes propiedades mecánicas y una rápida degradación[34]. Los procesos sintéticos más utilizados para la producción de hidrogeles por medio de interacciones físicas son la condensación térmica, autoagregación, interacciones iónicas e interacciones electrostáticas[35,36].

- ***Condensación térmica*:** En este método (Figura 1.6a), el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas en el proceso de gelificación es dependiente de la temperatura, ya que esta afecta a la solubilidad del polímero y, con ello, a la rigidez de la estructura del hidrogel. Este mecanismo es muy dependiente del tipo/origen del polímero y del peso molecular, siendo la gelatina un ejemplo claro. Así, en función del origen de la gelatina las temperaturas de gelificación difieren varios grados, siendo en torno a 25ºC en el caso de la gelatina proveniente de mamíferos y en torno a 10-12ºC en aquella que proviene de peces de agua fría[37].

- ***Entrecruzamiento por autoagregación:*** Como se puede observar en la Figura 1.6b, este tipo de entrecruzamiento se produce por interacciones moleculares débiles no covalentes entre las que se encuentran los enlaces de hidrógeno, las interacciones de Van der Waals o las interacciones hidrófobas, que dan lugar a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

andamios con estructura y funcionalidad bien definidas. Por ejemplo, los hidrogeles obtenidos por enlaces de hidrógeno pueden generarse por la disminución del pH de disoluciones acuosas de polímeros que contengan cadenas de grupos carboxilo. Un ejemplo de gelificación por enlace de hidrógeno es el experimentado por la carboximetilcelulosa (CMC), que es un polímero soluble en agua y que forma geles cuando se mezcla con ácido clorhídrico (HCl), reemplazando el sodio presente en su cadena por hidrógenos, para con ello, formar enlaces de hidrógeno. Este procedimiento da lugar a geles muy elásticos con buenas propiedades mecánicas, que pueden ser moduladas dependiendo de la concentración de HCl[38]. Otro ejemplo de entrecruzamiento por agregación son los hidrogeles de colágeno. El colágeno es la proteína más abundante del cuerpo humano y en determinadas condiciones se produce una distribución regular de los aminoácidos prolina y hidroxiprolina de sus moléculas lo que facilita la formación de una estructura en triple hélice, también conocida como tropocolágeno[14]. Posteriormente, se produce un empaquetamiento en fibras de subunidades de tropocolágeno que una vez estabilizadas pueden generar los hidrogeles[39–41].

- ***Entrecruzamiento iónico:*** El entrecruzamiento de hidrogeles por medio de interacciones iónicas, que se esquematiza en la Figura 1.6c, es uno de los métodos más utilizados para obtener hidrogeles empleando polímeros iónicos, mediante la combinación de iones di y/o tri valentes de carga opuesta, ya sea otro polímero iónico, ion metálico o molécula iónica. Los iones metálicos producen hidrogeles más fuertes, mientras que los polímeros con distintas cargas pueden formar hidrogeles o precipitar, en función de su concentración, la fuerza iónica y el pH de la disolución, aunque no es necesaria la presencia de grupos iónicos en el polímero para formar un hidrogel. Este proceso de entrecruzamiento se da en condiciones suaves, a temperatura ambiente y pH fisiológico[42]. El alginato es un ejemplo de polisacárido que forma hidrogeles por medio de interacciones iónicas debido a que tiene restos de ácido manurónico y glucurónico que pueden entrecruzarse con cationes divalentes de calcio (Ca) o bario (Ba) gelificando en forma de "caja de huevos" en la cual pares de cadenas helicoidales empaquetan y rodean iones encerrados en el medio[43]. El poli- [dicarboxilato fenoxi) fosfaceno (PCPP) es un polímero sintético que también se puede reticular con iones de Ca[44].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- ***Entrecruzamiento por interacción electrostática:*** Este ocurre entre polímeros con carga neta opuesta (Figura 1.6d). La mayoría de los polímeros naturales presentan carga negativa a pH ~7 debido a la presencia de grupos carboxilo como sucede, por ejemplo, con el ácido hialurónico o el alginato. Sin embargo, en algunos de estos polímeros dominan los grupos amino lo que les confiere carga positiva a pH neutro, como es el caso de la gelatina o el quitosano[36].

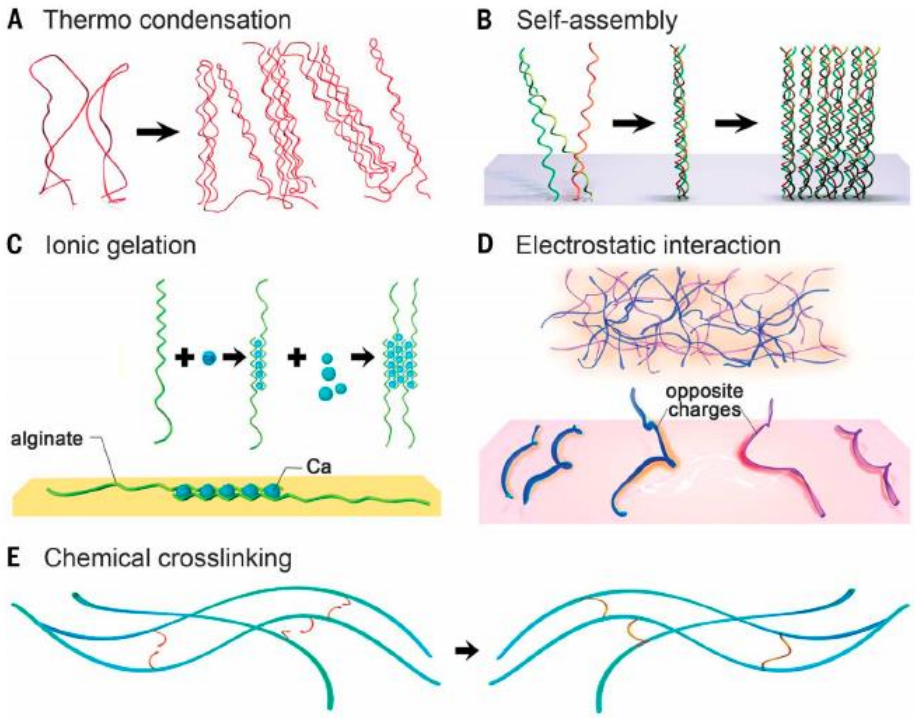


Figura 1.6.- Tipos de entrecruzamientos en la síntesis de hidrogeles: a) entrecruzamiento por condensación térmica, b) autoagregación moléculas, c) entrecruzamiento iónico, d) entrecruzamiento electrostático y e) entrecruzamiento químico. Imagen reproducida de la referencia 36 Copyright (2020) con permiso de MPDI.

1.1.1.1.4 Entrecruzamiento químico

El entrecruzamiento químico es el proceso por el cual se obtienen hidrogeles mediante la adición de un agente de reticulación apropiado que reacciona con el polímero hidrófilo. Este agente provoca el inicio o regula la formación de enlaces intermoleculares covalentes para obtener hidrogeles con uniones permanentes que no pueden disolverse en presencia de un disolvente, tal y como se observa en la Figura 1.6e[36,42]. Las principales características de los geles entrecruzados químicamente es que presentan una mayor resistencia mecánica y su degradación es relativamente más prolongada respecto a los de entrecruzamiento físico[45].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La reticulación de los polímeros se logra mediante la reacción de grupos funcionales como los grupos hidroxilo, carboxilo y amina con agentes reticulantes como los aldehídos. En este contexto, los métodos más utilizados para la fabricación de hidrogeles químicamente entrecruzados son el entrecruzamiento mediante enzimas, por grupos funcionales reactivos, por fotopolimerización, entre otros[34].

- ***Entrecruzamiento mediante enzimas:*** El entrecruzamiento mediante enzimas es uno de los métodos más utilizados para la preparación de hidrogeles debido a que éstos presentan un alto grado de especificidad por el sustrato, evitando reacciones secundarias durante el proceso de entrecruzamiento y, con ello, permitiendo predecir la cinética y controlar la tasa global del mismo[46]. Algunas de las principales ventajas del entrecruzamiento enzimático son que se desarrolla en condiciones fisiológicas, es biocompatible, no genera productos secundarios tóxicos, presenta alta eficiencia energética, selectividad, no son necesarios agentes de reticulación, además de ser adecuado para obtener sistemas de gelificación *in situ*[10,47].

- ***Entrecruzamiento por grupos funcionales reactivos:*** El entrecruzamiento por grupos funcionales reactivos se trata de reacciones covalentes entre los grupos funcionales de la cadena del polímero (principalmente, -OH, -COOH, NH_2). Estos enlaces covalentes se establecen mediante la reacción de los grupos funcionales que presentan una reactividad complementaria. Las reacciones típicas son la formación de bases de Schiff y adiciones tipo Michael, entre otras. La formación de una base de Schiff se obtiene entre un aldehído y un grupo amino, y el tiempo de entrecruzamiento y propiedades mecánicas del hidrogel resultante dependen del número de grupos amino y aldehído que reaccionan. El glutaraldehído es uno de los compuestos más utilizados debido a que reacciona con grupos amino en condiciones suaves, sin embargo, es un componente tóxico aún a concentraciones bajas[46]. Además, aunque se ha demostrado la buena viabilidad celular en este método de entrecruzamiento también existe la posibilidad de que los grupos aldehído libres en la cadena principal del polímero reaccionen con grupos amino presentes en biomoléculas y generen toxicidades no deseables[48].

  Los hidrogeles formados mediante la reacción de adición de Michael tienen lugar en polímeros hidrófilos entre su nucléfilo (una amina o un grupo tiol) y un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

electrófilo (grupo vinilo/ acrilato/maleimida) utilizando un agente de reticulación[49]. Este método se ha utilizado para formar hidrogeles como, por ejemplo, poli (vinil alcohol) (PVA) utilizado para reemplazar la retina *in vitro*. Este método se utilizó para la formación *in situ* del hidrogel en ausencia de un mecanismo de radicales, el cual puede presentar un riesgo para el tratamiento quirúrgico[50].

- ***Fotopolimerización:*** El entrecruzamiento de hidrogeles por radicales libres activados por luz es uno de los métodos más utilizados en aplicaciones médicas debido a su gelificación no tóxica e *in situ*[51]. Se basa en el uso de una molécula denominada fotoiniciador (PI, por sus siglas en inglés) que genera radicales libres en contacto con la luz. Estos radicales reaccionan con el monómero polimérico mediante un proceso de transferencia electrónica/de carga de modo que la reacción se propaga a otros monómeros. Así, la fotopolimerización es un proceso que presenta tres etapas principales: La iniciación, la propagación y la terminación, tal y como muestra la Figura 1.7. La etapa de iniciación se produce cuando la luz visible o UV causa la excitación del PI para crear radicales libres. En la etapa de propagación, los radicales libres conducen a la formación de enlaces covalentes entre las moléculas precursoras en una reacción rápida; por último, la etapa de terminación se refiere al final de la reacción obteniendo como resultado una red polimérica tridimensional[48,52]. Los fotoiniciadores utilizados para la formación de hidrogeles deben presentar una alta absorción de la longitud de onda adecuada para producir especies iniciadoras, ser biocompatibles, solubles en agua y no tóxicos[53].

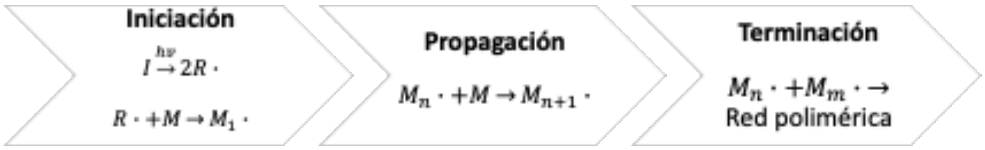


Figura 1.7.- Etapas de fotopolimerización.

La polimerización activada por luz visible o ultravioleta (UV) tiene varias ventajas respecto a una polimerización convencional como el control temporal y espacial de la reacción, bajo requerimiento de energía y tiempos de curado clínicamente aceptables[54].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.1.1.3 Según el origen

Los hidrogeles se pueden clasificar según el origen/fuente del polímero en sintéticos, naturales e híbridos.

1.1.1.1.5 Hidrogeles sintéticos

Los hidrogeles sintéticos son aquellos que se obtienen a partir de componentes puramente artificiales, tales como hidrogeles de poli (vinil alcohol) (PVA), poli (etilenglicol) (PEG), poli (2-hydroxietil metacrilato) (PHEMA), poli(vinil pirrolidona) (PVP), entre otros. Estos hidrogeles poseen propiedades físicas y químicas muy reproducibles gracias a su potencial monodispersidad y control de su peso molecular posible gracias a un control estricto de sus condiciones sintéticas, lo cual es clave para la fabricación de andamios para ingeniería de tejidos[55].

Las características principales de los hidrogeles sintéticos son, por ejemplo, su resistencia mecánica ajustable mediante el control del peso molecular polimérico y la adición de agentes de reticulación o una vida útil más larga que los hidrogeles naturales. Sin embargo, son poco atractivos, en principio, para aplicaciones biomédicas debido a la falta de elementos de reconocimiento celular, lo que dificulta en primera instancia la posibilidad de lograr una buena adhesión y migración celular al andamio[56,57].

Los polímeros utilizados para preparar hidrogeles sintéticos se pueden clasificar en:

- ***Polímeros sintéticos no biodegradables:*** Los polímeros sintéticos no biodegradables se utilizan para formar hidrogeles por copolimerización de varios monómeros o macrómeros de vinilos como metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), metacrilato de 2-hidroxipropilo (HPMA), acrilamida (AAm), entre otros[58–60] y por el autoensamblaje de polímeros con una estructura de poli (óxido de etileno) (PEO) -poli (óxido de propileno) (PPO) más conocidos como Pluronic, reticulados químicamente con poli (vinil alcohol) (PVA) modificado y/o reticulación por radiación de PEG lineal o ramificado[61].

  El PEG es el polímero más ampliamente investigado que se utiliza para fabricar hidrogeles debido a sus propiedades únicas, como la solubilidad en agua y en disolventes orgánicos, no toxicidad, baja adhesión a proteínas y no inmunogenicidad[62].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los hidrogeles no biodegradables se han utilizado para la ingeniería de huesos y cartílagos[63] debido a que se pueden optimizar la resistencia mecánica y elasticidad que presentan para esta aplicación, sin embargo, están limitados en la ingeniería de construcciones vasculares u otros tejidos blandos debido a su no biodegradabilidad[64].

- ***Polímeros sintéticos biodegradables:*** Los polímeros sintéticos biodegradables más utilizados para la fabricación de andamios son los poliésteres como el poli (ácido láctico) (PLA), el poli (ácido glicólico) (PGA), la poli (ε-caprolactona) (PCL) y sus copolímeros tribloque, por ejemplo, PLA-PEG-PLA y PEG-PLA-PEG sintetizados y cubiertos con grupos acrilato[65,66]. Otro de los polímeros utilizados son los péptidos sintéticos de autoensamblaje debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad, estructura adaptable que permite una interacción específica, la formación de redes nanofibrosas que imitan la estructura fibrilar natural de la MEC y capacidad de encapsular células para la IT[67].

  La característica más importante de estos andamios es que pueden degradarse mediante péptidos o proteínas, lo que ofrece una vía conveniente para controlar la biodegradabilidad del andamio[68].

- ***Polímeros sintéticos bioactivos:*** Los polímeros sintéticos bioactivos consisten en la unión de moléculas bioactivas a los polímeros sintéticos anteriormente descritos, durante o después de la formación del hidrogel[69]. De esta manera, se obtienen andamios con una arquitectura, composición química, propiedades físicas y bioactividad adaptables para la formación de tejido. Con estas moléculas bioactivas, se obtienen andamios cuya adhesión celular, migración y biodegradación son óptimas para la regeneración tisular[45]. Un ejemplo de estas moléculas bioactivas son los péptidos derivados de los componentes de la MEC, que han sido utilizados para fabricar andamios que presenten buena adhesión celular, sensibilidad enzimática o afinidad para su unión con proteínas[70–72].

En esta Tesis Doctoral se utilizó el polímero sintético poli (ε-caprolactona) (PCL) en forma de microfibras mediante electrohilado para inducir anisotropía en la estructura, tal y como se mostrará en el Capítulo 6.

USC DE COMPOSTELA

a) Poli(ε-caprolactona) (PCL)

La poli(ε-caprolactona) (PCL) es un poliéster semicristalino alifático, con una temperatura de fusión que oscila entre 59 y 64ºC y una temperatura de transición de vítrea de -60ºC, biodegradable y biocompatible con una excelente resistencia mecánica. Las características más importantes de la PCL es que a temperatura corporal presenta alta resistencia y elasticidad dependiendo del peso molecular, no tóxico y un tiempo de degradación entre 2-3 años[73]. Esta degradación se da por medio de microorganismos o por hidrolisis de su enlace éster alifático en condiciones fisiológicas[74].

Se han fabricado microesferas, películas, nanopartículas (Nps) y andamios de PCL por su capacidad para promover la regeneración ósea o el crecimiento tisular[75]. Los andamios fabricados con PCL son de dos tipos: andamios porosos y andamios fibrosos. Los métodos utilizados para la fabricación de andamios porosos son la lixiviación de porógenos, saturación y liberación de CO_2, impresión 3D, separación de fases y liofilización. Mientras que para fabricar andamios fibrosos se utiliza el método de electrohilado[76,77].

Los andamios de PCL han sido utilizados como portadores de factores de crecimiento o antibióticos para acelerar el crecimiento o la curación de los tejidos dañados, debido a que presentan una morfología, porosidad y propiedades mecánicas óptimas para la liberación del fármacos y crecimiento celular[78,79]. Los tamaños de poro necesarios para cada cultivo son 380-405µm para condrocitos y osteoblastos, 186-200µm para fibroblastos, 290-310µm para formación de hueso nuevo[80]. Su utilidad para el crecimiento celular/ IT *in vivo* y la liberación de fármacos es prometedora debido a su capacidad para mantener la integridad estructural durante un largo período de tiempo.

1.1.1.1.6 Hidrogeles naturales

Los hidrogeles naturales son redes tridimensionales de cadenas moleculares de materiales de origen natural como algas marinas y pardas, cultivos bacterianos, polisacáridos y proteínas, en un entorno rico en agua[28,81,82]. Dado su origen y, por ende, su alta biocompatibilidad, estos materiales tienen un gran potencial en la regeneración de tejidos humanos como cartílago, hueso, tendón, piel, tejidos neuronales y de corazón entre otros[83].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Respecto a los hidrogeles obtenidos a partir de polímeros sintéticos, los hidrogeles naturales poseen una serie de ventajas[84]:

- Mayor biocompatibilidad.
- Presentan ligandos/receptores en su estructura que permiten una mayor adhesión y proliferación celular.
- Presentan arquitectura fibrilar, de modo que mimetizan la MEC.
- Pueden ser reconocidos y procesados metabólicamente por el cuerpo, permitiendo su biodegradación por las células.

Los polímeros naturales más utilizados para la fabricación de hidrogeles se pueden dividir en cuatro tipos[56]:

- Proteínas y péptidos como el colágeno, la gelatina, la fibrina, la seda o la elastina.
- Polisacáridos: como el ácido hialurónico (HA), la celulosa, el alginato, la agarosa, el dextrano y el quitosano.
- Mezclas de proteínas-polisacáridos: colágeno/HA, laminina/celulosa y gelatina/quitosano.
- Ácidos nucleicos: ADN y ARN.

Esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de hidrogeles incluidos dentro de los tres primeros tipos de polímeros naturales principalmente, ya que proteínas y polisacáridos como el colágeno, la elastina, la fibronectina y el ácido hialurónico son componentes principales de la MEC humana[27,85] y, por lo tanto, se presentan como biomateriales idóneos para construir andamios poliméricos sintéticos en tres dimensiones, biocompatibles y biodegradables que mimeticen la MEC. En concreto, en este trabajo se han sintetizado hidrogeles simples y/o híbridos de gelatina, ácido hialurónico, colágeno y quitosano por lo que a continuación se comentan las principales características de los mismos.

a) Gelatina

La gelatina (Gel) es una forma de colágeno desnaturalizado (mezcla heterogénea de proteínas con una estructura de triple hélice) y parcialmente hidrolizado obtenida a partir de piel bovina o porcina (Figura 1.8), principalmente, siendo el mayor componente de la MEC de muchos tejidos como cartílagos, huesos, piel, ligamentos, tendones, vasos

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

sanguíneos, córnea y epitelio[86]. La gelatina se puede obtener en condiciones ácidas denominada gelatina tipo A o básicas denominándose gelatina tipo B[85,87]. Cuando la Gel se incuba a temperaturas inferiores a 23ºC se generan fuertes enlaces de hidrógeno intramoleculares transformando la estructura de la gelatina en un gel insoluble en agua, biocompatible y biodegradable y, por lo tanto, libre de posibles respuestas inmunológicas adversas. Esto hace que este tipo de geles estén ya aceptados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) para aplicaciones biomédicas[88]. La gelatina tiene sitios de escisión donde las proteasas pueden ejercer de manera más sencilla su actividad enzimática, dando lugar a la degradación de la proteína y, por tanto, de la red polimérica que forma, y de grupos funcionales/secuencia de reconocimiento que permiten su interacción con las células. En particular, en la gelatina está presente la secuencia Arg-Gly-Asp típica de las proteínas de adhesión de la MEC natural como la fibronectina[89,90], la cual permite una importante mejora de la adhesión celular a través de sitios específicas con las integrinas $\alpha_V\beta_3$ de la membrana celular. Además, promueve la adhesión de diferentes tipos de células y es fácilmente degradable debido a la presencia de secuencias proteicas sensibles a metaloproteinasas[91], lo que es esencial para permitir la deposición de la nueva MEC formada por la célula.

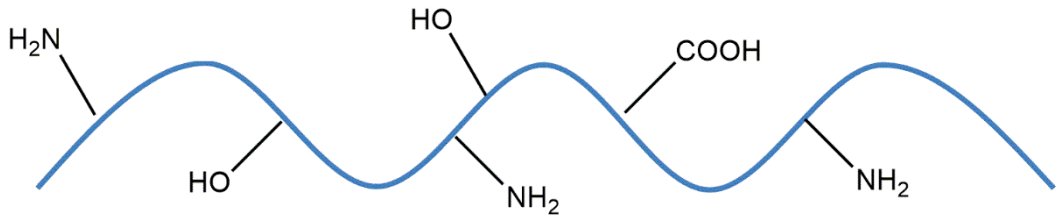


Figura 1.8-Estructura de la gelatina.

b) Ácido Hialurónico

El ácido hialurónico (HA) es un polisacárido lineal compuesto por unidades repetitivas no ramificadas de ácido β-1,4-D-glucurónico y β-1,3-N-acetilo-D-glucosamina, unidas por enlaces glicosídicos, y con pesos moleculares que rondan el rango de 100kDa hasta

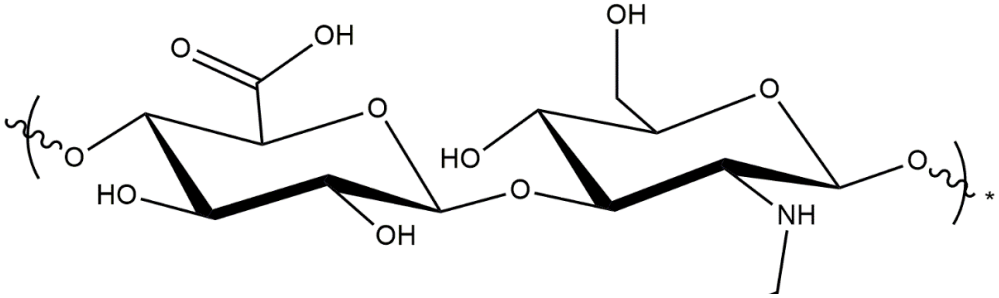


Figura 1.9.-Estructura del ácido hialurónico

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8MDa[92]. El HA presenta una carga global negativa y grupos funcionales como el ácido carboxílico, grupos hidroxilo y grupos N-acetilo que permiten su modificación química, tal y como se muestra en la Figura 1.9[83,93]. La principal característica del HA es su biocompatibilidad, ya que es uno de los principales componentes de la MEC en tejidos como el sistema nervioso central, cartílagos, fluidos sinovial y vítreo, cardíaco y tejido epitelial[94]. El HA es el principal responsable de la cicatrización de las heridas, además, de regular la formación de tejidos, la inflamación y la morfogénesis[95] gracias a su gran afinidad por los receptores de adhesión como el clúster de diferenciación 44 (CD44), molécula-1(ICAM-1) de adhesión intracelular y los receptores para motilidad mediada por HA (RHAMM)[96,97]. Otras propiedades del HA que lo hacen un material excelente para su empleo en la fabricación de hidrogeles son su alta capacidad de retención de agua y sus propiedades viscoelásticas. Por último, el HA puede ser fácilmente degradado gracias a la acción de las hialuronidasas.

c) Colágeno

El colágeno es la principal proteína de la MEC y su función es brindar soporte para el crecimiento celular y resistencia mecánica a los tejidos conectivos. El colágeno presenta tres principales características, siendo la primera la secuencia repetitiva de los aminoácidos $–(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$ con y sin interrupciones, la segunda la ocupación de las posiciones X (Prolina) e Y (forma hidrolizada de hidroxiprolina) y la tercera una triple hélice izquierda, que se forma a partir de tres cadenas α de poliprolina de idéntica longitud, lo que le da al colágeno una estructura cuaternaria única[98].

La triple hélice de colágeno tiene una estructura en espiral formada por tres cadenas de polipéptido α paralelas que se enrollan entre sí para generar una estructura similar a una cuerda con un peso molecular aprox. 300,000g mol^{-1} con una longitud de 280nm y con un diámetro de 1.4nm. Los enlaces de hidrógeno intramoleculares entre glicinas en cadenas adyacentes y los grupos hidroxilo de los residuos de hidroxiprolina estabilizan la triple hélice[99].

Existen al menos 29 variantes del colágeno que se diferencian entre si por sus cadenas y el peso molecular de sus componentes, que da lugar a características bastante heterogéneas. El colágeno más abundante es el colágeno de tipo I que existe como heterotrímero de dos cadenas α1 y una cadena α2, pero también como homotrímero de tres cadenas α1. Mientras que el colágeno tipo II, tipo III o tipo VII, existen

USC DE COMPOSTELA

exclusivamente como homotrímeros. Entre el 80-90% del colágeno del cuerpo humano es de tipo I, II o III. El colágeno tipo I, se presenta en forma de fibrillas alargadas que pueden tener más de 500μm de longitud, 500nm de diámetro y contener más de 107 moléculas[100].

El colágeno se ha utilizado para formar injertos de tejido, hidrogeles, esponjas, fibras, películas y esferas huecas para la regeneración de tejidos. La principal fuente de colágeno tipo I se extrae de la piel y los tendones de los mamíferos, mientras que el colágeno tipo II se extrae principalmente del cartílago de bovino, porcino y pollo[101].

Los hidrogeles basados en colágeno han sido ampliamente utilizados para la regeneración de tejidos debido a su abundancia, biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja respuesta inmunológica, entre otras características; sin embargo, sus deficientes propiedades mecánicas, baja elasticidad, estabilidad y termoestabilidad[102] han obligado a los investigadores ha buscar nuevas alternativas como la modificación de la estructura del colágeno. Así, los grupos funcionales presentes en el colágeno como las aminas y carboxilo se utilizan para modificar su estructura y crear redes tridimensionales (hidrogeles) con propiedades mecánicas similares a los tejidos mediante métodos físicos y químicos. Los métodos más utilizados para la reticulación química de los hidrogeles de colágeno son el uso de glutaraldehído, formaldehido, carbodiimida, genipina o fotopolimerización[103,104].

d) Quitosano

El quitosano (CS) es un polisacárido lineal compuesto por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidas con β-(1-4) distribuidas aleatoriamente, producido mediante la desacetilación exhaustiva de la quitina obtenida a partir de conchas de crustáceos (Figura 1.10)[105]. El quitosano es el biopolímero más abundante en la tierra después de la celulosa, con un peso molecular promedio oscila entre 50 y 1000kDa, además, es el único polímero ionizante debido a sus grupos amino por lo que ha sido utilizado en distintas aplicaciones como aceleración en la cicatrización de heridas, antimicrobiano, anticoagulante, antibacteriano, antifúngico, antitumoral y hemostático[104].

Las propiedades fisicoquímicas del quitosano dependen del grado de desacetilación (DA), que oscila entre el 50 y el 90%[106]. Las propiedades biológicas que presenta son su biocompatibilidad, biodegradabilidad, actividad antiinflamatoria, actividad

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

antibacteriana, actividad antitumoral e immunoestimulación. Las limitaciones del quitosano son causadas por su solubilidad, el pH, la temperatura y sus bajas propiedades mecánicas, sin embargo esta problema ha sido superado mediante una reticulación química o física del quitosano[107].

Los geles de quitosano reticulados físicamente mediante interacción hidrofóbica, complejamiento de polielectrolitos y procesamiento de congelación-descongelación tienen una gran ventaja debido a la ausencia de reticulantes químicos. Sin embargo, presenta varias desventajas como su inestabilidad, baja resistencia mecánica y difícil control del tamaño de los poros[108]. Además, los extremos libres de la cadena o los bucles de la cadena también están presentes como defectos transitorios de la red en los geles físicos[109].

Los hidrogeles de químicamente reticulados se forman por enlace covalente de los macrómeros de quitosano, mediante la reacción de sus grupos funcionales (como OH, COOH y NH_2) con agentes reticulantes[110].

Debido a las características antes mencionadas, el quitosano ha sido utilizado como material de apósito para heridas debido a que un apósito ideal para heridas debe proteger la herida de infecciones bacterianas, proporcionar un ambiente húmedo y cicatrizante y ser biocompatible.

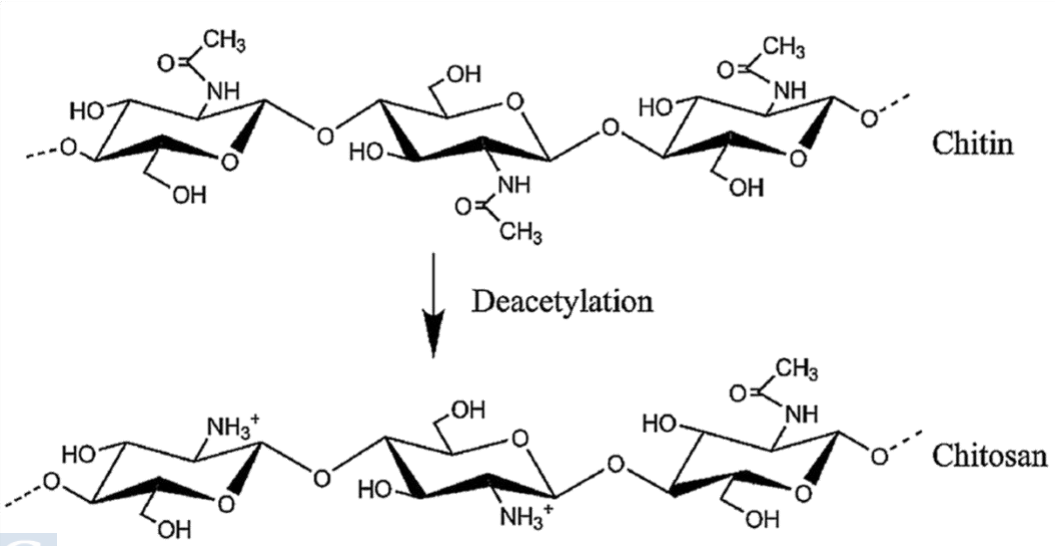


Figura 1.10.- Estructura del quitosano. Imagen reproducida de la referencia 105 Copyright (2018) con permiso de Elsevier.

1.1.1.1.7 Hidrogeles híbridos

En el contexto de esta Tesis Doctoral, las propiedades mecánicas de los hidrogeles son claves tanto para que puedan ser manipulados de forma adecuada para su implantación, así como, para desarrollar sus funciones en condiciones fisiológicas. La mayoría de los polímeros naturales no presentan las resistencias mecánicas adecuadas y por ello, son necesarias modificaciones químicas y/o físicas para mejorar la resistencia y dureza de los implantes[106]. Así, una alternativa para obtener andamios con las propiedades adecuadas son los hidrogeles híbridos formados por la combinación de dos o más polímeros de igual o diferente tipo. En concreto, en este trabajo se han sintetizado hidrogeles híbridos de gelatina y ácido hialurónico modificados químicamente por grupos metacrilo e hidrogeles de quitosano, ácido hialurónico y colágeno, que permitirán la formación de andamios con mejores propiedades físicas como la dureza, la degradación y la arquitectura de poros[111] para promover la bioactividad de los andamios, la adhesividad y las propiedades de proliferación celular[112], tal y como se comentará posteriormente.

Por otra parte, a pesar de las ventajas que muestran los hidrogeles de polímeros naturales como andamio en IT, estos presentan el gran inconveniente de poseer una estructura isotrópica, la cual limita su aplicación como plantillas biomiméticas de diversos tejidos del cuerpo humano, que están conformados por complejas estructuras con una elevada organización anisótropa[113–117] desde la nanoescala a la macroescala. y que les confiere propiedades mecánicas, físicas y ópticas particulares[118]. En los tejidos nativos, la señalización biológica se origina o, al menos se ve muy influenciada, a partir de la morfología celular que se define en respuesta a las propiedades mecánicas y estructurales de los tejidos, lo que dictamina y regula el destino celular, por lo que el control de los parámetros geométricos tridimensionales de los biomateriales empleados para andamiaje en IT es una de las estrategias más efectivas para regular la proliferación, migración y morfología celular.

En particular, la organización estructural anisótropa de las células, y de estas en los tejidos, proviene principalmente de la disposición de la MEC, como se comentó anteriormente. Así, la microestructura de la MEC puede mediar interacciones celulares clave en el nicho celular tales como la adhesión, migración, proliferación y diferenciación[119]. Por ejemplo, Lee *et al*. demostraron esta influencia mediante el desarrollo de superficies 2D con patrones micrométricos bien definidos (rejillas, círculos,

cuadrados, líneas) permitiendo el análisis de los efectos que la expansión y forma celular tienen en el desarrollo del linaje celular empleando células madre neuronales (NSCs, por sus siglas en inglés). Así, se observó que los patrones cuadrados permitían el aislamiento de las células, mientras que las líneas llevaban a interacciones células-célula unidireccionales y los patrones en forma de rejilla a interacciones bidireccionales. Después de una semana de incubación, se observó que la diferenciación celular de las NSCs estaba dictada por la forma del patrón y la geometría. Así, el patrón de rejilla mostró un porcentaje muy significativo de diferenciación celular comparado con el observado en los patrones con forma cuadrada[120].

No obstante, la respuesta celular también está altamente influenciada por características topográficas en el rango nanométrico, que son varios órdenes de magnitud más pequeños que el tamaño celular. De hecho, las células en su ambiente *in vivo* interaccionan con componentes extracelulares en la nanoescala como, por ejemplo, moléculas de adhesión transmembranal (*e.g.* integrinas), uniéndose al medio adyacente mediante interacciones sustrato-célula. Cuando el microambiente extracelular es examinado por la célula mediante sus proyecciones membranales *(e.g.,* filopodia), se activan diferentes mecanismos de retroalimentación en respuesta a las cuñas nanotopográficas que aquellas detectan, lo que conduce a cambios en la dinámica del citoesqueleto y de las rutas de señalización que terminan por influenciar el comportamiento y fenotipo celular[121]. Por ello, la creación de estas estructuras jerárquicas anisótropas organizadas en los hidrogeles influenciaría directamente el alineamiento y orientación de las células mediante la inducción de cambios morfológicos celulares a lo largo de los patrones[122]. Este proceso lleva al reposicionamiento del citoesqueleto, a alteraciones del núcleo, y a cambios en los niveles de expresión de genes como, por ejemplo, de aquellos implicados en los procesos de diferenciación celular[123].

En los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias de fabricación y modificación para preparar biomateriales capaces de recrear la microestructura anisótropa deseada, estableciendo de esta manera una plantilla tisular biomimética que simule la arquitectura nativa del tejido. Así, para generar nano/microestructuración anisótropa en hidrogeles poliméricos se han empleado las siguientes metodologías/aproximaciones:

- El enfriamiento direccional, que consiste en la solidificación de una disolución del polímero, generalmente en agua, controlando la velocidad de crecimiento y la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

orientación de los cristales del disolvente y obteniendo andamios con poros unidireccionales después de la sublimación de los cristales y una posterior sinterización de la estructura obtenida. El tamaño de poro se puede controlar a través del tamaño de los cristales del disolvente, que se puede ajustar variando la concentración de la disolución[124].

- La preparación de andamios híbridos con componentes porosos degradables -en los que es posible generar poros en el interior de los hidrogeles, que permiten el crecimiento y la migración de las células, como han demostrado recientemente, por ejemplo, Wang *et al*. Estos investigadores desarrollaron hidrogeles de gelatina metacrilada en presencia de Nps de óxido de silicio porosas de 70nm que permitieron la obtención de hidrogeles con poros macroscópicos de ~70μm pero con un pobre control de su distribución dentro de la matriz[125].

- La compresión unidireccional y la difusión iónica de disoluciones poliméricas precursoras. En estas técnicas, dos o más reactivos se difunden cuando se liberan localmente en diferentes posiciones, dando lugar a patrones de concentración espacial que pueden inducir la formación de estructuras locales[126]. Por ejemplo, Dobsahi *et al.* obtuvieron hidrogeles líquido-cristalinos en tubos semipermeables a través de la diálisis de una disolución de ADN en una disolución catiónica multivalente, en donde las biomoléculas con estructura semirígida y cargas negativas formaban complejos con el catión multivalente. La difusión preferencial en una dirección de los iones catión en el tubo de diálisis indujo la orientación molecular y la gelificación física para formar estructuras simétricas cilíndricas en esa dirección[127].

- El ensamblaje controlado de microgeles, por ejemplo, mediante ensamblaje de abajo a arriba, que permite un mejor control de la arquitectura del hidrogel que las metodologías anteriores. Así, por ejemplo, Dinh *et al*. añadieron nanocilindros de oro a microgeles de gelatina metacrilada (GelMA). Las propiedades ópticas intrínsecas de las Nps metálicas fueron empleadas para guiarlas bajo irradiación lumínica en el infrarrojo cercano de cara a obtener su ordenamiento deseado. Así, cambiando el tamaño del punto de luz láser fue posible controlar el ensamblaje de los bloques constituyentes (las Nps) asegurando el entrecruzamiento de las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estructuras porosas creadas formando los patrones deseados[128]. Sin embargo, estas irradiaciones de baja intensidad pueden presentar dificultades para la construcción de tejidos y órganos puesto que pueden no ser lo suficientemente energéticas para asegurar la adecuada penetración en los andamios diseñados.

- Métodos litográficos como el modelado químico multifotónico y la fotodegradación, se basan en reacciones fotoquímicas en tres dimensiones en las que se producen absorciones no lineales del fotoiniciador[129] y producen de forma selectiva patrones muy precisos de moléculas/ligandos de adhesión en el interior de un hidrogel, pero que solo se pueden utilizar con ciertos tipos de materiales y tienen, en gran medida, un bajo rendimiento. Además, las células están expuestas a productos químicos e irradiación de media/alta energía durante el proceso de fabricación[130].

A pesar de los resultados obtenidos con estas aproximaciones, en la mayoría de los casos las estrategias propuestas no permiten el control deseado sobre la arquitectura del hidrogel para obtener materiales adecuadamente nano/microestructurados para IT. Además, estas metodologías a menudo requieren el empleo de técnicas de post-procesado invasivas para manipular la arquitectura del hidrogel, y tienen un potencial limitado para poder ser controladas externamente.

Por ello, la modificación de los hidrogeles con diferentes nano- y/o micromateriales es una estrategia eficiente de cara a reproducir dentro de los mismos los complejos patrones estructurales observados en los tejidos nativos, imitando de este modo sus propiedades y características físico-químicas anisótropas[131–134] sobre todo cuando pueden ser manipulados para orientarse de la forma adecuada para reproducir la estructura deseada como, por ejemplo, mediante la aplicación de estímulos externos, como campos eléctricos[135], esfuerzos de cizalla[136] o radiaciones lumínicas[128].

En el caso particular de este trabajo, la creación de nanoestructuración en los hidrogeles poliméricos se ha realizado a partir de la aplicación de un campo magnético externo sobre Nps esféricas magnéticas basadas en óxido de hierro incorporadas en Nps de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) y en microfibras poliméricas electrohiladas, tal y como se comentará en el Capítulo 6 del presente trabajo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2 Ingeniería de Tejidos: Andamios sometidos a estudio

Como se comentó al inicio de este Capítulo, los andamios ideales para IT deben ser biocompatibles, biodegradables, permitir la adhesión, retención y crecimiento celular, y también la difusión de nutrientes y metabolitos además de tener unas propiedades mecánicas adecuadas[137–139].

Un aspecto importante a tener en cuenta en la ingeniería de tejidos es el hecho de que el tipo de célula y el andamio deben combinarse de forma adecuada para su objetivo final, esto es, para poder reproducir/obtener el tejido/órgano concreto, es decir, debe tener en cuenta la heterogeneidad de los mismos de forma individual. De este modo, la IT tiene que comenzar por entender el comportamiento celular subyacente, el microentorno específico de los tejidos, y la causa de su degradación y lesión. Así, el comportamiento de las células de diferentes tejidos está relacionado con diversos factores como la topografía física o la rigidez de la superficie, gradientes de sitios de adhesión celular, campos eléctricos y factores químicos pudiéndose, incluso, producir efectos contrarios en células distintas bajo los mismos estímulos[140]. Por ello, en los últimos años se están haciendo grandes esfuerzos en mimetizar los microentornos de las células fabricando estructuras de modo que las funciones específicas de las mismas dependan de las señales físicas.

Uno de los grandes retos actuales es superar las desventajas asociadas al uso de hidrogeles, tales como su inestabilidad y falta de elasticidad, condiciones imprescindibles para su empleo en condiciones fisiológicas para obtener el tejido objetivo[141]. Existen diversos trabajos que obtienen hidrogeles de origen natural de alginato y colágeno que permiten imitar el entorno biológico, pero su aplicación médica se ve limitada por la baja cantidad de oxígeno y nutrientes que llegan a las células[95,142,143]. Además, en estos sistemas las interacciones superficiales hidrogel-células están limitadas, lo que conlleva a una restricción en las posibilidades de regeneración tisular. En este contexto, los hidrogeles de polímeros naturales de polisacáridos y proteínas, en concreto de Gel, HA, colágeno y CS han sido ampliamente utilizados en el campo de medicina regenerativa ya que permiten mimetizar la MEC[34,107,144].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

La Gel sin modificación química permite la formación de hidrogeles mediante el entrecruzamiento de su estructura con distintos agentes químicos, como la genipina[145].

Sin embargo, estos agentes deben utilizarse en pequeñas cantidades debido a su potencial citotoxicidad y al efecto inflamatorio que presentan cuando se degradan rápidamente. Además, la principal limitación de los hidrogeles basados en Gel para su uso como andamiajes está relacionada principalmente con sus pobres propiedades mecánicas y térmicas[87,146], que son muy importantes para configurar estructuras que imiten la MEC de forma adecuada y estable[146]. La gelatina se puede entrecruzar fácilmente cuando se modifica por la metacrilación de los residuos de lisina de la estructura de la proteína a través de la exposición a radiación UV para obtener hidrogeles de GelMA[95]. La metacrilación de la Gel ayuda a formar una estructura de andamio en 3D térmicamente resistente y rígida a la temperatura del cuerpo (37ºC), al tiempo que mejora las propiedades físicas del hidrogel resultante como la rigidez, la porosidad y la degradación y, con ello, se promueve la bioactividad de los andamios, la adhesividad y las propiedades de proliferación para la regeneración de tejidos específicos como de cartilago[147], tejido oseo[148] y tejido nervioso[149], entre otros. Por ejemplo, los andamios basados en GelMA se han utilizado con éxito para desarrollar modelos de cultivo y andamios que mimetizan el tejido de las válvulas cardiacas[150], para aumentar la microvascularización endotelial[28], para formar canales microvasculares[151], y para acelerar la formación de hueso endocondrial[35], entre otras aplicaciones en ingeniería tisular.

Por su parte, el HA es un polímero no adhesivo, lo que impide la proliferación celular y que carece de grupos funcionales capaces de generar/provocar señales bioquímicas específicas para estructurar una regeneración tisular[152]. Sin embargo, los grupos carboxilos e hidroxilos del HA son fácilmente modificables químicamente por metacrilación dando lugar a la formación de hidrogeles de HA metacrilados (HAMA) después de su exposición a radiación de luz UV corrigiendo, de este modo, algunas de las limitaciones del HA no modificado[153]. Los hidrogeles de HAMA han demostrado tener mejores propiedades mecánicas y químicas en comparación con los de HA puros tales como una mayor rigidez, una lenta degradación y una buena biocompatibilidad[154]. Estas características se pueden modular dependiendo del grado de metacrilación que se obtenga en la estructura del HAMA por lo que puede promover la proliferación, migración y diferenciación celular[150] y, con ello, adaptarse para la regeneración de distintos tejidos[155]. Así, por ejemplo, Bian *et al.* observaron que el aumento del entrecruzamiento de HAMA promovió la diferenciación de células madres mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) para la regeneración de cartílago[156]. Los hidrogeles de HAMA se han utilizado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

también, por ejemplo, para estimular la generación de elastina en células valvulares intersticiales, que podrían dar lugar a una ventaja significativa para la fabricación de válvulas cardíacas artificiales[152].

Aunque tanto los hidrogeles de GelMA como el HAMA se emplean en IT tal y como se ha comentado, estos también presentan una serie de limitaciones. En el caso de la GelMA este es un material relativamente débil que se degrada rápidamente, incluso en ausencia de células y, por lo tanto, lo excluye para su uso en experimentos/aplicaciones cuando se necesitan andamiajes que tengan una duración/mantengan sus propiedades a largo plazo. Por ello, una estrategia para mejorar las propiedades de este tipo de andamios es sintetizar hidrogeles híbridos de GelMA enriquecidos con otros componentes de la MEC, como es el HA, con el fin de modificar las propiedades de los andamios y controlar la respuesta celular[157–159].

Así, hidrogeles híbridos compuestos por GelMA y HAMA han demostrado poseer excelentes propiedades estructurales y fisicoquímicas. Por ejemplo, Camci-Unal *et al.*[91] obtuvieron diferentes hidrogeles híbridos GelMA-HAMA y estudiaron la influencia de su composición en el hinchamiento, la degradación y las propiedades de compresión de estos andamios, además de su biocompatibidad celular y adhesividad. Estos investigadores observaron que se pueden obtenerse diferentes grados de hinchamiento de los hidrogeles ajustando la concentración total de polímero y de gelatina; así mismo, aumentando la concentración de polímero se mejora la rigidez del hidrogel que, a su vez, influye en su degradación y compresibilidad. Por otro lado, se ha observado que la proliferación celular en cultivos celulares en modelos 2D con este tipo de hidrogeles se ve aumentada a medida que se incrementa su rigidez, mientras que la capacidad de proliferación en cultivos 3D está correlacionada con tamaños de poro elevados (>200 μm) y menor rigidez. En otro trabajo, Hjortnaes *et al.* estudiaron la diferenciación del fenotipo de las células intersticiales valvulares en el interior de hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA. Estos autores encontraron que hidrogeles más blandos y menos entrecruzados promovían la diferenciación espontánea de fibroblastos inactivos a miofibroblastos, mientras que los más rígidos requerían la administración del factor de diferenciación TGFβ1 para lograr niveles de diferenciación celular similares[160]. Además, Kuo *et al.* sintetizaron microhidrogeles híbridos de GelMA-HAMA para controlar la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas (iPS) en células similares a neuritas. Observaron que las concentraciones más elevadas de microhidrogel (altas razones de GelMA)

mejoraban la encapsulación celular, mientras que las más bajas (altas razones de HAMA) aumentaban el grado de hinchamiento del andamio y, como consecuencia, se obstaculizaba la siembra y la propagación de las células[161].

Por otro lado, otro tipo de andamios apropiados para direccionar el comportamiento celular deseado y fortalecer mecánicamente los tejidos diseñados, son los obtenidos a partir de la mezcla de CS con uno o más biopolímeros. El quitosano, CS, es un polisacárido seminatural lineal que se obtiene de la quitina a través de una desacetilación alcalina[95]. Es un polímero muy hidrófilo, barato y altamente disponible que muestra una importante biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad hacia las células y los tejidos[97], además de actividades antimicrobianas[96] y antioxidantes[162]. Por otro lado, como consecuencia de naturaleza catiónica, el CS presenta excelentes propiedades mucoadhesivas y de gelificación[96] y puede servir como análogo de gliosaminoglicano (GAG) para estimular procesos celulares por ejemplo, de regeneración de huesos, cartílagos o piel[163]. Sin embargo, para determinadas aplicaciones de la IT, los andamios de CS pueden carecer de suficiente resistencia mecánica, tiempos de bioreabsorción excesivamente largos y no pueden proporcionar una interfaz amigable a las células debido a la falta de receptores de reconocimiento y señalización para facilitar los procesos de adhesión, proliferación y/o diferenciación celular con el fin de regenerar algunos tejidos específicos[164].

De especial interés son, por ejemplo, los hidrogeles híbridos formados por el ácido hialurónico y/o el colágeno (Coll). La combinación del quitosano catiónico y el ácido hialurónico aniónico permite la formación de polielectrólitos (PECs) complejos a través de enlaces iónicos[165] que aumentan la estabilidad del andamio, mejoran la adhesión celular e incrementan la fuerza mecánica del material resultante. Así, hidrogeles de CS-HA obtenidos por este procedimiento se han utilizado para fabricar andamios porosos en 2D y 3D para regeneración de pulpa dental[166,167], abdominal[168], cartílago[166,169,170] y hueso[171], así como para cicatrización de heridas y para configurar matrices *in vitro* 3D para evaluar respuestas farmacológicas dependientes de la dosis y expresiones génicas de tumores, como por ejemplo, en el caso del glioblastoma[172,173].

Por otro lado, el Coll es otro biopolímero ampliamente utilizado para la construcción de andamios, ya que es el principal componente del tejido conectivo, responsable de la fuerza de los tejidos de piel, huesos, tendones y cartílagos[174]. Su incorporación en andamios

permite la generación de sitios específicos de adhesión celular tales como secuencias de arginina-glicina-aspartato (RGD) que ayudan a promover la adhesión celular, crecimiento y diferenciación[143]. Sin embargo, su rápida biodegradación y baja fuerza mecánica hace necesaria su combinación con otros biopolímeros tales como el quitosano y/o el ácido hialurónico. En este sentido, se han probado andamios híbridos de Coll-CS como biomateriales potenciales para cicatrización de heridas y regeneración de piel[175–177], tratamiento de lesiones cerebrales traumáticas[178], recuperación de axón neuronal[179], modelización de vascularización[180], ingeniería de tejidos miocardial[181] y reparación de hueso[182,183]. Por otro lado, también se han probado andamios CS-HA-Coll para favorecer la osteoinducción para regeneración de hueso y para controlar la diferenciación de células madre y orientación para la reparación de la médula espinal[184].

A pesar de todos los estudios previos realizados hasta la fecha, la relación entre las propiedades estructurales, físico-químicas y mecánicas de hidrogeles CS/HA, CS/HA/Coll y GelMA-HAMA no se ha establecido de forma completa y sistemática por lo que, en los Capítulos 3 y 4, se ha trabajado en la optimización de estas propiedades, presentándose los resultados obtenidos. Asimismo, el Capítulo 3 también presenta los resultados de viabilidad y proliferación celular de los andamios de CS-HA y CS-HA-Coll.

1.3 Ingeniería de tejidos: Capacidad de adhesión, proliferación y diferenciación celular de los andamios sometidos a estudio

El inicio del uso de hidrogeles como materiales para aplicaciones médicas se remota a los años 60[185], produciéndose grandes avances en sus propiedades en los años posteriores[186,187] con el objetivo de emplearlos para localizar y controlar la liberación de agentes terapéuticos y con ello, optimizar las dosis de fármacos administrados respecto a la liberación tradicional, protegerlos de la degradación enzimática y aumentar su tiempo de circulación en la sangre. Para ello, los hidrogeles se fueron haciendo *"inteligentes"*[188] comenzando a actuar bajo ciertos estímulos externos o internos como cambios de pH, de temperatura o de hinchamiento que fomentan, por ejemplo, cambios en la estructura del hidrogel y con ello una liberación controlada del fármaco según las necesidades del paciente y permitiendo, de este modo, una minimización de los efectos secundarios, y mejorando, así, su calidad de vida[189]. El control en la liberación del fármaco viene determinado por la forma en la que este se incorpora en el hidrogel[188]. Así, por ejemplo, cuando las moléculas bioactivas presentan uniones covalentes con el hidrogel, la

USC DE COMPOSTELA

liberación se produce por mecanismos químicos o enzimáticos como reacciones químicas, cambios de pH o estímulos externos como la luz[190]. Por otra parte, cuando la encapsulación del fármaco es por interacciones físicas, la liberación se produce por cambios en la estructura del hidrogel debidos a procesos de deshinchamiento provocados, por cambios de pH o temperatura[191].

Sin embargo, aunque los hidrogeles sensibles a estímulos han supuesto un avance en la liberación de fármacos, todavía tienen algunas limitaciones respecto, por ejemplo, a sus propiedades mecánicas, velocidades de liberación o encapsulación de fármacos hidrófobos[192]. Por ello, en los últimos tiempos se están mejorando/reforzando sus propiedades para aplicaciones biomédicas con la incorporación por entrecruzamiento físico o de forma covalente con partículas de diferentes tipos como poliméricas, metálicas o nanomateriales basados en carbono[193,194], siendo de interés en este trabajo las partículas poliméricas.

Las Nps poliméricas como dendrímeros, polimersomas, micelas poliméricas, nanogeles y partículas poliméricas núcleo-coraza se han utilizado principalmente en la administración de fármacos ya que presentan estructura esférica, alta capacidad para encapsular fármacos hidrófobos o hidrófilos y liberar de forma controlada dichas cargas bioactivas al lugar de acción deseado respondiendo a estímulos fisiológicos o externos[194]. Una vez incorporadas las partículas en la matriz del hidrogel, los procesos de liberación se pueden controlar y ralentizar a través de una liberación directa del agente bioactivo cargado en las partículas en el hidrogel para su posterior difusión a través del mismo (Figura 1.11a), mediante una liberación lenta de las partículas cargadas en el hidrogel y por lo tanto del fármaco (Figura 1.11b) o también por una combinación de ambos mecanismos[195], todo ello en función del tamaño y composición de la partícula, de la composición y tamaño de poro del hidrogel y/o del carácter del fármaco[196].

Por su parte, la encapsulación de fármacos hidrófobos en micelas o partículas poliméricas como polímeros ramificados, liposomas o ciclodextrinas, permite incrementar su solubilidad y por lo tanto controlar su acción terapéutica en función de la concentración[195]. En este sentido, Allen *et al.*[197] realizaron un estudio comparativo de liberación del fármaco acetato de dexametasona (DMSA) directamente en el hidrogel y solubilizándolo previamente en micelas poliméricas de poli(etileno glicol)-poli(ε-caprolactona) (PEG-PCL) observando que la liberación pasa de 3 días en el primer caso

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

hasta 30 días en el segundo. Esta diferencia se vincula al aumento de contenido de agua en el hidrogel por la presencia de la corona hidrófila de PEG que incrementaría la hidrofobicidad del conjunto hidrogel-micela. Zhong *et al.*[198] sintetizaron un sistema dual formado por seroalbúmina humana directamente inyectada en un hidrogel de alginato y microesferas de poli(D,L-láctico) en las que se encontraba encapsulado el fármaco hidrófobo ácido glicirrhetinico embebidas en el mismo.

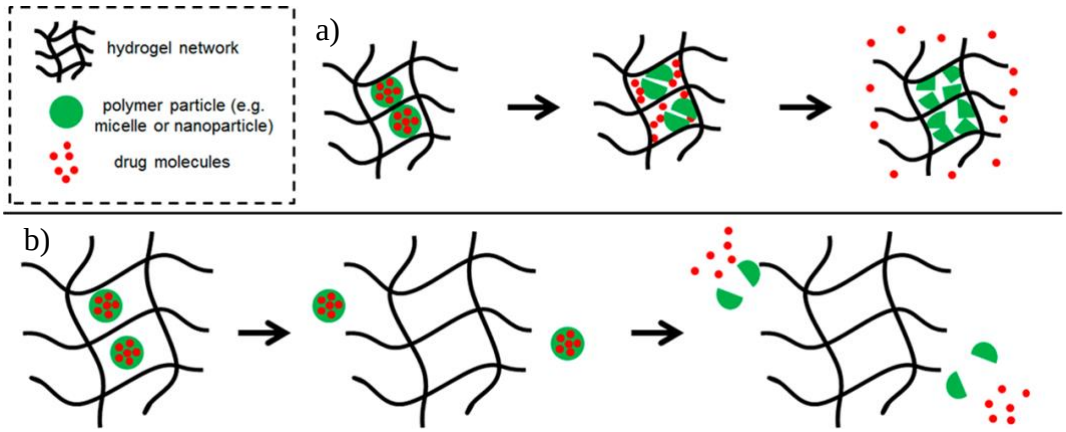


Figura 1.11.- Representación esquemática de los mecanismos de liberación de agentes bioactivos encapsulados en partículas poliméricas embebidas en matrices de hidrogel: a) liberación del fármaco dentro de la matriz de hidrogel y posterior difusión y b) liberación de las partículas cargadas con el fármaco a través de la matriz de hidrogel y posterior liberación por degradación de las partículas. Imagen reproducida de la referencia de 196 Copyright (2016) con permiso de American Chemical Society.

Por otro lado, en los últimos años estos hidrogeles híbridos se están presentando como potenciales plataformas para la IT, ya que por un lado los hidrogeles en si mismos pueden usarse como soportes para las células, tal y como ya se ha comentado, y por otro, las partículas embebidas en ellos, como materiales para encapsular diferentes sustancias biológicamente activas para la modulación celular como factores de crecimiento u otras citoquinas o proteínas de adhesión. En concreto, los factores de crecimiento se degradan muy rápidamente en condiciones fisiológicas, por lo que la administración externa presenta importantes limitaciones como: i) su rápida inactivación administrada *vía* intravenosa, ii) su baja adsorción transdermal por su tamaño y iii) su degradación hidrolítica y proteolítica por administración oral, y que se pueden superar con su encapsulación previa en partículas con una posterior liberación por una combinación de mecanismos de difusión y/o degradación[199]. Por ejemplo, Chen *et al.*[200] encapsularon dos tipos diferentes de factores de crecimiento, proteína morfogenética de hueso (BMP-2) y factores de crecimiento de insulina (IGF-1), en partículas de gelatina ácidas y básicas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

embebidas en hidrogeles de dextrano metacrilado glidicilo/gelatina observando que este sistema facilitaba la fijación, proliferación y diferenciación celular de manera sinérgica. Por otro lado, Kim *et al.*[201] consiguieron la liberación del factor endotelial vascular (VEGF) para revascularización a partir de hidrogeles de fibrina complejados con partículas de PLGA con heparina. Por otro lado, el fármaco hidrófobo Paclitaxel se solubilizó en micelas de Polaxamer 407 que se embebieron en hidrogeles de quitosano observándose en estudios *in vivo* la reducción en la velocidad de crecimiento de un tumor y de los efectos secundarios en comparación con el Paclitaxel en disolución[202].

En base a su potencial uso en IT, en esta Tesis Doctoral se procederá a la síntesis y caracterización de hidrogeles simples e híbridos de GEMA y HAMA con el fármaco hidrófobo antiinflamatorio dexametasona, DEX, encapsulado en Nps de PLGA.

1.3.1 Nps poliméricas de ácido poli(láctico-co-glicólico), PLGA

Las Nps formadas por el poli(ácido láctico-co- ácido glicólico) (PLGA, por sus siglas en inglés) han sido ampliamente utilizadas para la encapsulación de fármacos por su biocompatibilidad y biodegradabilidad tal y como demuestra su aprobación por la FDA[203]. El PLGA es un copolímero biocompatible que se caracteriza por presentar cadenas lineales y saturadas, velocidad de biodegradación constante, resistencia mecánica, hidrofobicidad y comportamiento termoplástico. El PLGA es un copolímero que está formado por un centro asimétrico de poli (ácido láctico) (PLA) conectado de forma alternante con poli (ácido glicólico) (PGA)[204], tal y como se muestra en la Figura 1.12. El proceso de polimerización se produce por la apertura de los anillos cíclicos de

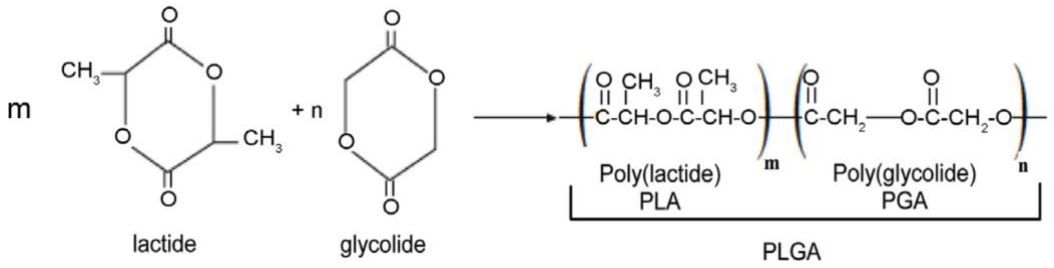


Figura 1.12.- Estructura química de los dímeros, polímeros y reacción de copolimerización del PLGA. Imagen reproducida con permiso de la referencia 197 Copyright (2015) con permiso de Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology.

dímeros de ambos monómeros por la acción de los iniciadores de la reacción. Los monómeros pueden encontrarse en distintas proporciones y esto es un factor importante debido a que determina la hidrofilia y la velocidad de degradación, en donde se ha

demostrado que el aumento del porcentaje de PGA en los oligómeros acelera la pérdida de peso del polímero. Como regla general, un mayor contenido de PGA conduce a tasas de degradación más rápidas, siendo la proporción 50:50 de PLA/PGA la más utilizada en nanomedicina debido que exhibe la degradación más rápida[205,206]. Por ejemplo, M. Cascone *et al.* encapsularon dexametasona en Nps de PLGA de distintas razones de PLA:GA (50:50 y 75:25) con un peso molecular de 40-75,000 Da. Se observó que las Nps de razón 50:50 presentaban una mayor velocidad de liberación del fármaco que aquellas formadas con la proporción de 75:25. Estas Nps de PLGA fueron incorporadas a hidrogeles compuestos de PVA puro o mezclado con dextrano, viéndose la liberación de dexametasona a través el hidrogel era mayor en presencia del dextrano[207].

Los métodos más comunes para formar Nps de PLGA son la evaporación del disolvente por emulsión simple, por emulsión doble y la nanoprecipitación. En el primer caso, la emulsión está formada por una fase orgánica y otra acuosa (o/a), y permite encapsular fármacos insolubles en agua. La técnica de doble emulsión consiste en dos fases acuosas y una orgánica (a/o/a), siendo este método el más utilizado para encapsular fármacos solubles en agua[208]. La técnica de nanoprecipitación consiste en un estabilizador que evita la agregación de las nanopartículas y se basa en la deposición interfacial del polímero de un disolvente semipolar miscible en agua. Estas partículas son colectadas por centrifugación o removiendo el disolvente mediante diálisis[209].

El PLGA se degrada lentamente mediante hidrólisis ácida una vez en contacto con el cuerpo humano dando lugar a elementos biocompatibles y metabolizables como son el ácido láctico y el ácido glicólico, que se eliminan del cuerpo por el ciclo del ácido cítrico sin afectar al funcionamiento normal de las células[203]. Por otro lado, la liberación farmacológica en las Nps de PLGA se produce por la difusión o degradación de la matriz polimérica[74], siendo esta última dependiente de la composición y peso molecular del polímero de bloque e influyendo, por lo tanto, en la velocidad de liberación del fármaco encapsulado[210].

Concretamente, en esta Tesis Doctoral se presentan los resultados de la encapsulación del fármaco antiinflamatorio e hidrófobo dexametasona en partículas de PLGA, a su vez embebidas dentro de hidrogeles híbridos GelMA-HAMA. Así, el Capítulo 5 mostrará los resultados de una liberación controlada y sostenida de DEX a través de la matriz del hidrogel para inducir la diferenciación de célula madre mesenquimales (MSC) en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

osteoblastos, de tal manera que se induzca la producción de calcio y el posterior proceso de calcificación.

1.4 Ingeniería de tejidos: Micro y nanoestructuración de los andamios sometidos a estudio en presencia de Nps magnéticas (MNPs)

Como se ha comentado a lo largo de este Capítulo, las diferentes estrategias desarrolladas en el campo de la IT a lo largo de las últimas décadas tienen el objetivo de reparar tejidos dañados por lesión o enfermedad, reduciendo, además, el tiempo de curación y las complicaciones médicas asociadas a los tratamientos actuales.

En este sentido, los hidrogeles híbridos con propiedades que respondan a estímulos magnéticos aparecen como biomateriales emergentes con funcionalidades adicionales ya que permiten un control remoto no invasivo sobre su arquitectura y propiedades. La aplicación de un campo magnético externo, combinado con la incorporación de materiales magnéticos en la estructura del hidrogel es una aproximación prometedora para crear biomateriales con arquitecturas anisótropas controlables[211]. Además de ser usados para generar la arquitectura deseada, los materiales magnéticos incorporados en los hidrogeles pueden ser también utilizados para llevar a cabo una estimulación magneto-mecánica continua de las células incorporadas en la estructura durante el tiempo de maduración de los andamios. Es decir, una vez constituidos los hidrogeles con materiales magnéticos incorporados, la estimulación remota de estos puede ser utilizada para proporcionar a las células próximas las señales biomecánicas adecuadas para controlar su comportamiento gracias a la deformación y movimiento magnéticamente inducidos del hidrogel cuando el material magnético se incorpora en el andamio. A este respecto, para conseguir la distribución deseada del material magnético dentro de los hidrogeles los campos magnéticos aplicados son típicamente magnetostáticos. Bajo su presencia, los materiales magnéticos están sujetos a fuerzas uniformes, lo que permite alcanzar la anisotropía deseada controlando la intensidad, dirección, y duración del estímulo externo. Por el contrario, para inducir la estimulación magneto-mecánica de las células usualmente se deben emplear campos alternos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La aplicación de campos magnéticos externos puede ser usada para fabricar estructuras anisótropas en hidrogeles y conseguir la estimulación magneto-mecánica remota de las células encapsuladas, lo que puede utilizarse para controlar sus procesos de crecimiento, migración, proliferación y diferenciación en diferentes linajes, permitiendo la generación de andamios con características físico-químicas y biológicas que reproduzcan las condiciones de los tejidos nativos.[212–215]. Curiosamente, incluso en la ausencia de material magnético en el hidrogel, la aplicación de campos magnéticos genera una estimulación magnética de los receptores superficiales celulares y la consiguiente activación de cascadas de señalización celular[216].

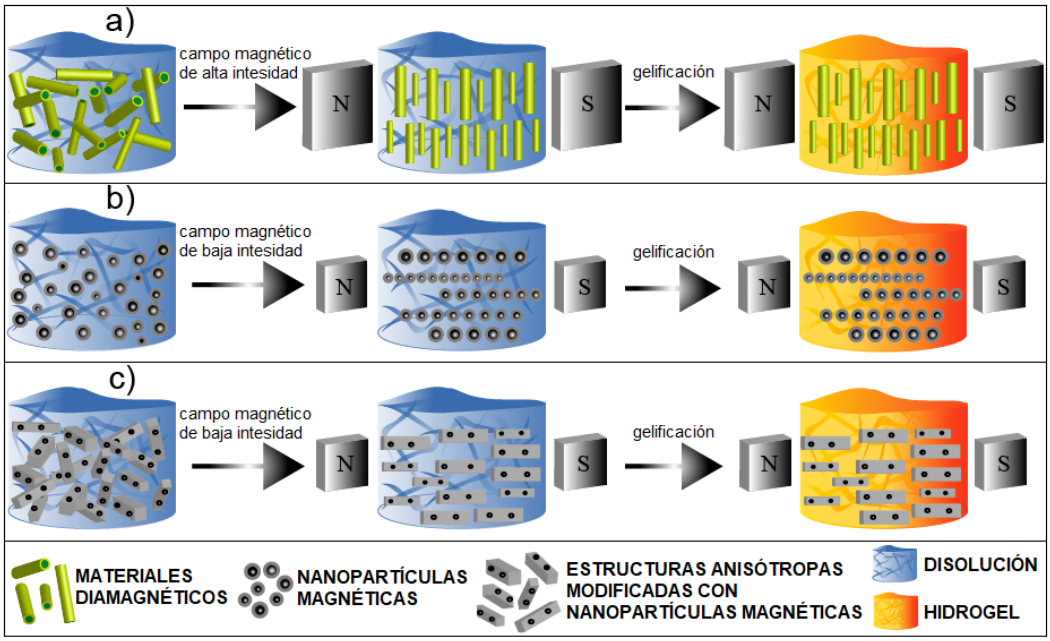


Figura 1.13.- Esquema mostrando los principales tipos de materiales utilizados para la fabricación de andamios magnéticos con arquitectura anisótropa. Imagen reproducida de la referencia 217 Copyright (2021) con permiso de American Chemical Society.

Para crear hidrogeles anisótropos sensibles a estímulos magnéticos empleando la organización de los bloques constituyentes como potenciales elementos para modificar las propiedades físicas de aquellos, se pueden usar dos grandes grupos de (nano)materiales, tal y como se puede observar en la Figura 1.13[217]:

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

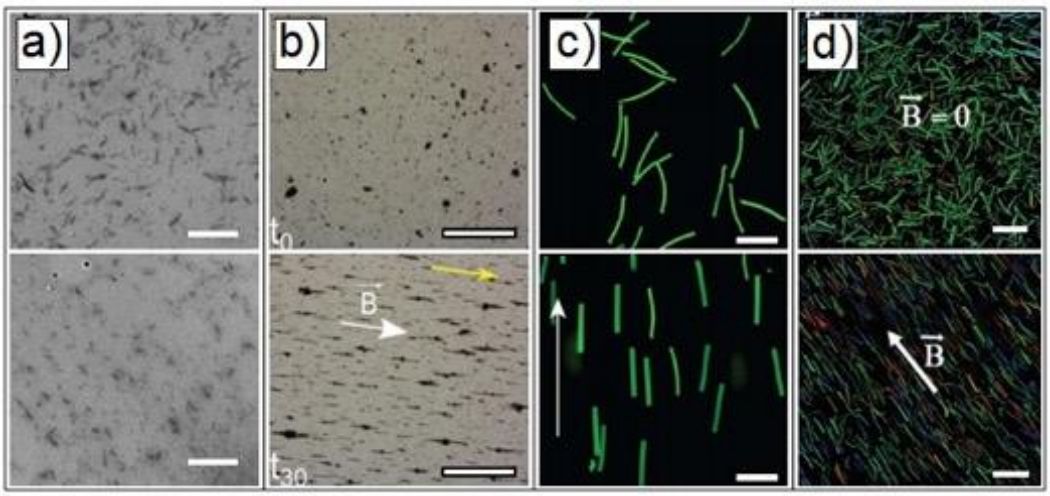


Figura 1.14.- Imágenes de microscopía de hidrogeles anisótropos preparados mediante la incorporación de materiales sensibles a estímulos magnéticos y la consiguiente aplicación de campos magnéticos externos. Las imágenes superiores son de las muestras en condiciones estáticas mientras que las inferiores son de las muestras bajo el efecto de un campo magnético. a) Imágenes de TEM crioseccionadas de hidrogeles de poli(oligoetilenglicol) metacrilado con nanocristales de celulosa diamagnéticos incorporados en condiciones estáticas y expuestos a un campo magnético de 1.2 T durante el proceso de gelificación (Escala = 1 mm). Reproducido de referencia 224 Copyright (2017) con permiso de la American Chemical Society; b) Imágenes de "time-lapse" de filamnetos de MNPs de maghemita en disoluciones de gelatina metacrilada bajo la acción de un campo magnetostático. Inicialmente, las MNPs están dispersas al azar, y se ensamblan a lo largo de las líneas del campo magnético cuando este se aplica (Escala = 500 mm). Imagen adaptada de la referencia 229 Copyright (2018) con permiso de Wiley-VCH; c) Imágenes de microscopía óptica de microgeles de forma elongada de poli(óxido de etileno)-stat-poli(óxido de propileno) modificados con MNPs en condiciones estáticas y bajo un campo magnético de 100 mT (Escala = 50 mm). Imagen adaptada de la referencia 241 Copyright (2017) con permiso de la American Chemical Society; d) Imágenes de fibras magnéticas de PLGA obtenidas por electrohilado en el interior de hidrogeles de fibrina en condiciones estáticas y en presencia de un campo magnético aplicado de 100 mT. (Escala = 100 mm). Imagen reproducida de la referencia 237 Copyright (2017) con permiso de Wiley-VCH.

- Nanomateriales diamagnéticos como proteínas, polímeros o nanomateriales basados en carbono como los nanotubos y el óxido de grafeno, que requieren la aplicación de campos magnéticos de elevada intensidad para obtener la orientación deseada[218] lo que puede comprometer su bioseguridad. Esta aproximación ha sido empleada, por ejemplo, para generar geles de colágeno[219] y fibrina[220] con arquitecturas fibrilares altamente anisótropas; para favorecer la orientación de nanocristales de celulosa[221], o de partículas de óxido de grafeno[222] con propiedades mecánicas dependientes de su dirección en hidrogeles de gelatina, o la formación de capas de colágeno consecutivas con anisotropía ortogonal bajo la aplicación de un campo magnético rotatorio que simulan la estructura de la córnea[223]. Por ejemplo, De France *et al.* diseñaron un hidrogel inyectable de PEG dopado con nanocristales de celulosa sensibles a estímulo magnéticos. En este trabajo se verificó que campos magnéticos de alrededor de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1T eran suficientes para conseguir el alineamiento de los nanocristales durante el proceso de gelificación, dando lugar a andamios anisótropos con propiedades mecánicas dependientes de la orientación y capaces de promover la diferenciación de mioblastos musculares como se muestra en la Figura 1.14a[224].

- Nanopartículas magnéticas (MNPs), que resultan particularmente interesantes debido a la posibilidad de ser manipuladas remotamente de forma no invasiva mediante la aplicación de campos magnéticos externos de intensidad no demasiado elevada gracias a sus propiedades magnéticas intrínsecas. La incorporación de este tipo de nanomateriales en hidrogeles (los así llamados hidrogeles magnéticos o ferrogeles), ya sea solas o como parte de estructuras híbridas más complejas, ha sido ampliamente evaluada en la literatura en los últimos años[225–227]. Su incorporación en el hidrogel puede tener lugar mediante distintos procesos, como la síntesis *in situ* (las MNPs se sintetizan en el interior del hidrogel), el "dip-coating" (las MNPs se depositan sobre el hidrogel mediante su deposición por inmersión en una disolución de aquellas, y su posterior infusión hacia el interior de la matriz polimérica), el mezclado (disoluciones de polímero y MNPs se juntan y se realiza la polimerización) , y la "unión sobre" (unión generalmente de tipo covalente de las MNPs sobre la superficie de andamio polimérico)[228], siendo las tres últimas metodologías las que permiten lograr un mayor grado de control de las nano/microtopografías resultantes, ya que el hidrogel y las MNPs se preparan separadamente. Por ejemplo, Tognato *et al*. incorporaron MNPs de maghemita en disoluciones precursoras de un hidrogel de gelatina, ensamblándose en la forma de filamentos ordenados bajo la aplicación de un campo magnetostático de 20mT para la regeneración de tejido muscular esquelético[229], tal y como muestra la Figura 1.14b. En otro estudio, Nps de hematita alargadas funcionalizadas con grupos metacrilato se emplearon como agentes entrecruzantes en la preparación de hidrogeles de poliacrilamida. Estas MNPs elongadas se orientaron durante el proceso de polimerización bajo la acción de un campo magnético aplicado, creando geles híbridos con estructura anisótropa muy uniaxial[230]. De manera alternativa, Sakai *et al*. obtuvieron hidrogeles magnéticos anisótropos de PVA y κ–carrageenan mediante la coprecipitación básica *in situ* de las sales de hierro precursoras en la disolución polimérica

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para obtener clusters de MNPs de 50-100nm y forma elipsoidal[231].

- Micro-/nano-estructuras anisótropas modificadas con MNPs (Figura 1.14c). En ocasiones, las MNPs pueden agregarse bajo el campo magnético aplicado, lo que puede dificultar la formación y/o control de las interdistancias de la nano/microtopografía generada magnéticamente. Por ello, para evitar estos problemas, una alternativa puede ser el empleo de partículas micrométricas magnéticas, aunque su incorporación en los hidrogeles puede poner en peligro su biocompatibilidad por la gran cantidad de material magnético requerido para generar la microestructura anisótropa. Para evitar esto, se pueden preparar elementos anisótropos no magnéticos que pueden ser modificados magnéticamente, bien mediante la incorporación de MNPs en su superficie o en su interior, logrando así las estructuras jerárquicas deseadas bajo el estímulo magnético externo aplicado. Así, se pueden crear fibras o micro/nanopartículas de simetría elongada mediante diversas metodologías como la fotolitografía [232], el moldeado[214], el electrohilado[233], o la microfluidica[234], entre otras, que pueden permitir la incorporación de las MNPs bien en la superficie o en el interior de la nanoestructura obtenida. A este respecto, las micro/nano partículas de forma fibrilar o elongadas son muy interesantes puesto que pueden inducir grados de anisotropía relevantes dentro de los hidrogeles gracias a su alineamiento a bajos niveles de incorporación del nanomaterial magnético. Esta aproximación ha sido, precisamente la escogida en el presente trabajo de Tesis. Por ejemplo, Araújo-Custodio *et al.* sintetizaron MNPs mediante el método de co-precipitación en presencia de nanocristales de celulosa de forma cilíndrica, obteniendo cilindros de celulosa decorados en su superficie con MNPs de 6.5nm. Estas estructuras magnéticas se incorporaron en hidrogeles de gelatina inyectables, en los que durante su proceso de polimerización se logró el alineamiento de las partículas híbridas en la dirección del campo aplicado para generar las topografías anisótropas necesarias y permitir, así, el crecimiento direccional de células madre adiposas para la regeneración de tejido tisular de tendón[235]. Por el contrario, Rose *et al.* [236] optaron por preparar la combinación de las técnicas de litografía y moldeo empleando un polímero de polietileno glicol en forma de estrella mezclado con MNPs para dar lugar a microgeles poliméricos magnéticos anisótropos. Estas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estructuras magnéticas se mezclaron con una disolución polimérica precursora y se aplicó un campo magnético externo de 130mT previo al proceso de entrecruzamiento para lograr hidrogeles con las topografías anisótropas deseadas gracias a la orientación de los microgeles magnéticos (Figura 1.14c).

Omidinia-Arkoli *et al.* añadieron MNPs a una disolución de PLGA para preparar microfibras poliméricas cortas mediante la técnica de electrohilado/microcortado. Estos autores incorporaron las microfibras una vez obtenidas a una matriz de fibrina, alineando las microfibras bajo la aplicación de un campo magnético externo de ~300 mT. La organización estructural anisótropa conseguida permitió la modificación de las propiedades mecánicas de los hidrogeles así como el crecimiento direccional de las células encapsuladas (Figura 1.14d)[237].

En resumen, a pesar de que los diferentes tejidos del cuerpo humano presentan una serie de características comunes, cada uno de ellos está caracterizado por propiedades únicas en lo que se refiere a su composición y arquitectura, así como a sus funcionalidades mecánicas y biológicas. No obstante, las posibilidades que ofrece el diseño de hidrogeles magnéticos para crear estructuras con las características anisótropas deseadas y/o permitir la estimulación magneto-mecánica remota de las células encapsuladas ha hecho que este tipo de sistemas hayan sido evaluados de forma eficiente para la IT tan dispares como hueso[238], cartílago[239], músculo[240] o tejidos neural[241] y cardíaco[242], cuyas células se caracterizan por organizarse en disposiciones altamente anisótropas, en muchas ocasiones generando topografías alineadas uniaxialmente y/o estructuras fibrilares jerarquizadas.

1.4.1 Nanopartículas superparamagnéticas (MNPs)

Una de las características más importantes de los materiales magnéticos es la presencia de dipolos magnéticos en donde los electrones polarizados pueden estar alineados paralela o antiparalelamente con sus vecinos por lo que, en función de cómo unos electrones polarizados interaccionen con otros, los materiales magnéticos se pueden clasificar en (Figura 1.15)[243]:

- ***Paramagnéticos:*** Aquellos materiales en los que los dipolos magnéticos están orientados al azar y sólo se alinean en presencia de un campo magnético externo.
- ***Ferromagnéticos:*** Aquellos materiales en los que los dipolos magnéticos están alineados paralelamente, incluso en ausencia de campo magnético externo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- ***Ferrimagnéticos*:** Aquellos materiales en lo que los dipolos magnéticos están alineados antiparalelamente en ausencia de campo magnético externo.

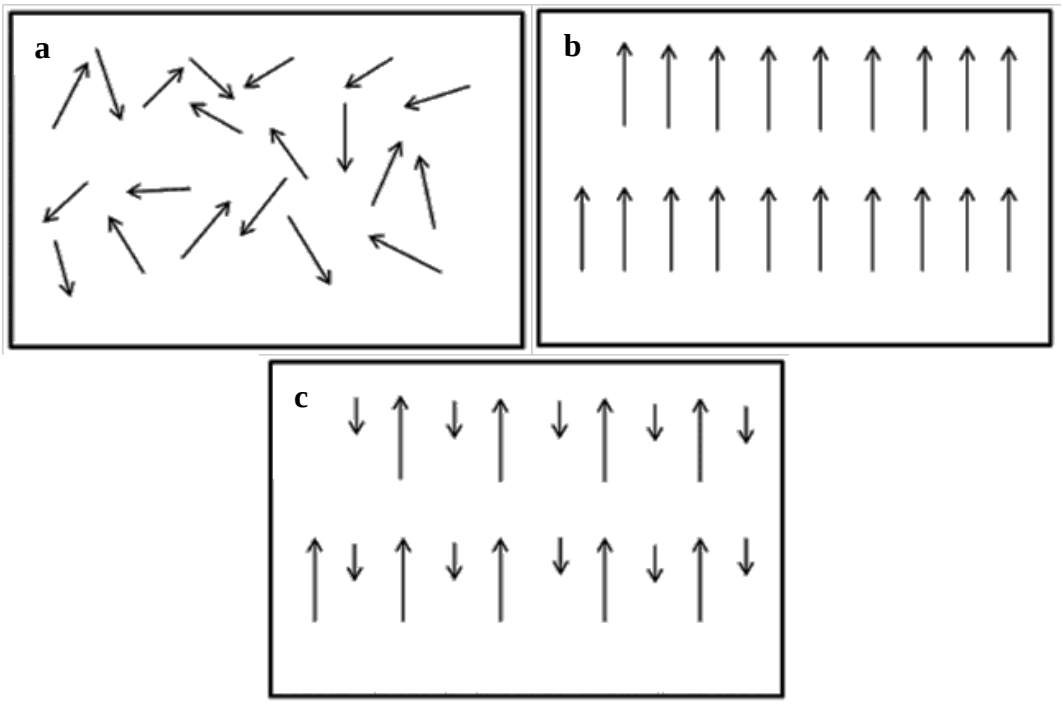


Figura 1.15.- Esquema de la orientación del momento magnético de diferentes materiales: a) paramagnético, b) ferromagnético y c) ferrimagnético.

Las propiedades magnéticas de los materiales vienen definidas por una serie de parámetros que, a su vez, dependen sus propiedades físico-químicas y que se obtienen a partir de la representación de sus ciclos de histéresis, es decir, de la magnetización *vs* el campo aplicado, tal y como se puede observar en la Figura 1.16 y que se pueden modificar manteniendo un control sobre los procesos sintéticos de las MNPs. Estos parámetros son[244,245]:

- La magnetización de saturación (M_S), definida como la máxima magnetización que pueden adquirir los materiales magnéticos sometidos a un campo magnético.
- La magnetización remanente (M_R), que es la magnetización residual una vez que el campo magnético es retirado.
- El campo coercitivo (H_C), que se define como el campo magnético que es necesario aplicar al material para conseguir que su magnetización neta vuelva a ser cero.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- La constante anisótropa magnética (K_a), característica de cada material magnético y que depende de sus propiedades físicas, especialmente de la simetría y de la red cristalina. Esta constante da información de la barrera energética para revertir la dirección de los dipolos magnéticos.

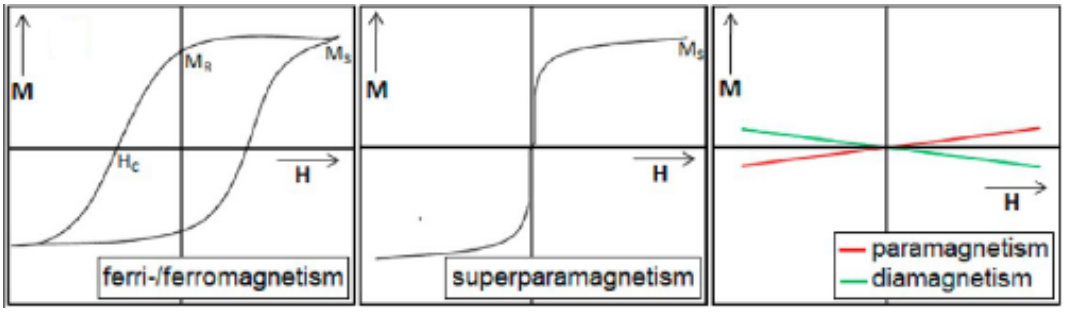


Figura 1.16.- Ciclos de histéresis para materiales ferro/ferimagnéticos, superparamagnéticos, paramagnéticos y diamagnéticos. Imagen reproducida con permiso de la referencia 217 Copyright (2021) con permiso de American Chemical Society.

El comportamiento magnético de estos sistemas es muy dependiente de su tamaño y forma, de modo que las propiedades magnéticas en la nanoescala cambian radicalmente ya que en esta escala los efectos de superficie son muy importantes. En este sentido, las partículas magnéticas esféricas ferro/ferrimagnéticas por debajo de cierto tamaño, en concreto el radio superparamagnético, r_{SP}, se conocen como partículas superparamagnéticas. El superparamagnetismo es, por tanto, una propiedad que se asocia exclusivamente a la nanoescala y se asocia a que la energía térmica de las MNPs puede llegar a superar la energía magnética de estabilización, tal y como se puede observar en la Figura 1.17, que indica que la coercitividad de las MNPs varia a medida que disminuye el tamaño de las MNPs hasta alcanzar el estado superparamagnético[246]. Esta reducción de tamaño implica la desaparición de los multidominios de las MNPs, es decir, de grupos de espines todos en la misma dirección separados por paredes y actuando de forma cooperativa, en favor de partículas de dominio simple en los que las fluctuaciones térmicas evitan la magnetización permanente. Esto sucede ya que, en partículas de mayor tamaño, desde un punto de vista energético, se favorece la formación de paredes de dominio de modo que la reversión de la magnetización ocurre a través de la nucleación y movimiento de estas paredes. Cuando las MNPs alcanzan el tamaño crítico, r_{SP}, la formación de estas paredes se vuelve energéticamente desfavorable y se vuelven monodominio. En este caso, los cambios en la magnetización se producen por la rotación coherente de los espines produciéndose un aumento del campo coercitivo. A medida que sigue disminuyendo el tamaño de las MNPs, los espines se ven más afectados por las

fluctuaciones térmicas, y el sistema se vuelve entonces superparamagnético[245]. En el caso de que estas partículas superparamagnéticas estén formadas por un núcleo de óxido de hierro (generalmente hematita (α-Fe_2O_3), magnetita (Fe_3O_4), o maghemita (γ-Fe_2O_3)), reciben el nombre de SPIONs y son ampliamente utilizadas en aplicaciones biomédicas por su gran estabilidad, baja toxicidad y elevada potencia magnética en medios biológicos[247]. Las propiedades magnéticas de las SPIONs son dependientes de la distribución de los cationes en la estructura cristalina de espinela que muestran las ferritas con composición MFe_2O_4, siendo M un metal de Fe, Mn, Co, Zn, donde los átomos de oxígeno se presentan en simetría cúbica con los cationes M^{2+} y Fe^{3+} que se encuentran en posiciones cristalográficas tetraédricas u octaédricas en función de su coordinación con los átomos de oxígeno[248]. De este modo, se pueden obtener estructuras espinelas normales o inversas que se caracterizan por tener los M^{2+} en posición tetraédrica u octaédrica, respectivamente, y que afectan directamente a la distribución de los momentos magnéticos y su alineación con los campos magnéticos[249]:

- Espinela normal: $(M^{2+})^{tet}(Fe^{3+})^{oct}O_4$
- Espinela inversa: $(Fe^{3+})^{tet}(M^{2+}Fe^{3+})^{oct}O_4$

Así, las SPIONs se caracterizan por presentar elevados momentos magnéticos en presencia de campos magnéticos externos, con una magnetización de saturación de varias decenas de emu/g[250] mientras que en su ausencia el campo coercitivo es nulo, tal y como se puede observar en la Figura 1.17. La inexistencia de magnetización remanente en ausencia de campo magnético evita la agregación de las MNPs y, por lo tanto, aumenta su estabilidad coloidal lo que las hace muy buenas candidatas para aplicaciones biomédicas[251,252] y siendo las únicas aprobadas por la FDA para ser utilizadas en el campo de la biomedicina como, por ejemplo, agentes de contraste de imagen[253].

Como cabría esperar, el control de las propiedades de las SPIONs es muy dependiente del proceso sintético por el que se obtienen. En este sentido, las rutas sintéticas se pueden dividir en métodos físicos y químicos. A partir de técnicas físicas como la evaporación térmica o la deposición por láser pulsante se obtienen grandes cantidades de partículas, pero de baja pureza y homogeneidad[254].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

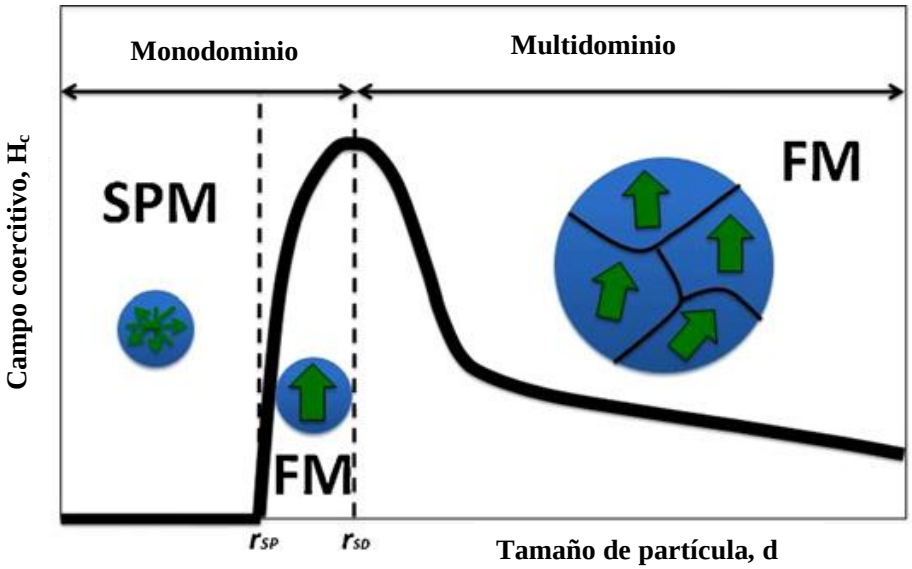


Figura 1.17.- Variación del campo coercitivo de las nanopartículas magnéticas en función de su tamaño. Imagen reproducida de la referencia 217 Copyright (2021) con permiso de American Chemical Society.

Sin embargo, los métodos químicos, aunque generan menor cantidad de producto, este es de mejor calidad en términos de la bondad de sus propiedades magnéticas. Dentro de los métodos químicos destacan:

1) Sol-gel: Este método se basa en la hidroxilación de los precursores magnéticos moleculares en disolución, produciéndose las MNPs por su condensación y polimerización inorgánica[255].
2) Síntesis solvotérmica: En esta técnica la reacción tiene lugar a presiones elevadas y a temperaturas por debajo del punto de ebullición del disolvente. En este caso, las partículas obtenidas son hidrófilas pero las de dimensiones más pequeñas no de gran calidad[256].
3) Co-precipitación: Esta metodología se basa en la co-precipitación de las sales ferrosas y férricas por la adición de una base que genera partículas magnéticas con bajo control sobre sus propiedades, pero solubles en agua[257].
4) Descomposición térmica: Esta metodología consiste en la reducción de precursores metálicos bajo condiciones controladas y altas temperaturas dando lugar a MNPs monodispersas con buenas propiedades magnéticas[258], que es la que se ha empleado en este trabajo.

En el Capítulo 6 de esta Tesis Doctoral se abordarán la síntesis de MNPs basadas en óxidos de hierro de simetría esférica y su posterior incorporación dentro NPs de PLGA y de microfibras poliméricas electrohiladas de PLC, respectivamente, para la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

nanoestructuración de los hidrogeles diseñados con el fin de evaluar la generación de estructuras anisótropas.

1.5 Hipótesis y objetivos

Hipótesis:

La presente Tesis Doctoral propone el desarrollo y caracterización sistemática de andamios fácilmente reproducibles basados en hidrogeles naturales de proteínas y polisacáridos que deberían permitir mimetizar la matriz extracelular (MEC) y actuar como elementos clave en las interacciones celulares tales como la adhesión, migración, proliferación y diferenciación.

Objetivo general:

El objetivo final de este trabajo doctoral es la obtención y análisis sistemático de la relación estructura/composición de hidrogeles en 3D que imiten la matriz extracelular y permitan controlar la organización, proliferación y diferenciación celular y descifrar el papel que juegan las señales físicas y bioquímicas en tales procesos para su aplicación en ingeniería de tejidos.

Objetivos Particulares:

1. **Síntesis y caracterización de hidrogeles híbridos:** Se sintetizarán hidrogeles híbridos de quitosano, ácido hialurónico y colágeno mediante entrecruzamiento físico por complejación electrolítica e hidrogeles híbridos de gelatina y ácido hialurónica a través de entrecruzamiento químico. Estos últimos hidrogeles se obtendrán por fotopolimerización, previa metacrilación de la gelatina (GelMA) y del ácido hialurónico (HAMA). En los procesos sintéticos se modificará la estructura y la composición de los hidrogeles con el fin de conseguir que presenten las mejores propiedades mecánicas, térmicas y biológicas para mimetizar la matriz extracelular.

   Se realizará una caracterización general de los hidrogeles híbridos de quitosano, ácido hialurónico y colágeno e hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA con distintas estructuras y concentraciones. La caracterización composicional se realizará a través de medidas de fracción gel, densidad aparente, entre otras. La

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

caracterización química se hará mediante medidas de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. El análisis térmico mediante análisis termogavimétrico y calorimetría diferencial de barrido. La caracterización mecánica con medidas de reología y finalmente, la caracterización estructural mediante medidas de porosimetría, microtomografía computacional y gravimetría. Para aplicaciones biológicas, se estudiará tanto su biocompatibilidad como su degradación en estudios *in vitro*.

2. **Síntesis y caracterización de partículas poliméricas:** Se llevará a cabo la síntesis de partículas orgánicas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) que permitirán encapsular moléculas bioactivas o partículas inorgánicas, que una vez embebidas en las matrices poliméricas y ante estímulos externos permitan la utilización de los sistemas completos en medicina regenerativa. Estas partículas deberán presentar un tamaño inferior a los poros de los hidrogeles sintetizados, ser altamente hidrófobas, y con ello presentar una interacción con componentes orgánicos o fármacos insolubles en agua. Además, deberán presentar una buena estabilidad en medio acuoso. El tamaño de las partículas se obtendrá mediante medidas de microscopía electrónica de barrido y dispersión dinámica de luz y la carga por anenometría láser Doppler. Termodinámicamente, se caracterizarán con medida de termogravimetría.

3. **Síntesis y caracterización de partículas magnéticas:** Se llevará a cabo la síntesis de partículas superparamagnéticas esféricas basadas en óxido de hierro (SPIONs), tanto puras de magnetita (Fe_3O_4) como con el elemento dopante Zn ($Zn_xFe_yO_4$) para modificar sus propiedades magnéticas, por la técnica de descomposición térmica. Se utilizará el ácido oleico como agente estabilizante con la finalidad de que las SPIONs tengan una interacción hidrófoba con las partículas de PLGA, de modo que sea posible su encapsulación. Se realizará una caracterización parcial de estas nanopartículas con medidas de microscopía electrónica de transmisión, magnetometría y degradación térmica.

4. **Encapsulación de moléculas bioactivas o nanopartícula inorgánicas hidrófobas en partículas de PLGA para su posterior incorporación en hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA:** Una vez optimizado el proceso sintético

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de las partículas de PLGA se procederá a encapsular el fármaco dexametasona, que además de ser un fármaco antiinflamatorio, presenta propiedades osteoinductivas. Así, se analizará la liberación de este fármaco fuera y dentro de los hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA, para posteriormente estudiar la diferenciación de las células mesenquimales (MSC) en osteoblastos para la regeneración ósea. Por otro lado, también se encapsularán SPIONs en partículas de PLGA para posteriormente embeberlas en los hidrogeles para el posterior estudio del control de la anisotropía topográfica 3D de los andamios.

5. **Inducción de anisotropía en los andamios:** Se estudiará el alineamiento magnético de diferentes concentraciones de SPIONs encapsuladas en partículas de PLGA o microfibras híbridas electrohiladas de policaprolactona y SPIONs embebidas, a su vez, en los hidrogeles para la formación de una matriz polimérica 3D nanoestructurada. Con ello, se tratará de dirigir la regeneración tisular mediante un campo magnético externo.

6. **Evaluación *in vitro* de hidrogeles híbridos:** Aquellos hidrogeles que muestren propiedades similares a la MEC serán analizados en cultivos celulares. Se determinará la citotoxicidad de los andamios con distintas líneas celulares a distintos tiempos de incubación. En particular, se estudiará el grado de regeneración ósea de hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA con partículas de PLGA con dexametasona encapsulada.

1.6 Referencias

1. Olson, J. L., Atala, A. & Yoo, J. J. Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions. *Chonnam Med. J.* (2011). doi:10.4068/cmj.2011.47.1.1

2. Sicari, B. M., Londono, R. & Badylak, S. F. *Extracellular Matrix as a Bioscaffold for Tissue Engineering*. *Tissue Engineering: Second Edition* (Elsevier Inc., 2014). doi:10.1016/B978-0-12-420145-3.00005-5

3. Moroni, L. *et al.* Tissue Engineering: An Introduction. in *Tissue Engineering: Second Edition* 1–21 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-420145-3.00001-8

4. O'Brien, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* **14**, 88–95 (2011).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. Monteiro, N. *et al.* Photopolymerization of cell-laden gelatin methacryloyl hydrogels using a dental curing light for regenerative dentistry. *Dent. Mater.* **34**, 389–399 (2018).

6. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews* **101**, 1869–1879 (2001).

7. Fung, Y. C. Emergence and Evolution of a Shared Concept. *J. Biomech. Eng.* 18–24 (2001).

8. Tsiapalis, D. & O'Driscoll, L. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Cells* **9**, (2020).

9. Vanderhooft, J. L., Alcoutlabi, M., Magda, J. J. & Prestwich, G. D. Rheological properties of cross-linked hyaluronan-gelatin hydrogels for tissue engineering. *Macromol. Biosci.* **9**, 20–28 (2009).

10. Dave, P. N. & Gor, A. Natural Polysaccharide-Based Hydrogels and Nanomaterials. in *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications* 36–66 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-813351-4.00003-1

11. Ude, C. C., Miskon, A., Idrus, R. B. H. & Abu Bakar, M. Bin. Application of stem cells in tissue engineering for defense medicine. *Military Medical Research* **5**, 7 (2018).

12. Solchaga, L. A., Goldberg, V. M. & Caplan, A. I. Cartilage regeneration using principles of tissue engineering. in *Clinical Orthopaedics and Related Research* S161-70 (Clin Orthop Relat Res, 2001). doi:10.1097/00003086-200110001-00016

13. McGloughlin, T. M. *Computational Modeling in Tissue Engineering*. *Biomechanics and Mechanobiology of Aneurysms* **10**, (Springer Berlin Heidelberg, 2011).

14. Gefen, A. *Multiscale computer modeling in biomechanics and biomedical engineering*. (Springer, 2013).

15. Reddy, M. S. B., Ponnamma, D., Choudhary, R. & Sadasivuni, K. K. A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers (Basel).* **13**, 1105 (2021).

16. Morouço, P. *et al.* Fabrication of poly(ϵ-caprolactone) scaffolds reinforced with cellulose nanofibers, with and without the addition of hydroxyapatite nanoparticles. *Biomed Res. Int.* **2016**, 1–10 (2016).

17. David, J., Hernández, O., Aguilar, E. J. & García, F. G. El hipocampo : neurogénesis y aprendizaje. (2015).

18. Arias, O., Olivares, T. & Drucker, R. Neurogénesis en el cerebro adulto. **44**, 541–

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

550 (2007).

19. Ming, G. & Song, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. (2011). doi:10.1016/j.neuron.2011.05.001

20. Akhtar, A. *et al.* Neurodegenerative diseases and effective drug delivery: A review of challenges and novel therapeutics. *Journal of Controlled Release* **330**, 1152–1167 (2021).

21. Freudenberg, U. *et al.* A star-PEG-heparin hydrogel platform to aid cell replacement therapies for neurodegenerative diseases. *Biomaterials* **30**, 5049–5060 (2009).

22. Scopus. Scopus - Analyze search results | Signed in. *Scopus* (2020).

23. Okay, O. *Hydrogel Sensors and Actuators*. *Hydrogel Sensors and Actuators* **6**, (Springer Berlin Heidelberg, 2010).

24. Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 4195–200 (2010).

25. Hynes, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216–9 (2009).

26. Nieto-Suárez, M., López-Quintela, M. A. & Lazzari, M. Preparation and characterization of crosslinked chitosan/gelatin scaffolds by ice segregation induced self-assembly. *Carbohydr. Polym.* **141**, 175–183 (2016).

27. McKee, T. J., Perlman, G., Morris, M. & Komarova, S. V. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **9**, 1–15 (2019).

28. Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J. Adv. Res.* (2015). doi:10.1016/j.jare.2013.07.006

29. Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z. & Akil, H. M. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Mater. Sci. Eng. C* **57**, 414–433 (2015).

30. Klouda, L. & Mikos, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68**, 34–45 (2008).

31. Sun, H., Chen, J., Han, X. & Liu, H. Multi-responsive hydrogels with UCST- and LCST-induced shrinking and controlled release behaviors of rhodamine B. *Mater. Sci. Eng. C* **82**, 284–290 (2018).

32. Ding, Y. *et al.* Multiple Stimuli-Responsive Cellulose Hydrogels with Tunable LCST and UCST as Smart Windows. doi:10.1021/acsapm.0c00414

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

33. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 3–12 (2002).

34. Mahinroosta, M., Jomeh Farsangi, Z., Allahverdi, A. & Shakoori, Z. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Materials Today Chemistry* **8**, 42–55 (2018).

35. Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z. & Akil, H. M. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Mater. Sci. Eng. C* **57**, 414–433 (2015).

36. Zhang, Y. S. & Khademhosseini, A. Advances in engineering hydrogels. *Science (80-.).* **356**, eaaf3627 (2017).

37. Eysturskard, J., Haug, I. J., Ulset, A. S. & Draget, K. I. Mechanical properties of mammalian and fish gelatins based on their weight average molecular weight and molecular weight distribution. *Food Hydrocoll.* **23**, 2315–2321 (2009).

38. Takigami, M. *et al.* Preparation and Properties of CMC Gel. *Trans. Mater. Res. Soc. Japan* **32**, 713–716 (2007).

39. Zhang, S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature Biotechnology* **21**, 1171–1178 (2003).

40. RICH, A. & CRICK, F. H. C. The Structure of Collagen. *Nature* **176**, 915–916 (1955).

41. O'Leary, L. E. R., Fallas, J. A., Bakota, E. L., Kang, M. K. & Hartgerink, J. D. Multi-hierarchical self-assembly of a collagen mimetic peptide from triple helix to nanofibre and hydrogel. *Nat. Chem.* **3**, 821–828 (2011).

42. Saini, K. Preparation method, Properties and Crosslinking of hydrogel: a review. *PharmaTutor* **5**, 27–36 (2017).

43. Gacesa, P. Alginates. *Carbohydr. Polym.* **8**, 161–182 (1988).

44. Hennink, W. E. & Van Nostrum, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. (2012). doi:10.1016/j.addr.2012.09.009

45. Chung, H. J. & Park, T. G. Self-assembled and nanostructured hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Nano Today* **4**, 429–437 (2009).

46. Martínez, M. Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la aministración y liberación modificada de fármacos. (2017).

47. Wei, Q. *et al.* Enzymatic crosslinking to fabricate antioxidant peptide-based supramolecular hydrogel for improving cutaneous wound healing. *J. Mater. Chem. B* **7**, 2220–2225 (2019).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

48. Sivashanmugam, A., Arun Kumar, R., Vishnu Priya, M., Nair, S. V. & Jayakumar, R. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *Eur. Polym. J.* **72**, 543–565 (2015).

49. Singhal, R. & Gupta, K. A Review: Tailor-made Hydrogel Structures (Classifications and Synthesis Parameters). *Polym. Plast. Technol. Eng.* **55**, 54–70 (2016).

50. Tortora, M., Cavalieri, F., Chiessi, E. & Paradossi, G. Michael-type addition reactions for the in situ formation of poly(vinyl alcohol)-based hydrogels. *Biomacromolecules* **8**, 209–214 (2007).

51. Sawhney, A. S., Pathak, C. P. & Hubbell, J. A. Interfacial photopolymerization of poly(ethylene glycol)-based hydrogels upon alginate-poly(l-lysine) microcapsules for enhanced biocompatibility. *Biomaterials* **14**, 1008–1016 (1993).

52. Mishra, S., Peddada, L. Y., Devore, D. I. & Roth, C. M. Poly(alkylene oxide) copolymers for nucleic acid delivery. *Acc. Chem. Res.* **45**, 1057–1066 (2012).

53. Mironi-Harpaz, I., Wang, D. Y., Venkatraman, S. & Seliktar, D. Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: Crosslinking efficiency versus cytotoxicity. *Acta Biomater.* **8**, 1838–1848 (2012).

54. Nguyen, K. T. & West, J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* **23**, 4307–4314 (2002).

55. Zhu, J. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* **31**, 4639–4656 (2010).

56. Zhu, J. & Marchant, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev. Med. Devices* **8**, 607–26 (2011).

57. Khansari, M. M. *et al.* Classification of Hydrogels Based on Their Source: A Review and Application in Stem Cell Regulation. *JOM* **69**, 1340–1347 (2017).

58. Schneider, G. B. *et al.* The effect of hydrogel charge density on cell attachment. *Biomaterials* **25**, 3023–8 (2004).

59. Hejcl, A. *et al.* HPMA-RGD hydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury. *Stem Cells Dev.* **19**, 1535–46 (2010).

60. Woerly, S., Pinet, E., de Robertis, L., Van Diep, D. & Bousmina, M. Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel). *Biomaterials* **22**, 1095–111 (2001).

61. Schmedlen, R. H., Masters, K. S. & West, J. L. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. *Biomaterials* **23**, 4325–4332 (2002).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

62. Buxton, A. N. *et al.* Design and characterization of poly(ethylene glycol) photopolymerizable semi-interpenetrating networks for chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* **13**, 2549–2560 (2007).

63. Beamish, J. A., Zhu, J., Kottke-Marchant, K. & Marchant, R. E. The effects of monoacrylated poly(ethylene glycol) on the properties of poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels used for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **92**, 441–450 (2010).

64. Yang, F. *et al.* The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **26**, 5991–5998 (2005).

65. Macdougall, L. J. & Anseth, K. Bioerodible Hydrogels Based on Photopolymerized Poly(ethylene glycol)- co-poly(α-hydroxy acid) Diacrylate Macromers. *Macromolecules* **53**, 2295–2298 (2020).

66. Clapper, J. D., Skeie, J. M., Mullins, R. F. & Guymon, C. A. Development and characterization of photopolymerizable biodegradable materials from PEG-PLA-PEG block macromonomers. *Polymer (Guildf).* **48**, 6554–6564 (2007).

67. Hauser, C. A. E. & Zhang, S. Designer self-assembling peptide nanofiber biological materials. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 2780–2790 (2010).

68. Geckil, H., Xu, F., Zhang, X., Moon, S. & Demirci, U. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine* **5**, 469–484 (2010).

69. Liu, S. Q. *et al.* Synthetic hydrogels for controlled stem cell differentiation. *Soft Matter* **6**, 67–81 (2009).

70. Kopesky, P. W., Vanderploeg, E. J., Sandy, J. S., Kurz, B. & Grodzinsky, A. J. Self-assembling peptide hydrogels modulate in vitro chondrogenesis of bovine bone marrow stromal cells. in *Tissue Engineering - Part A* **16**, 465–477 (Tissue Eng Part A, 2010).

71. Hern, D. L. & Hubbell, J. A. Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *J. Biomed. Mater. Res.* **39**, 266–276 (1998).

72. Lee, H. J. *et al.* Collagen mimetic peptide-conjugated photopolymerizable PEG hydrogel. *Biomaterials* **27**, 5268–5276 (2006).

73. Bezwada, R. S. *et al.* Monocryl® suture, a new ultra-pliable absorbable monofilament suture. *Biomaterials* **16**, 1141–1148 (1995).

74. Anderson, J. M. & Shive, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* **28**, 5–24 (1997).

75. Wei, J. *et al.* Comparison of physical, chemical and cellular responses to nano- and micro-sized calcium silicate/poly(ε-caprolactone) bioactive composites. *J. R. Soc.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Interface **5**, 617–630 (2008).

76. Pitt, C. G., Chasalow, F. I., Hibionada, Y. M., Klimas, D. M. & Schindler, A. Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly(ϵ-caprolactone) in vivo. *J. Appl. Polym. Sci.* **26**, 3779–3787 (1981).

77. You, Y., Min, B. M., Lee, S. J., Lee, T. S. & Park, W. H. In vitro degradation behavior of electrospun polyglycolide, polylactide, and poly(lactide-co-glycolide). *J. Appl. Polym. Sci.* **95**, 193–200 (2005).

78. Chuenjitkuntaworn, B. *et al.* Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **94**, 241–251 (2010).

79. Agrawal, C. M. & Ray, R. B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* **55**, 141–150 (2001).

80. Oh, S. H., Park, I. K., Kim, J. M. & Lee, J. H. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials* **28**, 1664–1671 (2007).

81. Yoon, H. J. *et al.* Cold Water Fish Gelatin Methacryloyl Hydrogel for Tissue Engineering Application. *PLoS One* **11**, e0163902 (2016).

82. Maharjan, B. *et al.* Synthesis and characterization of gold/silica hybrid nanoparticles incorporated gelatin methacrylate conductive hydrogels for H9C2 cardiac cell compatibility study. *Compos. Part B Eng.* **177**, 107415 (2019).

83. Poldervaart, M. T. *et al.* 3D bioprinting of methacrylated hyaluronic acid (MeHA) hydrogel with intrinsic osteogenicity. *PLoS One* **12**, (2017).

84. Gomez-Florit, M. *et al.* Natural-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)* **25**, 5858 (2020).

85. Rose, J. B. *et al.* Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering. *Mater. (Basel, Switzerland)* **7**, 3106–3135 (2014).

86. McKee, T. J., Perlman, G., Morris, M. & Komarova, S. V. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **9**, 10542 (2019).

87. Klotz, B. J., Gawlitta, D., Rosenberg, A. J. W. P., Malda, J. & Melchels, F. P. W. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels : Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. **34**, 394–407 (2016).

88. Zwiorek, K. *et al.* Delivery by Cationic Gelatin Nanoparticles Strongly Increases the Immunostimulatory Effects of CpG Oligonucleotides. *Pharm. Res.* **25**, 551–562 (2008).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

89. and, K. Y. L. & Mooney*, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering. (2001). doi:10.1021/CR000108X

90. Novak, U. & Kaye, A. H. Extracellular matrix and the brain: Components and function. *J. Clin. Neurosci.* **7**, 280–290 (2000).

91. Camci-Unal, G., Cuttica, D., Annabi, N., Demarchi, D. & Khademhosseini, A. Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **14**, 1085–1092 (2013).

92. Burdick, J. A. & Prestwich, G. D. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Mater.* **23**, H41–H56 (2011).

93. Kripotou, S. *et al.* Water dynamics and thermal properties of tyramine-modified hyaluronic acid - Gelatin hydrogels. *Polymer (Guildf).* **178**, 121598 (2019).

94. Tejero, J., Shiva, S. & Gladwin, M. T. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. *Physiological Reviews* **99**, 311–379 (2019).

95. Nichol, J. W. *et al.* Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* **31**, 5536–5544 (2010).

96. Benton, J. A., Deforest, C. A., Vivekanandan, V. & Anseth, K. S. Photocrosslinking of gelatin macromers to synthesize porous hydrogels that promote valvular interstitial cell function. *Tissue Eng. - Part A* **15**, 3221–3230 (2009).

97. Prakash Parthiban, S., Rana, D., Jabbari, E., Benkirane-Jessel, N. & Ramalingam, M. Covalently immobilized VEGF-mimicking peptide with gelatin methacrylate enhances microvascularization of endothelial cells. *Acta Biomater.* **51**, 330–340 (2017).

98. Liu, X., Zheng, C., Luo, X., Wang, X. & Jiang, H. Recent advances of collagen-based biomaterials: Multi-hierarchical structure, modification and biomedical applications. (2019). doi:10.1016/j.msec.2019.02.070

99. Sorushanova, A. *et al.* The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv. Mater.* **31**, 1–39 (2019).

100. Lodish, H., Berk, A. & SL, Z. 'Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix' in Molecular Cell Biology. 4th edition. (2000).

101. Lin, Z. *et al.* In vitro evaluation of natural marine sponge collagen as a scaffold for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Sci.* **7**, 968–977 (2011).

102. Samadian, H. *et al.* Naturally occurring biological macromolecules-based hydrogels: Potential biomaterials for peripheral nerve regeneration. *Int. J. Biol. Macromol.* **154**, 795–817 (2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

103. Sarrigiannidis, S. O. *et al.* A tough act to follow: collagen hydrogel modifications to improve mechanical and growth factor loading capabilities. *Mater. Today Bio* **10**, 100098 (2021).

104. Shi, Z. *et al.* Electroconductive natural polymer-based hydrogels. *Biomaterials* **111**, 40–54 (2016).

105. Hamedi, H., Moradi, S., Hudson, S. M. & Tonelli, A. E. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers* **199**, 445–460 (2018).

106. Zhao, W., Jin, X., Cong, Y., Liu, Y. & Fu, J. Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **88**, 327–339 (2013).

107. Catoira, M. C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M. & Boccafoschi, F. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **30**, (2019).

108. Croisier, F. & Jérôme, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* **49**, 780–792 (2013).

109. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 18–23 (2012).

110. Liu, R., Xu, X., Zhuang, X. & Cheng, B. Solution blowing of chitosan/PVA hydrogel nanofiber mats. *Carbohydr. Polym.* **101**, 1116–1121 (2014).

111. Ifkovits, J. L. & Burdick, J. A. Review: Photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue Engineering* **13**, 2369–2385 (2007).

112. Chandra, P. K. & Atala, A. A. Use of matrix and seeding with cells for vasculature of organs. in *Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **1**–**3**, 425–446 (Academic Press, 2019).

113. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, 421746 (2015).

114. Chung, C., Beecham, M., Mauck, R. L. & Burdick, J. A. The influence of degradation characteristics of hyaluronic acid hydrogels on in vitro neocartilage formation by mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **30**, 4287–96 (2009).

115. Schmidt, C. E. & Leach, J. B. Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **5**, 293–347 (2003).

116. Vunjak-Novakovic, G. *et al.* Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **16**, 169–187 (2010).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

117. Wang, J. H. C., Guo, Q. & Li, B. Tendon biomechanics and mechanobiology - A minireview of basic concepts and recent advancements. *J. Hand Ther.* **25**, 133–141 (2012).

118. Datta, P., Vyas, V., Dhara, S., Chowdhury, A. R. & Barui, A. Anisotropy Properties of Tissues: A Basis for Fabrication of Biomimetic Anisotropic Scaffolds for Tissue Engineering. *J. Bionic Eng.* **16**, 842–868 (2019).

119. Loving, G. S., Mukherjee, S. & Caravan, P. Redox-activated manganese-based MR contrast agent. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 4620–4623 (2013).

120. Solanki, A. *et al.* Controlling differentiation of neural stem cells using extracellular matrix protein patterns. *Small* **6**, 2509–2513 (2010).

121. Dalby, M. J., Gadegaard, N. & Oreffo, R. O. C. Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. *Nat. Mater.* **13**, 558–569 (2014).

122. Sano, K., Ishida, Y. & Aida, T. Synthesis of Anisotropic Hydrogels and Their Applications. *Angewandte Chemie - International Edition* **57**, 2532–2543 (2018).

123. Tay, C. Y. *et al.* Micropatterned matrix directs differentiation of human mesenchymal stem cells towards myocardial lineage. *Exp. Cell Res.* **316**, 1159–1168 (2010).

124. Mo, K., Zhang, T., Yan, W. & Chang, C. Tunicate cellulose nanocrystal reinforced polyacrylamide hydrogels with tunable mechanical performance. *Cellulose* **25**, 6561–6570 (2018).

125. Wang, N. *et al.* Mesoporous Silica Nanoparticles-Reinforced Hydrogel Scaffold together with Pinacidil Loading to Improve Stem Cell Adhesion. *ChemNanoMat* **4**, 631–641 (2018).

126. Wu, Z. L. *et al.* Anisotropic hydrogel from complexation-driven reorientation of semirigid polyanion at Ca2+ diffusion flux front. *Macromolecules* **44**, 3535–3541 (2011).

127. Dobashi, T., Nobe, M., Yoshihara, H., Yamamoto, T. & Konno, A. Liquid crystalline gel with refractive index gradient of curdlan. *Langmuir* **20**, 6530–6534 (2004).

128. Dinh, N. D. *et al.* Effective Light Directed Assembly of Building Blocks with Microscale Control. *Small* **13**, 1700684 (2017).

129. Kaehr, B. & Shear, J. B. Multiphoton fabrication of chemically responsive protein hydrogels for microactuation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 8850–8854 (2008).

130. Watanabe, T. *et al.* Photoresponsive hydrogel microstructure fabricated by two-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

photon initiated polymerization. *Adv. Funct. Mater.* **12**, 611–614 (2002).

131. Mehrali, M. *et al.* Nanoreinforced Hydrogels for Tissue Engineering: Biomaterials that are Compatible with Load-Bearing and Electroactive Tissues. *Adv. Mater.* **29**, (2017).

132. Salehi, M. *et al.* Regeneration of sciatic nerve crush injury by a hydroxyapatite nanoparticle-containing collagen type I hydrogel. *J. Physiol. Sci.* **68**, 579–587 (2018).

133. Castilho, M., Mouser, V., Chen, M., Malda, J. & Ito, K. Bi-layered micro-fibre reinforced hydrogels for articular cartilage regeneration. *Acta Biomater.* **95**, 297–306 (2019).

134. Wu, S. *et al.* Biocompatible chitin/carbon nanotubes composite hydrogels as neuronal growth substrates. *Carbohydr. Polym.* **174**, 830–840 (2017).

135. Guo, R. *et al.* Tailoring Self-Polarization of BaTiO3 Thin Films by Interface Engineering and Flexoelectric Effect. *Adv. Mater. Interfaces* **3**, 1600737 (2016).

136. Lin, X. Y., Wang, Z. J., Pan, P., Wu, Z. L. & Zheng, Q. Monodomain hydrogels prepared by shear-induced orientation and subsequent gelation. *RSC Adv.* **6**, 95239–95245 (2016).

137. Kelly, C. N., Miller, A. T., Hollister, S. J., Guldberg, R. E. & Gall, K. Design and Structure-Function Characterization of 3D Printed Synthetic Porous Biomaterials for Tissue Engineering. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, 1701095 (2018).

138. Huang, C.-C., Ravindran, S., Yin, Z. & George, A. 3-D self-assembling leucine zipper hydrogel with tunable properties for tissue engineering. *Biomaterials* **35**, 5316–5326 (2014).

139. Docheva, D., Müller, S. A., Majewski, M. & Evans, C. H. Biologics for tendon repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **84**, 222–39 (2015).

140. Alvarez-Lorenzo, C., Blanco-Fernandez, B., Puga, A. M. & Concheiro, A. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1148–71 (2013).

141. Xiao, W. *et al.* Synthesis and characterization of cell-laden double-network hydrogels based on silk fibroin and methacrylated hyaluronic acid. *Eur. Polym. J.* **118**, 382–392 (2019).

142. Hassan, K. A. *et al.* Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1972–1980 (2013).

143. Moshaverinia, A. *et al.* Dental mesenchymal stem cells encapsulated in an alginate hydrogel co-delivery microencapsulation system for cartilage regeneration. *Acta*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Biomater. **9**, 9343–9350 (2013).

144. Slaughter, B. V, Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A. & Peppas, N. A. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials* **21**, 3307–3329 (2009).

145. Ilkar Erdagi, S., Asabuwa Ngwabebhoh, F. & Yildiz, U. Genipin crosslinked gelatin-diosgenin-nanocellulose hydrogels for potential wound dressing and healing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **149**, 651–663 (2020).

146. Eke, G., Mangir, N., Hasirci, N., MacNeil, S. & Hasirci, V. Development of a UV crosslinked biodegradable hydrogel containing adipose derived stem cells to promote vascularization for skin wounds and tissue engineering. *Biomaterials* **129**, 188–198 (2017).

147. Pahoff, S. *et al.* Effect of gelatin source and photoinitiator type on chondrocyte redifferentiation in gelatin methacryloyl-based tissue-engineered cartilage constructs. *J. Mater. Chem. B* **7**, 1761–1772 (2019).

148. Celikkin, N., Mastrogiacomo, S., Frank Walboomers, X. & Swieszkowski, W. Enhancing X-ray attenuation of 3D Printed Gelatin Methacrylate (GelMA) hydrogels utilizing gold nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Polymers (Basel).* **11**, 1–13 (2019).

149. Dursun Usal, T., Yucel, D. & Hasirci, V. A novel GelMA-pHEMA hydrogel nerve guide for the treatment of peripheral nerve damages. *Int. J. Biol. Macromol.* **121**, 699–706 (2019).

150. Xiao, W. *et al.* Synthesis and characterization of cell-laden double-network hydrogels based on silk fibroin and methacrylated hyaluronic acid. *Eur. Polym. J.* **118**, 382–392 (2019).

151. Kamperman, T., Karperien, M., Le Gac, S. & Leijten, J. Single-Cell Microgels: Technology, Challenges, and Applications. *Trends Biotechnol.* **36**, 850–865 (2018).

152. Masters, K. S., Shah, D. N., Leinwand, L. A. & Anseth, K. S. Crosslinked hyaluronan scaffolds as a biologically active carrier for valvular interstitial cells. *Biomaterials* **26**, 2517–2525 (2005).

153. Almeida, L. D. F. *et al.* Hyaluronic acid hydrogels incorporating platelet lysate enhance human pulp cell proliferation and differentiation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **29**, 88 (2018).

154. Yousefi, F., Kandel, S. & Pleshko, N. Infrared Spectroscopic Quantification of Methacrylation of Hyaluronic Acid: A Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Appl. Spectrosc.* **72**, 1455–1466 (2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

155. Bencherif, S. A. *et al.* Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials* **29**, 1739–1749 (2008).

156. Bian, L. *et al.* The influence of hyaluronic acid hydrogel crosslinking density and macromolecular diffusivity on human MSC chondrogenesis and hypertrophy. *Biomaterials* **34**, 413–421 (2013).

157. Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A. & Langer, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Adv. Mater.* **18**, 1345–1360 (2006).

158. Messing, R. & Schmidt, A. M. Perspectives for the mechanical manipulation of hybrid hydrogels. *Polym. Chem.* **2**, 18–32 (2011).

159. Wu, L. C., Yang, J. & Kopeček, J. Hybrid hydrogels self-assembled from graft copolymers containing complementary β-sheets as hydroxyapatite nucleation scaffolds. *Biomaterials* **32**, 5341–5353 (2011).

160. Hjortnaes, J. *et al.* Directing valvular interstitial cell myofibroblast-like differentiation in a hybrid hydrogel platform. *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 121–130 (2015).

161. Kuo, Y. C. & Chen, Y. C. Regeneration of neurite-like cells from induced pluripotent stem cells in self-assembled hyaluronic acid-gelatin microhydrogel. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **67**, 74–87 (2016).

162. Visser, J. *et al.* Endochondral bone formation in gelatin methacrylamide hydrogel with embedded cartilage-derived matrix particles. *Biomaterials* **37**, 174–182 (2015).

163. Haruki, O., Guillo, S. & Bauer, T. *Muscle and Tendon Injuries*. *Muscle and Tendon Injuries: Evaluation and Management* (Springer Berlin Heidelberg, 2017). doi:10.1007/978-3-662-54184-5

164. Chowdhury, A., Kunjiappan, S., Panneerselvam, T., Somasundaram, B. & Bhattacharjee, C. Nanotechnology and nanocarrier-based approaches on treatment of degenerative diseases. *Int. Nano Lett.* **7**, 91–122 (2017).

165. Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O. & Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **57**, 35–52 (2004).

166. Coimbra, P. *et al.* Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds for dental pulp regeneration: Synthesis and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* **49**, 573–579 (2011).

167. Miranda, D. G. *et al.* A chitosan-hyaluronic acid hydrogel scaffold for periodontal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **104**, 1691–1702 (2016).

168. Deng, Y. *et al.* Injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for abdominal tissue regeneration. *Sci. Rep.* **7**, 2699 (2017).

169. Karabiyik Acar, O., Kayitmazer, A. B. & Torun Kose, G. Hyaluronic Acid/Chitosan Coacervate-Based Scaffolds. *Biomacromolecules* **19**, 1198–1211 (2018).

170. Huang, Y. *et al.* Induction of articular chondrogenesis by chitosan/hyaluronic-acid-based biomimetic matrices using human adipose-derived stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4487 (2019).

171. Li, X. *et al.* Nano-pearl powder/chitosan-hyaluronic acid porous composite scaffold and preliminary study of its osteogenesis mechanism. *Mater. Sci. Eng. C* **111**, 110749 (2020).

172. Erickson, A. E., Lan Levengood, S. K., Sun, J., Chang, F. C. & Zhang, M. Fabrication and Characterization of Chitosan–Hyaluronic Acid Scaffolds with Varying Stiffness for Glioblastoma Cell Culture. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, 1800295 (2018).

173. Wang, K. *et al.* Culture on 3D Chitosan-Hyaluronic Acid Scaffolds Enhances Stem Cell Marker Expression and Drug Resistance in Human Glioblastoma Cancer Stem Cells. *Adv. Healthc. Mater.* **5**, 3173–3181 (2016).

174. Ifkovits, J. L. & Burdick, J. A. Review: Photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue Engineering* **13**, 2369–2385 (2007).

175. Udhayakumar, S. *et al.* L-Arginine intercedes bio-crosslinking of a collagen-chitosan 3D-hybrid scaffold for tissue engineering and regeneration:: In silico, in vitro, and in vivo studies. *RSC Adv.* **7**, 25070–25088 (2017).

176. You, C. *et al.* Silver nanoparticle loaded collagen/chitosan scaffolds promote wound healing via regulating fibroblast migration and macrophage activation. *Sci. Rep.* **7**, 10489 (2017).

177. Recombinant, E., Collagen, H. & Nanofibers, P. C. applied sciences Tissue Engineering 3D Porous Scaffolds Prepared from. (2021).

178. Yan, F. *et al.* Collagen-chitosan scaffold impregnated with bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of traumatic brain injury. *Neural Regen. Res.* **14**, 1780–1786 (2019).

179. Sun, Y. *et al.* 3D printing collagen/chitosan scaffold ameliorated axon regeneration and neurological recovery after spinal cord injury. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

107, 1898–1908 (2019).

180. Yin, Y. *et al.* Pore size-mediated macrophage M1-to-M2 transition influences new vessel formation within the compartment of a scaffold. *Appl. Mater. Today* **18**, 100466 (2020).

181. Fang, Y., Zhang, T., Song, Y. & Sun, W. Assessment of various crosslinking agents on collagen/chitosan scaffolds for myocardial tissue engineering. *Biomed. Mater.* **15**, 045003 (2020).

182. Kozlowska, J., Stachowiak, N. & Sionkowska, A. Preparation and characterization of collagen/chitosan poly (ethylene glycol)/nanohydroxyapatite composite scaffolds. *Polym. Adv. Technol.* **30**, 799–803 (2019).

183. Păun, I. A., Mustăciosu, C. C., Popescu, R. C., Călin, B. Ș. & Mihăilescu, M. Collagen/chitosan functionalization of complex 3D structures fabricated by laser direct writing via two-photon polymerization for enhanced osteogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–18 (2020).

184. Liu, X. *et al.* 3D bioprinted neural tissue constructs for spinal cord injury repair. *Biomaterials* **272**, 120771 (2021).

185. Wichterle, O. & Lím, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* **185**, 117–118 (1960).

186. Hoffman, A. S., Schmer, G., Harris, C. & Kraft, W. G. Covalent binding of biomolecules to radiation-grafted hydrogels on inert polymer surfaces. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **18**, 10–18 (1972).

187. Ulbrich, K., Subr, V., Podpěrová, P. & Burešová, M. Synthesis of novel hydrolytically degradable hydrogels for controlled drug release. *J. Control. Release* **34**, 155–165 (1995).

188. Qiu, Y. & Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **53**, 321–339 (2001).

189. Merino, S., Martín, C., Kostarelos, K., Prato, M. & Vázquez, E. Nanocomposite hydrogels: 3D polymer-nanoparticle synergies for on-demand drug delivery. *ACS Nano* **9**, 4686–4697 (2015).

190. Schoenmakers, R. G., Van De Wetering, P., Elbert, D. L. & Hubbell, J. A. The effect of the linker on the hydrolysis rate of drug-linked ester bonds. *J. Control. Release* **95**, 291–300 (2004).

191. Sutter, M., Siepmann, J., Hennink, W. E. & Jiskoot, W. Recombinant gelatin hydrogels for the sustained release of proteins. *J. Control. Release* **119**, 301–312 (2007).

192. McKenzie, M. *et al.* Hydrogel-based drug delivery systems for poorly water-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

soluble drugs. *Molecules* **20**, 20397–20408 (2015).

193. Annabi, N. *et al.* 25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials* **26**, 85–124 (2014).

194. Gaharwar, A. K., Peppas, N. A. & Khademhosseini, A. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 441–453 (2014).

195. Chen, M. C. *et al.* A nanoscale drug-entrapment strategy for hydrogel-based systems for the delivery of poorly soluble drugs. *Biomaterials* **30**, 2102–2111 (2009).

196. Buwalda, S. J., Vermonden, T. & Hennink, W. E. Hydrogels for Therapeutic Delivery: Current Developments and Future Directions. *Biomacromolecules* **18**, 316–330 (2017).

197. Lu, C., Yoganathan, R. B., Kociolek, M. & Allen, C. Hydrogel containing silica shell cross-linked micelles for ocular drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **102**, 627–637 (2013).

198. Zhong, D. *et al.* Study on poly(D,L -lactic) microspheres embedded in calcium alginate hydrogel beads as dual drug delivery systems. *J. Appl. Polym. Sci.* **129**, 767–772 (2013).

199. Censi, R., Di Martino, P., Vermonden, T. & Hennink, W. E. Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. *Journal of Controlled Release* **161**, 680–692 (2012).

200. Chen, F. M., Chen, R., Wang, X. J., Sun, H. H. & Wu, Z. F. In vitro cellular responses to scaffolds containing two microencapulated growth factors. *Biomaterials* **30**, 5215–5224 (2009).

201. Chung, Y. Il *et al.* Efficient revascularization by VEGF administration via heparin-functionalized nanoparticle-fibrin complex. *J. Control. Release* **143**, 282–289 (2010).

202. Ju, C., Sun, J., Zi, P., Jin, X. & Zhang, C. Thermosensitive micelles-hydrogel hybrid system based on poloxamer 407 for localized delivery of paclitaxel. *J. Pharm. Sci.* **102**, 2707–2717 (2013).

203. Panyam, J. & Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 329–347 (2003).

204. Silva, A. T. C. R., Cardoso, B. C. O., Silva, M. E. S. R. e, Freitas, R. F. S. & Sousa, R. G. Synthesis, Characterization, and Study of PLGA Copolymer in Vitro Degradation. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **06**, 8–19 (2015).

205. Lü, J.-M. *et al.* Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **9**, 325–341 (2009).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

206. Liu, J. *et al.* Controlled release of insulin from PLGA nanoparticles embedded within PVA hydrogels. in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **18**, 2205–2210 (2007).

207. Cascone, M. G., Pot, P. M., Lazzeri, L. & Zhu, Z. Release of dexamethasone from PLGA nanoparticles entrapped into dextran/poly(vinyl alcohol) hydrogels. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **13**, 265–269 (2002).

208. Jain, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* **21**, 2475–2490 (2000).

209. Hans, M. L. & Lowman, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **6**, 319–327 (2002).

210. Lin, S. Y., Chen, K. S., Teng, H. H. & Li, M. J. In vitro degradation and dissolution behaviours of microspheres prepared by three low molecular weight polyesters. *J. Microencapsul.* **17**, 577–586 (2000).

211. Shi, W., Huang, J., Fang, R. & Liu, M. Imparting Functionality to the Hydrogel by Magnetic-Field-Induced Nano-assembly and Macro-response. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 5177–5194 (2020).

212. Santos, L. J., Reis, R. L. & Gomes, M. E. Harnessing magnetic-mechano actuation in regenerative medicine and tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **33**, 471–479 (2015).

213. Huang, Q. *et al.* Hydrogel scaffolds for differentiation of adipose-derived stem cells. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 6255–6275 (2017).

214. Rose, J. C. *et al.* Biofunctionalized aligned microgels provide 3D cell guidance to mimic complex tissue matrices. *Biomaterials* **163**, 128–141 (2018).

215. Santo, V. E., Rodrigues, M. T. & Gomes, M. E. Contributions and future perspectives on the use of magnetic nanoparticles as diagnostic and therapeutic tools in the field of regenerative medicine. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **13**, 553–566 (2013).

216. Van Huizen, A. V *et al.* Weak magnetic fields alter stem cell–mediated growth. *Sci. Adv.* **5**, eaau7201 (2019).

217. Pardo, A. *et al.* Magnetic Nanocomposite Hydrogels for Tissue Engineering: Design Concepts and Remote Actuation Strategies to Control Cell Fate. *ACS Nano* **15**, 175–209 (2021).

218. Frka-Petesic, B., Sugiyama, J., Kimura, S., Chanzy, H. & Maret, G. Negative Diamagnetic Anisotropy and Birefringence of Cellulose Nanocrystals. *Macromolecules* **48**, 8844–8857 (2015).

219. Eguchi, Y., Ohtori, S., Sekino, M. & Ueno, S. Effectiveness of magnetically

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aligned collagen for neural regeneration in vitro and in vivo. *Bioelectromagnetics* **36**, 233–243 (2015).

220. Dubey, N., Letourneau, P. C. & Tranquillo, R. T. Neuronal contact guidance in magnetically aligned fibrin gels: Effect of variation in gel mechano-structural properties. *Biomaterials* **22**, 1065–1075 (2001).

221. Echave, M. C. *et al.* Biphasic Hydrogels Integrating Mineralized and Anisotropic Features for Interfacial Tissue Engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 47771–47784 (2019).

222. Wu, L. *et al.* Magnetically induced anisotropic orientation of graphene oxide locked by in situ hydrogelation. *ACS Nano* **8**, 4640–4649 (2014).

223. Torbet, J. *et al.* Orthogonal scaffold of magnetically aligned collagen lamellae for corneal stroma reconstruction. *Biomaterials* **28**, 4268–4276 (2007).

224. De France, K. J. *et al.* Injectable Anisotropic Nanocomposite Hydrogels Direct in Situ Growth and Alignment of Myotubes. *Nano Lett.* **17**, 6487–6495 (2017).

225. Gila-Vilchez, C. *et al.* Anisotropic magnetic hydrogels: Design, structure and mechanical properties. *Philos. Trans. R. Soc. A* **377**, 20180217 (2019).

226. Lee, E. A. *et al.* Application of magnetic nanoparticle for controlled tissue assembly and tissue engineering. *Arch. Pharm. Res.* **37**, 120–128 (2014).

227. Li, Y. *et al.* Magnetic Hydrogels and Their Potential Biomedical Applications. *Adv. Funct. Mater.* **23**, 660–672 (2013).

228. Li, Y. *et al.* Magnetic hydrogels and their potential biomedical applications. *Adv. Funct. Mater.* **23**, 660–672 (2013).

229. Tognato, R. *et al.* A Stimuli-Responsive Nanocomposite for 3D Anisotropic Cell-Guidance and Magnetic Soft Robotics. *Adv. Funct. Mater.* **29**, 1804647 (2019).

230. Landers, J., Roeder, L., Salamon, S., Schmidt, A. M. & Wende, H. Particle-Matrix Interaction in Cross-Linked PAAm-Hydrogels Analyzed by Mössbauer Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **119**, 20642–20648 (2015).

231. Sakai, R., Teramoto, Y. & Nishio, Y. Producing a magnetically anisotropic soft material: Synthesis of iron oxide nanoparticles in a carrageenan/PVA matrix and stretching of the hybrid gelatinous bulk. *Polym. J.* **50**, 251–260 (2018).

232. Helgeson, M. E., Chapin, S. C. & Doyle, P. S. Hydrogel microparticles from lithographic processes: Novel materials for fundamental and applied colloid science. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **16**, 106–117 (2011).

233. Yang, G. *et al.* From nano to micro to macro: Electrospun hierarchically structured polymeric fibers for biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **81**, 80–113 (2018).

USC

234. Chen, R., Chen, X., Jin, X. & Zhu, X. Morphology design and control of polymer particles by regulating the droplet flowing mode in microfluidic chips. *Polym. Chem.* **8**, 2953–2958 (2017).

235. Araújo-Custódio, S. *et al.* Injectable and Magnetic Responsive Hydrogels with Bioinspired Ordered Structures. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **5**, 1392–1404 (2019).

236. Rose, J. C. *et al.* Nerve Cells Decide to Orient inside an Injectable Hydrogel with Minimal Structural Guidance. *Nano Lett.* **17**, 3782–3791 (2017).

237. Omidinia-Anarkoli, A. *et al.* An Injectable Hybrid Hydrogel with Oriented Short Fibers Induces Unidirectional Growth of Functional Nerve Cells. *Small* **13**, 1702207 (2017).

238. Filippi, M. *et al.* Magnetic nanocomposite hydrogels and static magnetic field stimulate the osteoblastic and vasculogenic profile of adipose-derived cells. *Biomaterials* **223**, 119468 (2019).

239. Betsch, M. *et al.* Incorporating 4D into Bioprinting: Real-Time Magnetically Directed Collagen Fiber Alignment for Generating Complex Multilayered Tissues. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, 1800894 (2018).

240. Fuhrer, R., Athanassiou, E. K., Luechinger, N. A. & Stark, W. J. Crosslinking metal nanoparticles into the polymer backbone of hydrogels enables preparation of soft, magnetic field-driven actuators with muscle-like flexibility. *Small* **5**, 383–388 (2009).

241. Antman-Passig, M. & Shefi, O. Remote Magnetic Orientation of 3D Collagen Hydrogels for Directed Neuronal Regeneration. *Nano Lett.* **16**, 2567–2573 (2016).

242. Sapir, Y., Cohen, S., Friedman, G. & Polyak, B. The promotion of in vitro vessel-like organization of endothelial cells in magnetically responsive alginate scaffolds. *Biomaterials* **33**, 4100–4109 (2012).

243. Jiles, D. *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials*. *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials* (2015). doi:10.1201/b18948

244. Pino, P. del & Pelaz, B. Hyperthermia using inorganic nanoparticles. in *Frontiers of Nanoscience* **4**, 309–335 (Elsevier, 2012).

245. Leslie-Pelecky, D. L. & Rieke, R. D. Magnetic properties of nanostructured materials. *Chemistry of Materials* **8**, 1770–1783 (1996).

246. Figuerola, A., Di Corato, R., Manna, L. & Pellegrino, T. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacological Research* **62**, 126–143 (2010).

247. Paterson, E. The Iron Oxides. Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses. *Clay Miner.* **34**, 209–210 (1999).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

248. Szotek, Z. *et al.* Electronic structures of normal and inverse spinel ferrites from first principles. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **74**, (2006).

249. Parkinson, G. S. Iron oxide surfaces. *Surface Science Reports* **71**, 272–365 (2016).

250. Laurent, S. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110 (2008).

251. Dennis, C. L. & Ivkov, R. Physics of heat generation using magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia* **29**, 715–729 (2013).

252. Kandasamy, G. & Maity, D. Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics. *International Journal of Pharmaceutics* **496**, 191–218 (2015).

253. Jia, Y. *et al.* Co-encapsulation of magnetic Fe3O4 nanoparticles and doxorubicin into biodegradable PLGA nanocarriers for intratumoral drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 1697–1708 (2012).

254. Zanella, R. Metodologías para la síntesis de nanopartículas controlando forma y tamaño. *Mundo Nano. Rev. Interdiscip. en Nanociencia y Nanotecnología* **5**, (2014).

255. Zhang, L. *et al.* Study of the effect of synthetic procedure on microstructure, defects and magnetism of multiferroic CuFeO2 ceramics. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **124**, 353 (2018).

256. Daou, T. J. *et al.* Hydrothermal synthesis of monodisperse magnetite nanoparticles. *Chem. Mater.* **18**, 4399–4404 (2006).

257. Lin, S., Lin, K., Lu, D. & Liu, Z. Preparation of uniform magnetic iron oxide nanoparticles by co-precipitation in a helical module microchannel reactor. *J. Environ. Chem. Eng.* **5**, 303–309 (2017).

258. Unni, M. *et al.* Thermal Decomposition Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Diminished Magnetic Dead Layer by Controlled Addition of Oxygen. *ACS Nano* **11**, 2284–2303 (2017).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2 Metodología

En este Capítulo se presentan los materiales y metodología de síntesis de los diferentes hidrogeles, tanto puros como híbridos, las partículas poliméricas de PLGA y las nanopartículas superparamagnéticas basadas en óxido de hierro, así como las técnicas de caracterización de sus propiedades físico-químicas y/o térmicas.

2.1 Materiales

Los reactivos necesarios para la síntesis de los andamios poliméricos fueron: Gelatina tipo B (Gel, de piel bovina), disolución salina tampón fosfato (PBS, pH 7.4, para preparar 1 L de disolución la concentración que se utilizó en todos los experimentos fue 1X), anhídrido metacrílico (MA) con pureza del 94%, quitosanos de diferentes pesos moleculares (bajo (L), media (M) y alta (H) viscosidad), colágeno tipo-I, 2-hidroxi-1-[4-(hidroxiethoxi)phenil]-2-methil-1-propanona (Irgacure 2959), hidróxido de sodio NaOH, lisozima de huevo de gallina, ácido acético, kit de ensayo de viabilidad CCK-8, kit de detección de fosfatasa alcalina (ALP) y óxido de deuterio (D_2O) todo suministrado por Sigma-Aldrich. Sal sódica de ácido hialurónico (HA, M_w=80000-100000 kDa) suministrada por Carbosynth. Membrana de diálisis Spectra/Por 4 (12-14 kDa MWCO) suministrada por Spectrum Lab Inc. Moldes de politetrafluoroetileno (PTFE, Teflon®) de 15 mm de diámetro y 40 mm de altura fabricados en la compañía local CNC. Otros reactivos fueron de la mayor pureza.

Los reactivos utilizados para síntesis de las partículas de PLGA fueron: Poli(vinil alcohol) (PVA) como agente estabilizante con Mw=30000-70000 g mol^{-1}, PLGA Resomer RG 503 H con una razón de D,L-ácido láctico:ácido glicólico de 50:50 con pesos moleculares de 7-17kDa, 24-38 kDa y 38-54kDa, acetona, diclorometano (DCM), dexametasona, todo suministrado por Sigma-Aldrich.

Los reactivos necesarios para la síntesis de las diferentes MNPs fueron: acetilacetonatos de hierro (III) (pureza 99%) y zinc (II) (97%) como compuestos precursores de los elementos metálicos que forman parte de la estructura de las MNPs, 1,2-hexadecanediol (90%) como agente reductor, ácido oleico (90%) y oleilamina (70%) como agentes surfactantes y éter bencílico (99%) como disolvente en el que llevar a cabo la reacción de

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

descomposición térmica. Para la preparación y microcorte de las membranas de fibras poliméricas se utilizaron policaprolactona (PLC) con un peso molecular de M_n = 80000, isotiocianato de rodamina B, fluoresceinamina isómero I y compuesto de temperatura de corte óptima (OCT). Todos los reactivos fueron subministrados por *Sigma-Aldrich* y usados sin purificación previa.

2.2 Procesos sintéticos

2.2.1 Preparación de hidrogeles

2.2.1.1 Hidrogeles basados en quitosano

Los hidrogeles puros de CS e híbridos de CS-HA y CS-HA-Coll se prepararon por un proceso de autoensamblaje en diferentes composiciones, en concreto, 3% CS, 3%HCS-1%HHA, 3%MCS-1%HHA, 3%LCS-1%HHA, 3%HCS-1%LHA, 4%HCS-1%HHA, 3%HCS-2·HHA, 3%HCS-2%LHA, 3%HCS-2%HHA-1%Coll y 3%HCS-2%HHA-2%Coll.

Los hidrogeles puros de CS se prepararon disolviendo el CS en una disolución agua-1% ácido acético bajo agitación magnética de 300 rpm. Posteriormente, la disolución se mantuvo en reposo durante una hora a temperatura ambiente para eliminar posibles burbujas.

Los hidrogeles híbridos de A%XCS-B%YHA (donde A% y B% representan la concentración %p/v de CS y HA en el andamio, mientras que X e Y son los pesos moleculares de CS y HA: H: alto peso molecular, M: medio peso molecular, L: bajo peso molecular) se mezclaron volúmenes iguales de HA y CS a las concentraciones deseadas, añadiendo la disolución de HA gota a gota sobre la de CS a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se dejó en agitación magnética a 300 rpm durante 24 horas.

Para formar los andamios híbridos A%XCS-B%YHA-C%Coll (donde A%, B% y C% representan la concentración %p/v de CS, HA y Coll en el andamio, mientras que X e Y son los pesos moleculares de CS y HA: H: alto peso molecular, M: medio peso molecular, L: bajo peso molecular), el Coll se añadió a la concentración deseada en la disolución previa de CS-HA y se mezcló a temperatura ambiente 12 horas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La disolución de polímero final se colocó en placas de 24 pocillos, se congeló a -20 ºC durante 24 horas y finalmente se liofilizó durante 72 horas. Los andamios preparados se seccionaron en discos gruesos de 5 mm, se neutralizaron en 25% v/v de hidróxido de amonio durante una hora en vacío y finalmente se lavaron con agua desionizada 4 veces y se sumergieron en PBS, pH 7.4 toda la noche para neutralizar y eliminar el exceso de base. Posteriormente, los andamios se volvieron a congelar a -20 ºC y a liofilizar. Por último, las matrices poliméricas se esterilizaron con etanol al 70% v/v durante una hora y se dispusieron en un agitador orbital toda la noche para eliminar el exceso de etanol. Todos los andamios se almacenaron en el congelador bajo condiciones estériles antes de ser usados para la evaluación de su respuesta biológica.

2.2.2 Metacrilación de la gelatina y el ácido hialurónico

Para la metacrilación de Gel se preparó una disolución 10% (p/v, 10g en 100 mL) disuelta en PBS a 50ºC bajo agitación magnética. Después de la disolución completa de la Gel, se agregó gota a gota 1.1 mL de MA para obtener una disolución con una concentración final de 1% (v/v) de MA dejándose reaccionar durante 3 horas a 50ºC bajo agitación magnética. Posteriormente, se detuvo la reacción diluyendo 5 veces (v/v, 400 mL) con PBS (1X) y se dializó durante 7 días usando una membrana de 12-14 kDa en agua desionizada a 40ºC con recambios diarios de agua para eliminar las impurezas que pudieran ser tóxicas, como el MA que no reacciona.

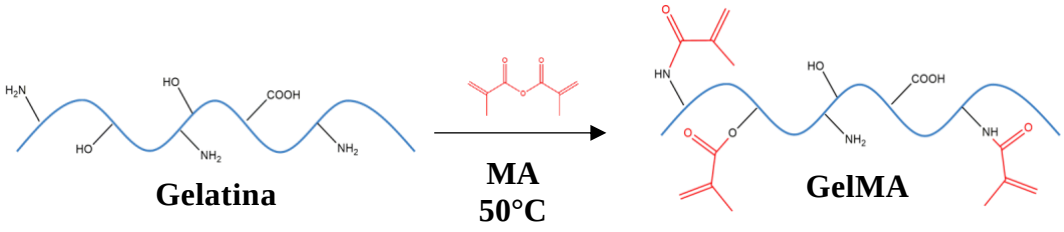


Figura 2.1.- Esquema de metacrilación de la gelatina.

Para la metacrilación de HA se utilizó un procedimiento similar al de la Gel. Se preparó una disolución 1% (p/v, 1g en 100 mL) de HA disuelto en agua MilliQ a 4ºC bajo agitación magnética. Después de la disolución completa del HA, se agregó gota a gota 1.1 mL de MA para obtener una disolución con una concentración final de 1% (v/v) de MA y se dejó reaccionar durante 24 horas a 4ºC bajo agitación magnética. Durante la reacción de metacrilación, el pH de la disolución se mantuvo entre 8 y 10 mediante la adición de NaOH a una concentración 5 M. La disolución resultante se dializó durante 3

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

días usando una membrana de 12-14 kDa en agua desionizada a una temperatura de 4ºC, con recambios diarios.

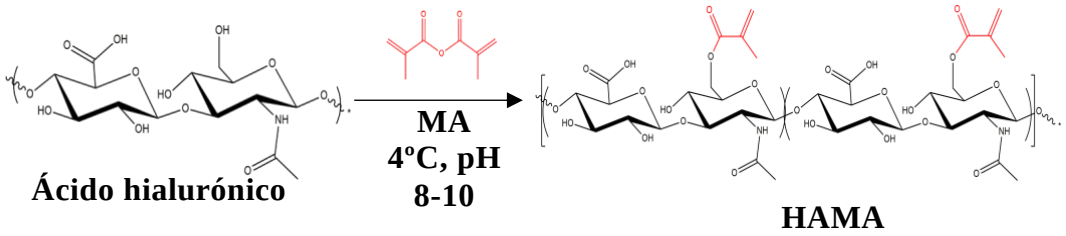


Figura 2.2.- Esquema de la metacrilación de HA.

Después del proceso de diálisis, la GelMA (Figura 2.1) y el HAMA (Figura 2.2) se congelaron en nitrógeno líquido, se liofilizaron y se obtuvo el material en polvo que se almacenó a -20ºC hasta su uso.

El grado de metacrilación (GM) de GelMA y HAMA se obtuvo por medidas de resonancia magnética nuclear de protón (^{1}H RMN). Se preparó una disolución de cada polímero modificado a una concentración de 30 mg/mL en óxido de deuterio (D_2O). El espectro ^{1}H RMN se obtuvo con un espectrofotómetro Bruker DRX 500 (Bruker, Billerica, MA, USA) a 400 MHz.

El GM de GelMA se obtuvo por normalización del espectro tomando como referencia los grupos de fenilalanina en el intervalo 7.6-7.1 ppm para cinco protones e integrando los protones metacrilados 5.4-6.6 ppm. El GM se calculó usando un contenido de fenilalanina de 0.1126 mmol/g [1] según la siguiente ecuación:

$$GM_{Gel} = \left(\frac{A_m(Grupos\ metacrilo)}{A_F(Fenilalanina)}\right) * 5H * Contenido\ de\ Fenilalanina\left(\frac{mmol}{g}\right) \quad (2.1)$$

donde A_m es el área de los picos metacrilo y A_F es el área de los protones fenilalanina a 7.1-7.6 ppm. Para el HAMA, el GM se obtuvo usando la razón entre el área de los protones metacrilo (5.6-6.2 ppm) y el de los protones metilo del HA (~2.0 ppm)[2–4], usando la siguiente ecuación:

$$GM_{HA} = \frac{Protones\ metacrilo}{Protones\ metilo} * 100 \quad (2.2)$$

2.2.2.1 Hidrogeles basados en GelMA y HAMA

Los hidrogeles puros e híbridos se prepararon a diferentes concentraciones de GelMA (2, 6, 10 % p/v) y HAMA (1, 3, 5% p/v) como se muestra en la Figura 2.3. Brevemente, los hidrogeles puros de GelMA se prepararon mezclando el polímero precursor en PBS a

37ºC con una concentración de 0.5 % p/v del fotoiniciador Irgacure® 2959. Los hidrogeles puros de HAMA e híbridos de GelMA-HAMA se obtuvieron mezclando diferentes concentraciones de los polímeros con una concentración 0.1% p/v del fotoiniciador Irgacure® 2959. Las mezclas poliméricas se depositaron en moldes de Teflón® de 15 mm de diámetro y se curaron con luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 365 nm con una potencia de 4W/cm^2 durante 10 minutos.

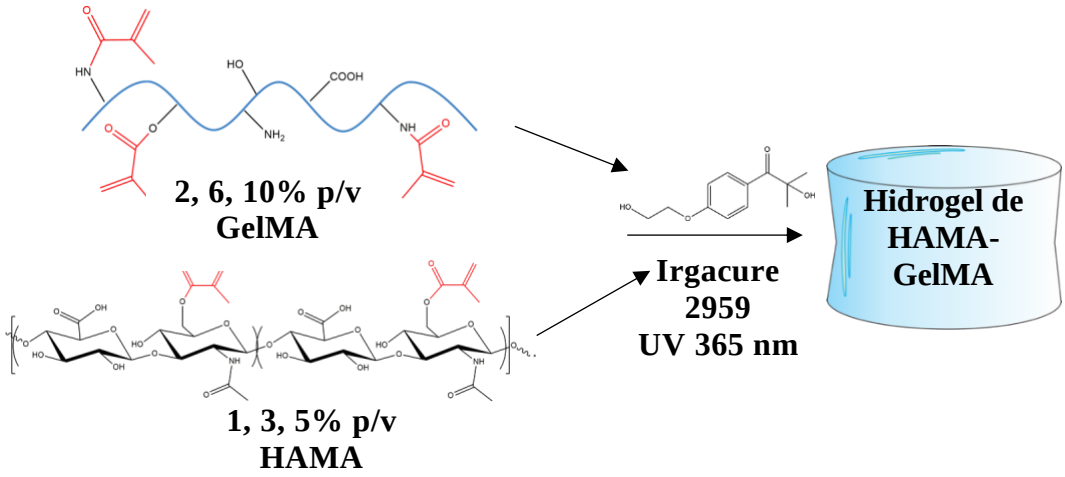


Figura 2.3.- Esquema de entrecruzamiento de hidrogeles de GelMA-HAMA.

2.2.3 Síntesis de partículas de PLGA

La síntesis de las partículas de PLGA se llevó a cabo mediante el método de emulsión simple. Así, se disolvieron 100 mg de PLGA (24-38 kDa) en 5mL diclorometano (DCM). Esta disolución representa el 10% de la fase acuosa y se añadió gota a gota a una disolución poli(acetato de vinilo) (PVA) con una concentracion de 1% p/v, que fue previamente disuelta y estabilizada. La mezcla resultante de PLGA en la disolución de PVA se emulsionó con una punta ultrasonicadora durante un minuto a una potencia de 40 W, poteriormente, esta emulsión se dejo en agitación magnética (250 rpm) toda la noche para la evaporación del diclorometano. La disolución resultante se centrifuga dos veces a 9000 rpm durante 20 min, obteniéndose un precipitado blanco. El sobrenadante se retiró y el precipitado se resuspendión en agua MQ, en el mismo volumen que la disolución inicial mientras que en la segunda centrifugación se resuspendió en la mitad del volumen inicial.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.4 Síntesis de las MNPs

Las síntesis de las MNPs de forma esférica se llevaron a cabo mediante procesos de descomposición térmica, tal y como se comentó en el Capítulo anterior, ya que es una de las rutas sintéticas que da lugar a sistemas de partículas más monodispersas. Se utilizó un reactor de 100 mL de volumen con tres bocas conectado a un condensador de reflujo de agua y a una línea Schlenk estándar, con el fin de generar ambientes inertes o de presión reducida en el interior del recipiente[5]. Este reactor se colocó sobre una manta calefactora para suministrar calor y controlar la temperatura de la reacción, empleándose agitación magnética durante el proceso sintético (Figura 2.4)[6].

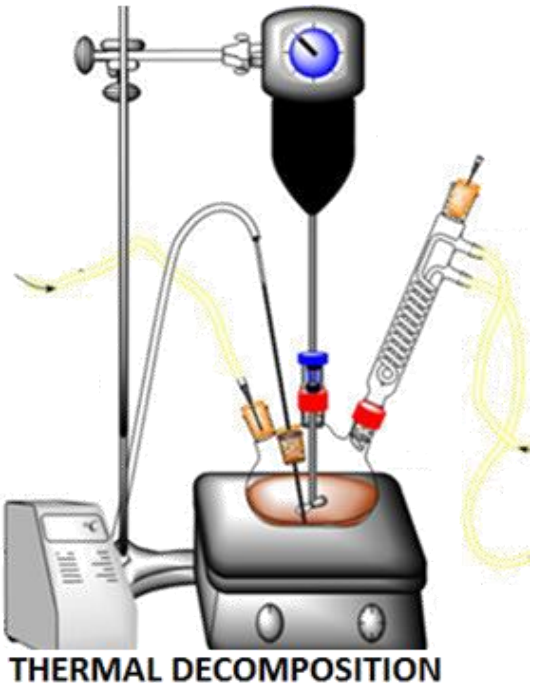


Figura 2.4.- Imagen del montaje experimental empleado para la síntesis de MNPs. Imagen reproducida de la referencia 263 Tesis doctoral de Alberto Pardo Montero (2018).

En una síntesis típica de MNPs esféricas de óxido de hierro con un diámetro aproximado de 8.50nm, 1.059 g de $Fe(acac)_3$ (3 mmol) se mezclan con 1.695 g de ácido oleico (6 mmol), 1.605 g de oleilamina (6 mmol) y 2.585 g de 1,2-hexadecanediol (10 mmol) en 20 mL de éter bencílico, obteniéndose una disolución de color marrón oscuro. Después de introducir la disolución en un baño de ultrasonidos durante 2 min, esta se vierte en el reactor y se inicia la agitación magnética a una velocidad de 700 rpm. La temperatura de la disolución se incrementa a 110ºC y, una vez alcanzada, se aplica un vacío primario de 10 mbar durante 60 min. Posteriormente, se sustituye el vacío por un flujo de nitrógeno a través de la línea Schlenk y se eleva la temperatura a 210ºC a una velocidad de

USC DE COMPOSTELA

calentamiento de 8ºC/min, manteniéndose esta durante 120 min. Finalmente, se incrementa la temperatura de la disolución de reacción hasta los 295ºC a una velocidad de 5ºC/min, manteniéndose el sistema bajo reflujo durante otros 60 min durante los cuales la disolución adquiere un color negro intenso.[7,8]

Después de dejar enfriar la disolución de MNPs hasta alcanzar la temperatura ambiente bajo agitación durante aproximadamente 2h, se añaden al reactor 50 mL de etanol; la disolución resultante se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min obteniéndose un precipitado de color negro. El sobrenadante se retira y el material precipitado se dispersa en 20 mL de tolueno con 0.05 mL de ácido oleico y 0.05 mL de oleilamina, introduciéndose en el baño de ultrasonidos durante 10 min. Esta nueva disolución se centrifuga a 3000 rpm durante 10 min a fin de eliminar posibles agregados de MNPs, descartándose el material precipitado. Al sobrenadante resultante se le añaden 50 mL de etanol y se centrifuga de nuevo a 4000 rpm durante 10 min, formándose un nuevo precipitado de color negro que se redispersa en tolueno de cara a la posterior caracterización de las MNPs mediante TEM. Mediante la disminución de volumen total de éter bencílico se lograron MNPs de óxido de hierro con un tamaño ligeramente superior, mientras que a través de la sustitución parcial del $Fe(acac)_3$por $Zn(acac)_2$ se obtuvieron MNPs dopadas con zinc.

2.2.5 Preparación de partículas de PLGA con dexametasona o con respuesta magnética

La encapsulación de dexametasona en las partículas de PLGA se llevó a cabo mediante la metodología descrita en la sección 2.2.3, donde se disuelven 100 mg de PLGA (24-38 kDa) y 25 mg de dexametasona en 5mL diclorometano (DCM) y se sonican hasta su completa solubilización. Esta disolución representa el 10% de la fase acuosa y se añadió gota a gota a una disolución poli(acetato de vinilo) (PVA) con una concentración de 1% p/v, que fue previamente disuelta y estabilizada. La mezcla resultante de PLGA con dexametasona en la disolución de PVA se emulsionó con una punta ultrasonicadora durante un minuto a una potencia de 40 W, poteriormente, esta emulsión se dejó en agitación magnética (250 rpm) toda la noche para la evaporación del diclorometano. La disolución resultante se centrifuga dos veces a 9000 rpm durante 20 min, obteniéndose un precipitado blanco. El sobrenadante se retiró y reservabo para su posterior análisis en la eficiencia de encapsulación del fármaco. Por otro lado, el precipitado se resuspende en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

agua MQ, en el mismo volumen que la disolución inicial en la primera centrifugación mientras que en la segunda centrifugación se resuspende en la mitad del volumen inicial.

Las partículas poliméricas de PLGA (24-38 kDa) modificadas magnéticamente también se sintetizaron por el método de emulsión simple. En una preparación estándar, una disolución de PLGA de concentración 20 mg ml^{-1} se mezcló con una disolución de MNPs en una razón 1/1 (v/v) utilizando diclorometano como disolvente. La concentración de la disolución magnética fue variada entre 2 y 20 mg·ml^{-1} a fin de obtener partículas híbridas con diferente carga magnética (concentración de MNPs). La disolución resultante de esta mezcla se añadió gota a gota sobre una disolución acuosa de PVA de concentración 1% p/v previamente preparada y estabilizada. La disolución obtenida se emulsionó mediante una punta ultrasónica durante 15 min en un baño de hielo utilizando una potencia de 50 W realizando, a continuación, la evaporación del diclorometano bajo agitación orbital (250 rpm) durante 12 h. Las partículas de PLGA cargadas con MNPs se centrifugaron dos veces (9000 rpm, 20 min) siendo finalmente resuspendidas en agua.

2.2.6 Preparación de microfibras de PCL con respuesta magnética

Las microfibras híbridas de PCL-MNPs se sintetizaron mediante procesos de electrohilado (Figura 2.5), siendo la respuesta magnética proporcionada a través de la incorporación de las nanoestructuras magnéticas previamente sintetizadas en las disoluciones precursoras. En una síntesis típica, se prepararon disoluciones de policaprolactona (17% p/v) disolviendo el polímero en una mezcla 70/30 (v/v) de cloroformo y N-N-Dimetilformamida (DMF). Las MNPs se disolvieron en la fase del cloroformo antes de la preparación de las muestras aprovechando su alta estabilidad en este disolvente gracias a su recubrimiento con ácido oleico y oleilamina. Por su parte, los compuestos fluorescentes, rodamina y fluoresceinamina, se disolvieron en la fase DMF. Las disoluciones se mantuvieron bajo agitación magnética (600 rpm) durante 24h y posteriormente se aplicaron 5 pulsos de ultrasonidos de 10 segundos (amplitud 40%) para mejorar la homogeneidad de los sistemas. Las disoluciones se cargaron dentro de jeringuillas de 5 ml y se llevaron a cabo procesos de electrohilado bajo diferentes condiciones de flujo y diferencia de potencial entre la aguja de salida de la disolución y la superficie colectora (Tabla 2.1). Las membranas fibrosas obtenidas se cortaron en secciones de ~5 x 5 mm y se sumergieron en etanol durante dos horas. Posteriormente, estos trozos de las membranas se incorporaron dentro de bloques de OCT que se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

congelaron a -20 ºC y se cortaron con diferentes espesores haciendo uso de un micrótomo-criostato. Las fibras resultantes de estos cortes se colocaron en agua templada para disolver el OCT y se lavaron varias veces (4000 rpm, 5 min), descartando el sobrenadante después de cada centrifugado y añadiendo más agua templada. Finalmente, se aplicaron sucesivos pulsos de ultrasonidos de 5 segundos para dispersar las fibras.

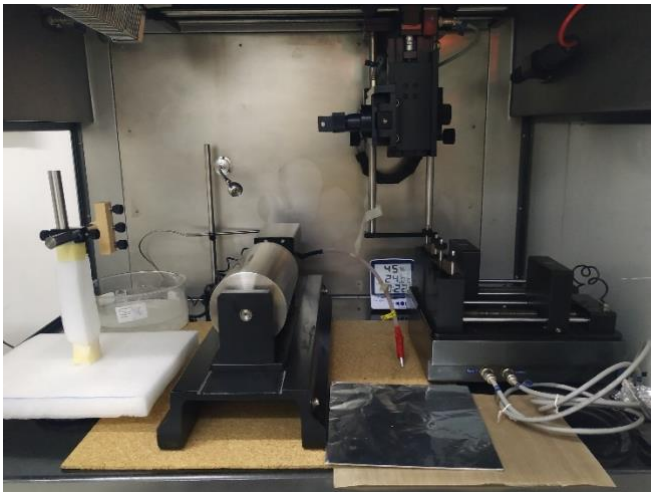


Figura 2.5.- Fotografía del equipo de electrohilado usado para la producción de microfibras poliméricas con respuesta magnética.

Tabla 2.1.- Parámetros de los procesos de electrohilado aplicados para preparar microfibras de PCL modificadas con distintas cantidades de MNPs.

Concentración MNPs [% p/p]	Voltaje [mV]	Flujo [ml·h^{-1}]	Distancia punta-colector [cm]
-	11.0	1.0	12.5
1%	11.5	1.0	12.5
5%	13.1	1.0	12.5
10%	13.7	1.0	12.5

2.2.7 Preparación de hidrogeles de gelatina cargados con microfibras/partículas híbridas y aplicación de campos magnéticos externos

Las disoluciones precursoras de los hidrogeles se prepararon disolviendo 250 mg de gelatina de piel porcina tipo A en 250 ml de agua a 60ºC durante 90 min (10% p/v). Tras esto, la temperatura de las disoluciones se bajó a 37ºC, a fin de evitar el fundido en el caso de las fibras magnéticas de PCL al ser añadidas, y se ajustó el pH a 7.4. Dentro de una estufa a 37ºC y sobre un portamuestras colocado entre un sistema de imanes paralelos,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

se mezclaron volúmenes iguales de disoluciones de gelatina y disoluciones de microfibras/partículas con respuesta magnética en agua a diferentes concentraciones. Se hicieron varias cargas y descargas con la pipeta a fin de asegurar la correcta homogenización de la mezcla de gelatina y estructuras híbridas, evaluando a continuación la intensidad y el tiempo de aplicación de los campos magnéticos necesarios para lograr el alineamiento de las fibras/partículas dentro de los hidrogeles. Posteriormente, las muestras se enfriaron a 4ºC para inducir la gelificación de la gelatina y conformar los hidrogeles, manteniéndose el ordenamiento magnético establecido previamente.

2.2.8 Generación de campos magnéticos

Los campos magnéticos utilizados para la organización de las estructuras híbridas con respuesta magnética dentro de los hidrogeles se generaron mediante un sistema de dos imanes de neodimio dispuestos de forma paralela con sus polos enfrentados. Esta configuración experimental permite la generación de campos magnéticos uniaxiales con un valor altamente constante entre los imanes. Haciendo uso de un gausímetro, determinamos que el campo magnético creado en el plano central entre los imanes varía desde 638 ± 12mT cuando la distancia entre ellos es de apenas 0.5 cm hasta 24 ± 3mT cuando esta distancia se incrementa a 8.7 cm, distancia máxima que permite nuestro montaje experimental para sujetar los imanes e impedir que se unan debido a la atracción magnética entre los mismos (Tabla 2.2 y Figura 2.6).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2.2.- Medidas de la densidad de flujo magnético en el punto central entre los imanes paralelos a diferentes inter-distancias entre los mismos. Se efectuaron seis mediciones a cada distancia para determinar un valor promedio.

Distancia imanes [cm]	Densidad de flujo magnético [mT]						
	M1	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**	**M6**	**PROMEDIO**
0.5	627	648	636	647	642	628	**638 ± 12**
1.5	374	359	353	350	367	357	**360 ± 10**
2.5	196	214	200	207	213	218	**208 ± 9**
3.5	151	157	141	152	149	150	**150 ± 6**
4.2	123	121	124	130	119	136	**126 ± 6**
5.0	77	83	83	79	87	76	**81 ± 5**
6.0	60	69	71	73	63	62	**66 ± 7**
7.7	43	42	43	39	41	45	**40 ± 4**
8.7	22	25	23	24	26	24	**24 ± 3**

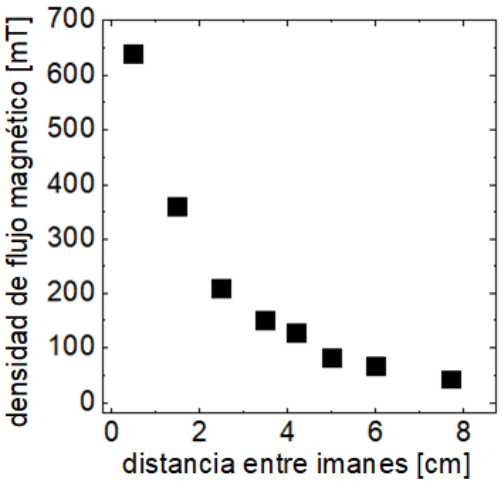


Figura 2.6.- Representación gráfica de la densidad de flujo magnético entre los imanes paralelos en función inter-distancia entre los mismos.

2.3 Caracterización de los andamios y las partículas orgánicas e inorgánicas

2.3.1 Fracción de Gel

El porcentaje de la fracción de gel en los hidrogeles se determinó por gravimetría. En el caso de los hidrogeles basados en CS, los diferentes hidrogeles liofilizados se pesaron y posteriormente se sumergieron en 20 mL de PBS durante 8 días a temperatura ambiente

mientras que en los de GelMA y HAMA se hizo en 10 mL de PBS durante 96 horas a 37ºC. Pasado el tiempo adecuado en cada tipo de hidrogel, se congelaron en nitrógeno líquido, se liofilizaron y pesaron. El porcentaje de la fracción de gel se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$Gel(\%) = \frac{W_w}{W_i} * 100 \quad (2.3)$$

donde W_i y W_w son los pesos (g) del hidrogel antes y después de los lavados para extraer las partes solubles. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.3.2 Densidad aparente

La densidad de los hidrogeles se evaluó a través de la razón del peso del hidrogel liofilizado respecto a su volumen. La densidad aparente, ρ, se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{w}{\pi * (D/2)^2 * H} \quad (2.4)$$

donde ρ es la densidad aparente (g/cm^3), *w* es el peso del hidrogel (g), D el diámetro (cm) y H el grosor del hidrogel (cm), respectivamente.

2.3.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

La caracterización química de los hidrogeles se realizó por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier reflectante atenuada (ATR-FTIR). Hidrogeles secos se depositaron sobre portas para micromuestras. La adquisición de los datos se realizó utilizando un espectrofotómetro FT-IR (Varían 670, Agilent, Santa Clara, CA, USA) acoplado a un microscopio de mapeo (Varian 620-IR, Agilent, Santa Clara, CA, USA) y un accesorio de diamante ATR. Las muestras se analizaron en el intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} con una resolución espectral de 4 cm^{-1} y 64 escaneos min^{-1} para un total de 100 escaneos para cada espectro.

2.3.4 Análisis térmico

El comportamiento térmico de los hidrogeles se analizó por análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para el estudio de descomposición, los hidrogeles liofilizados se colocaron en una cápsula de platino HT para el TGA 55 (TA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Instruments, EE. UU.). De este modo, el peso de todas las muestras fue entre 3 y 8 mg con una rampa de calentamiento de 10ºC/min. El intervalo de temperatura fue de 40 a 800ºC bajo una velocidad de flujo de nitrógeno de 60 mL/min.

Para el estudio de la estabilidad térmica, se utilizó un microcalorímetro diferencial de barrido Q-100 (TA Instruments, USA), en el que se colocaron entre 3 y 5 mg de hidrogel liofilizado en unos platillos herméticos de aluminio y se calentaron desde -40ºC hasta 300ºC con una rampa de calentamiento de 10ºC/min bajo atmósfera de N_2 y se utilizó como referencia un platillo hermético de aluminio vacío.

2.3.5 Medidas de reología oscilatoria

Las propiedades reológicas de los andamios se determinaron usando un reómetro de esfuerzo constante Anton-Para MCR301 con una geometría de platos paralelos de 15 mm y un gap 240 μm. Primeramente, se realizaron medidas oscilatorias a deformación variable con el fin de obtener la región viscoelástica lineal (LVR) usando un rango de deformaciones de 0.1 a 100% en la frecuencia (ω) de 6.28 rad/s (1Hz), a 37ºC. La región LVR se define como el rango de deformación en el que el módulo elástico ($G´$) es independiente de la deformación aplicada (%γ). Después de una deformación crítica (%γ_c), $G´$ presenta un cambio en la pendiente con una disminución a medida que aumenta la deformación, debido a la ruptura de la microestructura del hidrogel. Una vez que se determinó la LVR, se monitorizaron cambios en las propiedades mecánicas de otro conjunto de hidrogeles entrecruzados en función de la frecuencia con experimentos de barrido oscilatoria desde 0.1 a 100 rad/s, con valores de deformación dentro de la LVR a 37ºC. Todas las muestras se estabilizaron inicialmente durante 3 min, mientras que se colocó una unidad de cámara de humidificación alrededor de las geometrías para evitar la evaporación del agua.

De modo particular, para los hidrogeles de Gel-HAMA, la cinética de fotopolimerización de los hidrogeles se siguió con el mismo reómetro. La fotopolimerización de GelMA (2, 6 y 10% p/v), HAMA (1, 3 y 5% p/v) y las mezclas de GelMA-HAMA se realizó agregando fotoiniciador Irgacure 2959 (0.5% p/v para GelMA, 0.1% p/v para HAMA e híbrido GelMA-HAMA) a las distintas soluciones de polímero y se irradiaron con luz UV (365nm, UV Omnicure S1500 a 30% de su capacidad nominal de 23 W/cm^2) durante 10

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

min iniciando la irradiación a los 50s de los experimentos de barrido de tiempo oscilatorio.

2.3.6 Pruebas de compresión mecánica

Los andamios puros e híbridos se sometieron a test de compresión unidireccionales en un banco de tracción con una celda de carga de 30 kg (TA, TX*Plus*, Stable Micro Systemas, Ltd., Godalming, UK) a una velocidad de cruceta de 1mm/min. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (25ºC), presión atmosférica y humedad relativa del 45%. El módulo de Young (E) se calculó a partir de la pendiente en la sección lineal de la curva esfuerzo-deformación a baja deformación (<20%). Las pruebas se realizaron por triplicado en cada composición de hidrogel.

2.3.7 Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo

La morfología y la microestructura de los hidrogeles se evaluó usando microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM, Zeiss Ultra-Plus, Germany). Los hidrogeles primeramente se hincharon durante dos días en PBS a 37ºC, y después se congelaron en nitrógeno líquido durante 2 minutos para después facturar los hidrogeles sin dañar la estructura. Posteriormente, las muestras se liofilizaron y se fijaron con adhesivo conductivo en soportes de aluminio, se recubrieron de iridio y se observaron a voltaje de aceleración de 20 kV. El área promedio de sección transversal de los poros se calculó usando el software ImageJ (NIH, USA).

2.3.8 Estudio de la porosidad de los hidrogeles

2.3.8.1 Porosimetría por el método del desplazamiento de líquido

Para determinar la porosidad de los andamios basados en CS, se utilizó el método de desplazamiento de líquido[9]. Así, los andamios se sumergieron en un cilindro graduado conteniendo un volumen conocido de etanol, V_1 ya que este no-disolvente para polímeros penetra dentro de los poros rápidamente sin inducir su disolución, encogimiento o hinchamiento. Posteriormente, el cilindro se somete a vacío para forzar al etanol a entrar en los poros del andamio hasta que no se observen burbujas de aire saliendo de la muestra. El volumen total de etanol-andamio se considera V_2. Finalmente, el andamio se retira del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

etanol y se mide el volumen de etanol que permanece en el cilindro, V_3. La porosidad (P) del andamio se evalúa según la siguiente expresión:

$$P(\%) = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} * 100 \quad (2.5)$$

El experimento se llevó a cabo por triplicado.

2.3.8.2 Porosimetría de inmersión de mercurio

En las pruebas porosidad de los hidrogeles de GelMA-HAMA en la que se estudiaron las propiedades de textura de los andamios (volumen total de poro-V_p, distribución de tamaño de poro y porosidad abierta, ε_{MIP}) antes y después del almacenamiento se midieron con porosimetría de intrusión de mercurio (MIP) con un equipo Autopore IV (modelo 9500, Micrometrics, Norcross, GA, USA). El equipo de MIP trabajo con un penetrómetro de 3 mL para sólidos y a presiones de trabajo de 0.07 a 1724 bar. Los valores de porosidad y tamaño de poro (MIP-tamaño medio de poro) se calcularon a partir del volumen de mercurio introducido en los andamios con el incremento de la presión usando la ecuación de Washburn[10]:

$$D = \frac{-4\,\gamma \cos\theta}{P} \quad (2.6)$$

2.3.9 Microtomografía computacional

La porosidad y la distribución de tamaños de los andamios seleccionados se analizó mediante microtomografía computacional usando un instrumento Skyscan 1272 (Bruker, Germany) operando a 40 kV con un tamaño de píxel de imagen de ~3µm y 2k de resolución. Las imágenes 3D se reconstruyeron y se analizaron con el paquete de software 3D Suite (Burker, Germany). Primeramente, se aisló una región de interés (ROI) de ~ 4 x 4 x 4 mm^3 representativa del resto del andamio para evaluar la influencia de los parámetros de trabajo sobre los datos obtenidos. Posteriormente, se calibró el límite de la escala de grises para diferenciar la fracción de huecos (poros e interconexiones) respecto al material sólido. Una vez hecho, la porosidad de los andamios se calculó en la ROI, expresada en porcentaje de voxels respecto al número total de voxels midiendo por las rutinas CTAn y CTVox del paquete de software 3D Suite.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.3.10 Hinchamiento

El hinchamiento de los hidrogeles se midió por gravimetría. Para ello, hidrogeles puros e híbridos se sumergieron en 10 mL de disolución tampón PBS, pH 7.4 a 37ºC. El cambio de peso inicialmente se midió cada 60 min durante 12 h y después cada 12 h hasta alcanzar el equilibrio de hinchamiento. A continuación, se determinó el peso húmedo de los hidrogeles hinchados después de eliminar el exceso de líquido con papel absorbente. Finalmente, los hidrogeles húmedos se secaron congelaron y liofilizaron hasta que estuvieran completamente secos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El grado de hinchamiento se calculó del siguiente modo:

$$Grado\ de\ Hinchamiento\ (GH) = \frac{W_H - W_S}{W_H} * 100 \quad (2.7)$$

donde W_H y W_S es el peso de hidrogel (g) húmedo y seco respectivamente.

Los datos cinéticos de hinchamiento se ajustaron con la siguiente ecuación:

$$\frac{SD_t}{SD_{eq}} = kt^n \quad (2.8)$$

donde S_{Dt} es el grado de hinchamiento en el tiempo t, S_{Deq} el grado de hinchamiento en el equilibrio, n la difusión por difusión del disolvente y k es la constante que cambia según la estructura del hidrogel polimérico.

2.3.11 Degradación *in vitro* de los hidrogeles

Hidrogeles puros e híbridos se esterilizaron y neutralizaron en alcohol durante una noche, se pesaron y lavaron con disolución tampón PBS a 37ºC y después se rehidrataron con un exceso de la misma disolución tampón durante 24 h antes del ensayo de degradación. La degradación enzimática se realizó poniendo los hidrogeles en contacto con 15 mL de la enzima colagenasa con 3.0 U/mL de actividad enzimática disuelta en PBS (1X, pH 7.4). La disolución enzimática fue cambiada cada 4 h para asegurar una actividad enzimática continua. Para determinar el peso en seco del polímero restante, los hidrogeles fueron retirados del medio a las 24 horas, se congelaron y se liofilizaron. El porcentaje de degradación (D%), se calculó siguiendo la expresión:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$$Porcentaje\ de\ degradación\ (D\%) = \frac{W_A - W_t}{W_A} * 100 \quad (2.9)$$

Donde W_A y Wt es el peso del hidrogel (g) antes de la degradación enzimática y el peso del hidrogel (g) cada dos horas de que en hidrogel se pusiera en contacto con la enzima. Cada experimento se realizó por triplicado y el valor promedio se tomó como el porcentaje de degradación.

2.4 Caracterización de las partículas orgánicas e inorgánicas

2.4.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para determinar la forma y el tamaño de las MNPs y las MNPs encapsuladas en las partículas de PLGA obtenidas en las síntesis antes descritas, se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando un microscopio modelo *JEOL JEM-2010* operando con un voltaje de aceleración de 120 kV en un rango de 100000 a 500000X. La preparación de las muestras se llevó a cabo depositando un volumen de 10 µL de las disoluciones de MNPs y MNPs encapsuladas en partículas de PLGA, ambas previamente diluidas hasta alcanzar un color marrón muy tenue, sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono que, posteriormente, se secó bajo condiciones ambientales durante 2 h.

2.4.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las partículas de PLGA se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) empleando un microscopio modelo *ZEISS FESEM ULTRA Plus* operado a 3 kV en un rango de 30000 a 300000X. En este caso, los sistemas se prepararon depositando un volumen de 50 µL de las disoluciones de partículas sobre un sustrato de silicio y se seco en un desecador a vacío durante 8 h. Las muestras fueron recubiertas con una capa de iridio durante un minuto para hacerlas conductoras.

2.4.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El tamaño hidrodinámico y el potencial zeta de las partículas de PLGA fue determinado por dispersión dinámica de luz (DLS) y anenometría láser Doppler, respectivamente, usando un *Zetasizer Nano Z* (*Nanoseries, Malvern Instruments, UK*). Se utilizo una celda estándar de poliestireno con un mililitro de muestra a temperatura de 25°C. El tiempo de estabilización de la muestra entre cada medición fue de dos minutos. Para las mediciones

de potencial zeta se utilizo una celda de poliestireno con electrodos de oro a la que se le aplico un voltaje de 150 mV.

2.4.3.1 Microscopía óptica y confocal

Las imágenes de microscopía óptica de las disoluciones de fibras magnéticas y de los hidrogeles de gelatina con fibras y partículas híbridas incorporadas se obtuvieron usando un microscopio *Leica DM750* empleando aumentos comprendidos entre 4X y 20X. Las muestras se colocaron en portamuestras de vidrio óptico con una dimensión de 76x26x1.2 mm.

Las imágenes de microscopía confocal de las fibras de PCL modificadas con fluoresceiamina y rodamina se utilizó un microscopio de epifluorescencia *Leica DMI6000B* equipado con un sistema modular *Leica AF6000* y una cámara *DFC3665FX* (*Leica Microsystems GmBH*), donde el canal verde correspondía a la fluoresceiamina y el canal rojo a la rodamina.

2.4.4 Distribuciones estadísticas de tamaño

Las distribuciones estadísticas de tamaños de las diferentes estructuras sintetizadas se determinaron haciendo uso del *software ImageJ*, efectuando un mínimo de 250 medidas independientes para cada distribución. Las interdistancias entre las microfibras híbridas y los agregados de partículas de PLGA-MNPs en el seno de los hidrogeles de gelatina después de su alineamiento remoto se midieron usando este mismo software. Para ello, se consideró el valor de esta interdistancia como la separación en la dirección perpendicular al alineamiento entre una fibra/agregado de partículas determinado y su semejante más próximo.

2.4.5 Difracción de rayos X

Las medidas de difracción de rayos X de polvo cristalino se efectuaron con un difractómetro *Phillips* manejado con una unidad de control modelo *PW1710*, un goniómetro vertical modelo *PW1820/00* y un generador modelo *Enraf Nonius FR590*, operado a 40kV y 30mA. Los rayos X se obtuvieron de un tubo sellado de cobre y la radiación fue monocromatizada con un monocromador de grafito. La detección de rayos X efectuó con un detector de área tipo *PanAnalytical PIXcel-3*. Los difractogramas se midieron en el rango angular 20º-70º con un ángulo de paso de 0.02º y un tiempo de paso

de 2 s. Para efectuar las medidas de difracción de rayos X las muestras fueron precipitadas mediante centrifugación y secadas durante 24 h bajo unas condiciones de temperatura y presión de 60ºC y 100 mbar, respectivamente.

2.4.6 Análisis termogravimétrico (TGA)

La caracterización termogravimétrica de las muestras para conocer la proporción de material inorgánico en las NPs de PLGA e hidrogeles se llevó a cabo utilizando un equipo *TGA Q500*, analizando un rango de temperaturas de 40ºC a 800ºC con una rampa de calentamiento de 10 $ºC \cdot min^{-1}$ bajo un flujo de nitrógeno de 60 $mL \cdot min^{-1}$. Las muestras se equilibraron durante 15 min antes de llevar a cabo las mediciones. Las muestras se colocaron en una cápsula de platino HT con un peso de alrededor de 5mg.

2.4.7 Espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

La composición de las MNPs se determinó mediante espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). El equipo utilizado fue un ICP-MS modelo *Agilent 7700x* con sistema de introducción de muestras formado por un nebulizador *Micromistglassslow-flow*, una cámara de spray de vidrio de doble paso con sistema Peltier y una antorcha de cuarzo, trabajando con una potencia de 1550 W y un flujo de plasma de 15 $dm^3 \cdot min^{-1}$. Para la preparación de las muestras para ICP-MS, 20 µL de las disoluciones originales fueron diluidos en 480 µL de una mezcla 75:25 (v/v) de ácido clorhídrico y ácido nítrico (agua regia) durante 2 h. Posteriormente, se añadieron 4.5 mL de ácido nítrico en agua al 1% (v/v), compuesto que sirve para neutralizar el agua regia y que actúa como agente de limpieza ante la presencia de trazas de iones metálicos de medidas previas presentes en los conductos del sistema de nebulización del equipo.

2.4.8 Caracterización magnética

La caracterización magnética de las MNPs y de las partículas de PLGA y fibras poliméricas híbridas fue llevada a cabo en un magnetómetro SQUID (*Quantum Design MPMS5, San Diego, CA*). Las curvas de magnetización de las muestras estudiadas se midieron desde -40000 Oe a +40000 Oe a 300 K, registrando los datos en los intervalos indicados en la Tabla 3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2.3.- Protocolo de variación del campo magnético para la obtención de los ciclos de histéresis de las muestras magnéticas (1 T = 10000 Oe).

	$\vec{B}_{inic}$ [T]	$\vec{B}_{fin}$ [T]	$\Delta\vec{B}$ [T]		$\vec{B}_{inic}$ [T]	$\vec{B}_{fin}$ [T]	$\Delta\vec{B}$ [T]
Etapa 1	4.0	2.0	-0.50	**Etapa 7**	-4.0	-2.0	+0.50
Etapa 2	2.0	0.4	-0.20	**Etapa 8**	-2.0	-0.4	+0.20
Etapa 3	0.4	0.1	-0.05	**Etapa 9**	-0.4	-0.1	+0.05
Etapa 4	0.1	-0.1	-0.01	**Etapa 10**	-0.1	0.1	+0.01
Etapa 5	-0.1	-0.4	-0.05	**Etapa 11**	0.1	0.4	+0.05
Etapa 6	-0.4	-4.0	-0.20	**Etapa 12**	0.4	4.0	+0.20

2.4.9 Estudios de la liberación de dexametasona

Para la obtención de las curvas de liberación de la dexametasona encapsulada en las partículas de PLGA y estas a su vez embebidas en hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA a distintas concentraciones se realizó mediante cromatografía de líquidos (HPLC). El experimento de liberación se llevó a cabo mediante experimentos de diálisis empleando membranas con un corte de peso molecular de 12-14 kDa. Para ello, se colocaron tanto partículas de PLGA como las partículas embebidas en los hidrogeles dentro de las membranas sumergidas en 80 mL de agua MilliQ. A distintos intervalos de tiempo se retiraron 0.5 mL del agua en la que estaban sumergidas las distintas membranas, reponiéndose el volumen extraído. La concentración de DEX se analizó mediante medidas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Para el análisis de HPLC se utilizó un cromatógrafo *Jasco, serie LC-4000*, equipado con una bomba *PU-4180*, detector de UV-visible en un rango de 200 a 600 nm, horno *CO-4061* y automuestreador *AS- 4150*. La columna de cromatografía utilizada para la medición de las muestras fue una Luna® C18, de 250 x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula. Estas mediciones se realizaron con un método isocrático, utilizando como fase móvil acetonitrilo-agua (55:45 %), con un flujo de trabajo 1.0 mL/min, haciendo una inyección de 5 µL por cada muestra a una longitud de onda de 242 nm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La concentración de DEX liberada se calculó mediante la construcción de una curva de calibración que se obtuvo calculando el área bajo la curva en el cromatograma a un tiempo de retención de 0.436 min. A partir de la regresión lineal a la que se ajusta la representación se pudo conocer la concentración de DEX en cada tiempo de liberación (Figura 2.7).

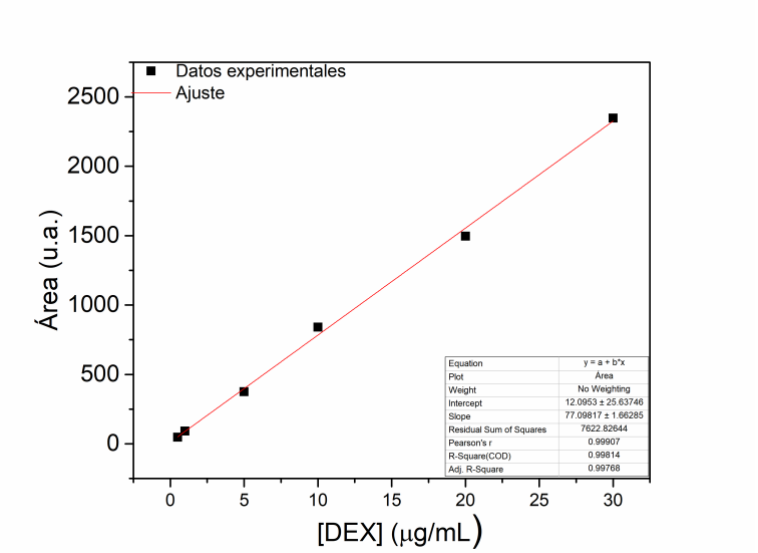


Figura 2.7.- Curva de calibración para el calculo de la concentración de la DEX.

El porcentaje de DEX encapsulada con respecto a la cantidad total de DEX usada en la preparación de las Nps de PLGA cargadas se define como la eficiencia de encapsulación (E.E.) Su cuantificación se realizó mediante:

$$E.E.(\%) = \frac{Peso\ de\ la\ DEX\ en\ las\ Nps}{Peso\ de\ la\ DEX\ inicial} * 100 \quad (2.10)$$

Mientras que la capacidad de carga (L.C.) es el rendimiento de la cantidad de fármaco administrada por cantidad de fármaco encapsulado

$$L.C.(\%) = \frac{Peso\ de\ la\ DEX\ en\ las\ Nps}{Peso\ de\ las\ Nps} * 100 \quad (2.11)$$

Los perfiles de liberación desde los hidrogeles se modelaron conforme a los siguientes modelos matemáticos:

1. Peppas-Kosmeyer: $\frac{M_s}{M_\infty} = K_p t^n$
2. Orden cero: $Q_t = Q_0 + K_0 t$
3. Primer orden: $LnQ_t = LnQ_0 + K_1 t$
4. Higuchi: $Q_t = K_H t^{1/2}$
5. Hixon-Crowell: $Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_s t$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

donde M_t es la cantidad acumulativa de fármaco liberado al tiempo *t*, M_∞ la carga farmacológica inicial, *Kp* una constante característica del sistema polímero-fármaco, y *n* denota el exponente de difusión que implica la naturaleza del mecanismo de liberación. Q_t es la cantidad de fármaco disuelta en el tiempo *t*, Q_0 es la cantidad inicial de fármaco en disolución, K_0 es la constante de liberación de orden cero, K_1 la de orden uno, K_H es la constante de disolución de Higuchi, y K_s es una constante que incorpora la relación superficie-volumen.

2.5 Estudios biológicos *in vitro* con hidrogeles

2.5.1 Células de cultivo

Los estudios celulares de los hidrogeles basados en CS se realizaron en células fibroblastos de embrión de ratón (Balb/3T3) y las líneas celulares de queratinocitos dérmicos humanos inmortalizados (HaCat) suministradas por Sigma Aldrich y cultivadas bajo condiciones estándar de cultivo, es decir, en DMEM suplementado con 10% FBS, 0.1 mM aminoácidos no esenciales (NEAA), 2 mM L-Glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y un 1% de penicilina estreptomicina, respectivamente y en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 a 37ºC.

En los estudios celulares de los hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA se utilizaron células madre mesenquimales adiposas humanas (MSC) aisladas del tejido adiposo humano suministradas por Sigma Aldrich y cultivadas en MesenPRO RS^{TM} suplementado con 2% de un suplemento de crecimiento y 1% de 2 mM L-Glutamina, en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 a 37ºC.

Para todas las líneas, las células se mantuvieron hasta alcanzar una confluencia óptica del 75%, momento en el que se trataron con una disolución de tripsina-EDTA y se incubaron 4 minutos bajo condiciones de cultivo para despegarlas del contenedor. Posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm durante 4 minutos y el sedimento se resuspendió en medio de cultivo y se plantaron sobre los andamios y placas de cultivo de tejidos (TCP) para los experimentos necesarios.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.5.2 Esterilización de los andamios basados en CS

Previamente a su uso con lixiviados y células, los andamios se esterilizaron introduciéndose en una disolución de etanol al 70% v/v durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS estéril y se incubaron en esa disolución tampón en condiciones de cultivo (5% CO_2, 37ºC) durante 15 min para una mayor depuración de etanol y rehidratación. Para la preparación de lixiviados, se descartó el PBS y los andamios se secaron, se pesaron y se incubaron en medio de cultivo completo durante 96 horas en condiciones de cultivo. Para el cultivo celular, el PBS se reemplazó completamente por medio de cultivo y los andamios se incubaron durante 30 minutos en condiciones de cultivo para la impregnación con el medio. Finalmente, las matrices poliméricas se transfirieron a platos de cultivo y las células se plantaron inmediatamente.

2.5.3 Esterilización de los andamios híbridos de GelMA-HAMA

Los andamios de híbridos de GelMA-HAMA se irradiaron con luz UV para su entrecruzamiento (sección 2.2.2.1) y esterilización por ambas caras en un ambiente estéril, es decir, las soluciones precursoras de los hidrogeles híbridos se prepararon en frascos y PBS estériles y la preparación y el entrecruzamiento se llevaron a cabo en una campana estéril con flujo vertical. Posteriormente, se colocaron en las placas de cultivo para cada uno de los experimentos.

2.5.4 Ensayos de viabilidad celular

La biocompatibilidad de los andamios basados en CS se analizó en las líneas celulares Balb y HaCaT mientras que para andamios híbridos de GelMA-HAMA se realizaron solo con células MSC. Para ambos andamios se prepararon dos ensayos diferentes. En el primero, la citocompatibilidad de los andamios se determinó según método de elución standard ISO 10993-5:2009[11]. Para ello, se cortaron en pequeñas piezas 20mg de cada andamio y se sumergieron en 2 ml de medio de cultivo para producir lixiviados. Para los andamios basados en CS, los lixiviados se incubaron durante 96 horas en condiciones de cultivo y se añadieron 100 µL de esa disolución a las células que habían sido previamente plantadas e incubadas durante 24 horas y 72 horas en placas de 96 pocillos con 10000 células/pocillo. Para los andamios híbridos de GelMA-HAMA se realizó un procedimiento similar, solo que los andamios se incubaron durante 7 días y se añadieron

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

100 µL de los lixiviados de los andamios cada dos días a células que habían sido previamente plantadas e incubadas una placa de 96 pocillos con misma cantidad de células que los andamios basados en CS.

Posteriormente, el medio celular se retiró y se añadieron 90 µL de DMEM en el caso de andamios de CS y MesenPRO RS^{TM} para andamios de GelMA-HMA y 10 µL del reactivo de proliferación celular CCK-8 para ambos andamios, seguido de una agitación suave y una incubación durante 1 hora a 5% CO_2, 37ºC. La densidad óptica (OC) del formazán se midió al cabo de ese tiempo mediante medidas de UV-Vis a una longitud de onda de 450nm usando un lector de microplacas (*BIO-RAD modelo 680, USA*). La actividad metabólica de las células después de la exposición a los lixiviados y representada como el porcentaje de la viabilidad celular, se calculó normalizando la lectura de la densidad óptica del formazán de las células expuestas a los lixiviados con el control formado por células no expuestas a él (100% de viabilidad) siguiendo la siguiente ecuación:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{Abs\ S}{Abs\ B} * 100 \quad (2.12)$$

donde Abs S es la absorbancia del andamio incubado en el fluido de lixiviado y Abs B es la absorbancia de las células incubadas en el medio celular. El resultado fue el promedio de por lo menos tres experimentos independientes.

De forma alternativa, la viabilidad celular de los andamios basados en CS también se analizó de la siguiente manera. Los andamios esterilizados se pre-incubaron en DMEM durante una hora y se depositaron en una placa de cultivo de 24 pocillos. Después se inyectaron en la parte superior de los andamios 1 mL de células en suspensión (50000 células/pocillo) y se incubaron durante 24 horas y 72 horas a 5% CO_2, 37ºC. Después de la incubación, se añadieron 10 µL de CCK-8 en cada pocillo y se incubaron durante 1 hora. Para los andamios híbridos de GelMA-HAMA se utilizó un procedimiento similar al de los andamios basados en CS. Así, una vez estilizados los hidrogeles estos se colocaron en una placa de 48 pocillos con 1mL de células en suspensión (20000 células/pocillo) y se incubaron durante 1, 3 y 7 días a 5% CO_2, 37ºC. Después de la incubación, se añadió una mezcla de 100 µL de CCK-8 y 900 µL de MesenPRO RS^{TM} en cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a 5% CO_2, 37ºC. Finalmente, la viabilidad celular se determinó midiendo la absorbancia del formazán a 450 nm mediante medidas de UV-Vis con un lector de micro placas (*Bio-Rad modelo 680, USA*) y la viabilidad celular se obtuvo a partir de la ecuación 2.12.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.5.5 Imagen celular de andamios basados en CS

La adhesión y proliferación celular se observó mediante microscopía óptica. 500000 células in 50 µL de medio de cultivo se sembraron sobre los andamios y se mantuvieron en incubación durante 2 horas para la adhesión celular. Posteriormente, se añadió medio de cultivo completo y las células se cultivaron hasta 7 días con cambios regulares de medio (cada dos días). Las células se fotografiaron en los días 1, 4 y 7 con un microscopio fluorescente *Leica DMI6000* tanto en campo brillante como modo fluorescencia. Además, las células adheridas en los andamios se colocaron en la parte superior de los portaobjetos del microscopio y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad en presencia de una disolución en PBS de calceina AM/yoduro de propidio (98:1:1 de PBS/calceina AM/yoduro de propidio) para fotografiar inmediatamente después con el fin analizar la viabilidad de las células adheridas. Los experimentos se realizaron al menos por duplicado para cada uno de los andamios, cada línea celular y temporalización. Se fotografiaron diferentes zonas. Las imágenes se realizaron a las longitudes de onda de excitación/emisión de 480/510 nm y 560/610 nm para detectar la calceina AM (verde) y el yoduro de propidio (rojo), respectivamente.

Para la realización de la microscopía electrónica de barrido (SEM), las muestras de células cultivadas se fijaron con una disolución 2.5% v/v de glutaraldehído 12 horas a 4ºC. Las muestras se deshidrataron en una serie de lavados con etanol (0%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% v/v) con dos repeticiones por concentración de alcohol. Las muestras se secaron en el punto crítico, se seccionaron, se recubrieron por pulverización catódica con iridio y posteriormente se tomaron imágenes con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, Zeiss Ultra-Plus, Germany).

2.5.6 Diferenciación de células MSC a osteoblastos

Para los estudios de diferenciación de las células MSC en osteoblasto, se seleccionaron concentraciones de DEX en el rango de 100 a 400. Estas concentraciones de DEX se cargaron tanto en partículas libres de PLGA como en aquellas embebidas en los hidrogeles de GelMA-HAMA. Todas las muestras se cultivaron con medio completo MesenPRO RS™ suplementado con β- glicerolfosfato a una concentración de 10 mM y ácido ascórbico a una concentración de 50µM. Las MSC se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos con 30000 células/pocillo y se incubaron a 5% CO_2, 37ºC y se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

dejaron adherir por 24 horas. Después, el medio se retiró y se agregaron las siguientes muestras y controles:

1. Control negativo: Células cultivadas en medio completo con β- glicerolfosfato (10 mM) y ácido ascórbico (50µM).
2. Control positivo: Células cultivadas en medio completo con β- glicerolfosfato (10 mM), ácido ascórbico (50µM) y DEX a una concentración de 0.1µM.
3. Partículas de PLGA vacías: Células cultivadas en medio completo con β- glicerolfosfato (10 mM), ácido ascórbico (50µM) y partículas de PLGA vacías con la misma concentración que las incorporadas en los pocillos con partículas PLGA-DEX.
4. Partículas de PLGA vacías embedidas en hidrogeles de GelMA-HAMA: Células cultivadas en medio completo con β- glicerolfosfato (10 mM), ácido ascórbico (50µM) y partículas de PLGA vacías embedidas en los hidrogeles con la misma concentración que las incorporadas en los pocillos con partículas PLGA-DEX.
5. Partículas de PLGA cargadas con DEX: Células cultivadas en medio completo con β- glicerolfosfato (10 mM), ácido ascórbico (50µM) y partículas de PLGA cargadas con DEX. Previamente, se calculó el volumen necesario de las partículas de PLGA para que estas en contacto con las células liberaran 100 y 400 ng/mL de DEX. Este cálculo se realizó en base a los datos obtenidos en la curva de liberación obtenida mediante el proceso de diálisis, tal y como se comento en la sección anterior.
6. Partículas de PLGA cargadas con DEX embedidas en hidrogeles de GelMA-HAMA: Células fueron cultivadas en medio completo con β- glicerolfosfato (10 mM), ácido ascórbico (50µM) y partículas de PLGA cargadas con DEX en los hidrogeles dos composiciones de andamios 10% GelMA-1% HAMA y 10% GelMA-5% HAMA. Previamente, se calculó el volumen necesario de las partículas de PLGA que tiene que estar incorporadas en los hidrogeles antes mencionados, para que estos hidrogeles en contacto con las células liberaran 100 y 400 ng/mL de DEX. Este cálculo se realizó en base a los datos obtenidos en la curva de liberación obtenida mediante el proceso de diálisis, tal y como se comento en la sección anterior.

USC DE COMPOSTELA

Todas las muestras se esterilizaron con luz UV a una longitud de onda de 365 nm antes de ponerlas en contacto con las células. Se realizaron cuatro replicas para cada muestra.

Los días 3, 7 y 14, se recogieron los sobrenadantes y se llevó a cabo el ensayo ALP siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez retirados los sobrenadantes, las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron en 1 mL de agua MQ (no estéril), es decir, mediante un triple proceso de congelación a -80ºC y descongelación. Se recogieron los lisados celulares y se llevaron a cabo ensayos BCA para cuantificar el contenido de proteína total.

El día 28, se recogieron los sobrenadantes de las células, se lavaron con PBS y se les agregaron 400µL de una disolución de formaldehído al 4% a cada pocillo por 15 min a temperatura ambiente para fijar las células. Después se lavaron tres veces con PBS. Después, se añadieron a las células 200µL de una disolución de teñido con rojo de alizarina con una concentración de 2% p/v con un pH de 4.2 ajustado previamente con HCl durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron varias veces con PBS para eliminar el exceso de alizarina y se obtuvieron imágenes de la tinción utilizando un microscopio óptico.

2.6 Referencias

1. Claaßen, C. *et al.* Quantification of Substitution of Gelatin Methacryloyl: Best Practice and Current Pitfalls. *Biomacromolecules* **19**, 42–52 (2018).

2. Bencherif, S. A. *et al.* Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials* **29**, 1739–1749 (2008).

3. Smeds, K. A., Pfister-Serres, A., Hatchell, D. L. & Grinstaff, M. W. Synthesis of a novel polysaccharide hydrogel. *J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem.* **36 A**, 981–989 (1999).

4. Bencherif, S. A. *et al.* Nanostructured hybrid hydrogels prepared by a combination of atom transfer radical polymerization and free radical polymerization. *Biomaterials* **30**, 5270–5278 (2009).

5. Zhang, Q. *et al.* Model Driven Optimization of Magnetic Anisotropy of Exchange-Coupled Core-Shell Ferrite Nanoparticles for Maximal Hysteretic Loss. *Chem. Mater.* **27**, 7380–7387 (2015).

6. Montero, A. P. Diseño y caracterización de sistemas nanoestructurados magnéticos con potenciales aplicaciones en biomedicina y eliminación de contaminantes. (2018).

7. Zeng, H., Rice, P. M., Wang, S. X. & Sun, S. Shape-controlled synthesis and shape-induced texture of MnFe 2O4 nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11458–

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

11459 (2004).

8. Chen, R., Christiansen, M. G. & Anikeeva, P. Maximizing hysteretic losses in magnetic ferrite nanoparticles via model-driven synthesis and materials optimization. *ACS Nano* **7**, 8990–9000 (2013).

9. Guan, J., Fujimoto, K. L., Sacks, M. S. & Wagner, W. R. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. *Biomaterials* **26**, 3961–3971 (2005).

10. Ho, S. T. & Hutmacher, D. W. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials* **27**, 1362–1376 (2006).

11. INTERNATIONAL STANDARD, I. ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. (2009).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 Obtención y caracterización de hidrogeles híbridos basados en quitosano para regeneración tisular

Como respuesta a las necesidades de la IT, en los últimos años se han diseñado nuevos biomateriales con las características necesarias de biocompatibilidad, bioreabsorbibilidad, bioactividad y biodegradabilidad a subproductos no tóxicos[1–3]. Actualmente, se están empleando biomateriales basados en polímeros naturales para crear andamios porosos con el fin de, por un lado, rellenar las cavidades del tejido y liberar compuestos bioactivos para regenerar y restaurara sus funcionalidades[4–6] o, por otro, construir nuevas estructuras artificiales que mimeticen el microentorno del tumor *in vivo* como plataformas modelo para análisis y cribado *in vitro* de productos terapéuticos más fiables[7–10].

El uso de polímeros naturales, o biopolímeros, tales como proteínas (fibroína de seda, colágeno, gelatina) y polisacáridos (quitosano, carragenina, condroitín sulfato, alginato de sodio, ácido hialurónico) en andamiaje se basa en su amplia disponibilidad, bajo coste, biocompatibilidad, propiedades físico-químicas similares a la MEC y biodegradabilidad, entre otras[11–15].

Como se ha comentado en Capítulos anteriores, el quitosano, CS, es un polisacárido seminatural catiónico, hidrófilo, barato, abundante, biocompatible, biodegradable y que presenta baja toxicidad hacia las células y los tejidos[16]. Sin embargo, para determinadas aplicaciones de la IT no presentan las propiedades físico-químicas adecuadas de adhesión y proliferación celular[17], por lo que una alternativa de mejora en sus propiedades es su mezcla con otros biopolímeros como por ejemplo el ácido hialurónico, HA, y/o el colágeno, Coll.

Tal y como se ha reseñado previamente, el HA es un polímero aniónico natural que se encuentra habitualmente en la MEC de diferentes órganos como la piel o el cerebro[18] e influencia varias funciones celulares como la adhesión, migración y proliferación[19]. La combinación el quitosano catiónico y el ácido hialurónico aniónico permite la formación de polielectrólitos (PECs) complejos a través de enlaces iónicos[20] que aumentan la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estabilidad del andamio, mejoran la adhesión celular e incrementan la fuerza mecánica del material resultante[21–24].

Por su parte, el Coll es otro biopolímero que promueve la adhesión celular, crecimiento y diferenciación[25], pero presenta una rápida biodegradación y baja fuerza mecánica, propiedades que mejoran con su mezcla con otros biopolímero como el CS y el HA[26–30].

Sin embargo, a pesar de la extensa investigación en el análisis del potencial uso de andamios basados en quitosano tanto puros como híbridos para aplicación en ingeniería de tejidos, aún es escaso el número de estudios sistemáticos dedicados a la correlación de la composición y la concentración de los andamios con las propiedades biofísicas y bioquímicas obtenidas y las aplicaciones de IT previstas. Por ello, el objetivo de este Capítulo de la presente Tesis Doctoral es el diseño de nuevos materiales de CS, HA y Coll para obtener matrices poliméricas 3D de quitosano puro o su combinación con otros biopolímeros y analizar el papel de diferentes factores como el peso molecular del biopolímero, la concentración la composición de los andamios y la presencia de un agente reticulante sobre la estructura y propiedades físico-químicas de los andamios obtenidos. Los andamios se obtuvieron mediante un sencillo proceso de autoensamblaje o mediante reticulación química utilizando genipín. La estructura, tamaño de poro y porosidad, propiedades reológicas, rigidez, grado de hinchamiento y degradación se monitorizaron mediante medias de microscopía electrónica de barrido (SEM), microtomografía computacional 3D, espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA), compresión y medidas de reología. Además, también se analizó en estudios *in* vitro la biocompatibilidad y la capacidad de los andamios para promover la adhesión y proliferación celular.

3.1 Caracterización estructural y termodinámica de los andamios

Andamios de CS puros e híbridos de CS-HA y CS-HA-Coll se obtuvieron usando un simple proceso de complejación iónica polielectrolítica (PEC). Brevemente, se disolvieron diferentes concentraciones de quitosanos y ácido hialurónico de pesos moleculares alto, medios y bajos, HCS, MCS y LCS, respectivamente y HHA y LHA, respectivamente en 1% ácido acético a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron despacio volúmenes definidos de la disolución de precursor polimérico bajo agitación de 300 rpm durante 24 horas para alcanzar la concentración final de cada

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

polímero en la composición del andamio. Para los andamios que contiene Coll, el volumen adecuado de la disolución de colágeno en PBS se añadió a la mezcla previa de CS-HA y se agitó a 300 rpm toda la noche. La disolución final polimérica se alicuotó en placas de 24 pocillos, se congelaron a -20ºC durante 24 horas y se liofilizaron durante 72 horas para obtener los xerogeles del andamio.

3.2 Efecto del peso molecular y la concentración del quitosano

Los andamios de hidrogeles híbridos CS-HA y CS-HA-Coll con las composiciones adecuadas se prepararon mediante PEC después de mezclar disoluciones de biopolímeros usando CS y HA de diferentes pesos moleculares, así como con Coll cuando corresponda. En el momento que la mezcla es homogénea, CS, HA y Coll forman andamios PEC estables que deben combinar los atributos positivos de los respectivos materiales y bajo un diseño de material racional, debe poder recapitular y/o imitar algunas de las propiedades estructurales y físicas de, por ejemplo, la MEC cerebral[31], tejidos cutáneos[32] y cartilaginosos[33], etc.

Las fracciones de gel se encuentran en el rango de 70-80% como presenta la Tabla 3.1. Se observa que esta cantidad y la densidad del hidrogel de los andamios híbridos 3%XCS-%YHA disminuyen a media que lo hace el peso molecular del CS utilizado para formar los andamios híbridos, mientras que se observa la tendencia opuesta al aumentar la concentración de CS en la composición.

Los andamios se analizaron usando FTIR para confirmar su formación después la mezcla individual de las disoluciones poliméricas. El espectro FITR del andamio híbrido 3%HCS-1%HHA se asemeja a la estructura característica GAG de ambos polímeros como se puede observar en la Figura 3.1, donde también se muestran los espectros del HCS al 3% y HHA al 1%. La banda ancha alrededor de 3454-3025 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones de tensión O-H y N-H del grupo funcional involucrado en el enlace de hidrógeno intramolecular entre las moléculas de CS y HA[34] y la banda compleja a 2972-2845 cm^{-1} a las tensiones simétricas y antisimétricas C-H[21]. En la región del espectro correspondiente a la huella digital, las vibraciones amida y carbonil dan lugar diferentes bandas distintivas entre 1500 y 1700 cm^{-1}. El andamio híbrido muestra bandas de tensión C=O en torno a 1640 cm^{-1}, desplazadas respecto al CS puro (observadas a ~1649 cm^{-1}) siempre que se localice la tensión de vibración asimétrica del grupo carbonil (COO^-) del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

carboxilato en el HA en 1606 cm^{-1} y se superponga un hombro amida I (-C=O- tensión de los grupos ácidos carboxilos) a 1648 cm^{-1} y una banda amida II a 1579 cm^{-1} [21]. La superposición de las bandas correspondiente a la amida II y a las vibraciones de flexión N-H de los grupos amina deacitilatos del CS en el andamio híbrido se intensifica y se desplaza hacia longitudes de onda inferiores respecto al espectro del CS puro debido a la presencia de HA en la composición (~1539 cm^{-1} en vez de 1566 cm^{-1} y 1559 cm^{-1} para CS puro y HA) y por lo tanto al potencial establecimiento de las interacciones iónicas entre las cadenas poliméricas del CS y HA (Figura 3.1)[19]. Se observan también las bandas a 1405-1381, 1308, 1152, 1067-1019 y 895 cm^{-1} atribuidas a vibraciones de deformación CH_2 y CH_3, vibraciones H-H y C-N de la amida III, tensiones asimétricas del puente C-O-C, vibración de tensión C-O y enlaces β-glucosídico del CS entre las unidades de glucosa, respectivamente[35,36]. En particular, el pico a 1405-1381 cm^{-1} se hace más prominente en los andamios híbridos 3%HCS-1%HHA, 4%HCS-1%HHA, 3%LCS-3%HHA indicando las interacciones CS-HA, tal y como previamente se ha publicado[31].

Ni las concentraciones de CS y el peso molecular del biopolímero entrañan grandes diferencias en el espectro FTIR de los andamios híbridos resultantes tal y como se puede observar en la Figura 3.1. Para concentraciones mayores de CS en el andamio híbrido (4%HCS-1%HHA) sólo se observan pequeños aumentos en la intensidad de las bandas características correspondientes a las vibraciones de tensión C=O y de flexión N-H a ~1640 y 1548 cm^{-1} además de a la banda correspondiente a la tensión asimétrica del puente C-O-C a 1153 cm^{-1}. En este caso, la influencia del HA en el espectro del hidrogel 4%HCS-1%HHA está más silenciada que en el de 3%HCS-1%HHA debido a la mayor diferencia en la concentración entre 4% p/v HCS y 1% p/v HHA. Por otro lado, el uso de CS de peso molecular más bajo parece favorecer la interacción entre las cadenas de CS y HA como se observa en el pequeño desplazamiento de las bandas de tensión C-O a ~1368 cm^{-1} mostrándose, ahora, bien definido un hombro, además de un incremento y un desplazamiento de la banda correspondiente a los modos vibracionales N-H y C-N de la amida III hacia ~1323 cm^{-1}. Por lo tanto, estos cambios en los espectros sugieren la formación del hidrogel híbrido CS-HA por interacción iónica entre el grupo carboxilo (-COOH) cargado negativamente del HA ($-NH_2$) y el grupo amino cargado positivamente del CS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

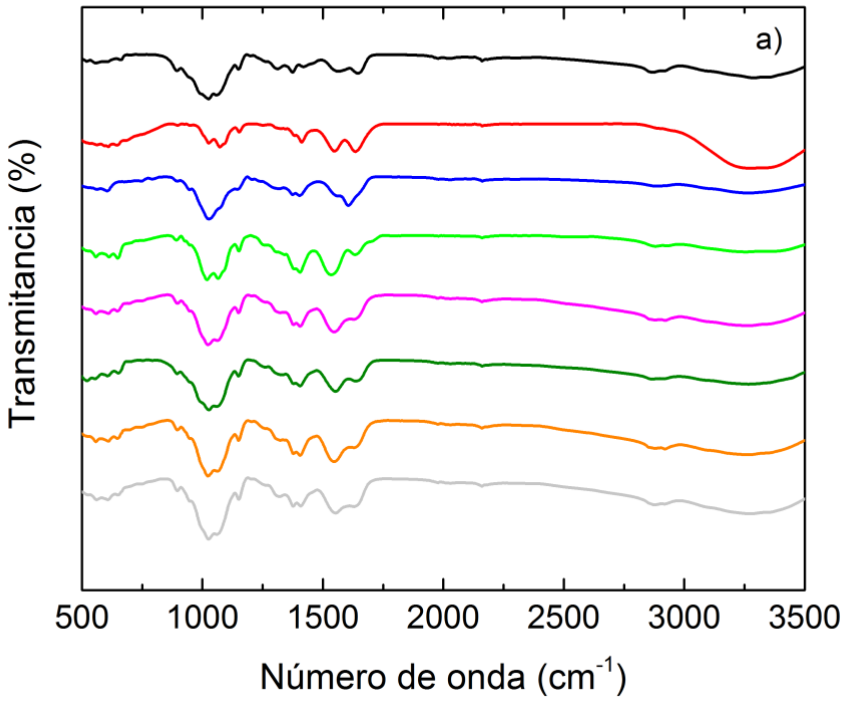


Figura 3.1.- Espectros FTIR de hidrogeles puros 3%HCS (––), 3% LCS (––), 1% HHA (––), 3% y de hidrogeles híbridos 3%HCS-1%HHA(––), 4%HCS-1%HHA(––), 3%HCS-2%HHA(––), 3%HCS-2%HHA-1%Coll (––) y 3%HCS-2%HHA-1%Coll (––).

3.2.1 Caracterización térmica

Los datos de TGA de los andamios híbridos 3%HCS-1%HHA, 3%HCS-1%MHA, 3%HCS-1%LHA y 4%HCS-1%HHA (Figura 3.2c,d) muestran que la pérdida de peso tiene lugar en tres pasos principales como ocurre con los hidrogeles de HA y CS puros (Figura 3.2a,b). El primer paso se asigna a la pérdida de moléculas residuales de agua en las muestras, que tiene lugar en el rango de temperaturas de 30-140ºC con una pérdida de peso del 10-15% en función de la concentración de CS y del peso molecular. Los polisacáridos y las proteínas tienen una importante afinidad por las moléculas de agua con diferentes fuerzas de interacción: las moléculas libres de agua se liberan a ~40-60ºC; por su parte, las moléculas de agua unidas mediante enlaces de hidrógeno, se liberan a 80-120ºC; finalmente, las moléculas de agua fuertemente unidas a través de interacciones polares a los grupos carboxilato liberan a ~140-160ºC[37]. Los siguientes pasos de degradación tienen lugar entre ~200-350ºC y 350-600ºC con la pérdida total de peso en el rango de 47-51% y 56-62%, respectivamente, y que se corresponde a las descomposiciones térmicas y oxidativas del CS y HA. Hidrogeles puros 3%HCS y 1% HHA muestran degradaciones del 60% y 61% a 350ºC y del 73% y 86% a 600ºC para el

CS y el HA, respectivamente, mientras que los híbridos muestran degradaciones inferiores de 47%, 47%, 49% y 51% a 350ºC y 57%, 56%, 57% y 62% a 600ºC, respectivamente para 3%HCS-1%HHA, 3%MCS-1%HHA, 3% LCS-1%HHA y 4%HCS-1%HHA. Cuando se usa CS de peso molecular intermedio en la formulación, la menor viscosidad del CS podría favorecer una mejor difusión de las cadenas de CS durante la formación del hidrogel y, así, favorecer las interacciones electrostáticas con las cadenas de HA, lo que debería ayudar en la estabilización de la estructura, como se confirma a partir de una pequeña disminución degradación térmica en el rango de temperaturas 40-375ºC. Además de la interacción electrostática, otras interacciones atractivas que también aportan estabilidad a los andamios son los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas.

Por otro lado, se observan mayores reducciones en la viscosidad del CS de los hidrogeles híbridos usando polímeros LCS, lo que da lugar a estabilidades térmicas similares a los HCS. Este comportamiento es diferente al observado para andamios de CS puros, para los que el uso de MCS y HCS da lugar a menores estabilidades térmicas en el rango 30-350ºC (Figura 3.2 a,b). Por otro lado, cuando se incrementa la concentración de HCS en el hidrogel híbrido , se observa que la degradación térmica es ligeramente inferior en el rango de temperaturas de 40-350ºC, lo que otra vez indica el potencial papel que juegan las interacciones electrostáticas entre los cationes del CS y los aniones del HA en su contribución a la formación de estructuras poliméricas más estables cuando las concentraciones de CS y HA son más parecidas[38].

Por otro lado, los andamios de HA puros se degradan desde ~195ºC con un primer máximo a ~226ºC y otro más a 240ºC, mientras que los de CS muestran un primer pico ancho a ~135ºC y con la degradación principal comenzando a ~245ºC con un máximo a 293ºC (T_m), independientemente del peso molecular del CS como se puede observar de la pérdida de peso derivada de la degradación (Figura 3.2b). Para andamios híbridos de CS-HA, los primeros dos picos a ~50-60ºC y 135-160ºC podrían corresponder a la eliminación de agua presente y unida a las diferentes partes del andamio. La verdadera degradación comienza a ~185-195ºC con un pequeño primer pico/hombro a ~215-219ºC, no visible en todos los andamios, que podría corresponder a la degradación del HA y un pico mayor a ~272ºC que correspondería a la degradación del CS y que se desplaza ligeramente 1-2ºC a temperaturas inferiores para los CS de peso molecular más bajo o

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

para las concentraciones más altas (Figura3.2 e), indicando una pequeña disminución de la estabilidad térmica del andamio.

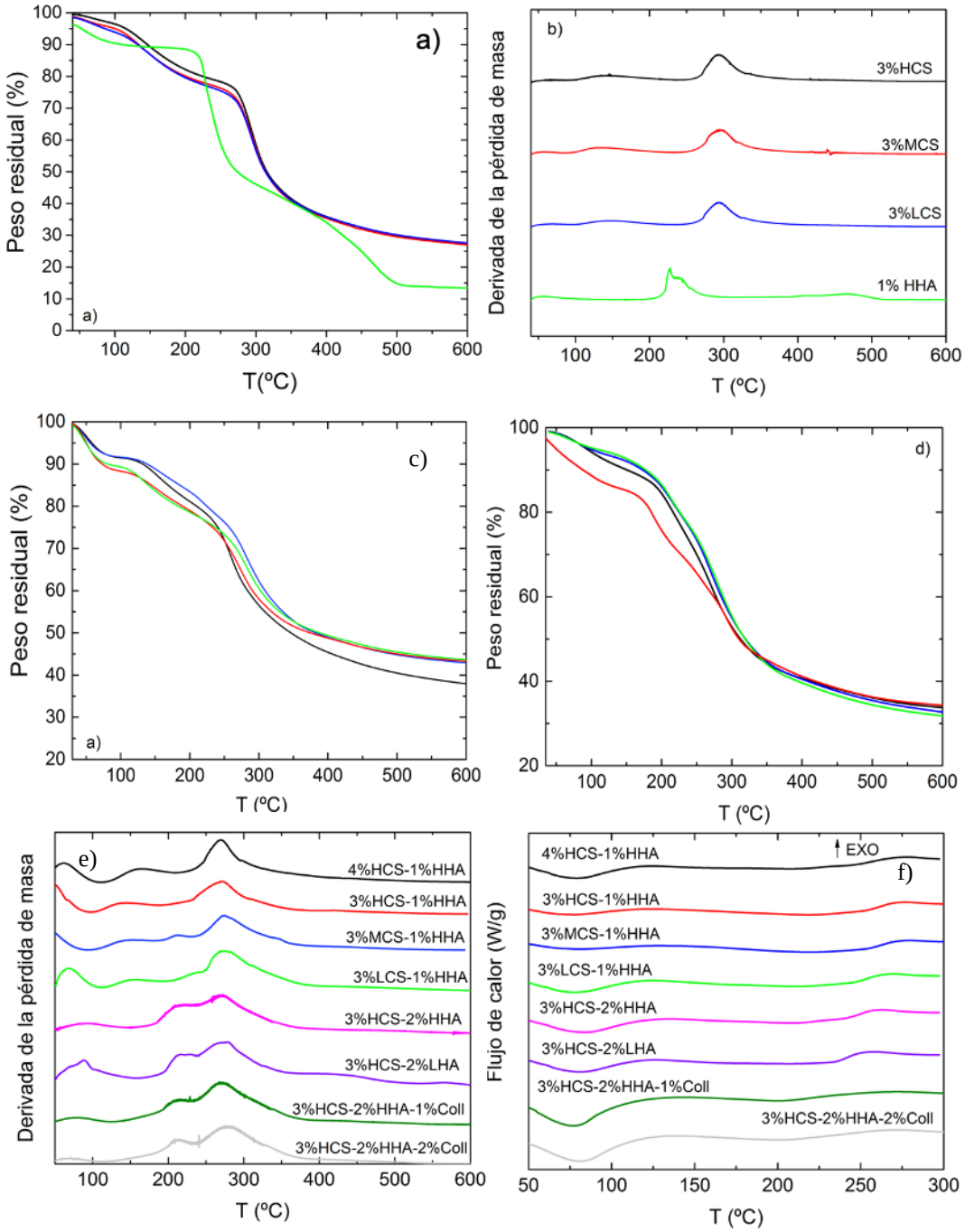


Figura 3.2.- a) Pérdida de peso y b) primera derivada de la pérdida de peso para los hidrogeles puros 3% HCS (—), 3% MCS (—), 3% LCS (—) y 1% HHA(—); c) Datos de TGA para 3% HCS-1% HHA (—), 4% HCS-1% HHA (—), 3%HCS-1%MHA (—), 3% HCS-1% LHA (—); d) Datos de TGA de hidrogeles híbridos con distintas composiciones; e) primera derivada de las curvas de TGA para diferentes hidrogeles híbridos; f) ejemplos de curvas de DSC correspondientes a diferentes andamios de hidrogeles híbridos 3% HCS-2% HHA (—), 3% HCS-2% LHA (—), 3% HCS-2% HA-1% Coll (—), and 3% HCS-2% HHA-2% Coll (—).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La caracterización térmica se completó por medidas de calorimetría de barrido diferencial (DSC) tal y como se puede observar en la Figura 3.2f. De acuerdo con los datos de TGA, el comportamiento térmico de los andamios 3%HC-1%HHA es una combinacion del observado para los de CS y HA puros. Los termogramas muestran un pico endotérmico bien definido a ~77 ºC y un segundo pico ancho en torno a ~224 ºC junto con un pico exotérmico a ~276 ºC, que se desplaza con respecto a los de los andamios de CS y HA puros y que se relaciona con la depolimerizacion, dehidratación del anillo sacárido, descomposicion de las unidades de quitosaono deacetilate y acetilate. El pico exotérmico de los andamios de HHA puros a ~217 ºC está completamente enmascarado probablmente debido a la gran diferencia de concentraciones entre el HCS y el HHA en los andamios. El primer pico endotérmico se relaciona con la evaporación del agua residual unida a las cadenas de polímero mientras que el máximo endotérmico se atribuye a la descomposición de las cadenas poliméricas, en correlación con los datos de TGA. En el último proceso también se observa un desplazamiento a temperaturas inferiores (~266ºC) para el LCS, mientras que para las condiciones restantes no cambia dentro de la incertidumbre experimental.

3.2.2 Caracterización reológica y morfológica

Las Figuras 3.3 a,c muestran el módulo elástico ($G´$) en función de la deformación. Hidrogeles híbridos 3%HCS-1%HHA presentan una región viscoelástica lineal (LVR) que se extiende hasta valores de deformacion de ~5% siendo mayores que las observadas para CS puro. En cambio, disoluciones de 1% HAA permanecen en estado sol (datos no mostrados). Esta tendencia está de acuerdo con la mayor densidad de entrecruzamiento debida a la complejación electrostática entre las cadenas de CS y HA, como se comentó previamente. El uso de CS de pesos moleculares inferiores da lugar a andamios más suaves con regiones LVR similares a las del hidrogel 3%HCS-1%HHA. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de CS en la composicion de la matriz, los andamios se vuelven más duros con una LVR relativamente mayor. Es importante mencionar que para hidrogeles puros de CS e híbridos de CS-HA, $G´$ es mucho mayor que $G´´$ (los datos no se muestran por claridad), de acuerdo con la formación y estructuración del hidrogel después de la autoagregacion del polímero.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las Figura 3.3b,d muestran que *G´* apenas aumenta en funcion de la frecuencia, mientras que se observar una pequeña disminución, excepto en los valores más altos, como consecuencia de la ruptura de la estructura del andamio. Hidrogeles híbridos con HCS o MCS prsesentan valores de *G´* mayores a los obtenidos para HHA y HCS puros (~25 y

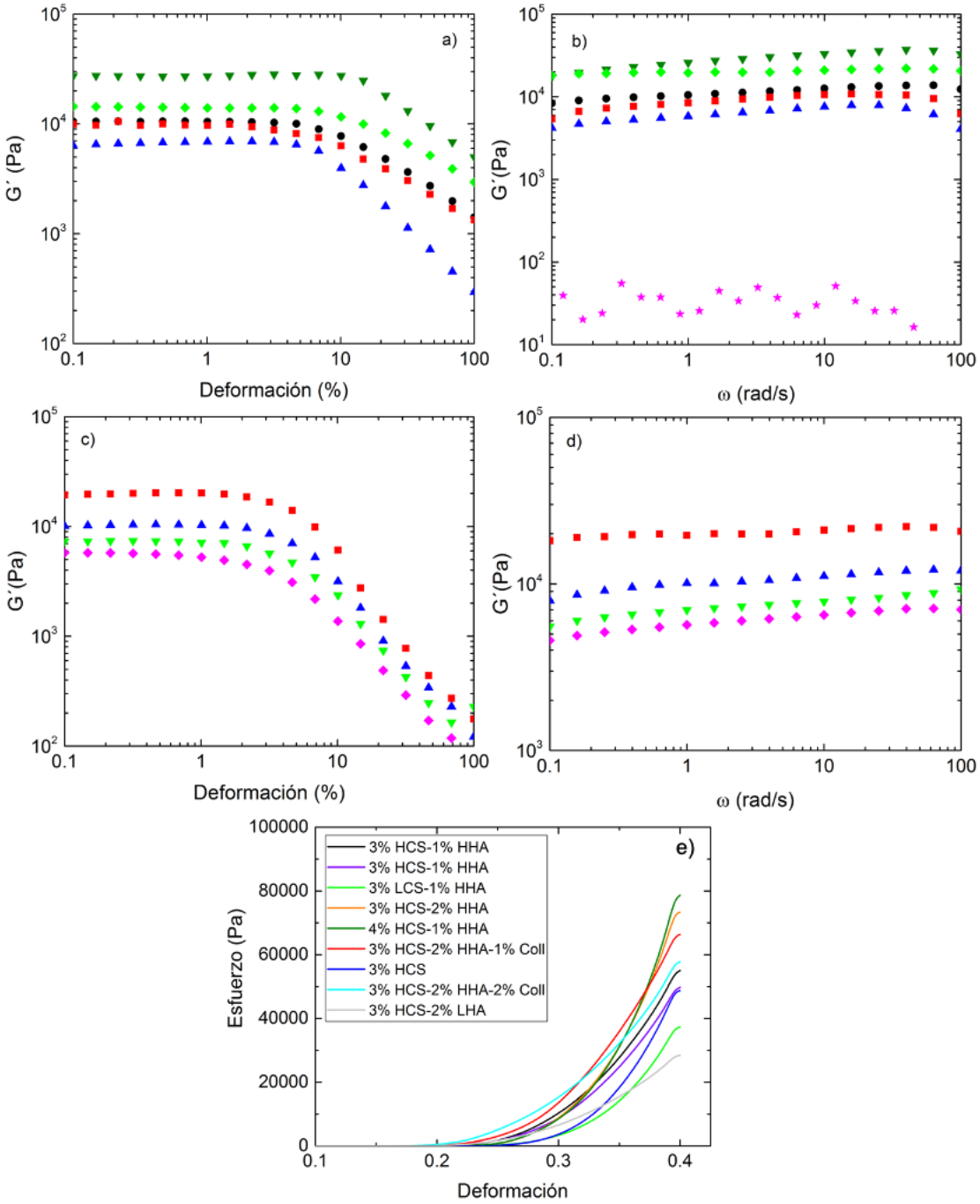


Figura 3.3.- Módulo de almacenamiento (*G´*) en función de a) la deformacion y b) la frecuencia para los andamios híbridos 3% HCS (•), 3% HCS-1% HHA (♦), 4% HCS-1% HHA (▼), 3% MCS-1% HHA (■) y 3% LCS-1% HHA (▲). Módulo de pérdida (*G´´*) de 3% HCS-1% HHA (*); Módulo de almacenamiento (*G´*) en función de c) la deformación y d) la frecuencia para los andamios híbridos 3% HCS-2% HHA (■), 3% HCS-2% LHA (♦), 3% MCS-2% HHA-1% Coll (▲) and 3% HCS-2% HHA-2% Coll (▼); e) Pruebas de compresión para andamios basados en CH para diferentes composiciones. Las concentraciones y composiciones están indicadas en la imagen.

7880 Pa a 1Hz, respectivamente), lo que otra vez confirma la idea de la estabilizacion adicional de la matriz polimérica a través de la existencia de interacciones entre las cadenas poliméricas del HA y CS. El incremento de la concentración de CS refuerza esta observación. El comportamiento observado se asemeja, por lo tanto, al de los geles verdaderos.

Los resultados obtenidos a partir de las pruebas de compresión (Figura 3.3e) indican que, en general, los hidrogeles híbridos presentan mayores módulos (ie, pendiente del esfuerzo *vs* curva de deformacion a baja deformación) que los hidrogeles de HA y CS puros, de acuerdo con la densidad de puntos de reticulación de la red (ie, hinchamiento). En todos los casos y como es habitual en ensayos de compresión, existe un comportamiento lineal inicial a deformaciones bajas seguido por un gran incremento del esfuerzo como deformación. El módulo de Young de compresión (E) de los andamios híbridos completamente hidratados se incrementa con aumento del contendio en CS desde 544 kPa para 3%HCS-1%HHA hasta ~599 kPa para 4%HCS-1%HHA, respectivamente, mientras que la disminucion en el peso molecular del CS da lugar a andamios con valores de E mucho más bajos, como se puede observar en la Tabla 3.1. El rendimiento mecánico de los andamios es muy dependiente de la porosidad y del tamaño de poro. Poros en el rango microporoso o mesoporos bajo no presentan una gran influencia en las propiedades mecánicas[39], mientras que los microporos exhiben una relación de escala de ley de potencia[40]. Por ello, se realizaron medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM) para analizar la estructura y porosidad de los andamios sintetizados (Figura 3.4).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.1.- Resumen de las composiciones y propiedades físico-químicas de los andamios.

Muestras	Fracción Gel (%)	E (kPa)	Densidad (g/mL)	Porosidad (%)	Tamaño poro (µm)
3% HCS	68 ± 5	615 ± 4	0.192 ± 0.007	87 ± 3	114 ± 34
3% HCS-1%HHA	74 ± 6	717 ± 7	0.169 ± 0.004	90 ± 4	96 ± 14
3% MCS-1%HHA	73 ± 3	599 ± 9	0.167 ± 0.009	92 ± 1	88 ± 12
3% LCS-1%HHA	68 ± 2	568 ± 7	0.166 ± 0.007	96 ± 2	77 ± 15
4% HCS-1%HHA	79 ± 4	1037 ±13	0.274 ± 0.009	86 ± 6	28 ± 11
3% HCS-2%HHA	79 ± 1	981 ± 13	0.147 ± 0.008	89 ± 3	30 ± 7
3% HCS-2%LHA	82 ± 3	538 ± 2	0.139 ± 0.003	90 ± 7	29 ± 8
3% HCS-2%HHA-1%Coll	78 ± 3	532± 5	0.148 ± 0.005	92 ± 6	36 ± 10
3% HCS-2%HHA-2%Coll	75 ± 6	285 ± 5	0.141 ± 0.003	95 ± 4	55 ± 9

Los diferentes andamios híbridos CS-HA obtenidos a partir de CS de diferente peso molecular y a diferente concentración son altamente porosos con sus puros interconectados. La porosidad de los andamios obtenida mediante medidas de desplazamiento de líquido fue superior al 85% en los hidrogeles puros 3% HCS e híbridos 3%HCS-1%HHA, 3%MCS-1%HHA y 3%LCS-1%HHA, confirmando la presencia de poros interconectados. Una estructura de poro abierta e interconectada es primordial para mantener la salud de las células *in vitro*, ya que permite la difusión de nutrientes, oxígeno y material de deshecho a través de la matriz polimérica, ideal para aplicaciones en ingeniería de tejidos[41,42]. También se estimó el diámetro de poro asociado con la composición de cada andamio, el cual se comparó con las medias del área de las secciones transversales de los poros de las imágenes SEM. Los andamios puros 3% HCS muestran una cierta estructura laminada (Figura 3.4a) con tamaños de poro de ~114 µm, de acuerdo con trabajos previos[43], que cambia cuando se añade el HA en el andamio híbrido. El andamio híbrido 3%HCS-1%HHA tiene señales estructurales y tamaño de poro ~96 µm (asumiendo medidas equivalentes a diámetros de círculos) y estructura de sección transversal estable en contraste con el hidrogel puro de HA que posee una estructura

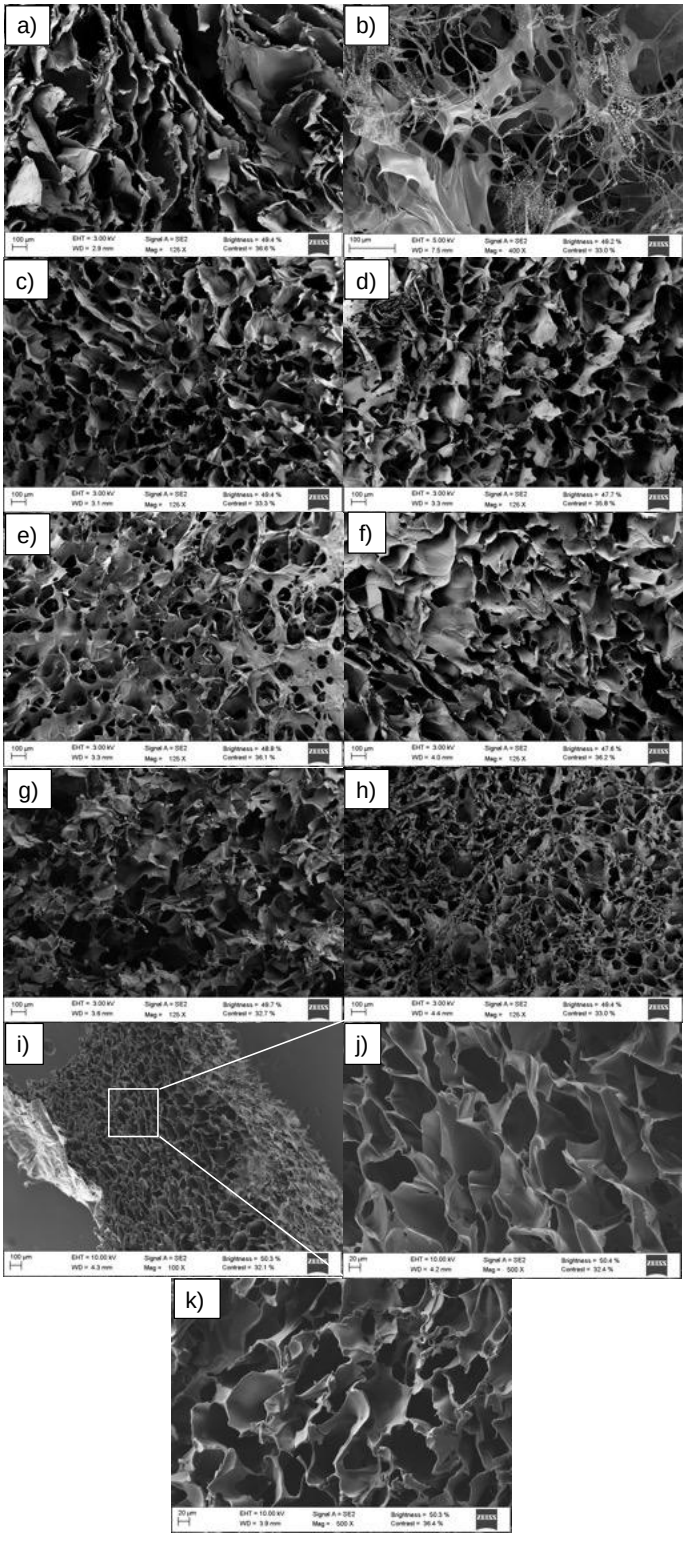
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

completamente desorganizada después de la liofilización (Figuras 3.4b,c). Este hidrogel también presenta una estructura porosa relativamente regular atribuida a la fase de separación del disolvente acuoso y el complejo PEC formado, seguido de la nucleación y crecimiento de cristales de disolvente durante la etapa de congelación. La estructura porosa abierta permanece después de la sublimación durante el proceso de liofilización. El patrón estructural se mantiene para los hidrogeles híbridos 3% MCS-1%HHA y 3% LCS-1% HHA (Figuras 3.4 d,e), con tamaños de poro 88 y 77 µm, respectivamente. Se observan también pequeños poros embebidos dentro de otros más grandes formando interconexiones, particularmente cuando se usan LCS, pero su presencia disminuye a media que la concentración de CS aumenta o cuando se usan CS de pesos moleculares elevados. Esto es consecuencia del incremento en la viscosidad del polímero en disolución que puede obstaculizar de alguna manera la formación de cristales de hielo dendríticos, disminuyendo así las interconexiones entre las paredes adyacentes de la estructura de los poros y reflejándose en una cierta disminución en la porosidad del andamio, tal y como muestra la Tabla 3.1. Los tamaños de los poros se encuentran dentro del rango de valores relevantes para los andamios porosos adecuados para el cultivo celular *in vitro*[31,44,45]. Se observa (Figura 3.4f) que los incrementos en la concentración de CS en los andamios híbridos como en el 4%HCA+1%HHA dan lugar a tamaños de poro ligeramente inferiores (28µm) de acuerdo con el hecho de que los hidrogeles con menor contenido y densidad de polímero pueden contener más agua dentro formando cristales mayores durante el proceso de congelación y, por lo tanto, generando poros mayores después de la liofilización.

Mediante medidas de micro-tomografía computacional (µCT) se confirmó también esta porosidad interconectada a través de imágenes reconstruidas 3D para los andamios 3%HCS-1%HHA y 4%HCA-1%HHA a modo de ejemplo. Las Figuras 3.5 a,b confirman que los andamios 3%HCS-1%HHA y 4%HCA-1%HHA presentan porosidades de ~90 y 88%, respectivamente, en gran consonancia con los datos del método por desplazamiento de líquido. Además, la distribución de poros confirma el carácter microscópico de los mismos, con medidas de tamaño de ~70 y 63 µm, de acuerdo con los valores medidos a partir de las imágenes de SEM. Por lo tanto, estos datos confirman que la porosidad disminuye a medida que la concentración de CS aumenta, consecuencia del mayor contenido de polímero, las paredes de los poros más gruesas y la disminución de las interconexiones entre los poros. Por otro lado, se observa un pequeño incremento en la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

porosidad a medida que disminuye el peso molecular del CS, pero dentro de la incertidumbre experimental a partir de los datos de desplazamiento de líquidos.



Fi**gura 3.4.-** Imagen SEM de los andamos híbridos a) 3%HCS, b) 1% HHA, c) 3% HCS-1% HHA, d) 3% MCS-1% HHA, e) 3% LCS-1% HHA, f) 4% HCS-1% HHA, g) 3% HCS-2% HHA, h) 3% HCS-2% LHA, i) 3% HCS-2% HHA-1% Coll y k) 3% HCS-2% HHA-1% Coll. j) es la magnificación de un área en el andamio i).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estas observaciones están en consonancia con las diferencias obtenidas en la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles, que también decrece a media que el contenido total de polímero aumenta, esto es, la porosidad se puede modificar ajustando las concentraciones de polímero[46,47].

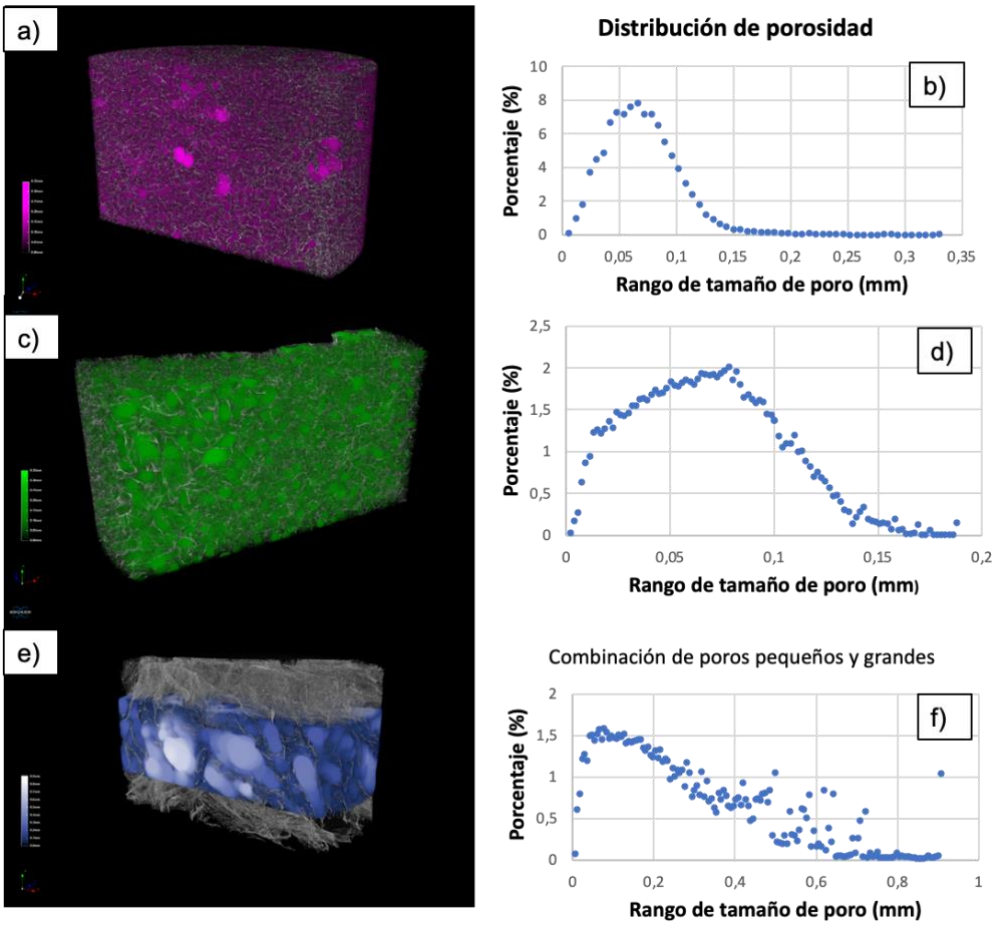


Figura 3.5.- Imágenes reconstruidas 3D de microtomografía computacional y distribución de tamaño de poro para a,b) 3%HCS-1%HHA; c,d) 4%HCS-1%HHA y e,f) 3%HCS-2%HHA-2%Coll, respectivamente.

3.2.3 Grado de hinchamiento y degradación

A este respecto, la Figura 3.6a muestra el grado de hinchamiento que se alcanza con diferentes hidrogeles basado en CS. Así, los andamios híbridos 3% HCS-1% HHA poseen una capacidad de hinchamiento de ~500% que es ligeramente mayor que la del CS puro (474%), mientras que los andamios de HA puros a bajas concentraciones son incapaces de retener agua debido a sus características de geles blancos ($G´>G´´$ y $G´<50$ Pa). Si se incrementa la concentración de CS en el andamio híbrido, la capacidad de hinchamiento es ligeramente inferior, ~417% para el 4%HCS-1%HHA que está relacionado con la disminución de la porosidad, además del incremento de la densidad de entrecruzamiento entre el HA y el CS a través, por ejemplo, de interacciones electrostáticas, puentes de

hidrógeno y/o interacciones hidrófobas, tal y como se comentó anteriormente y, que a su vez, disminuyen la flexibilidad y capacidad de expansión del hidrogel[11,48].

Por el contrario, el uso de MCS y LCS para fabricar los andamios, favorece el hinchamiento con valores en el equilibrio de 539% y 631%, respectivamente, en el andamio híbrido 3%XCS-1%HHA. La capacidad de absorción de agua se atribuye tanto a restos hidrófilos que poseen las cadenas de HA y CS y a la propia estructura de los andamios de hidrogel, mientras que la resistencia a la disolución existente se origina en la reticulación iónica de las cadenas poliméricas. Se observó que la velocidad de hinchamiento era muy rápida entre 5 y 10 minutos (dependiendo de la composición y del peso molecular del CS, no mostrado).

Con el objetivo de evaluar la biodegradabilidad de los andamios de hidrogel preparados, estos se sumergieron en disolucion tampón PBS conteniendo la proteína lisozima. La Figura 3.6b muestra la degradación de los andamio poliméricos después de 28 días en presencia de lisozima. Se realizaron experimentos control en ausencia de proteína para desacoplar la degradación de la enzima por erosión o disolucion de la red dentro del marco de tiempo de los experimentos. La degradación mostrada por el andamio híbrido 3%HCA-1%HHA fue en torno al 35%, ligeramente mejor que el CS puro lo que se atribuye a la formacion de enlaces iónicos fuertes, esto es, complejación entre el CS y el HA. Sin embargo, la degradación no enzimática del andamio híbrido fue solo del 21% ,

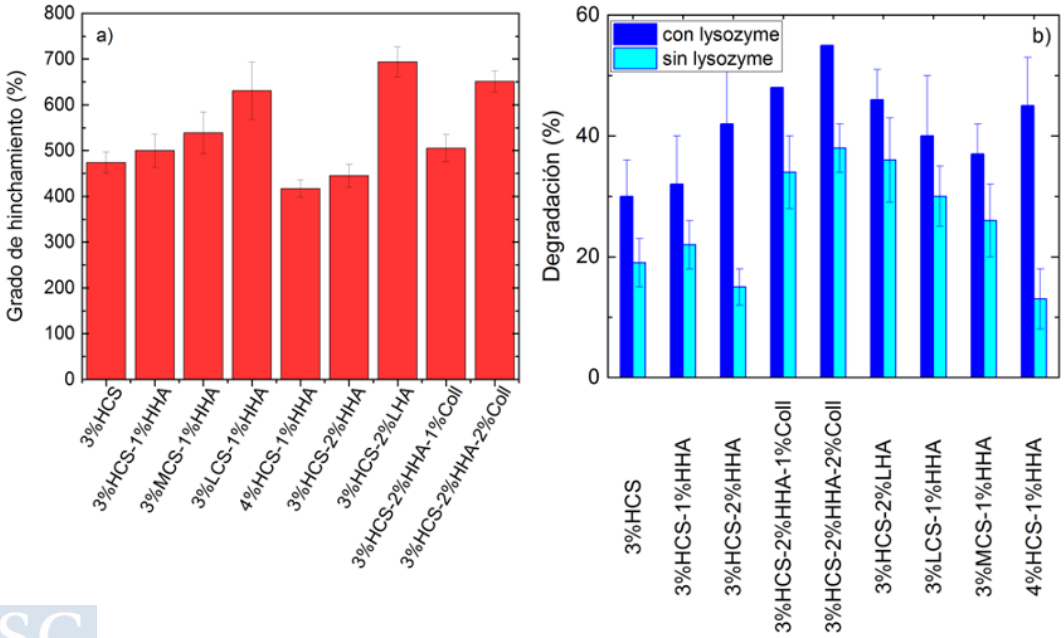


Figura 3.6.- a) Grado de hinchamiento en el equilibrio para diferentes hidrogeles basados en CS; b) Degradación de los hidrogeles híbridos después de 28 días en presencia y ausencia de lisozima.

confirmando la actividad del lisozima. Además, tanto el incremento en la concentracion de CS como el uso de ese polímero con el menor peso molecular en la formación de los hidrogeles híbridos da lugar a una mayor degadración tras la incubación con lisozima (~4% y 38-40%, respectivamente).

3.3 Efecto de la concentración y el peso molecular del HA

El incremento de la concentración de HA en el andamio híbrido CS-HA dio lugar a cambios sutiles en las propiedades físico-químicas y estructurales de los hidrogeles híbridos. La Figura 3.1 muestra los espectros FTIR de los andamios híbridos 3%HCS-1%HHA y 3%HCS-2%HHA en los que apenas se ven cambios, tan solo un pequeño aumento en la banda a ~1323 cm^{-1} y el correspondiente a la vibración de tensión del grupo C=O, así como la aparición de un hombro a 990 cm^{-1}. Por su parte, la incorporación del LHA en la composición no afecta al espectro resultante del hidrogel híbrido 3%HCS-2%LHA.

Respecto a las propiedades termodinámicas, el incremento del HA en la composición del andamio híbrido da lugar a un incremento visible en la altura del pico a ~212-214ºC, que se desplaza a temperaturas más bajas respectos a los andamios 3%XCS-1%HHA y que se corresponde con la degradación del HA. Además, el pico de degradación del CS permanece invariable a ~271-274ºC (Figuras 3.2a,b). Por otro lado, los andamios híbridos 3%HCS-2%HHA y 3%HCS-2%LHA alcanzan pérdidas totales de peso de ~56% a 350ºC y de ~66% a 600ºC, respectivamente, tanto para el hidrogel 3%HCS-2%HHA como para el 3%HCS-2%LHA (Figuras 3.2c,d). Como se puede observar, la masa residual es inferior a la observada para los hidrogeles 3%XCS-1%HHA debido a la presencia de una elevada cantidad de HA en la formulación que se degrada a temperaturas más bajas que el CS. A partir de los datos de DSC, el primer pico endotérmico se desplaza ligeramente a temperaturas superiores (~80-81ºC) mientras que se observa un comportamiento opuesto para el exotérmico (261ºC) en consonancia con el incremento de la concentración de HA para los andamios híbridos 3%HCS-2%HHA. Además, para el andamio híbrido 3%HCS-2%HHA, se observa un pequeño y ancho pico exotérmico a 227ºC que podría corresponder a la degradación del pico de HHA. En este caso, esto se puede observar como consecuencia del incremento de la concentración de este polímero. Sin embargo, un desplazamiento en el pico exotérmico principal correspondiente al CS a ~257ºC enmascara su presencia cuando en el andamio se usan polímeros de HA de bajo peso

USC DE COMPOSTELA

molecular, es decir, 3%HCS-2%LHA. Esto puede ser consecuencia de la reducción de la viscosidad del polímero que podría favorecer una degradación más temprana.

La Figura 3.3c muestra que los andamios híbridos 3%HCS-2%HHA y 3%HCS-2%LHA tienen una LVR hasta una deformación del 1.5% que es ligeramente menor que la del 3%HCS-1%HHA. Sin embargo, el hidrogel 3%HCS-2%HHA es más rígido que el 3%HCS-1%HHA como consecuencia del probable incremento de las interacciones iónicas entre el HA y el CS, además del incremento en el contenido total de polímero. En cambio, el uso de HA de bajo peso molecular en el hidrogel 3%HCS-2%LHA da lugar andamios más blandos con valores de *G´* ligeramente más pequeños que los de 3%HCS-1%HHA. Esto es un resultado de la menor viscosidad del HA a pesar de la mayor cantidad total de polímero. Además, los andamios formados por 3%HCS-2%HHA muestran un comportamiento independiente de la frecuencia típico de los geles verdaderos, mientras que los de 3%HCS-2%LHA presentan una débil dependencia de *G´* con la frecuencia como se ha observado para geles débiles de cristales líquidos lamelares formados por surfactantes iónicos de doble cola, es decir, aerolo OT/agua y didodecildimetilamonio (DDBA)[19,37]. Respecto a la resistencia de compresión, los hidrogeles 3%HCS-2%HHA y 3%HCS-2%LHA presentan un módulo elástico de 981 y 531 kPa (Tabla 3.1), reflejando el primero la resistencia derivada del entrecruzamiento iónico entre el CS y el HA, de acuerdo con los datos de reología.

La modificación tanto de la concentración de HA como del peso molecular también se refleja en los datos estructurales. Por ejemplo, el incremento en el andamio de la concentración de HA implica un incremento en la fracción de gel (79%) como consecuencia del aumento de las interacciones iónicas entre los componentes, mientras que tanto la densidad como la porosidad del hidrogel disminuye ligeramente como resultado de que el HA se hace menos denso que el CS y al incremento total en contenido polimérico de la estructura, respectivamente (Tabla 3.1). Las imágenes de SEM (Figuras 3.4g,h) confirman que un incremento en el porcentaje de peso del HA también dio lugar a paredes vacías más rugosas que las observadas en el andamio híbrido 3%HCS-1%HHA, es decir, los andamios híbridos 3%HCS-2%HHA mantienen una estructura muy porosa pero con poros más desorganizados de tamaños medios de ~30 µm si se comparan con los del 3%HCS-1%HHA, de acuerdo con la estructura observada en otros hidrogeles híbridos que contienen HA[14,49,50].

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cambio, el uso de LHA en la composición de los hidrogeles híbridos no presentó un gran impacto en las propiedades de los andamios híbridos. Se observaron pequeños incrementos en la fracción gel (82%) y porosidad (~90%), además de una menor densidad debido a la reducción de la viscosidad del HA en la mezcla polimérica, mostrando una estructura caracterizada por la observación de poros no regulares de tamaños ~29 µm.

Los andamios híbridos 3%HCS-2%HHA fueron capaces de retener más cantidad de agua en comparación con los 3%HCS-1%HHA, hasta un 445 % más, que se incrementó hasta el 694% cuando se usó LHA en la formulación (Figura 3.6a). Como el HA es ligeramente más hidrófilo que el CS, esto podría crear volúmenes vacíos dentro de la estructura del gel, debido a la disposición irregular de las cadenas de gel, es decir, las cadenas de HA se entremezclarían con las de CS para formar una matriz híbrida capaz de absorber más agua y con ello que los tamaños de los cristales de hielo se expandan durante el proceso de congelación creando huecos relativamente más grandes.

Además, la extensión de la degradación enzimática mostrada por los hidrogeles híbridos 3%HCS-2%HHA y 3%HCS-2%LHA en presencia de lisozima fue de ~42 y 45%, respetivamente, muy similar a la de otros andamios con menos cantidad de HA en su composición. Sin embargo, a este respecto, es necesario destacar la menor resistencia a la disolución del andamio 3%HCS-2%LHA que mostró una degradación aproximada del 35% en ausencia de la proteína, mucho más alta que la que presentó el 3%HCS-2%HHA de aproximadamente el 19% (Figura 3.6b).

3.4 Efecto de la incorporación y concentración de colágeno

Como se mencionó previamente, la adición de colágeno a los andamios sirve para conferirles una adhesión adicional y mayor fuerza de tensión para favorecer la adhesión y proliferación celular. Además, esta proteína puede adoptar una gran cantidad de estructuras similares a las biológicas, lo que contribuye a su alto nivel de biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Cuando se introdujo el colágeno para obtener hidrogeles híbridos como, por ejemplo, 3%HCS-2%HHA-1%Coll y 3%HCS-2%HHA-2%Coll, las bandas características del espectro FTIR de esta proteína como las amidas A, B, I, II y III se superpusieron con las correspondientes del CS y del HA (Figura 3.1). Sin embargo, se observó un ligero incremento en la intensidad de las bandas amidas I y II, particularmente en la primera de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ellas a ~1637 y 1555 cm^{-1}, así como en la tensión asimétrica de los puentes de C-O-C y en la vibración del C-O a ~1063 y 1027 cm^{-1}, respectivamente, indicando la incorporación de la proteína.

Respecto a las características termodinámicas, la incorporación del colágeno dio lugar a un desplazamiento relativo del máximo localizado a ~271ºC para el 3%HCS-2%HHA y a 280ºC para el hidrogel 3%HCS-2%HA-2%Coll en consonancia con la mayor temperatura de degradación de la Coll (cerca de 300ºC[51]). La incorporación del Coll en la composición del andamio no provocó cambios considerables en el proceso de degradación observado a 350ºC y 600ºC cuando se compara con los de los hidrogeles 3%HCS-2%HHA y 3%HCS-2%LHA, siendo otra vez 55-56% y 66-68% para 3%HCS-2%HHA-1%Coll y 3%HCS-2%HHA-2%Coll, respectivamente. Comparando los andamios 3%HCS-2%HHA-1%Coll y 3%HCS-2%HHA, se confirma la presencia de Coll en el primero de ellos mediante medidas de DSC que muestran desplazamiento y un aumento de la anchura del pico exotérmico hacia temperaturas superiores ~275ºC, respecto al andamio si colágeno, que presenta este pico en ~261ºC. Además, para los andamios 3%HCS-2%HHA-1%Coll y 3%HC-2%HHA-2%Coll, el primer máximo endotérmico se hace más pronunciado y se desplaza hacia ~78-80ºC comparado con los andamios 3%HCS-1%HHA, 3%HCS-2%HHA y 3%HCS-2%HLA, probablemente debido a cierta humedad en la muestra. El pico exotérmico correspondiente a la degradación del HA y el CS se mantiene en ~260-262ºC, pero como se mencionó previamente, este pico es más ancho y está desplazado a temperaturas superiores a medida que se incrementa la concentración de Coll como consecuencia de la mayor temperatura de degradación de esta proteína en comparación con el HA y que está relacionada con la desintegración de las cadenas laterales intermoleculares de colágeno. Además, el mínimo superficial observado en ~208ºC puede ser indicativo de la transición vítrea (T_g) de la proteína[50].

La incorporación del colágeno en los andamios híbridos condujo a pequeños cambios en su comportamiento reológico. La presencia de la proteína dentro de la composición del andamio implica una progresiva disminución en los valores de *G´* a medida que la concentración de colágeno aumenta, además de una reducción en la LVR (hasta ~1%), como se observa cuando se comparan los andamios 3%HCS-2%HHA, 3%HCS-2%HHA-1%Coll y 3%HCS-2%HHA-2%Coll. Estas observaciones están de acuerdo con resultados previos[52] en los que la presencia de colágeno en la formulación empeora las propiedades

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

reológicas, esto es, permite el desarrollo de andamios híbridos más blandos debido a las pobres propiedades mecánicas de esta proteína. Las pruebas de compresión también están de acuerdo con las primeras observaciones, esto es, se obtuvieron módulos de Young menores a medida que la concentración de colágeno aumentaba en la composición del andamio híbridos (Tabla 3.1). Además, la presencia de la proteína en el andamio también se manifiesta través de cambios en su estructura. Las fracciones de gel y la porosidad de los andamios que contienen colágeno se incrementan ligeramente a medida que su concentración aumentar. Igualmente, la introducción de colágeno dio lugar a la formación de andamios con una estructura aparentemente más irregular y desorganizada con porosidad de ~90% y tamaños de poro de ~36 y 55 µm para los andamios 3%HCS-2%HHA-1%Coll y 3%HCS-2%HHA-2%Coll, respectivamente. La Figura 3.5e muestra una imagen 3D reconstruida a partir de experimentos de microtomografía computacional para el andamio 3%HCS-2%HHA-2%Coll que confirma estas observaciones. Este andamio muestra un esqueleto más suelto, compuesto por estructuras alargadas reticuladas, también visibles por SEM, y con una porosidad de ~95% y dos poblaciones de poros con diferente tamaño, uno por debajo de 70 µm y otra entre 200-600 µm, de acuerdo con las imágenes de SEM (Figuras 3.4i,j,k). Este comportamiento se refleja en la mayor capacidad de hinchamiento de estos andamios, en particular, de aquellos con composición 3%HCS-2%HHA-2%Coll (~670%), acompañado de una menor resistencia al ataque enzimático con una biodegradación de ~48 y 55% después de 28 días de incubación en la presencia de lisozima para los hidrogeles 3%HCS-2%HHA-1%Coll y 3%HCS-2%HA-2%Coll, significativamente superiores a los observados para 3%HCS-2%HHA y 3%HCS-1%HHA.

3.5 Evaluación biológica

Una vez que los diferentes tipos de andamios se caracterizaron físico-químicamente, se procedió a su evaluación biológica *in vitro*. Como se comentó previamente, el HA y el Coll son los principales componentes de la matriz extracelular, por ejemplo, del tejido de piel[53], mientras que CS presenta muy buenas propiedades para la adhesión celular, además de excelentes propiedades mecánicas[54]. Así, con el objetivo de evaluar biológicamente estos materiales, se utilizaron fibroblastos de ratón BALB-3T3 y Keratinocitos humanos como modelos de líneas celulares para ser cultivadas con los andamios y evaluar su potencial biocompatibilidad para posibles aplicaciones como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

contenedores de fármacos intradérmicos y/o biomateriales para rellenar huecos intradérmicos y favorecer la reparación de la MEC de la piel. Con esta finalidad, se realizaron dos tipos diferentes de experimentos de citocompatibilidad. En el primero, los andamios se incubaron durante 96 horas en medio de cultivo y el lixiviado resultante se añadió al cultivo celular y posteriormente se incubó adicionalmente 24 y 72 horas más. En la Figura 3.7 se observa que todos los andamios híbridos son citocompatibles, con viabilidades celulares comprendidas entre el 85% y el 103% y del 88 al 107% a las 24 y 72 horas, respectivamente, para keratinocitos desde ~80% hasta 95% y de 73 hasta 107% después de 24 y 72 horas de incubación para fibroblastos, respectivamente. Así, a partir de esta Figura se observa que los andamios son completamente biocompatibles después de una eliminación óptima de todos los residuos derivados del proceso de entrecruzamiento. Además, los fibroblastos presentan un ligero menor promedio de viabilidad debido probablemente a la sensibilidad de la línea celular a las condiciones del entorno que la rodea, lo que la hace una línea celular control típica para evaluar la biocompatibilidad de gran número de materiales[55]. Por otro lado, no se han observaron diferencias apreciables de viabilidad celular entre los diferentes andamios en relación a su composición y concentración. Quizás, en los andamios el CS es el componente principal, son ligeramente más tóxicos para células posiblemente debido a un exceso de cargas catiónicas interaccionando con la membrana celular. También es interesante mencionar que los andamios que contienen HA y Coll en su composición son ligeramente más citocompatibles dentro de incertidumbre experimental, posiblemente como consecuencia de la estructura y composición del andamio, pareciéndose este tipo de andamios, por ejemplo, a la MEC de la piel.

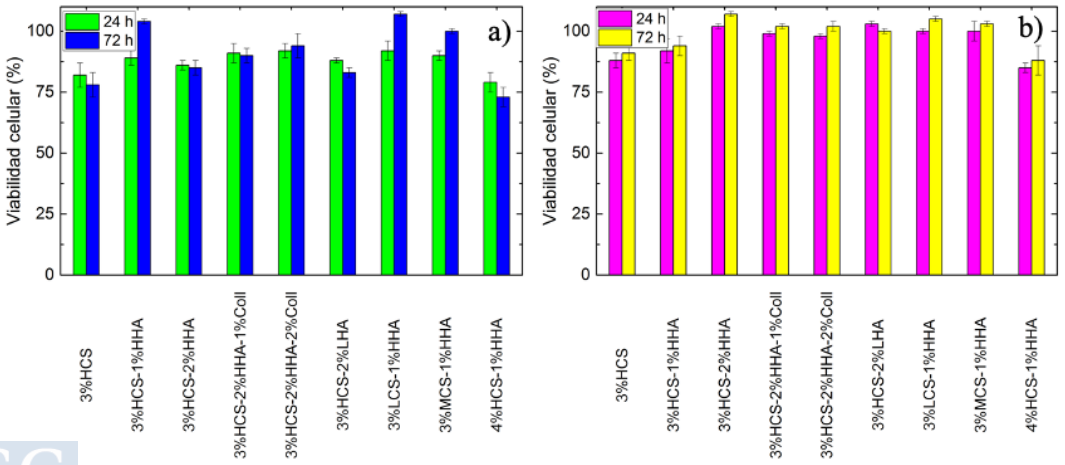


Figura 3.7.- Citotoxicidad de diferetnes andamios híbridos basados en CS después de 24 y 72 horas para a) fibroblastos de ratón BALB-3T3 y b) keratinicitos humanos HaCAT.

La viabilidad y proliferación celular de las células en los andamios también se analizó por microscopía óptica, fluorescente y por SEM. La Figura 3.8a muestra que, por ejemplo, las células fibroblastos son capaces de adherirse a la superficie de los andamios híbridos. Además, el teñido con calceina AM-yoduro de propidio confirma que las células permanecen viables (Figura 3.8). Las imágenes de SEM también confirman que las células se infiltran a través de los poros de la matriz polimérica y se adhieren y proliferan dentro de los mismos, como se observa para la keratinocitos (Figura 3.8b) que presenta

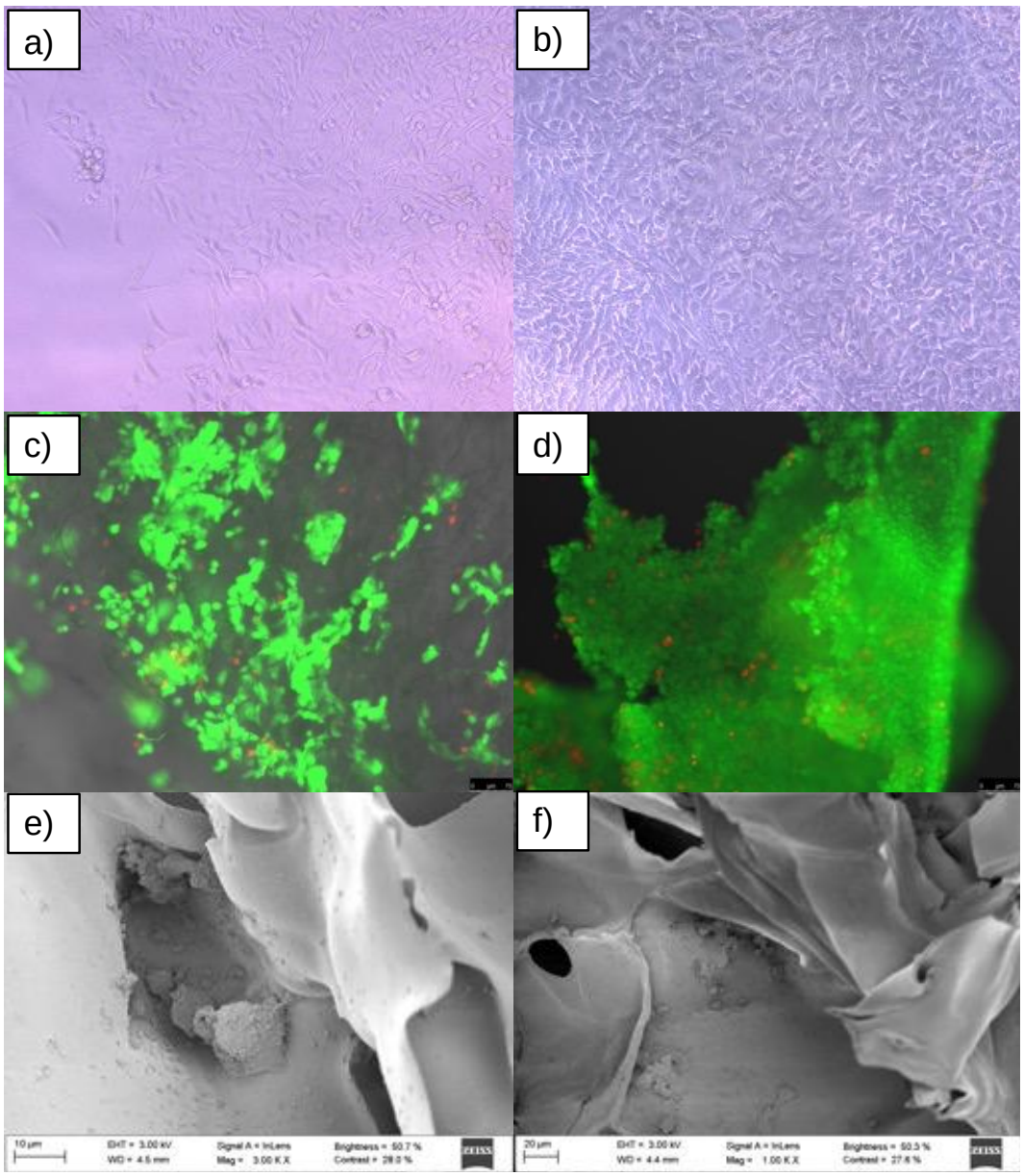


Figura 3.8.- Imágenes de microscopía óptica de proliferación de fibroblastos de ratón BALB 3T3 después de a) 3 y b) 7 días de incubación. Imágenes de epiflorescencia de experimentos célula viva/muerta para ilustrar la proliferación de keratinocitos humanos HaCAT después de c) 3 y d) 7 días. e) y f) Imágenes de SEM que muestran la infiltración de células HaCAT dentro de un andamio híbrido 3%HCS-1%HHA.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la forma redondeada clásica de la keratinocitos cuando se colocan en superficies no planas.

La incubación adicional conduce a una gran dispersión de células dentro y sobre los andamios, como se confirma en la Figuras 3.8 y corroboran que estas estructuras poliméricas son adecuadas para aplicaciones biológicas.

3.6 Conclusiones

Los hidrogeles híbridos compuestos de CS y HA se prepararon por autoagregación a partir de la formación de complejos polielectrolíticos formados entre las cadenas de ambos biopolímeros mediante interacciones electrostáticas. Además, en alguna formulación también se añadió colágeno en la composición con el objetivo, por un lado, de proporcionar sitios de adhesión adicionales, mayor resistencia a la tracción y un entorno más biomimético para inducir la proliferación celular y, por otro, producir materiales con una estructura porosidad y rigidez adecuadas. Los andamios sintetizados se caracterizaron estructural y físicamente mediante microscopía electrónica de barrido, reflectancia total atenuada por transformada de Fourier infrarroja, espectroscopía Raman, análisis termogravimétrico, calorimetría diferencial de barrido y experimentos de reología y compresión. Su estabilidad se caracterizó a través del análisis del grado de hinchamiento y la degradación enzimática. Se observó que los andamios de CS-HA y CS-HA-Coll obtenidos presentaban una buena mezcla de sus componentes, con el HA y el CS bien dispersos en la matriz de CS, como confirmaron estudios termodinámicos. Todos los andamios tenían una porosidad superior al 80% y una buena estructura interconectada, con tamaños de poro comprendidos entre ~29 y ~114 µm. Esta porosidad parecía ser más regular cuando el Coll estaba presente en la composición y más desorganizados a medida que el HA estaba más presente en la estructura del andamio. Además, las interacciones iónicas entre el CS y el HA hacen que los andamios soporten un módulo de almacenamiento más grande y una región LVR más larga, presentado los hidrogeles 4%HCS-1%HHA los mayores módulos de almacenamiento y de Young, que disminuían progresivamente a medida que las concentraciones de HA y Coll en la formulación se aproximaban a las del CS. Por otro lado, los hidrogeles híbridos presentaban una buena capacidad de hinchamiento que variaba entre ~42% y 690% en función de la porosidad y características estructurales de los andamios. Se confirmó que la resistencia a la degradación enzimática era menor para los andamios más ricos en CS, es decir, los que

USC DE COMPOSTELA

presentaban mayores proporciones CS:HA y CS:HA:Coll. En particular, los hidrogeles de CS-HA-Coll mostraron una mayor degradabilidad, posiblemente por la acción enzimática de la lisozima sobre la parte proteica del andamio (colágeno). Finalmente, cabe mencionar que todos los andamios presentaron una citocompatibilidad muy elevada, en particular aquellos en cuya composición existía colágeno, y que permitieron la proliferación de fibroblastos de ratón y keratinocitos humanos tanto en el interior como su superficie. En particular, estas líneas celulares se seleccionaron ya que los andamios de CS-HA-Coll podían presentar propiedades adhesivas y reológicas similares a diferentes tejidos, como por ejemplo la piel, que se puede convertir en matriz óptima para aplicaciones en ingeniería de tejidos, así como para depósitos para administración de fármacos transdérmicos.

3.7 Referencias

1. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem. Rev.* **101**, 1869–1880 (2001).

2. Vanderhooft, J. L., Alcoutlabi, M., Magda, J. J. & Prestwich, G. D. Rheological properties of cross-linked hyaluronan-gelatin hydrogels for tissue engineering. *Macromol. Biosci.* **9**, 20–28 (2009).

3. Dave, P. N. & Gor, A. Natural polysaccharide-based hydrogels and nanomaterials: Recent trends and their applications. in *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications* 36–66 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-813351-4.00003-1

4. Nieto-Suárez, M., López-Quintela, M. A. & Lazzari, M. Preparation and characterization of crosslinked chitosan/gelatin scaffolds by ice segregation induced self-assembly. *Carbohydr. Polym.* **141**, 175–183 (2016).

5. McKee, T. J., Perlman, G., Morris, M. & Komarova, S. V. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **9**, 10542 (2019).

6. Rose, J. B. *et al.* Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering. *Mater. (Basel, Switzerland)* **7**, 3106–3135 (2014).

7. Bissell, M. J. & Hines, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature Medicine* **17**, 320–329 (2011).

8. Hutmacher, D. W. Biomaterials offer cancer research the third dimension. *Nature Materials* **9**, 90–93 (2010).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9. Hutmacher, D. W. *et al.* Can tissue engineering concepts advance tumor biology research? *Trends in Biotechnology* **28**, 125–133 (2010).

10. Kimlin, L. C., Casagrande, G. & Virador, V. M. In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: An update. *Mol. Carcinog.* **52**, 167–182 (2013).

11. Camci-Unal, G., Cuttica, D., Annabi, N., Demarchi, D. & Khademhosseini, A. Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **14**, 1085–1092 (2013).

12. Chandra, P. K. & Atala, A. A. Use of matrix and seeding with cells for vasculature of organs. in *Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **1**–**3**, 425–446 (Academic Press, 2019).

13. Loessner, D. *et al.* Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nat. Protoc.* **11**, 727–746 (2016).

14. Eke, G., Mangir, N., Hasirci, N., MacNeil, S. & Hasirci, V. Development of a UV crosslinked biodegradable hydrogel containing adipose derived stem cells to promote vascularization for skin wounds and tissue engineering. *Biomaterials* **129**, 188–198 (2017).

15. Van Den Bulcke, A. I. *et al.* Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **1**, 31–38 (2000).

16. Prakash Parthiban, S., Rana, D., Jabbari, E., Benkirane-Jessel, N. & Ramalingam, M. Covalently immobilized VEGF-mimicking peptide with gelatin methacrylate enhances microvascularization of endothelial cells. *Acta Biomater.* **51**, 330–340 (2017).

17. Chowdhury, A., Kunjiappan, S., Panneerselvam, T., Somasundaram, B. & Bhattacharjee, C. Nanotechnology and nanocarrier-based approaches on treatment of degenerative diseases. *Int. Nano Lett.* **7**, 91–122 (2017).

18. Schanté, C. E., Zuber, G., Herlin, C. & Vandamme, T. F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* **85**, 469–489 (2011).

19. Florczyk, S. J. *et al.* Porous chitosan-hyaluronic acid scaffolds as a mimic of glioblastoma microenvironment ECM. *Biomaterials* **34**, 10143–10150 (2013).

20. Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O. & Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **57**, 35–52 (2004).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

21. Coimbra, P. *et al.* Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds

for dental pulp regeneration: Synthesis and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* **49**, 573–579 (2011).

22. Miranda, D. G. *et al.* A chitosan-hyaluronic acid hydrogel scaffold for periodontal tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **104**, 1691–1702 (2016).

23. Deng, Y. *et al.* Injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for abdominal tissue regeneration. *Sci. Rep.* **7**, 2699 (2017).

24. Li, X. *et al.* Nano-pearl powder/chitosan-hyaluronic acid porous composite scaffold and preliminary study of its osteogenesis mechanism. *Mater. Sci. Eng. C* **111**, 110749 (2020).

25. Baniasadi, M. & Minary-Jolandan, M. Alginate-collagen fibril composite hydrogel. *Materials (Basel).* **8**, 799–814 (2015).

26. Udhayakumar, S. *et al.* L-Arginine intercedes bio-crosslinking of a collagen-chitosan 3D-hybrid scaffold for tissue engineering and regeneration:: In silico, in vitro, and in vivo studies. *RSC Adv.* **7**, 25070–25088 (2017).

27. You, C. *et al.* Silver nanoparticle loaded collagen/chitosan scaffolds promote wound healing via regulating fibroblast migration and macrophage activation. *Sci. Rep.* **7**, 10489 (2017).

28. Recombinant, E., Collagen, H. & Nanofibers, P. C. applied sciences Tissue Engineering 3D Porous Scaffolds Prepared from. (2021).

29. Yan, F. *et al.* Collagen-chitosan scaffold impregnated with bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of traumatic brain injury. *Neural Regen. Res.* **14**, 1780–1786 (2019).

30. Liu, X. *et al.* 3D bioprinted neural tissue constructs for spinal cord injury repair. *Biomaterials* **272**, 120771 (2021).

31. Erickson, A. E., Lan Levengood, S. K., Sun, J., Chang, F. C. & Zhang, M. Fabrication and Characterization of Chitosan–Hyaluronic Acid Scaffolds with Varying Stiffness for Glioblastoma Cell Culture. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, 1800295 (2018).

32. Feng, P. *et al.* Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair: Mechanisms and Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9**, 111 (2021).

33. Choi, B., Kim, S., Lin, B., Wu, B. M. & Lee, M. Cartilaginous extracellular matrix-modified chitosan hydrogels for cartilage tissue engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 20110–20121 (2014).

34. Pradal, C., Kithva, P., Martin, D., Trau, M. & Grøndahl, L. Improvement of the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

wet tensile properties of nanostructured hydroxyapatite and chitosan biocomposite films through hydrophobic modification. *J. Mater. Chem.* **21**, 2330–2337 (2011).

35. Olad, A. & Farshi Azhar, F. The synergetic effect of bioactive ceramic and nanoclay on the properties of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite-montmorillonite scaffold for bone tissue engineering. *Ceram. Int.* **40**, 10061–10072 (2014).

36. Smitha, B., Sridhar, S. & Khan, A. A. Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *Eur. Polym. J.* **41**, 1859–1866 (2005).

37. Pieróg, M., Gierszewska-Drużyńska, M. & Ostrowska-Czubenko, J. EFFECT OF IONIC CROSSLINKING AGENTS ON SWELLING BEHAVIOUR OF CHITOSAN HYDROGEL MEMBRANES. *Prog. Chem. Appl. Chitin Its* . **XIV**, 75–82 (2009).

38. Al-Qadi, S., Alatorre-Meda, M., Martin-Pastor, M., Taboada, P. & Remuñán-López, C. The role of hyaluronic acid inclusion on the energetics of encapsulation and release of a protein molecule from chitosan-based nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **141**, 223–232 (2016).

39. Rege, A., Hillgärtner, M. & Itskov, M. Mechanics of biopolymer aerogels based on microstructures generated from 2-d Voronoi tessellations. *J. Supercrit. Fluids* **151**, 24–29 (2019).

40. Goimil, L. *et al.* Preparation and stability of dexamethasone-loaded polymeric scaffolds for bone regeneration processed by compressed CO2 foaming. *J. CO2 Util.* **24**, 89–98 (2018).

41. Vedadghavami, A. *et al.* Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. *Acta Biomater.* **62**, 42–63 (2017).

42. Romn, J., Cabãas, M. V., Pẽa, J. & Vallet-Regí, M. Control of the pore architecture in three-dimensional hydroxyapatite- reinforced hydrogel scaffolds. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **12**, 045003 (2011).

43. Moura, M. J., Faneca, H., Lima, M. P., Gil, M. H. & Figueiredo, M. M. In situ forming chitosan hydrogels prepared via ionic/covalent Co-cross-linking. *Biomacromolecules* **12**, 3275–3284 (2011).

44. Erickson, A. E. *et al.* Chitosan-based composite bilayer scaffold as an in vitro osteochondral defect regeneration model. *Biomed. Microdevices* **21**, 34 (2019).

45. Florczyk, S. J. *et al.* 3D porous chitosan-alginate scaffolds promote proliferation and enrichment of cancer stem-like cells. *J. Mater. Chem. B* **4**, 6326–6334 (2016).

46. Magami, S. M. & Williams, R. L. Gelation studies on acrylic acid-based hydrogels

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

via *in situ* photo-crosslinking and rheology. *J. Appl. Polym. Sci.* **135**, 46691 (2018).

47. Alcantara, M. R. & Vanin, J. Rheological properties of lyotropic liquid crystals. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **97**, 151–156 (1995).

48. Sivashanmugam, A., Arun Kumar, R., Vishnu Priya, M., Nair, S. V. & Jayakumar, R. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *Eur. Polym. J.* **72**, 543–565 (2015).

49. Chang, K. H., Liao, H. T. & Chen, J. P. Preparation and characterization of gelatin/hyaluronic acid cryogels for adipose tissue engineering: In vitro and in vivo studies. *Acta Biomater.* **9**, 9012–9026 (2013).

50. Gilarska, A., Lewandowska-Łańcucka, J., Horak, W. & Nowakowska, M. Collagen/chitosan/hyaluronic acid – based injectable hydrogels for tissue engineering applications – design, physicochemical and biological characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **170**, 152–162 (2018).

51. Sorushanova, A. *et al.* The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv. Mater.* **31**, 1–39 (2019).

52. Pietrucha, K. Changes in denaturation and rheological properties of collagen-hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies. *Int. J. Biol. Macromol.* **36**, 299–304 (2005).

53. Papakonstantinou, E., Roth, M. & Karakiulakis, G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-Endocrinology* **4**, 253–8 (2012).

54. Huang, Y. *et al.* Induction of articular chondrogenesis by chitosan/hyaluronic-acid-based biomimetic matrices using human adipose-derived stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4487 (2019).

55. Yassue-Cordeiro, P. H. *et al.* Development of chitosan/silver sulfadiazine/zeolite composite films for wound dressing. *Pharmaceutics* **11**, 535 (2019).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4 Obtención y caracterización de hidrogeles fotopolimerizables híbridos para regeneración tisular

Este Capítulo se deriva de la siguiente publicación "Hybrid methacrylated gelatin and hyaluronic acid hydrogel scaffolds. Preparation and systematic characterization for prospective tissue engineering applications", con un índice de impacto del IJMS 5.923; revista Q1 en el área de Bioquímica y Biología molecular.

Como se comentó en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, a pesar de las grandes ventajas que presentan los hidrogeles para IT, existen todavía una serie de deficiencias tales como su inestabilidad y falta de elasticidad que son necesarias superar para su aplicación en medicina regenerativa.

Dentro de los diferentes tipos de hidrogeles, los de origen natural permiten imitar el entorno biológico, como sucede con proteínas y polisacáridos como la gelatina (Gel), el colágeno (Coll), la elastina, la fibronectina y el ácido hialurónico (HA), que son los componentes principales de la MEC humana[1,2] y, por lo tanto, se presentan como biomateriales idóneos para construir andamios poliméricos sintéticos en 3D biocompatibles y biodegradables que imiten la MEC.

En concreto, tal y como se comentó, la Gel sin modificar químicamente permite la formación de hidrogeles biocompatibles mediante el entrecruzamiento de su estructura con distintos agentes químicos, sin embargo, presenta unas propiedades mecánicas y térmicas limitadas para su aplicación en IT[3]. La metacrilación de los residuos de lisina de la Gel a través de su exposición a radiación UV permite obtener hidrogeles de gelatina metacrilada (GelMA) que presentan una resistencia térmica, mecánica, así como una porosidad y biodegradabilidad más adecuadas para su uso en IT[4–6].

Así, aun mejorando la GelMA sus propiedades respecto a la Gel sin modificar, sigue siendo un material que se degrada muy rápidamente impidiendo su empleo para tratamientos a largo plazo, por lo que una alternativa de mejora de estos hidrogeles es enriquecerlos con otros componentes de la MEC como, por ejemplo, el ácido hialurónico.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

El ácido hialurónico, por sus propiedades intrínsecas, en sí mismo no es candidato óptimo para IT[7], sin embargo, sus grupos funcionales son fácilmente modificables por metacrilación a través de su exposición a luz UV, dando lugar a hidrogeles de HA metacrilados (HAMA), que presentan, al igual que la GelMA mejores propiedades mecánicas y químicas para aplicaciones regeneración tisular. Aunando las propiedades de ambos hidrogeles metacrilados en un único hidrogel híbrido, se han conseguido estructuras en 3D con unas excelentes propiedades estructurales y físico-químicas para aplicación en IT[3,8].

A pesar de los estudios previos, la relación entre las propiedades estructurales, físico-químicas y mecánicas de hidrogeles GelMA-HAMA no se han establecido completa y sistemáticamente. Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral se ha trabajado en la metacrilación de los hidrogeles, así como, en el grado de hinchamiento, degradación, tamaño de poro, porosidad, estructura química (FT-IR Raman) y propiedades reológicas de los hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA con el fin de correlacionar el proceso de fabricación y composición con la estructura del andamio resultante y las propiedades físico-químicas, con un énfasis importante en sus características mecánicas y reológicas, ya que es bien sabido que las células pueden detectar la rigidez local de la MEC y responder alterando la expresión de la integrina, las adhesiones focales y la organización citoesquelética[9]. Los resultados obtenidos, se presentan a continuación.

4.1 Grado de metacrilación de GelMA-HAMA

El proceso de metracrilación conlleva la adición del grupo metacriloilo a los residuos amino e hidroxilos de la Gel y el HA. El GM de los polímeros es un parámetro importante que da información sobre la densidad de entrecruzamiento del hidrogel y permite, en último caso, predecir sus propiedades mecánicas[10]. La cantidad de fotoiniciador usada se ajusta al número de enlaces dobles en la cadena polimérica. En este sentido, altos valores sustitución de la Gel y HA da lugar a hidrogeles rígidos que deberían favorecer la adhesión celular y, con ello, sus potenciales aplicaciones en regeneración de tejidos[11]. Los espectros de ^{1}H RMN confirman la presencia de los grupos metacrilo en la Gel y el HA, como se muestra en la Figura 4.1. El análisis para la Gel, se llevó a cabo tomando como referencia los grupos de fenilalanina en el intervalo 7.6-7.1 ppm (rectángulo gris Figura 4.1a) y no usando la disminución de los grupos lisina en el rango 3.3-3.0 ppm (rectángulo gris Figura 4.1a), debido a que lleva a errores en los cálculos del grado de

USC DE COMPOSTELA

metacrilación[12]. El pico que se muestra en todos los espectros a 4.79 ppm corresponde al D_2O que se utilizó como disolvente. Mientras que para el HA, los grupos metilo ~2.0 ppm (rectángulo gris Figura 4.1b) son tomados como referencia respecto al pico extra que aparece a la incorporación de grupos metilo del MA a ~1.9 ppm en la cadena[13]. Los picos a 5.5-5.8 ppm y 6.0-6.3 ppm para la GelMA y el HAMA y que se corresponden con los protones acrilato (CH_2=CH(CH_3)) de la lisina y la hidroxilisina, respectivamente (rectángulos punteados en las Figura 4.1a y 4.1b). El pico en torno a 1.9 ppm se corresponde con los protones metilos (CH_2=CH(CH_3)) del grupo metacriloilo ramificado, que no está presente en el espectro de ambos hidrogeles no modificados de Gel y HA.

A partir de los espectros de RMN, el GM fue calculado obteniéndose un 40% para la GelMA y un 11% para el HAMA. Teniendo en cuenta el mayor GM de la GelMA, los andamios de hidrogeles puros e híbridos que contengan este biopolímero como el principal componente serían más estables y rígidos que los de HAMA puros.

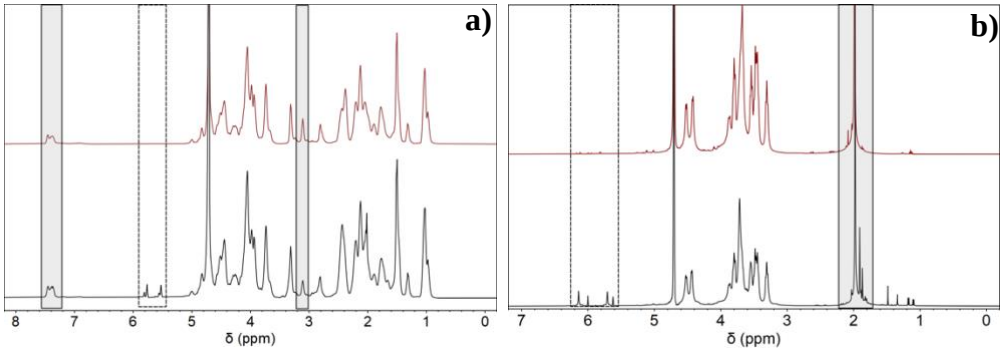


Figura 4.1.- Espectros RMN de a) Gel (—), GelMA (—), y b) HA (—), HAMA (—). En a) y b) los rectángulos punteados indican la presencia del pico metacrilo después de la modificación química. En a) el rectángulo gris a ca. 7.1-7.5 denota los picos de fenilalanina y a 3.0-3.3 ppm corresponde a los grupos de lisina. En b), el rectángulo gris indica los grupos metilo de HA a ac. 2.0 ppm y la apariencia de protones metilo de metacrilato a ca. 1.9 ppm, respectivamente.

4.2 Caracterización físico-química

Se sintetizaron por fotopolimerización hidrogeles de HAMA puros, GelMA puros e híbridos de GelMA-HAMA utilizando Irgacure 2959 en disolución de PBS como fotoiniciador, con concentración de polímeros entre 1-5% p/v HAMA y 2-10% p/v GelMA como se muestra en la Tabla 4.1. El contenido de gel de los andamos se encuentra en el rango de 70 a 100% para obtener este parámetro de cálculo el porcentaje de la fracción en gel descrita en la sección 2.4. Para los hidrogeles de GelMA puros, el porcentaje de la fracción de gel aumenta ligeramente a medida que la concentración de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

proteína aumenta, mientras que para los hidrogeles de HAMA puros el grado de gelificación fue del 100% independientemente de la concentración de polímero. Para los hidrogeles híbridos GelMA-HAMA mostraron un comportamiento similar a los hidrogeles de GelMA puros, es decir, la formación de hidrogel se favorece a medida que aumenta la concentración de GelMA en la composición, lo que se potencia aún más cuando se añade HAMA probablemente como consecuencia de la unión física resultante principalmente de interacciones intercadena de carácter electrostático entre grupos carboxílicos protonados de HAMA y lisina libre de GelMA, pero también enlaces de hidrógeno entre restos de aldehído, carboxilo y amina de ambas cadenas poliméricas, además, las interacciones hidrofóbicas podrían jugar un cierto papel. Estas interacciones físicas se suman a las reticulaciones químicas proporcionadas por la fotopolimerización UV. Los andamios de gel y HA no reticulados se disolvieron cuando se sumergieron en agua desionizada, confirmando así la ausencia de cualquier red polimérica reticulada químicamente.

Por otro lado, se realizaron análisis de FT-IR para identificar las interacciones y los componentes estructurales de las matrices poliméricas de hidrogel. La Figura 4.2a muestra los espectros FTIR de hidrogeles de HAMA puros, hidrogeles de GelMA puros e hidrogeles híbridos GelMA-HAMA. Los espectros de andamios de HA y Gel no entrecruzados son similares a los de los polímeros comerciales (no se muestran). El espectro del hidrogel de HA puro muestra una banda ancha a ~3370-3270 cm^{-1}, que se atribuye a vibraciones de estiramiento de los O-H y N-H de los grupos funcionales involucrados en el enlace de hidrógeno intra e intermolecular entre moléculas de HA[14]. Los picos a 2920 y 2880 cm^{-1} se corresponden con los modos de vibración de estiramiento simétrico y antisimétrico C-H, mientras que las bandas en 1615, 1560 y 1320 cm^{-1} se atribuyen al estiramiento de C=O de la amida I, vibraciones de flexión de N-H de la amida II y vibraciones N-H y C-N de la amida III, respectivamente. Las bandas a ~1150, 1070-1035 y 950 cm^{-1} son las típicas de los estiramientos asimétricos del puente hemiacetálico C-O-C, el estiramiento de C-O en alcoholes y enlaces glicosídicos entre unidades de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, respectivamente[15,16] y picos a ~1405 y 1380 cm^{-1} se asignan a vibraciones de deformación CH_2 y CH_3[17]. Por el contrario, los espectros de los hidrogeles puros de HAMA mostraron un pequeño desplazamiento de las bandas atribuidas a los modos de vibración de estiramiento O-H y N-H a ~3355-3255 cm^{-1}. Además, la correcta metacrilación del HA se confirmó con la presencia de los picos a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

~1708 y 1648 cm^{-1} que se atribuyen al enlace éster C=O característico asociado a los grupos metacrilado añadidos a la cadena principal de HA junto con la formación de un nuevo enlace C=C, respectivamente. Sin embargo, estos hombros no son muy intensos debido al bajo GM del HA.

Tabla 4.1.-Resumen de la composición y propiedades de los andamios.

Muestra	**Fracción de Gel (%)**	**E (kPa)**	**Densidad (g/ml)**	**ε_{MIP} (%)**	**Diámetro medio de poro (μm)**
1% HAMA	100 ± 6	1.0 ± 0.2	0.065 ± 0.005	94 ± 6	89 ± 8
3% HAMA	100 ± 3	6.6 ± 0.1	0.072 ± 0.003	75 ± 4	54 ±5
5% HAMA	100 ± 1	12.4 ± 0.09	0.084 ± 0.001	65 ± 1	32 ± 4
2% GelMA	70 ± 8	0.8 ± 0.3	0.072 ± 0.03	89 ± 8	26 ± 11
6% GelMA	79 ± 6	2.1 ± 0.1	0.105 ± 0.009	77 ± 5	17 ± 4
10% GelMA	79 ± 3	3.1 ± 0.02	0.157 ± 0.004	67 ± 2	11 ± 3
2% GelMA-1% HAMA	91 ± 7	2.0 ± 0.1	0.070 ± 0.01	91 ± 5	31 ± 6
2% GelMA-5% HAMA	95 ± 6	12.8 ± 0.08	0.079 ± 0.009	76 ± 3	19 ± 5
6% GelMA-1% HAMA	83 ± 5	5.6 ± 0.1	0.101 ± 0.008	81 ± 3	22 ± 3
6% GelMA-3% HAMA	87 ± 7	9.0 ± 0.1	0.101 ± 0.006	74 ± 2	20 ± 2
10% GelMA-1% HAMA	80 ± 2	9.5 ± 0.07	0.149 ± 0.003	68 ± 1	13 ± 1
10% GelMA-5% HAMA	71 ± 1	18.3 ±0.04	0.192 ± 0.002	54 ± 1	8 ± 1

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los espectros FTIR de los andamios del Gel puros muestran bandas a 3290 cm^{-1} que se corresponde con el estiramiento de N-H acoplado con el enlace de hidrógeno de la amida A, 3070 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento asimétrico de =C-H y NH^{3+} de la amida B, y 2935-2875 cm^{-1} atribuido a las vibraciones de estiramiento de C-H. Además, los picos a 1635, 1525 y 1235 cm^{-1} se corresponden con los enlaces de estiramiento/hidrógeno acoplados con los grupos COO^- de la amida I, vibraciones de flexión de los grupos N-H y vibraciones de estiramiento de grupos C-N de la amida II y vibraciones en plano de los grupos C-N y N-H de los enlaces de amida o vibraciones de los grupos CH_2 de la glicina de la amida III, respectivamente. Picos a ~1445-1400 cm^{-1} se asignan a los modos de deformación simétricos del CH_2, mientras que los observados a 1165 y 1030 cm^{-1} corresponden al estiramiento del grupo C-O del ácido carboxílico al estiramiento de C-N de las aminas, respectivamente. En cambio, en los espectros de los hidrogeles de GelMA, las bandas atribuidas a las amidas A, B, I y II y a las vibraciones de estiramiento CH se desplazan a 330, 3070, 1632, 1530 y 2930-2880 cm^{-1}, respectivamente.

Los hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA presentan bandas de ambos componentes poliméricos cuyas intensidades dependen la composición del andamio. Se observa un aumento claro en la banda a ~1030 cm^{-1} correspondiente al modo de estiramiento C-O en alcoholes de los anillos de azúcar del HA cuando la concentración del biopolímero se incrementa en el hidrogel híbrido. Sin embargo, el comportamiento que se observa para la GelMA es opuesto, es decir, un cierto debilitamiento de algunas bandas típicas (particularmente aquellas de las amidas I y II). Además, se observa un desplazamiento tanto de las bandas amino como de las de carbonil en los espectros FTIR de los andamios híbridos debidos probablemente a los enlaces intermoleculares entre el HAMA y la GelMA hasta la formación del gel híbrido. La formación del hidrogel se puede asociar obviamente a la polimerización por radicales libres del grupo metacrilato inducida por la luz UV, aunque puede existir otras contribuciones como, por ejemplo, reacciones entre grupos aldehídos del HA y grupos amino de la Gel y/o interacciones electrostáticas entre los grupos carboxílicos del HA y los grupos amino de la Gel.

Se utilizó microscopía Raman confocal de alta resolución para aclarar la incorporación y distribución de los diferentes polímeros dentro de los hidrogeles híbridos. La Figura 4.2b-c muestra los mapas combinados de los polímeros HAMA y GelMA individuales en los hidrogeles híbridos, que se identificaron utilizando algunas bandas Raman específicas de

USC DE COMPOSTELA

los biopolímeros: 1380 y 1410 cm^{-1} para HAMA y 1455 cm^{-1} para GelMA, respectivamente. Como se muestra en esta Figura, la estabilidad y preservación de los dos componentes iniciales, HAMA y GelMA, se logró mostrando una distribución regular y formando una matriz polimérica coherente y homogénea, como ya predijeron los datos de FT-IR. Las cadenas de HAMA aparecen bien dispersas en una matriz de GelMA, siendo el último biopolímero el más prevalente en las composiciones de hidrogel analizadas. La buena mezcla de ambos polímeros en la matriz del hidrogel híbrido puede considerarse una consecuencia de un proceso de fotopolimerización exitoso, pero también una prueba la existencia de interacciones físicas entre los polímeros, como los electrostáticos que probablemente juegan un papel clave en favorecer la mezcla entre las cadenas. Curiosamente, no se observó interferencia y, se realizo una proyección 3D. Para confirmar que la mezcla entre HAMA y GelMA también está presente dentro de los hidrogeles, es decir, para demostrar que no solo se tiene lugar en la superficie del hidrogel, también se adquirieron imágenes confocales en profundidad (es decir, en el eje z). El color azul marino claro observado en la Figura 4.2d, proviene de la mezcla de los espectros verde y azul asignados a los espectros HAMA y GelMA respectivamente en el

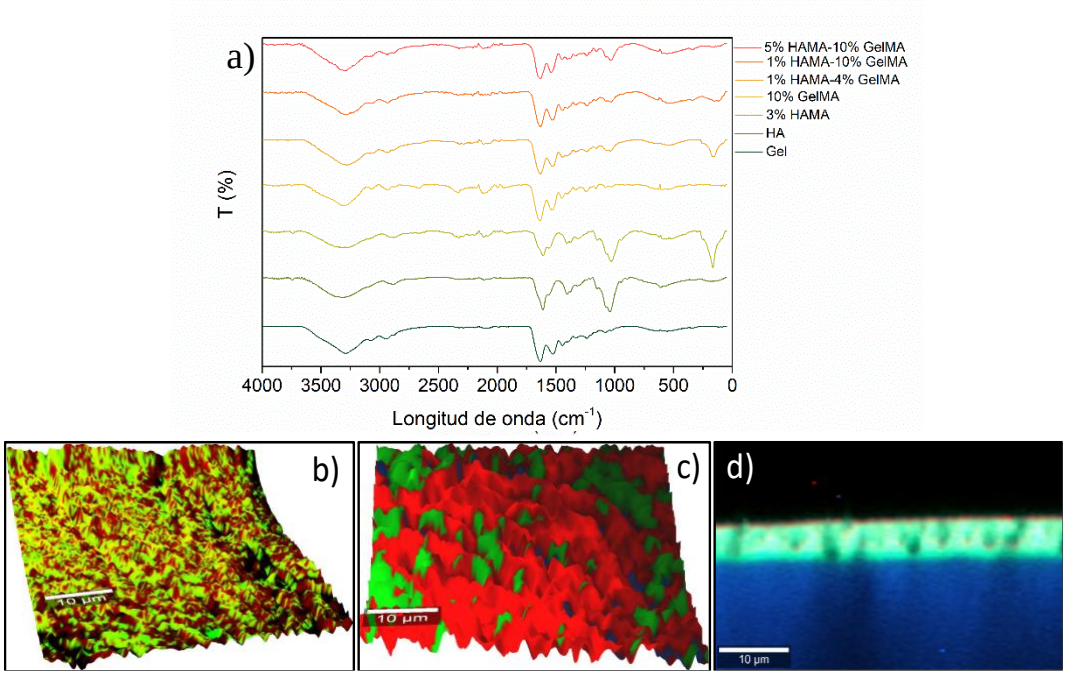


Figura 4.2.- a) Espectros FTIR de hidrogeles de HAMA puros, GelMA puros e híbridos de GelMA-HAMA a diferentes concentraciones. Composición topográfica superficial obtenida por imagen Raman confocal 3D de hidrogeles híbridos b) 2% GelMA(verde) -1%HAMA (rojo) y c) 10% GelMA(rojo)-1% HAMA (verde). HAMA se detectó usando bandas a ~1380 y 1410 cm^{-1} mientras que para GelMA se utilizó a ~1455 cm^{-1}. d) Imágenes Raman en profundidad de hidrogeles 2% GelMA-1%HAMA. El color brillante azul-verde indica la mezcla perfecta de HAMA y GelMA en el hidrogel.

software del instrumento, también corrobora la perfecta mezcla de ambos componentes dentro del hidrogel al menos a lo largo de la sección que el microscopio confocal es capaz de analizar.

4.3 Caracterización térmica

Los resultados de las medidas de TGA de los hidrogeles formados por GelMA y HAMA puros, y GelMA-HAMA híbridos se muestran en la Figura 4.3 a-d. Las imágenes muestran que el proceso de pérdida de peso tiene lugar en tres etapas principales: la primera asignada a la pérdida de moléculas de agua residuales de la muestra que tiene lugar en el rango de temperaturas de 40-150ºC donde la pérdida de peso es ~12% para los hidrogeles puros de HA y HAMA a cada concentración. En el caso de los hidrogeles puros de Gel y GelMA, se observa una dependencia con la concentración, es decir, a medida que la concentración de proteína aumenta, se libera menos cantidad de agua y por lo tanto el peso perdido disminuye de 11% a 5% para la Gel pura no entrecruzada y hasta el 10% para la GelMA. Es importante destacar que los polisacáridos y las proteínas tienen una importante afinidad para las disoluciones acuosas y, dependiendo de sus estructuras y composiciones, se pueden establecer diferentes interacciones entre las moléculas de agua y las cadenas polisacáridas/péptidas. Existen hasta tres tipos diferentes de moléculas de agua unidas: moléculas libres de agua liberadas a 40-60ºC, moléculas de agua unidas a través de enlaces de hidrógeno liberadas a 80-120ºC, e, incluso, moléculas de agua más fuertemente unida a través de interacciones polares a grupos carboxilos que pueden liberarse desde 160ºC[18].

El segundo paso tiene lugar entre 250 y 400ºC para la Gel y la GelMA con pérdida de masa entre 57-63% y desde ~200 hasta 300ºC para el HA y desde 200 hasta 400ºC para el HAMA, con pérdidas de masa de 43% y 48%, respectivamente. Finalmente, el tercer paso de degradación se observa que ocurre entre 400 y 800ºC para la Gel y la GelMA con pérdida de masa en el rango de 9-12%, y entre 300-500ºC y 500-800ºC para HA y HAMA, respectivamente, con pérdida de peso alrededor del 25-30%.

La degradación térmica de los andamios de Gel puros empieza en torno a 250ºC con un máximo a 320ºC, T_{max}, mientras que para los puros de HA empieza a ~195ºC, con un máximo a ~226ºC y otro secundario a ~240ºC, respectivamente. Para hidrogeles puros de GelMA, la degradación comienza a 223ºC con una temperatura de máxima, T_{max}, a 312ºC

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

mientras que la degradación en los hidrogeles de HAMA comienza en el rango de 187-198ºC, con un primer máximo en torno a 224-235ºC y otro secundario a 250-261ºC que aumenta a medida que aumenta la concentración de polímero (Figura 4.3d). La degradación de los andamios híbridos comienza a ~190ºC mostrando un comportamiento intermedio entre los andamios puros de HAMA y GelMA. En particular, los hidrogeles híbridos de composición 2% GelMA-5% HAMA muestran un comportamiento muy similar al de los de HAMA puros como consecuencia de tener la mayor proporción de HAMA de todos los andamios híbridos analizados; en cambio, las mezclas de hidrogel con composición 10% GelMA-1% HAMA presentan un patrón de degradación similar al de los andamios de GelMA puros. En general, hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA muestran los dos picos distintivos principales pertenecientes tanto al HAMA como a la GelMA a ~223 y 324ºC, respectivamente, y la intensidad de cada pico es proporcional al contenido de HAMA y GelMA en el andamio híbrido. Además, en los hidrogeles híbridos, T_{max} se desplaza ligeramente a temperaturas superiores cuando se incrementa la concentración de GelMA, indicando de este modo una mayor estabilidad de los andamios.

Sorprendentemente, los hidrogeles puros de HA se degradan mucho más rápido, con un grado de degradabilidad del ~87% a 500ºC, mientras que los de HAMA está en torno al 64 %, probablemente como consecuencia de la fotopolimerización. Esta diferencia no se observa entre hidrogeles puros de Gel y GelMA, con grados de degradabilidad alcanzando entre 67-70% a 500ºC. A 800ºC tanto los hidrogeles puros de HAMA como los de HA se degradan hasta un 90-95% mientras que los de Gel y GelMA puros se sitúan en torno al 80% a esa temperatura. Finalmente, los andamios híbridos de GelMA-HAMA presentan grados de degradabilidad similares a aquellos observados en los hidrogeles de GelMA puros, pero los primeros parecen ser más estables con grados de degradabilidad de entre 64-71% a 500ºC y entre 74-85% a 800ºC, respectivamente.

Por otro lado, los datos de DSC (Figuras 4.3e-f) están en concordancia con los experimentos de TGA/DTG. Los termogramas muestran un pico ancho endotérmico centrado en ~71ºC y un pico exotérmico a 231ºC para los andamios de HA, los cuales están desplazados a 82ºC y 218ºC para los puros de HAMA, respectivamente. Las matrices puras de Gel muestran dos picos endotérmicos a ~74ºC y 281ºC, con una temperatura de transición vítrea (T_g) a 227ºC. Estas temperaturas están desplazadas a 70, 297 y 202ºC, respectivamente, para los hidrogeles de GelMA. El primer pico endotérmico está relacionado con la evaporación de residuos de agua unidos a HA, Gel, GelMA o

USC DE COMPOSTELA

HAMA. El pico exotérmico del HA y el HAMA se atribuye a la descomposición de las cadenas de HA y el pico endotérmico a ~280-300ºC en Gel/GelMA se atribuye a la desintegración de las cadenas laterales intermoleculares de la proteína. En el caso de los andamios híbridos de GelMA-HAMA, el comportamiento térmico es la combinación de los observados para el HAMA y GelMA puros. El primer pico endotérmico se observa entre 66 y 95ºC y los picos exotérmicos principal y secundario desplazados a 233ºC y 261-271ºC corresponden al contenido de HAMA. Además, la T_g de la gelatina se

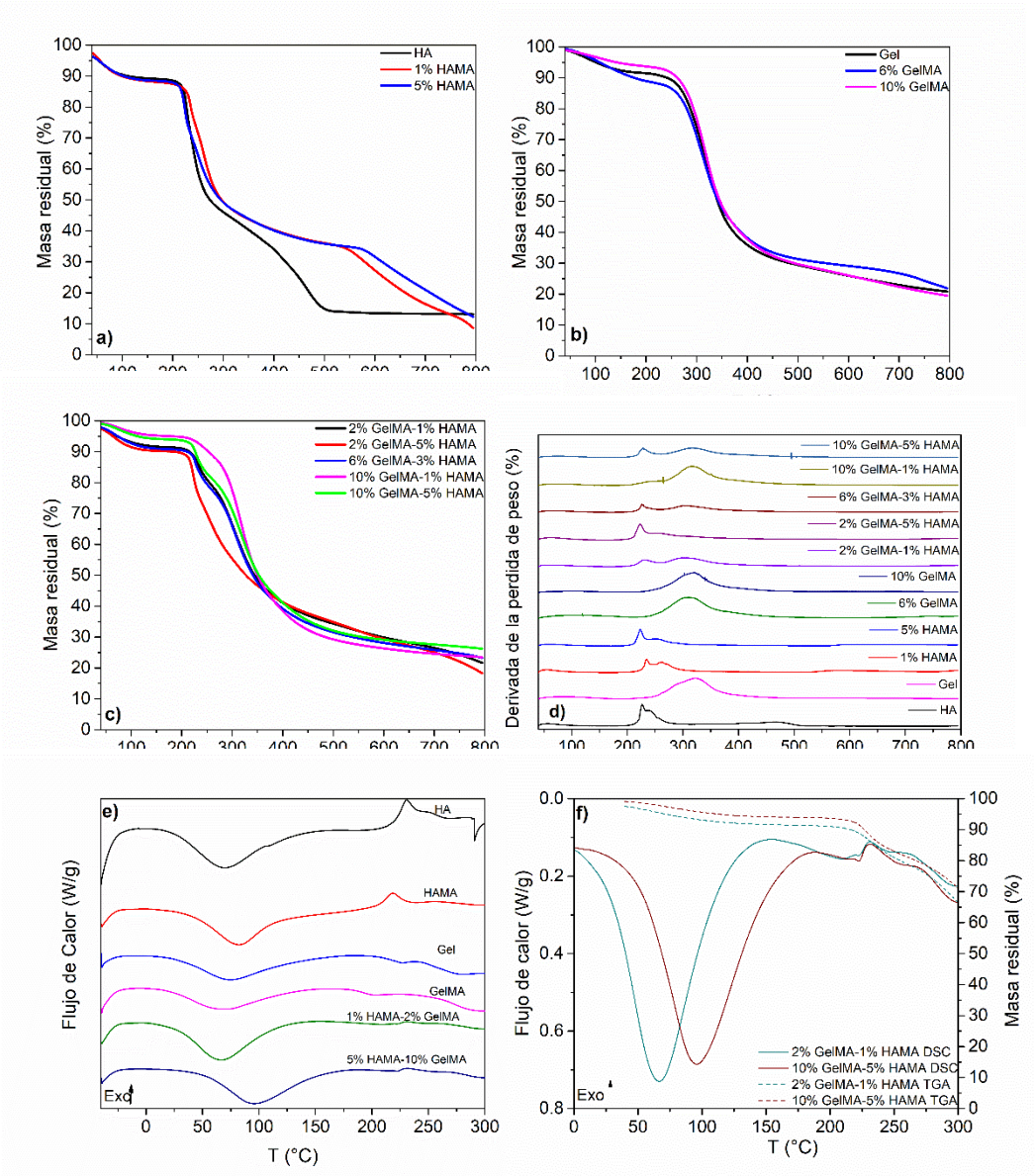


Figura 4.3.- Medidas de TGA para a) hidrogeles puros de HA y HAMA b) hidrogeles puros de Gel y GelMA y c) hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA a diferentes concentraciones como ejemplo; d) primera derivada de los datos de TGA para distintos hidrogeles puros e híbridos; e) ejemplos de curvas de DSC correspondientes a Gel puro, HA puro, GelMA puro, HAMA puro y algunos hidrogeles híbridos GelMA-HAMA; f) representación de los datos de TGA y DSC de hidrogeles híbridos 2% GelMA-1% HAMA y 10% GelMA-5% HAMA para su comparación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

encuentra en torno a ~210-212ºC, mientras que no se observa el pico endotérmico secundario correspondiente al desplazamiento de la proteína por encima de 300ºC.

4.4 Propiedades reológicas de los andamios

La Figura 4.4 muestra el módulo elástico (*G´*) en función de la deformación para hidrogeles puros de GelMA y HAMA, así como hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA a 37ºC. Para hidrogeles 10% GelMA, la zona lineal viscoelástica (LVR) se extiende para valores de deformación de ~10% mientras que para el hidrogel de 5% HAMA, la LVR se detecta a deformaciones de ~1%. De forma similar, el límite de la zona lineal viscoelástica de los hidrogeles 10% GelMA-5%HAMA aparece a deformaciones $\gamma < 0.5\%$; a valores comprendidos entre 0.5 y 80%, *G´* presenta una disminución escalonada en torno al 0.5% para después pasar a disminuir gradualmente. Esta disminución es consecuencia de una degradación gradual de la estructura del gel a medida que aumenta la deformación aplicada[19].

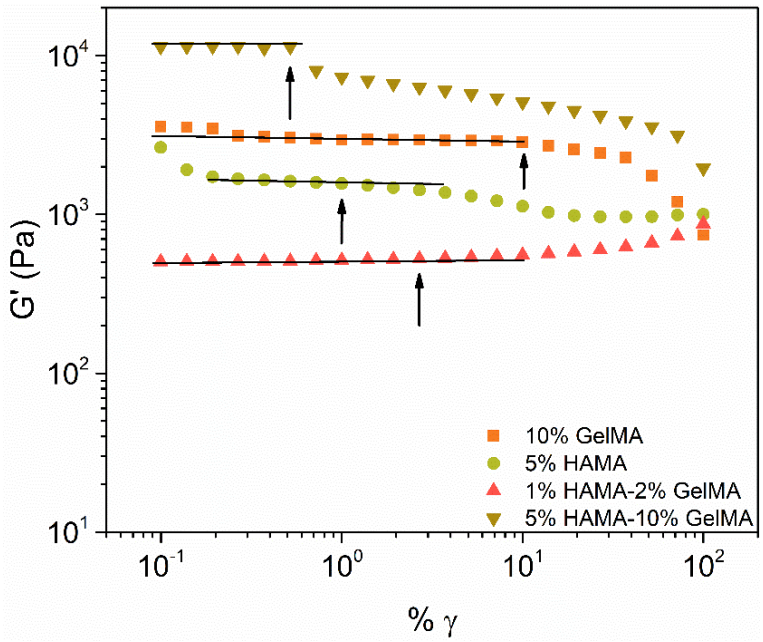


Figura 4.4.- Módulo elástico (G') en función del % de deformación (%c) para hidrogeles puros de GelMA y HAMA e hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA.

Para valores de deformación superiores al 80%, *G´* decrece abruptamente, indicando el colapso de la estructura. Además, el hidrogel híbrido 10% GelMA-5% HAMA es más duro en la LVR que los hidrogeles puros de 5% HAMA y 10% GelMA, ya que el módulo elástico de los hidrogeles es 3X (1576) y 6X (3024) veces mayor para los hidrogeles puros HAMA y GelMA, respectivamente. Esto se puede explicar debido al incremento en la

densidad de entrecruzamiento en el hidrogel híbrido; sin embargo, la reducción de la LVR indica que estos hidrogeles se rompen más fácilmente que los de HAMA y GelMA.

El límite de la LVR de los hidrogeles 2% GelMA-1%HAMA se incrementa a valores de deformación alrededor del 3%, mientras que el módulo elástico en la LVR es inferior en más de un orden de magnitud, mostrando una densidad más baja de entrecruzamiento. Interesante es el hecho de que hidrogeles 2%GelMA-1%HAMA muestran un endurecimiento con deformaciones superiores al 3%, que es poco común en sistemas poliméricos sintéticos, pero que se ha reportado en hidrogeles biológicos blandos[20]. Este comportamiento también se detectó en coágulos de fibrina para amplitudes de deformación por encima del 10% p/v y se asocia a la formación de redes constituidas por proteínas muy alargadas con tamaños de malla del orden de micrones[21].

La cinética de foto-polimerización de todas las muestras de hidrogel se estudió con experimentos de barrido de tiempo oscilatorio como se muestra en la Figura 4.5. A bajos tiempos de reacción, tanto para los sistemas de GelMA como para los de HAMA, el módulo de pérdida (G'') es mayor que el módulo de almacenamiento (G') como resultado del estado de disolución de los hidrogeles (estado sol). Ambos módulos presentan una zona plana de transición hasta un valor de tiempo en el que G' se incrementa de forma abrupta[22]. Este escalón representa la transición del estado de disolución (estado sol) al estado viscoelástico sólido (estado gel), y donde el inicio de este aumento se le conoce como el tiempo de gelificación (t_{gel}).

El t_{gel} disminuye a medida que aumenta la concentración de polímero, como se esperaba, para los hidrogeles puros. Para los hidrogeles híbridos de HAMA-GelMA, los valores de t_{gel} se sitúa entre 0.7-1 min, excepto para 1%HAMA-2%GelMA, que presentan valores similares de t_{gel} respecto a sus contrapartes (1.69 min). La lista completa de valores de t_{gel} se muestra en la Tabla4.2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4.2.- Tiempo de gelificación (t_{gel}) para hidrogeles puros de HAMA, GelMA e hidrogeles híbridos HAMA-GelMA obtenidos desde el inicio del proceso de gelificación.

Muestra	Concentración (%)	t_{gel} (min)
HAMA	1	1.92
	3	1
	5	0.88
GelMA	2	0.94
	6	0.52
	10	0.35
1% HAMA-X% GelMA	2	1.69
	6	0.93
	10	1
5% HAMA-X% GelMA	2	0.91
	6	0.86
	10	0.77

La Figura 4.5 también muestra los valores de *G´* obtenidos en los experimentos de tiempo de barrido para los hidrogeles de HAMA (Figura 4.5a), GelMA (Figura 4.5b) e hidrogeles híbridos HAMA-GelMA con 1%HAMA-2, 6 y 10% GelMA (Figura 4.5c) y 5% HAMA-2,6 y 10% GelMA (Figura 4.5d).

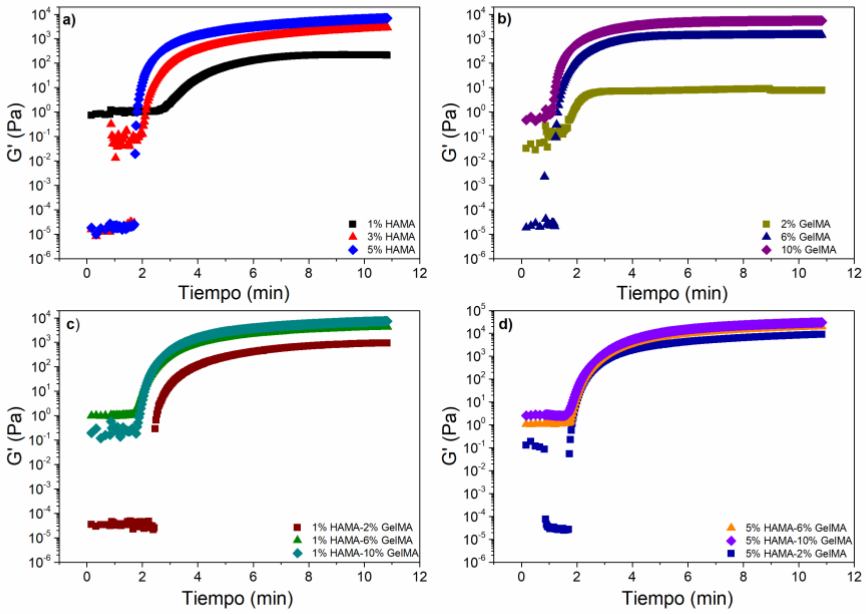


Figura 4.5.- Módulo elástico (G') en función del tiempo de reticulacion para diferentes concentraciones de: a) HAMA; b) GelMA; c) 1%HAMA-X% GelMA y d) 5% HAMA-X% GelMA.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las curvas para todos los sistemas presentan incrementos marcados y rápidos en el módulo *G´* seguido de una zona constante. Los valores de *G´* para los hidrogeles de HAMA después de 10 min de fotoirradiacion fueron muy similares a los obtenidos para los de GelMA, pero usando la mitad de concentración, es decir, 1% HAMA (217Pa), 3% HAMA (2574 Pa) y 5% HAMA (6366 Pa) para los hidrogeles de HAMA, mientras que para los de GelMA las proporciones fueron 2% GelMA (7Pa), 6% GelMA (1382 Pa) y 10% GelMA (5446 Pa). Los hidrogeles híbridos con 5%HAMA(-2% GelMA, 8255 Pa; -6% GelMA, 18417 Pa; -10% GelMA, 28140 Pa;) muestran valores de *G´* al menos un orden de magnitud mayor que los hidrogeles puros de HAMA y GelMA y los hidrogeles híbridos de contenido 1% HAMA (-2% GelMA, 886 Pa; -6% GelMA, 4043 Pa; -10% GelMA, 6868 Pa;), como cabría esperar debido a la mayor densidad de entrecruzamiento.

La Figura 4.6 representa el módulo elástico (*G´*) en función de la frecuencia para diferentes concentraciones de HAMA (Figura 4.6a) y de GelMA (Figura 4.6b). Para los hidrogeles puros de 1% HAMA y 2% GelMA, *G´* es casi independiente de la frecuencia, excepto para valores superiores a 20 rad/s. Para el hidrogel 1% HAMA (Figura 4.6a símbolos en negro), las barras de error se omitieron para los últimos valores debido a la elevada variación que se observó para esas frecuencias. El comportamiento de los hidrogeles de HAMA y GelMA es similar al observado en geles débiles de cristales líquidos lamelares formados por surfactantes iónicos de doble cola como, por ejemplo, aeorosoles OT/agua o el bromuro de didodecil dimetilamonio (DDAB)[23,24]. Sin embargo, para el resto de hidrogeles probados, *G´* muestra el comportamiento de un gel real con valores independientes de la frecuencia.

Para las muestras 1% HAMA-2% GelMA y 1% HAMA-6% GelMA (Figura 4.6c), el módulo elástico presenta un comportamiento similar al de un gel real; sin embargo, los hidrogeles 1% HAMA-2% GelMA presentan una pequeña dependencia de *G´* a altas frecuencias (>40 rad/s). El módulo elástico es mucho mayor (795 Pa) que para los obtenidos para 2% GelMA (10 Pa) y 1 % HAMA (174 Pa), que puede ser debido al aumento de la densidad de entrecruzamiento. Este efecto también se observa en los hidrogeles híbridos 1% HAMA-6% GelMA (4606 Pa) y 1% HAMA-10 %GelMA (7643 Pa) con valores mayores que el 6% GelMA (1306 Pa) y 10 % GelMA (5355 Pa).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

A frecuencias superiores a 6.28 rad/s, el módulo *G´* de los hidrogeles 5% HAMA-2% GelMA, 5% HAMA-6% GelMA y 5% HAMA-10% GelMA (Figura 4.6d) disminuye y

se vuelve independiente de la frecuencia aplicada. En comparación, los hidrogeles híbridos más pequeños (5% HAMA-2% GelMA) tiene valores de *G´* mayores (9358 Pa) que los del 1% HAMA-10% GelMA (7643 Pa), los cuales tienen un mayor peso de materiales añadidos (7% vs 11%) y el mayor valor de *G´* comparado con los hidrogeles 5% HAMA (6574 Pa) y 2% GelMa (10 Pa).

La variación en la representación log-log de los módulos elástico y viscoso en función de las concentraciones de HAMA y GelMA puros a la frecuencia de 6.28 rad/s, se muestra en la Figura 4.7. El módulo *G´* aumenta desde $2x10^2$ hasta $6x10^3$ Pa y $1x10^1$ hasta $5x10^3$ Pa para los hidrogeles de HAMA y GelMA, respectivamente.

En este rango de dureza, los hidrogeles se pueden usar como andamios para tejido cerebral, nervios, hígado, músculos de relajación y tejido de mama[25]. Para los hidrogeles de HAMA, el módulo viscoso (*G´´*) aumenta a velocidades similares que el módulo elástico (*G´*). Esta velocidad similar de incremento produce geles más duros y fuertes, lo que queda demostrado con los bajos valores del factor de pérdida (*tan δ*)[26]. Por el contrario, para los hidrogeles GelMA, el módulo *G´* muestra una tendencia similar a la que se observa en los hidrogeles HAMA; sin embargo, para obtener esos valores similares

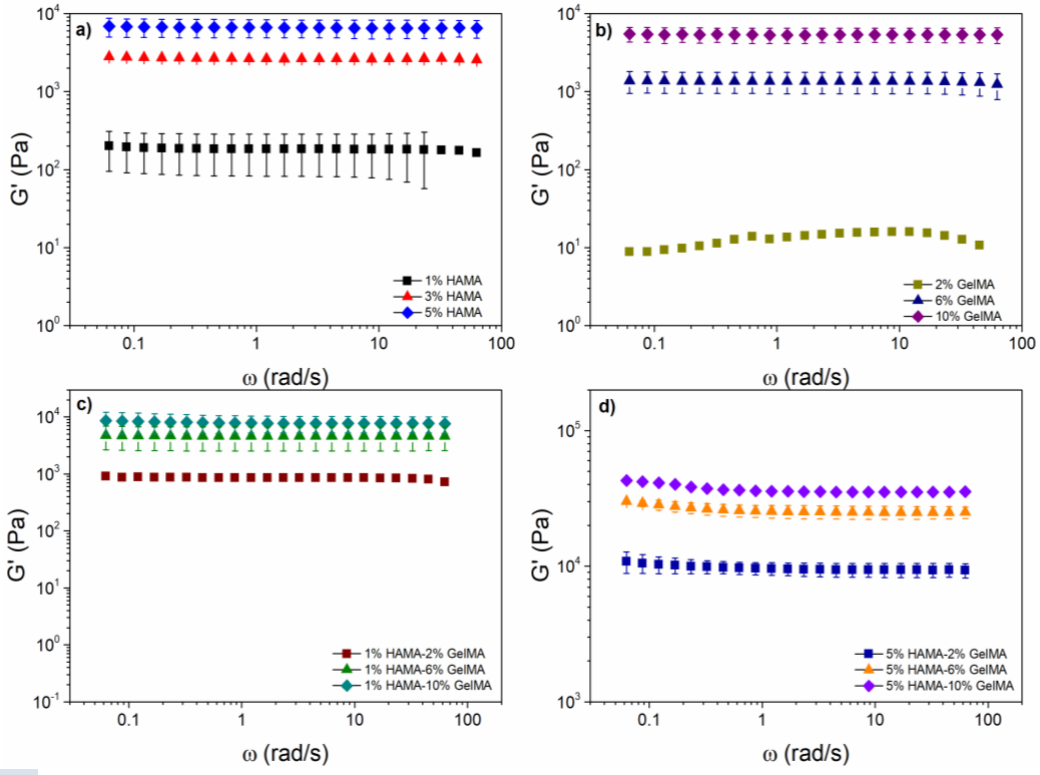


Figura 4.6.- Módulo elástico en función de la frecuencia a) concentración de HAMA; b) concentración de GelMA; c) 1%HAMA-X% GelMA y d) 5% HAMA-X% GelMA. Experimentos realizados a una deformación dentro de la LVR a 37ºC.

de *G´* se necesitan concentraciones más elevadas de GelMA. Además, los valores del módulo elástico aumentan a diferente velocidad que los del módulo viscoso, el factor de pérdida (*tan δ*). El relativo incremento de *G´* sobre *G´´* provoca que los geles se vuelvan más duros y rígidos. Sin embargo, el máximo nivel de rigidez alcanzado por los hidrogeles de GelMA es similar a los de HAMA.

La Figura 4.7b,c representa los módulos *G'* y *G´´* para los hidrogeles híbridos HAMA-GelMA , concretamente 1% HAMA-2,6 y 10% GelMA y 5% HAMA-2,6 y 10% GelMA a 37ºC y 6.28 rad/s. Para el primer tipo de hidrogeles (conteniendo 1% HAMA) tanto *G´* como *G´´* aumentan con la concentración de GelMA con una velocidad de incremento similar, lo cual produce hidrogeles más duros con valores de fuerza similares. El módulo elástico tiene valores de $8x10^2$ a $9x10^3$ Pa, demostrando que estos hidrogeles pueden usarse como andamios para tejido hepático, músculo relajado, tejido mamario y de glándula[27]. Para el segundo tipo de hidrogeles híbridos (con 5% HAMA), ambos módulos *G´* y *G´´* muestran una velocidad de incremento similar a la de los hidrogeles 1% HAMA, con dos diferencias principales: *i)* la dureza se incrementa aproximadamente un orden de magnitud y la fuerza es menor con valores de *G´* desde $9x10^3$ a $2x10^4$ Pa; *ii)* estos

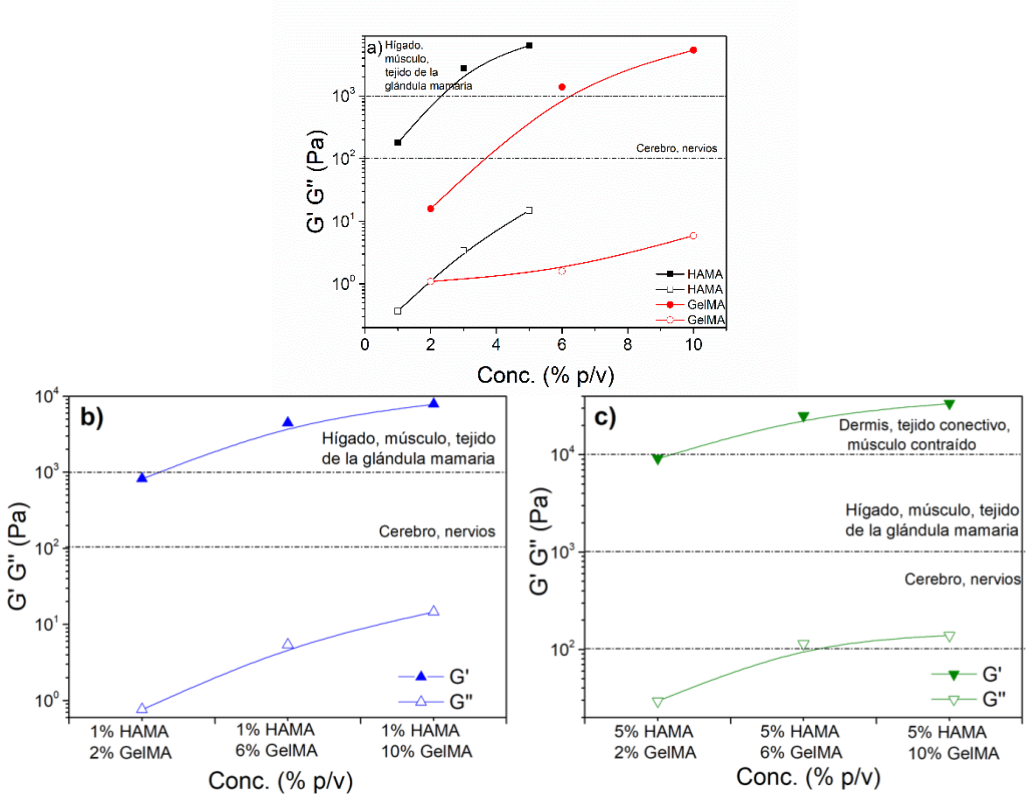


Figura 4.7.- Módulos de almacenamiento y pérdida en función de las concentraciones de HAMA y GelMA. a) HAMA y GelMA puros y b-c) hidrogeles híbridos a 37ºC a una frecuencia de 6.28 rad/s. Las líneas discontinuas representan los limites de los valores de G' para el uso del hidrogel como andamios para diferentes tipos de tejidos.

hidrogeles híbridos se pueden usar como andamios para regeneración de la dermis, tejidos conectivos y estudios de músculos contraídos. En conclusión, los hidrogeles sintetizados en este trabajo presentan valores de dureza que cubren un amplio rango, lo que les hace útiles para su uso como andamios en una gran variedad de tejidos[28,29].

Los datos obtenidos en las pruebas de compresión se muestran en la Figura 4.8. La pendiente general es lineal a bajas deformaciones (<15-20%) y después se incrementan con el aumento en la deformación. En general, los módulos (ie, pendiente de esfuerzo vs. curva de deformación a baja deformación) se correlacionan bien con las densidades de reticulación de la red y contenido total de polímero, siendo mayores cuando la presencia de HAMA en la composición es mayor. Sin embargo, los valores obtenidos no son altos en concordancia con hidrogeles con excepcionales capacidades de hinchamiento, capaces de incorporar grandes cantidades de agua en su interior.

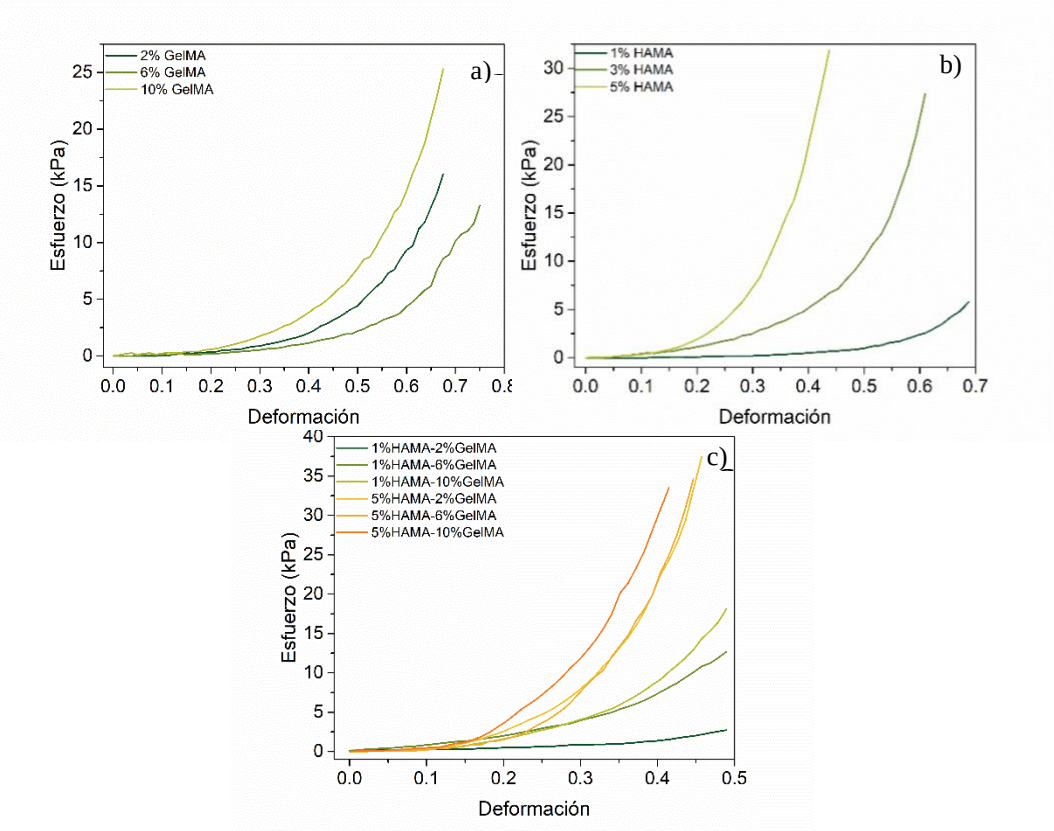


Figura 4.8.- Medidas de compresión de hidrogeles puros a) GelMA, b) HAMA y c) hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA de diferentes composiciones.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.5 Estructura y morfología de los andamios

La estructura interna y la morfología de los andamios juegan un papel crucial para su potencial uso en aplicaciones biomédicas, en particular en IT. Los andamios deberían poseer una estructura adecuada que permita la adhesión, propagación y proliferación celular, además de permitir el intercambio de nutrientes, oxígeno e incluso fármacos, si es necesario, a través de la matriz polimérica. La Figura 4.9 muestra las micrografías de FE-SEM de los hidrogeles puros de HAMA, GelMA e híbridos GelMA-HAMA a distintas concentraciones. Las imágenes de sección transversal de los hidrogeles de HAMA puros (Figura 4.9a-c) muestran una estructura de andamio no homogénea y desordenada con unas paredes aparentemente frágiles incluso a las concentraciones más elevadas de polímero (5 % p/v). La sección transversal de las micrografías muestra macroporos o huecos con tamaños entre 90 hasta 380 μm dependiendo de la concentración de polímero (asumiendo diámetros circulares). Los andamios puros de GelMA muestran una estructura de sección transversal más intacta y estable (Figura 4.9d-e), presentando un patrón de panal con poros más homogéneos de tamaño menor desde 40 hasta 250 μm. Para ambos tipos de andamios puros, la estructura de hidrogel está mejor definida y los tamaños de poro son más pequeños a medida que aumenta la concentración total de monómero de hidrogel. Este comportamiento puede ser consecuencia de que los hidrogeles con menor contenido polimérico pueden contener más cantidad de agua en su interior, formando cristales de hielo más grandes durante la congelación, dando lugar a tamaños de poros más grandes después de la liofilización. Esta apreciación está en consonancia con las significativas diferencias que se observan en la habilidad de hinchamiento de los hidrogeles, la cual también disminuye a medida que la concentración total de polímero aumenta, ie, la porosidad se puede modificar cambiando la concentración polimérica así como la composición del hidrogel[30].

Los hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA muestran unas señales estructurales y tamaños de poros comprendidas entre las de los andamios puros de HAMA y GelMA. Las bajas concentraciones de HAMA en los hidrogeles híbridos (1% p/v) aumenta ligeramente el tamaño de poro, respecto a los de GelMA puro. Esto podría sugerir que las cadenas de HAMA se entremezclan con las de GelMA para formar matrices híbridas capaces de absorber más agua y, como resultado, el tamaño de los cristales de hielo se expande durante la congelación dando lugar a huecos más grandes. Sin embargo, a

concentraciones mayores de HAMA, la tendencia que se observa es opuesta como resultado de del contenido polimérico de hidrogel sustancialmente mayor (Figura 4.9f-i). Un incremento en el porcentaje de peso de HAMA en los hidrogeles híbridos también da lugar a paredes más rugosas de los huecos, convirtiéndose en una estructura de andamio más similar a la de los HAMA puros.

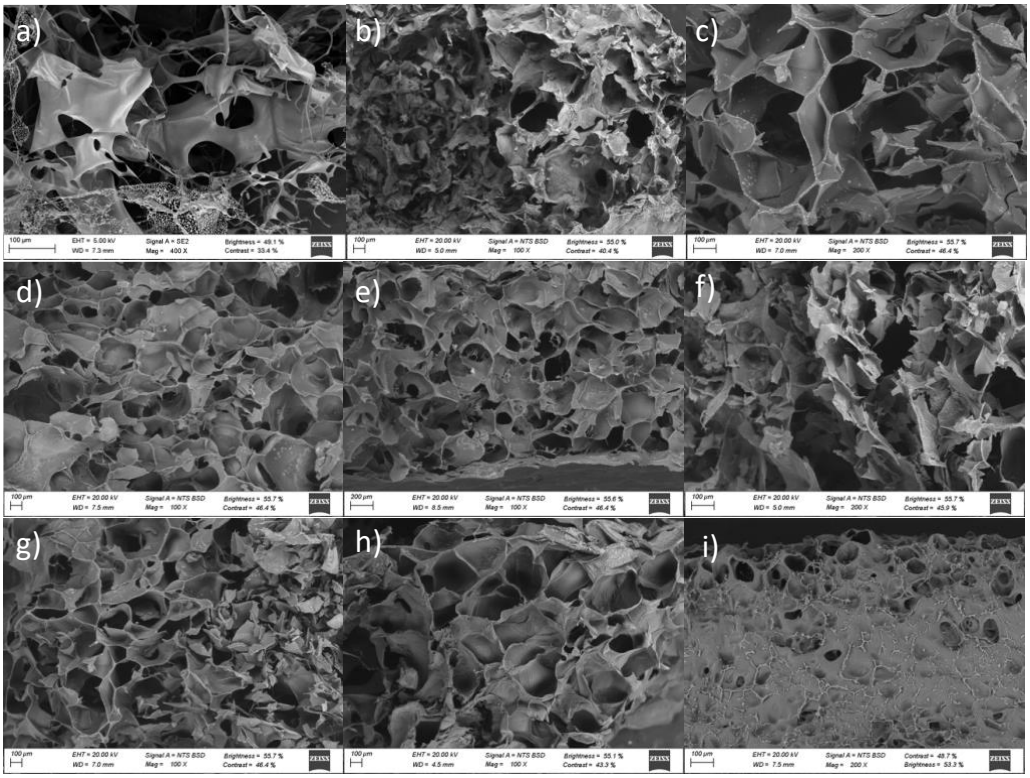


Figura 4.9.- Micrografías de SEM de a) 1%, b) 3%, c) y 5% HAMA; d) 2% y e) 10% GelMA; f) 1% HAMA-2% GelMA, g) 5% HAMA-2% GelMA, h) 1% HAMA-10% GelMA, y i) 5% HAMA-10% GelMA.

Este comportamiento puede ser consecuencia del bajo GM de los hidrogeles de HAMA comparados con los de GelMA lo que impacta fuertemente en las propiedades finales del hidrogel. Los valores más elevados del GM se han correlacionado con poros más homogéneos y pequeños dentro de la matriz polimérica, mientras se mejora la rigidez general del hidrogel como se confirma por reología. Las imágenes de SEM de los hidrogeles híbridos también confirman este punto, es decir, la estructura de los andamios híbridos está bien protegida y el tamaño de los poros disminuye a medida que la concentración de GelMA en el andamio híbrido aumenta (Figura 4.9f-i) en el rango, por ejemplo, de ~75-210 μm hasta 40-140 μm para los andamios híbridos 1%HAMA-2%GelMA y 1%HAMA-10%GelMA, respectivamente. Además, la distribución del tamaño de los macroporos es susceptible de favorecer la vascularización a través de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

macroporos más pequeños y la colonización celular y el crecimiento tisular a través de los grandes[31], además de favorecer la prevención de la formación rápida de tejido en el área externa de los andamios que pueda impedir el acceso de las células y los nutrientes hacia el interior y con ello impedir o dificultar la proliferación celular y estructuración en el interior de los andamios[32].

Las micrografías de SEM se complementaron con datos de porosimetría por inmersión de mercurio (MIP) con el fin de tener un conocimiento más profundo acerca de la estructura de los poros de los andamios. Todos los andamios tienen, en general, buena interconexión de poros siempre que la porosidad proporcionada por los datos de MIP sean porosidades abiertas (ε_{MIP}). En particular, se observa una porosidad relativamente alta para los hidrogeles puros de HAMA y GelMA, con un tamaño medio de poro más pequeño que el obtenido por medidas de SEM (Tabla 4.1). Para hidrogeles híbridos GelMA-HAMA, se observa que la porosidad y el tamaño de los poros disminuye a medida que aumenta el contenido de GelMA de los andamios desde 2 hasta 10% p/v, es decir, la fracción de volumen ocupada por el material polimérico en si mismo aumenta a medida que lo hace el contenido de proteína, de acuerdo con los datos de densidad (Tabla 4.1) y las imágenes de SEM. Es importante también mencionar, que la mayoría de las composiciones de hidrogeles híbridos estudiados presentan una porosidad por encima del 70%, lo que parece ser ideal para su potencial uso en IT ya que esto debería permitir una correcta permeación de nutrientes[33] y desechos de células[34]. A este respecto, la IT necesita andamios con estructura porosa adecuada, generalmente una porosidad en el rango de 60-80% y con poros interconectados de tamaños de 75 μm y mayores para facilitar la colonización y crecimiento celular[35]. Por otro lado, las diferencias en los tamaños entre los datos de SEM y MIP pueden deberse a las limitaciones de esta última técnica relacionadas con la conectividad y la disposición espacial de los poros (ie, poros grandes rodeados de poros pequeños solo se rellenan de mercurio a la presión a la que lo hacen los pequeños) y las suposiciones hechas al calcular el tamaño de los poros[36].

4.6 Grado de hinchamiento

La capacidad de estos andamios para retener agua es otro parámetro esencial de las redes polimérica. Esta capacidad de los hidrogeles para hincharse depende del tamaño de poro, de la densidad de reticulación y de las interacciones polímero-polímero y polímero-disolvente y es de importancia clave para su uso en el suministro de fármacos para la

cicatrización de heridas y, por supuesto, para aplicaciones en IT ya que caracteriza su capacidad para absorber fluidos corporales y regular la transferencia de nutrientes y metabolitos celulares[37].

La Figura 4.10 presenta el tiempo de evolución del hinchamiento del hidrogel para diferentes andamios tanto puros como híbridos de GelMA-HAMA. La velocidad de hinchamiento es muy rápida durante los primeros 30-90 minutos (dependiendo de la composición y concentración del hidrogel) seguido por una fase más sostenida que se vuelve estacionaria a ~10 h para los hidrogeles puros de HAMA y para lo hidrogeles puros e híbridos que contengan 10% GelMA y en torno a 25 h para el resto de composiciones. Observamos que el grado de hinchamiento (GH) disminuye a media que la concentración total de polímero aumenta, en el rango de 2400 a 6700% y 470 a 1480% para hidrogeles HAMA puros y GelMA puros, respectivamente, como consecuencia del mayor GM del último tipo de hidrogel. La capacidad de absorción de agua se atribuye tanto a los restos hidrofílicos que presentan las cadenas de HA y Gel como a la propia estructura de los andamios de hidrogel, mientras que la resistencia a la disolución existente se origina en la reticulación de las cadenas poliméricas. La hidrofobicidad debería disminuir cuando los polímeros y las proteínas se entrecruzan porque los grupos hidrofílicos (OH, NH_2 y COOH) se consumen a través del proceso de reticulación.

En el caso de los andamios híbridos de HAMA-GelMA, los valores del GH se encuentran entre los hidrogeles puros HAMA y GelMA y se hace más pequeña a medida que la concentración de GelMA en la composición del andamio aumenta. Esto puede estar relacionado con la disminución en la porosidad del hidrogel, así como en el aumento de la densidad de entrecruzamiento que, a su vez, disminuye la flexibilidad y capacidad de expansión del hidrogel[2,38]. Además, la tasa de absorción del disolvente aumenta a medida que lo hace la razón HAMA-GelMA. Por ejemplo, hidrogeles con 5% p/v HAMA presentan una disminución en el grado de hinchamiento desde ~2820 a 1350% en el equilibrio a medida que la concentración de GelMA aumenta de 2 a 10%. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los valores del GH presentados pueden ser inferiores a los obtenidos cuando se usa agua como disolvente, debido a que la relativamente alta fuerza iónica del PBS puede facilitar la formación de enlaces fuertes de hidrógeno dentro de la matriz de hidrogel, lo que impide una mayor absorción del disolvente[16].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

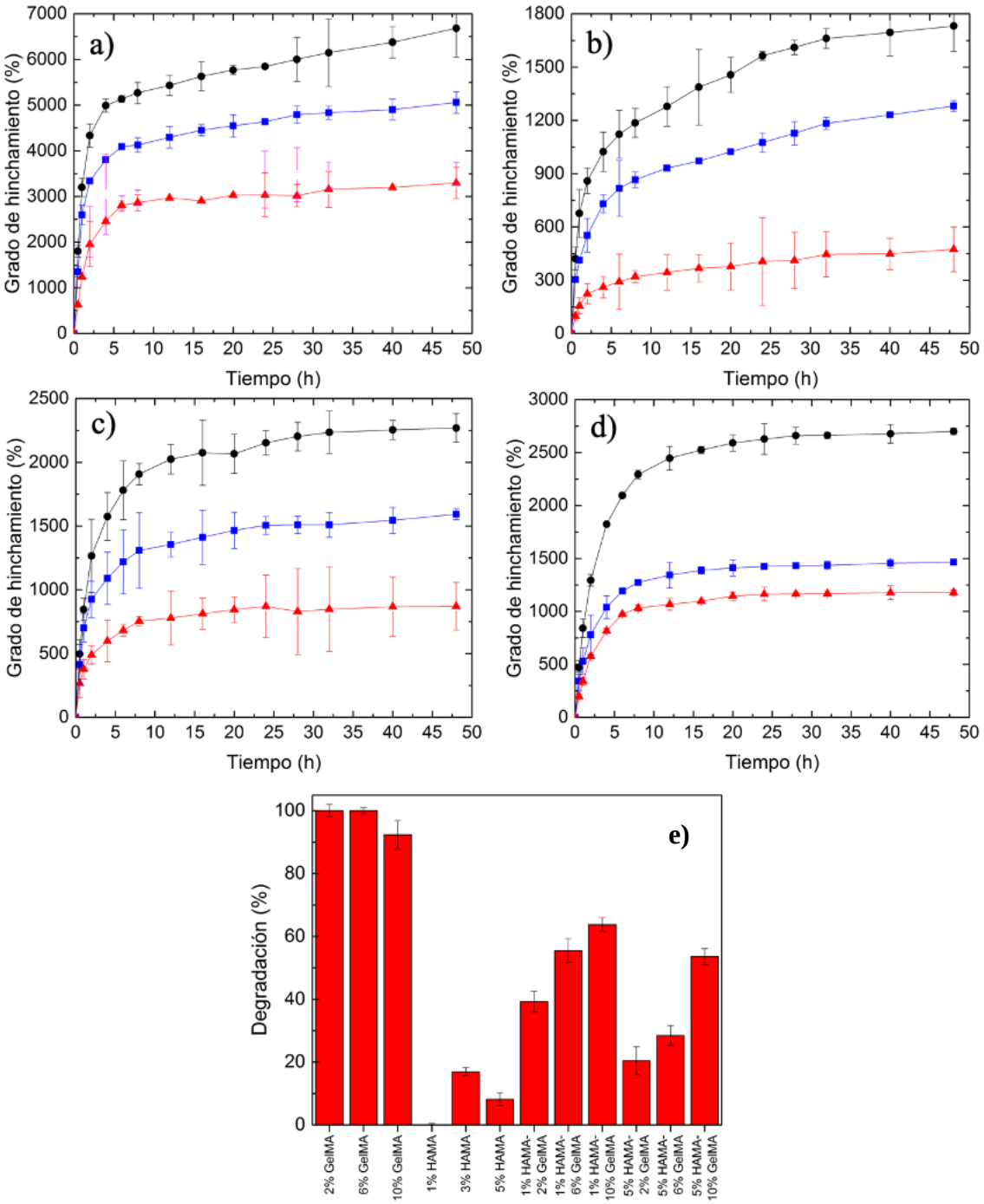


Figura 4.10.- Datos de cinética de hinchamiento para a) hidrogeles puros HAMA de (●) 1, (■) 3, y (▲) 5%; b) hidrogeles puros de GelMA de (●) 2, (■) 6, y (▲) 10%; hidrogeles híbridos HAMA-GelMA de c) (●) 1-2, (■) 3-2, y (▲) 5-2%; y d) (●) 5-2, (■) 5-6, y (▲) 5-10%, respectivamente. e) Degradación de andamios por ataque enzimático a las 24h de incubación.

Por otro lado, los datos cinéticos experimentales se ajustan con la ecuación 2.8 que describe perfectamente el comportamiento de hinchamiento. Los datos de ajuste se presentan en la Tabla 4.3. *k* está directamente relacionada con la velocidad de absorción del disolvente dentro de la matriz de hidrogel y sigue la secuencia de los andamios GelMA

puro<HAMA-GelMA híbrido<HAMA puro, en consonancia con los datos estructurales previos. La presencia del HAMA en los andamios híbridos, incluso a bajas concentraciones, aumenta de forma importante los valores de *k* respecto a los de GelMA puros[17]. Por otro lado, los valores *n* son inferiores a 0.5 lo que está de acuerdo con un modo de difusión de Fickian del disolvente, es decir, su velocidad de difusión dentro de los poros es menor que la relajación de las cadenas poliméricas[18,19]. Nuestros datos confirman que los mayores valores del GH corresponden con andamios con menor contenido en polímero y alta porosidad de acuerdo con las imágenes de SEM y los datos de porosidad, ofreciendo más espacio para el almacenaje de agua[39]. Si el agua/disolución tampón se absorbiera en las paredes del hidrogel, los andamios con mayor concentración polimérica deberían tener la mayor capacidad de adsorción en contraste con lo aquí expuesto.

Tabla 4.3.- Datos de ajuste cinético de hinchamiento de andamios puros e híbridos de acuerdo con la Ecuación (2.8).

Muestra	k	n
1% HAMA	0.80 ± 0.09	0.22 ± 0.07
3% HAMA	0.74 ± 0.06	0.23 ± 0.05
5% HAMA	0.72 ± 0.03	0.29 ± 0.02
2% GelMA	0.70 ± 0.07	0.28 ± 0.05
6% GelMA	0.65 ± 0.05	0.30 ± 0.04
10% GelMA	0.51 ± 0.01	0.31 ± 0.01
2% GelMA-1% HAMA	0.69 ± 0.11	0.29 ± 0.08
2% GelMA-5% HAMA	0.62 ± 0.07	0.35 ± 0.06
6% GelMA-1% HAMA	0.70 ± 0.10	0.25 ± 0.08
6% GelMA-5% HAMA	0.66 ± 0.04	0.29 ± 0.05
10% GelMA-1% HAMA	0.77 ± 0.08	0.25 ± 0.09
10% GelMA-5% HAMA	0.67 ± 0.02	0.35 ± 0.02

4.7 Biodegradación *in vitro*

Para evaluar la biodegradabilidad de los andamios de hidrogel sintetizados, se sumergieron en disolución tampón de PBS conteniendo la enzima colagenasa, que está presente en entorno fisiológico de cuerpo humano y tiene la habilidad de degradar colágeno/Gel. Andamios no entrecruzados de Gel y HA se disolvieron en también e una disolución de colagenasa. Independientemente de la enzima, los andamios con el mayor contenido de gelatina fueron los primeros en degradarse. La Figura 4.10e muestra la extensión de la degradación de los andamios poliméricos fotopolimerizados después de 24h en presencia del enzima; por el contrario, no se observaron signos de degradación

USC

por la erosión o disolución de la red en ausencia de colagenasa dentro del marco de tiempo de los experimentos.

Los andamios de GelMA puros se degradaron completamente después de 24h de incubación en presencia de la colagenasa. Esta rápida degradación puede ser motivada por la elevada actividad del enzima después de ser cambiada cada 4 h. Sin embargo, los hidrogeles de HAMA apenas se vieron afectados por la enzima como se esperaba. Los hidrogeles híbridos muestran un patrón de degradación en presencia de la colagenasa que es dependiente de la composición, es decir, a mayor concentración de GelMA, mayor pérdida de peso del andamio. También se observó que una mayor presencia de HAMA en la composición del andamio reduce la degradación enzimática. Este comportamiento se puede atribuir a la formación de enlaces covalentes fuertes entre el HAMA y la GelMA después de la fotopolimerización, haciendo que hidrogeles sean más difíciles de romper después de un ataque enzimático. Así, la presencia del HAMA parece mejorar la estabilidad de la red polimérica y el camino de degradación se puede controlar a través de la razón HAMA-GelMA con el fin de conseguir las condiciones necesarias para biomimetizar la MEC para una potencial aplicación en IT.

4.8 Conclusiones

Se prepararon andamios puros e híbridos HAMA-GelMA por fotopolimerización para producir materiales con estructura, porosidad y rigidez adecuada. Los andamios preparados fueron caracterizados estructural y físicamente por microscopía electrónica de barrido (SEM), porosimetría de intrusión de mercurio (MIP), reflectancia total atenuada por transformada de Fourier infrarroja, espectroscopía Raman, análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría de barrido diferencia (DSC), experimentos de reología y compresión. Por su parte, la estabilidad se evaluó a través del grado de hinchamiento y ensayos de degradación enzimática. Se observó que los andamios híbridos HAMA-GelMA tienen estructuras y porosidades comprendidas entre sus contrapartes puros, siendo más porosos pero más desorganizados aquellos hidrogeles con mayores grados de hinchamiento a valores fijos de la concentración de HAMA en la composición si se comparara con GelMA puros; por el contrario, la progresiva predominancia del GelMA en la composición de los andamios lleva a andamios más rígidos, más estructurados pero menos porosos, como también se observa cuando aumenta el contenido polimérico total del andamio. Además, la presencia del HAMA en los hidrogeles híbridos mejora la

USC DE COMPOSTELA

resistencia a la degradación de la colagenasa gracias a la formación de enlaces covalentes fuertes entre el HAMA y la GelMA después de la fotopolimerización, haciendo que los andamios sean más difíciles de romper después de un ataque enzimático en comparación con los hidrogeles puros de GelMA de composición similar. En resumen, los andamios presentan propiedades como porosidad ajustable, grado de hinchamiento y estabilidad que los hacen adecuados como biomateriales de soporte en diferentes aplicaciones de regeneración y reparación tisular.

4.9 Referencias

1. Vanderhooft, J. L., Alcoutlabi, M., Magda, J. J. & Prestwich, G. D. Rheological properties of cross-linked hyaluronan-gelatin hydrogels for tissue engineering. *Macromol. Biosci.* **9**, 20–28 (2009).

2. Dave, P. N. & Gor, A. Natural Polysaccharide-Based Hydrogels and Nanomaterials. in *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications* 36–66 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-813351-4.00003-1

3. Camci-Unal, G., Cuttica, D., Annabi, N., Demarchi, D. & Khademhosseini, A. Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **14**, 1085–1092 (2013).

4. Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J. Adv. Res.* (2015). doi:10.1016/j.jare.2013.07.006

5. Xiao, W. *et al.* Synthesis and characterization of cell-laden double-network hydrogels based on silk fibroin and methacrylated hyaluronic acid. *Eur. Polym. J.* **118**, 382–392 (2019).

6. Kamperman, T., Karperien, M., Le Gac, S. & Leijten, J. Single-Cell Microgels: Technology, Challenges, and Applications. *Trends Biotechnol.* **36**, 850–865 (2018).

7. Masters, K. S., Shah, D. N., Leinwand, L. A. & Anseth, K. S. Crosslinked hyaluronan scaffolds as a biologically active carrier for valvular interstitial cells. *Biomaterials* **26**, 2517–2525 (2005).

8. Kuo, Y. C. & Chen, Y. C. Regeneration of neurite-like cells from induced pluripotent stem cells in self-assembled hyaluronic acid-gelatin microhydrogel. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **67**, 74–87 (2016).

9. Bencherif, S. A. *et al.* Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials* **29**, 1739–1749 (2008).

10. Loessner, D. *et al.* Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nat. Protoc.* **11**, 727–746 (2016).

11. Levett, P. A. *et al.* A biomimetic extracellular matrix for cartilage tissue engineering centered on photocurable gelatin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *Acta Biomater.* **10**, 214–223 (2014).

12. Claaßen, C. *et al.* Quantification of Substitution of Gelatin Methacryloyl: Best Practice and Current Pitfalls. *Biomacromolecules* **19**, 42–52 (2018).

13. SMEDS, K. A., PFISTER-SERRES, A., HATCHELL, D. L. & GRINSTAFF, M. W. SYNTHESIS OF A NOVEL POLYSACCHARIDE HYDROGEL. *J. Macromol. Sci. Part A* **36**, 981–989 (1999).

14. de Oliveira, S. A. *et al.* Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. *Int. J. Biol. Macromol.* **97**, 642–653 (2017).

15. Farshi Azhar, F., Olad, A. & Mirmohseni, A. Development of novel hybrid nanocomposites based on natural biodegradable polymer-montmorillonite/polyaniline: Preparation and characterization. *Polym. Bull.* **71**, 1591–1610 (2014).

16. Pawlak, A. & Mucha, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochim. Acta* **396**, 153–166 (2003).

17. Smitha, B., Sridhar, S. & Khan, A. A. Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *Eur. Polym. J.* **41**, 1859–1866 (2005).

18. Pieróg, M., Gierszewska-Drużyńska, M. & Ostrowska-Czubenko, J. EFFECT OF IONIC CROSSLINKING AGENTS ON SWELLING BEHAVIOUR OF CHITOSAN HYDROGEL MEMBRANES. *Prog. Chem. Appl. Chitin Its* . **XIV**, 75–82 (2009).

19. Macosko, C. W. *Rheology : principles, measurements, and applications*. (VCH, 1994).

20. Cui, Y., Tan, M., Zhu, A. & Guo, M. Strain hardening and highly resilient hydrogels crosslinked by chain-extended reactive pseudo-polyrotaxane. *RSC Adv.* **4**, 56791–56797 (2014).

21. Shah, J. V. & Janmey, P. A. Strain hardening of fibrin gels and plasma clots. *Rheol. Acta* **36**, 262–268 (1997).

22. Magami, S. M. & Williams, R. L. Gelation studies on acrylic acid-based hydrogels via *in situ* photo-crosslinking and rheology. *J. Appl. Polym. Sci.* **135**, 46691 (2018).

23. Alcantara, M. R. & Vanin, J. Rheological properties of lyotropic liquid crystals. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **97**, 151–156 (1995).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

24. Soltero, J. F. A. *et al.* Rheological behavior in the didodecyldimethylammonium bromide/water system. *Colloid Polym. Sci.* **278**, 37–47 (2000).

25. Liao, H., Zhang, H. & Chen, W. Differential physical, rheological, and biological properties of rapid in situ gelable hydrogels composed of oxidized alginate and gelatin derived from marine or porcine sources. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **20**, 1263–1271 (2009).

26. Hassan, N., Soltero, A., Pozzo, D., Messina, P. V. & Ruso, J. M. Bioinspired templates for the synthesis of silica nanostructures. *Soft Matter* **8**, 9553 (2012).

27. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).

28. Shiroud Heidari, B., Ruan, R., De-Juan-Pardo, E. M., Zheng, M. & Doyle, B. Biofabrication and Signaling Strategies for Tendon/Ligament Interfacial Tissue Engineering. *Cite This ACS Biomater. Sci. Eng* **7**, 383–399 (2021).

29. Liu, R., Zhang, S. & Chen, X. Injectable hydrogels for tendon and ligament tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **14**, 1333–1348 (2020).

30. Gutiérrez, M. C. *et al.* Poly(vinyl alcohol) scaffolds with tailored morphologies for drug delivery and controlled release. *Adv. Funct. Mater.* **17**, 3505–3513 (2007).

31. Salerno, A., Zeppetelli, S., Di Maio, E., Iannace, S. & Netti, P. A. Architecture and properties of bi-modal porous scaffolds for bone regeneration prepared via supercritical CO 2 foaming and porogen leaching combined process. *J. Supercrit. Fluids* **67**, 114–122 (2012).

32. Silva, M. M. C. G. *et al.* The effect of anisotropic architecture on cell and tissue infiltration into tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **27**, 5909–17 (2006).

33. Ikeda, T. *et al.* Fabrication and characteristics of chitosan sponge as a tissue engineering scaffold. *Biomed Res. Int.* **2014**, 786892 (2014).

34. Yan, L.-P. *et al.* Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **95**, 465–75 (2010).

35. Murphy, C. M., Haugh, M. G. & O'Brien, F. J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **31**, 461–6 (2010).

36. Goimil, L. *et al.* Preparation and stability of dexamethasone-loaded polymeric scaffolds for bone regeneration processed by compressed CO2 foaming. *J. CO2 Util.* **24**, 89–98 (2018).

37. Alizadeh, M., Abbasi, F., Khoshfetrat, A. B. & Ghaleh, H. Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

freeze-drying/leaching method. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 3958–3967 (2013).

38. Razzak, M. A., Kim, M., Kim, H. J., Park, Y. C. & Chung, D. Deciphering the interactions of fish gelatine and hyaluronic acid in aqueous solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* **102**, 885–892 (2017).

39. Wu, X. *et al.* Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. *Acta Biomater.* **6**, 1167–1177 (2010).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5 Evaluación biológica de hidrogeles fotopolimerizables

Como se ha visto en los Capítulos anteriores, los hidrogeles híbridos poliméricos naturales representan una nueva generación de materiales con grandes aplicaciones para la reconstrucción o regeneración de estructuras biológicas dañadas gracias a la posibilidad de modificar sus composiciones y, como consecuencia, su estructura microscópica, porosidad, elasticidad y resistencia mecánica, degradabilidad, capacidad de retención acuosa, *etc*, siendo materiales clave en las distintas aproximaciones científico-tecnológicas seguidas actualmente en el ámbito de la IT. Sin embargo, la utilidad y aplicabilidad de los hidrogeles en el ámbito biomédico no está únicamente circunscrita a reproducir las propiedades mecánicas y estructurales de los tejidos biológicos, sino que previamente se han empleado también como, por ejemplo, sistemas de encapsulación y liberación controlada de medicamentos de forma localizada[1], esto es, como depósitos de fármaco, bien en la forma de hidrogeles inyectables[2] -que aumentan su rigidez mecánica una vez introducidos en el cuerpo humano por efecto de la temperatura o el pH; o bien como estructuras sólidas implantables[3], tal y como se comentó en el Capítulo 1 de esta Tesis. Por ello, esta capacidad de encapsulación de compuestos bioactivos en los hidrogeles puede ser aprovechada también en el ámbito de la regeneración tisular, puesto que la matriz polimérica jugaría un papel doble: Por un lado, dando soporte estructural y enviando señales físicas a las células (según la nano- y microarquitectura y organización) para su adhesión, proliferación, *etc*, pero también, por otro, permitiendo una señalización de carácter químico gracias a su capacidad de encapsular y liberar de forma controlada (mediante las características físicas y estructurales de la matriz y/o mediante la aplicación de estímulos externos o internos) biomoléculas que permitan la regulación de procesos celulares como la proliferación o la diferenciación celular[4].

A este respecto, y como se comentó en Capítulos anteriores, los hidrogeles presentan un carácter hidrófilo muy acusado por lo que la encapsulación de moléculas hidrófobas es poco exitosa; por el contrario, la capacidad de solubilización y encapsulación de fármacos/moléculas hidrófilas es extraordinariamente alta. Sin embargo, la naturaleza y estructura de los hidrogeles formada generalmente por micro y mesoporos limita en cierta

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

medida el control sobre la liberación de los agentes bioactivos[5]. Para superar estas dificultades, una de las estrategias más comunes es encapsular el agente/s bioactivo/s en Nps y, posteriormente, introducir estas en la matriz del hidrogel durante el proceso de polimerización. Así, como se comentó anteriormente, se pueden lograr solubilizaciones/encapsulaciones del fármaco muy elevadas independientemente de su naturaleza escogiendo la partícula más adecuada para las características del agente activo pero asegurando, al mismo tiempo, una adecuada dispersabilidad de las Nps en la matriz polimérica del hidrogel sin alterar la homogeneidad de la misma ni sus propiedades físico-químicas, y disminuyendo la potencial agregación de las Nps. La incorporación de las Nps con el principio activo encapsulado en su interior dentro del hidrogel ayuda, por tanto, a controlar el perfil de liberación del fármaco a través de la matriz polimérica, a través de una selección adecuada del tamaño, composición, concentración y capacidad de degradación de las Nps en el interior de la matriz polimérica, así como de la propia estructura, composición y propiedades del hidrogel que las contiene[6].

A este respecto y tal y como se comentó en el Capítulo 1, las Nps de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) han demostrado un gran potencial como nanovehículos de transporte y liberación farmacológica de pequeñas moléculas como fármacos, péptidos, proteínas, antibióticos, *etc*,[7–9] gracias a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, y el control de su tamaño, capacidad de encapsulación y velocidad de liberación mediante la selección de la composición y peso molecular del PLGA, así como de las condiciones sintéticas y el agente estabilizante empleados[10,11].

Aunque el tratamiento sostenido y a largo plazo con corticosteoides está frecuentemente asociado con pérdidas óseas severas y osteoporosis, los efectos de una exposición corta y controlada se traducen en una importante respuesta antiinflamatoria pero también en resultados beneficiosos en términos de regeneración ósea[12,13]. En concreto, la DEX es un glucocorticoide sintético cristalino, que tiene una muy baja solubilidad acuosa y que ha sido ampliamente usado como fármaco antiinflamatorio para inhibir la actividad de los macrófagos pro-inflamatorios, pero que también ha demostrado provocar importantes actividades osteoinductivas y de diferenciación osteogénica de células madre humanas[14,15]. Sin embargo, la administración sistémica de este compuesto conlleva efectos colaterales adversos como ganancia de peso, problemas cardiovasculares, cataratas y osteoporosis por lo que su aplicación clínica se ha venido restringiendo en los últimos años. Por ello, y para superar estas limitaciones e incrementar al mismo tiempo

USC DE COMPOSTELA

su eficiencia farmacológica, las Nps de PLGA son, a priori, un vehículo adecuado para encapsular y controlar el perfil de liberación de DEX[16–18] desde el interior de matrices poliméricas, permitiendo una administración localizada del agente bioactivo lo que será ventajoso para la regeneración tisular, mientras se evita o al menos se mitiga los efectos colaterales adversos de la administración sistémica de glucocorticoides.

Aunque las Nps de PLGA con DEX encapsulada en su interior, así como su incorporación en hidrogeles de HA o quitosano (CS) se han estudiado previamente[6,19] la incorporación de este tipo de Nps en geles híbridos de GelMA-HAMA su impacto en la estructura y propiedades físico-químicas de estos, así como la identificación de sus potenciales efectos biológicos, en particular, en la capacidad de diferenciación de MSC en células óseas no ha sido estudiada previamente.

Por todo ello, en este Capítulo de la Tesis Doctoral, se presentan los resultados de la preparación de hidrogeles híbridos de gelatina metacrilada (GelMA) y ácido hialurónico metacrilado (HAMA) con Nps de PLGA incorporadas cargadas con DEX con el objetivo de conseguir una liberación controlada y sostenida de DEX a través de la matriz del hidrogel para inducir la diferenciación de célula madre mesenquimales (MSC) en osteoblastos, de tal manera que se induzca la producción de calcio y el posterior proceso de calcificación.

5.1 Caracterización de las nanopartículas de PLGA-DEX

El tamaño hidrodinámico promedio, la polidispersidad y la distribución de tamaños de las nanopartículas de PLGA y de PLGA con DEX encapsulada en su interior (PLGA-DEX) se analizaron mediante DLS Figura 5.1a. Las Nps de PLGA vacías poseen un tamaño de 301±19nm y un índice de polidispersidad (PDI) de 0.154, mientras que las cargadas con el fármaco apenas modificaron sus dimensiones, con un tamaño de 305±25nm y una polidispersidad de 0.215. La encapsulación del fármaco, por lo tanto, no con lleva un incremento de tamaño de las Nps, y aunque el PDI aumenta ligeramente se puede considerar que las Nps siguen siendo bastante monodispersas. Las imágenes de SEM de las Nps de PLGA y PLGA-DEX confirman los resultados obtenidos por DLS. Como se puede observar en las Figuras 5.1b-c, las Nps presentan morfología esférica y son relativamente monosdispersas. Sus tamaños fueron obtenidos midiendo el diámetro de 100 partículas mediante el *software Image J* y calculando su tamaño promedio. Los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

valores obtenidos fueron de 149 ± 10 nm y 156 ± 13 para las Nps de PLGA y PLGA-DEX, respectivamente, de acuerdo con los valores obtenidos previamente por DLS, y teniendo en cuenta el proceso de deshidratación al que se someten las partículas cuando se analizan al microscopio electrónico, lo que provoca que tanto el corazón de la partícula como el estabilizante polimérico de su superficie se encuentran más compactados -en particular, no se establecen puentes de hidrógeno entre el estabilizante y el disolvente que provocan el estiramiento de las cadenas poliméricas superficiales[20].

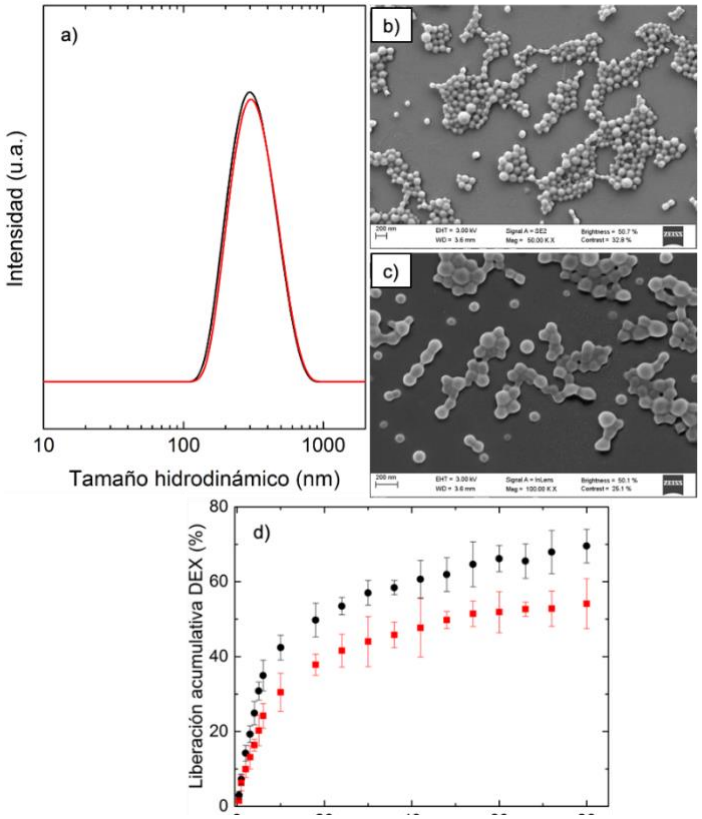


Figura 5.1.- a) Distribuciones de tamaño en intensidad de NPs de PLGA vacías (—) y de PLGA-DEX (—); imágenes de SEM de b) Nps de PLGA vacías y de c) Nps de PLGA-DEX; d) perfiles de liberación de la DEX desde las Nps poliméricas con pesos moleculares de PLGA 38-54 kDa (■) y 24-38 kDa(●) at pH 7.4 and 37 ºC.

La carga superficial de las Nps fue determinada a través de medidas de potencial zeta, obteniéndose valores de -27±6 mV y -30±5 mV para las Nps de PLGA y PLGA-DEX con distintos pesos moleculares de PLGA en agua, respectivamente, valores de acuerdo con la presencia de grupos terminales carboxilos libres del polímero en la superficie de las Nps. Se observa también que la incorporación de DEX desplaza el valor del potencial zeta a valores ligeramente más negativos debido a la ligera carga negativa que presenta este fármaco[17] en disolución acuosa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La capacidad de encapsulación/solubilización de DEX en las Nps de PLGA y la consiguiente eficiencia se calculó mediante las ecuaciones 2.10 y 2.11, obteniéndose una eficacia del 84% y una carga terapéutica en las Nps poliméricas de 28% para una masa inicial de fármaco a encapsular de 25 mg, valores ligeramente superiores a los obtenidos en estudios previos[6,19,21] gracias a la optimización del proceso.

La Figura 5.1d muestra los perfiles de liberación del glucocorticoide desde las Nps de PLGA-DEX con distintos pesos moleculares formadas con PLGA de distinto peso molecular (24-38 kDa y 38-54 kDa). La liberación del fármaco tiene lugar en dos fases: En primer lugar, el agente bioactivo experimenta una fase de liberación muy rápida, con hasta un 43 y 31% de la carga total durante las primeras 10 h para el PLGA de menor y mayor peso molecular, respectivamente, debido posiblemente a que la DEX se encuentra en su mayoría adsorbida superficialmente sobre las Nps y/o en la capa más externa del corazón polimérico. A tiempos de incubación más largos, la velocidad de liberación se reduce progresivamente debido a la difusión de la DEX disponible desde el corazón de las Nps hacia el medio circundante, con una cantidad del fármaco liberado del ~62 y 50% después de 48 h para PLGAs 24-38 y 38-54 kDa, respectivamente. Finalmente, al cabo de 80 h se confirma la liberación de un 80 y 64% de DEX, respectivamente, al que contribuye también, y al menos en parte, la progresiva degradación de las Nps debido a su degradación hidrolítica. También se observa que la liberación desde la Nps realizadas con el polímero de 24-38 kDa es más elevada la del de 38-54 kDa fruto de la hidrólisis más activa que experimenta el primer PLGA en esas condiciones de disolución[22]. A este respecto, es conveniente indicar que la velocidad de degradación del PLGA depende de su peso molecular y de la razón de los monómeros que lo componen (ácido láctico, LA y ácido glicólico, GA), que para la razón 50:50 LA:GA de los polímeros de PLGA empleados en este estudio es muy elevada[23]. Por ello, el PLGA se degrada permitiendo la penetración del disolvente en las partículas, acelerando la liberación de la DEX. No obstante, es también necesario remarcar que dado el tamaño nanométrico de las Nps y, por tanto, su gran área superficial el mecanismo de liberación predominante debe ser la difusión[16].

Para investigar precisamente el mecanismo de liberación de la DEX desde las Nps poliméricas, los perfiles de liberación se ajustaron a distintos modelos matemáticos: Peppas-Krosmeyer, ecuaciones de difusión de orden cero y primer orden, Higuchi y Hixon-Crowell[19] cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.1. Los resultados del análisis

USC DE COMPOSTELA

confirman que las Nps presentan una liberación de tipo difusivo como se demuestra por los coeficientes de regresión elevados obtenidos para el modelo de Peppas-Kosmeyer. De acuerdo a este modelo, valores de *n* entre 0.24 y 0.28 son indicativos de difusión de carácter difusico fickiano por lo que se confirma este comportamiento para las Nps. Estos valores inferiores a 0.4 indican también una pequeña polidispersidad del sistema[24], Asimismo, los resultados para el modelo de Higuchi fueron también razonablemente buenos consecuencia del proceso de liberación rápido promovido por la fracción de fármaco adsorbido o encapsulado en la cercanía de la superficie de las Nps, lo que confirma, a su vez, el carácter predominantemente difusivo del proceso de liberación. Por el contrario, los ajustes de los datos experimentales a los modelos de difusión de orden cero, primer orden, y de Hixon-Crowell arrojan coeficientes de regresión alejados de los considerados como óptimos, posiblemente como consecuencia del tamaño nanométrico de las Nps. Por tanto, se confirma que el mecanismo de liberación está dominado por la difusión de la DEX desde las Nps hacia la disolución, y que es más rápido que el de degradación de la matriz polimérica, aunque no limitado por esta[25].

Tabla 5.1.- Ajustes de los distintos modelos de los perfiles de liberación de la DEX.

Modelo		**24-38 kDa**	**38-54 kDa**
Peppas-Kosmeyer	M_∞	4.93816	3.6761
	K_p	4.84048	4.38826
	n	0.24673	0.28525
	r^2	0.9986	0.99739
Orden Cero	Q_0	68.4463	53.86008
	K_0	-259.90363	-210.66859
	r^2	0.99469	0.99455
Primer Orden	Q_0	71.47527	56.96069
	K_1	-5.86038	-6.50922
	r^2	0.99765	0.9982
Higuchi	K_H	8.90727	6.97051
	r^2	0.9777	0.9847
Hixon-Crowell	Q_0	70.37434	55.80861
	K_S	6.96904	6.98151
	r^2	0.9968	0.99716

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2 Nps de PLGA-DEX encapsuladas en hidrogeles poliméricos

Puesto que la liberación de la DEX al cabo de 80 h se traduce en liberaciones del fármaco encapsulado en el rango del 64-80% según las condiciones del medio externo, se hace necesario buscar un mecanismo/sistema que nos permita realizar una liberación aún más sostenida del fármaco con el objetivo de lograr una osteo-inducción localizada y duradera que conduzca a un proceso de formación ósea a través de una calcificación adecuada, para lo que es imprescindible una diferenciación progresiva y controlada de las MSC en osteoblastos. Por ello, de cara a controlar el perfil y la velocidad de liberación de la DEX, proveer con un andamiaje y medio adecuado para las células que facilite su adhesión, proliferación y diferenciación, y ayudar al fármaco a liberarse en el ambiente y frenar la degradación de las Nps al decrecer la concentración de subproductos de degradación ácidos, se decidió incorporar la Nps de PLGA (24-38 kDa)-DEX, en el interior de andamios poliméricos de GelMA-HAMA con la composición de 10% GelMA-1% HAMA y 10% GelMA-5% HAMA estudiados en el Capítulo anterior.

A este respecto, cabe mencionar que la estructura porosa interconectada de estos hidrogeles debería facilitar la penetración de agua en su interior, suministraría un entorno adecuado para la transferencia de la DEX a las células/tejidos circundantes, y promovería la expulsión de los subproductos ácidos resultantes de la degradación hidrolítica de las Nps de PLGA fuera del hidrogel. La composición de los hidrogeles seleccionados es aquella que presentó el mejor balance entre las propiedades mecánicas y la estructura del hidrogel de cara a facilitar la adhesión celular, además de ser los que poseen los módulos de carga más próximos a los valores del propio tejido óseo (40 a 280 MPa)[26–28], -es necesario recordar en este punto que cuanto más duro es un andamiaje polimérico, se debe de obtener una mayor adhesividad celular[29].

Puesto que la encapsulación de DEX en las Nps ha sido elevada, como se ha comentado anteriormente, la cantidad de Nps de PLGA-DEX a incorporar en los hidrogeles ha sido de 1.5 mg con el objetivo de que la concentración de DEX en el seno del hidrogel alcance el rango de los 100-400 ng, dentro del rango de concentraciones considerado como adecuado para que este fármaco actúe como agente inductor de la diferenciación de MSC a osteoblastos (40-400 ng/mL,[30]). Las Nps de PLGA-DEX se han incorporado en las disoluciones poliméricas previamente al proceso de fotopolimerización, para asegurar que las Nps permanecen en el interior de la matriz polimérica. La baja concentración de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nps de PLGA-DEX en las matrices poliméricas seleccionadas implica que las propiedades físicas de estas como los módulos de carga y pérdida, módulo de Young, capacidad de gelificación, densidad, hinchamiento, *etc*, apenas varían respecto a aquellas sin las NPs incorporadas, como se puede ver en la Tabla 5.2 y Figura 5.2.

Tabla 5.2.- Propiedades físicas de los hidrogeles sin y con Nps de PLGA.

	Sin Nps			Con Nps		
Muestra	**E (kPa)**	**Densidad (g/ml)**	**Diámetro medio de poro (μm)**	**E (kPa)**	**Densidad (g/ml)**	**Diámetro medio de poro (μm)**
10% GelMA-1% HAMA	9.5 ± 0.07	0.149 ±0.003	13 ± 1	10.1± 0.04	0.163 ± 0.002	9 ± 2
10% GelMA-5% HAMA	18.3 ±0.04	0.192 ± 0.002	8 ± 1	21.2 ± 0.003	0.203 ± 0.005	5 ± 0.09

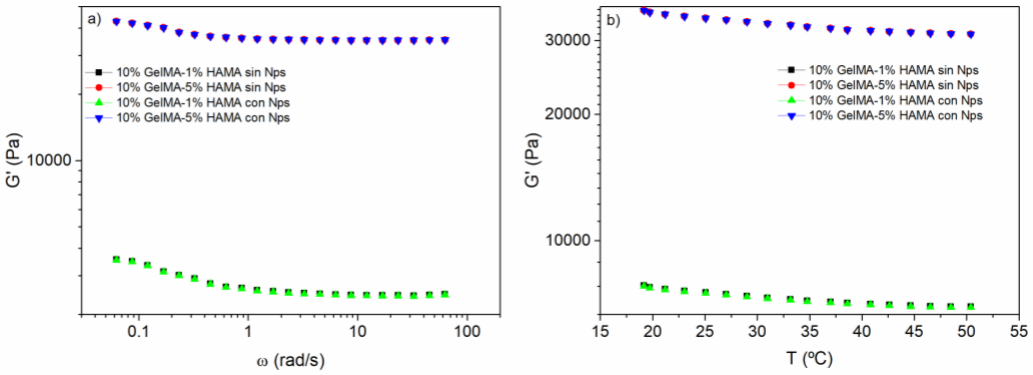


Figura 5.2.- G' en función de la frecuencia y temperatura para hidrogeles sin y con Nps de PLGA.

La incorporación efectiva de las Nps de PLGA en los hidrogeles se ha corroborado mediante medidas de FTIR y TGA. Es necesario mencionar que la incorporación de las Nps en las matrices poliméricas depende de la afinidad de aquellas por las estructuras poliméricas así como de la propia arquitectura tridimensional del hidrogel. Como se puede ver en la Figura 5.3a, las bandas que aparecen en el espectro de FTIR de los

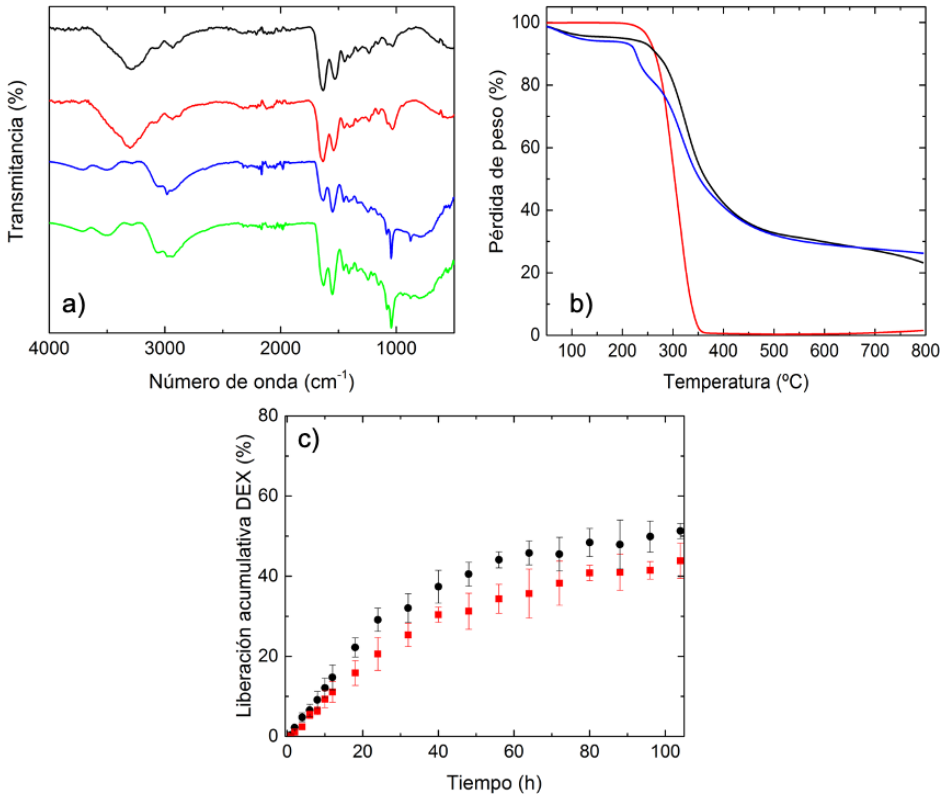


Figura 5.3.- a) Espectros de FTIR de los andamios de 10% GelMA-1% HAMA y 10% GelMA-5% HAMA sin (—, —) y con (—, —) NPs de PLGA en su interior; b) Curvas de TGA de NPs de PLGA (—) y del hidrogel con composición 10% GelMA-5% HAMA sin (—) y con NPs de PLGA incorporadas (—); c) perfiles de liberación del fármaco en capsulado en NPs de PLGA en el interior de hidrogeles de 10% GelMA-1% HAMA (●) y 10% GelMA-5% HAMA (■).

hidrogeles de composiciones 10% GelMA-5% HAMA y 10% GelMA-1% HAMA con Nps encapsuladas experimentan un desplazamiento hacia el rojo en la banda correspondiente al estiramiento de los grupos C=O de 1630 a 1638 cm^{-1} así como un incremento en la banda situada a 1045 cm^{-1} relacionado con el estiramiento del grupo C-O de los grupos éster de las unidades de L-ácido láctico y glicólico del PLGA, respectivamente, en relación con los espectros de los andamios sin Nps. Asimismo, la curva de TGA para el hidrogel 10% GelMA-5% HAMA libre y con Nps de PLGA incorporadas tomado como ejemplo (Figure 5.3b) presenta ciertas diferencias en el primer proceso de degradación que tiene lugar en el rango de temperaturas de 250-400ºC, siendo precisamente el intervalo en el que tiene lugar la degradación completa del PLGA (275-350ºC).

El perfil de liberación de la DEX desde las Nps de PLGA incorporadas en los hidrogeles se muestra en la Figura 5.2c. Como se esperaba, la liberación del fármaco resulta ya más lenta durante la fase de liberación rápida, con tasas de liberación del 9% y el 12% tras 10

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

h de incubación y de 44% y 51% tras 96 h para los andamios de 10% GelMA-1% HAMA y 10% GelMA-5% HAMA, respectivamente, bastante inferior a la observada cuando el fármaco se libera desde Nps de PLGA-DEX suspendidas directamente en el medio. Este comportamiento posiblemente se deba al extraordinario hinchamiento que experimentan estos hidrogeles y la consiguiente absorción del medio acuoso. Esto hace que los oligómeros producto de la degradación de las Nps de PLGA pasen de manera más sencilla a través del hidrogel lo que decelera la velocidad de degradación de las Nps al encontrarse estas en un medio menos ácido[9]. También el mayor recorrido del fármaco para difundir a lo largo del hidrogel juega un efecto muy importante. Como se comentó anteriormente, la liberación del fármaco desde las Nps se debe a dos factores: difusión y degradación. Por tanto, la velocidad de liberación puede ser controlada y reducida disminuyendo la tasa de destrucción de la partícula polimérica así como aumentando el camino difusivo de la DEX[31,32]. A este respecto, la estructura más compacta consecuencia de una mayor concentración total de material polimérico, el grado de entrecruzamiento a través de la fotopolimerización y las interacciones de carácter electrostático y de puentes de hidrógeno entre las cadenas de GelMA y HAMA de estos hidrogeles 10% GelMA-1% HAMA y 10% GelMA-5% HAMA ayudan a disminuir la liberación desde las Nps de PLGA; en particular, la liberación desde el hidrogel de 10% GelMA-5% HAMA es inferior que en el 10% GelMA-1% HAMA debido a los factores previamente comentados. Por otro lado, la fase de liberación más rápida en los perfiles de liberación durante el primer día de incubación, pero esta puede ser beneficiosa ya que podría ayudar a prevenir cierta actividad celular pro-inflamatoria durante las horas iniciales de la incubación. Como en el caso de las Nps de PLGA-DEX libres, se analizaron los perfiles de liberación experimentales de la DEX una vez se incorporaron las NPs de PLGA-DEX (Figura 5.3c) en el interior de los hidrogeles mediante los modelos matemáticos previamente empleados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.3. Se puede observar que los dos tipos de hidrogel presentan una difusión de tipo Fickiano, con valores de n inferiores a 0.6 a partir de los ajustes con la ecuación de Peppas-Kosmeyer. Los resultados obtenidos a partir del modelo de Higuchi y del de orden cero también muestran unos elevados coeficientes de correlación. Sin embargo, el ajuste de los datos experimentales con el modelo de Hixon-Crowell arrojó peores resultados debido a que la difusión de la DEX es más rápida que la degradación de la matriz polimérica, y que la liberación ocurre principalmente por difusión más que por degradación. Finalmente, a partir del modelo de primer orden tampoco se obtuvieron buenos resultados de ajuste ya que la velocidad del

USC

proceso es directamente proporcional a la concentración de DEX que difunde. En resumen, la encapsulación de las Nps de PLGA-DEX en los hidrogeles permite minimizar la dosis a administrar del fármaco, controlando su liberación y haciéndola más sostenida, y asegurado que la concentración local se encuentre dentro del rango óptimo de actividad farmacológica. Esto último es de suma importancia puesto que la DEX se absorbe de forma significativa cuando se administra localmente, causando efectos adversos sistémicos y complicaciones como osteoporosis[33].

Tabla 5.3.- Ajustes de los distintos modelos de los perfiles de liberación de la DEX embebidas en los hidrogeles.

		10% GelMA-1% HAMA	**10% GelMA-5% HAMA**
Peppas-Kosmeyer	M_∞	2.54094	2.66474
	K_p	3.55235	2.17116
	n	0.40329	0.46695
	r^2	0.99633	0.99769
Orden Cero	Q_0	49.82478	40.95112
	K_0	-260.07502	-213.8766
	r^2	0.99044	0.98898
Primer Orden	Q_0	55.55241	47.17453
	K_1	-10.47866	-11.83421
	r^2	0.9979	0.99762
Higuchi	K_H	6.16165	5.07868
	r^2	0.99501	0.99778
Hixon-Crowell	Q_0	53.3605	44.73449
	K_S	10.42248	10.68417
	r^2	0.99596	0.99543

En resumen, los perfiles de liberación en dos fases observados son sumamente interesantes para aplicaciones de regeneración de tejidos puesto que la fase inicial de liberación rápida sería efectiva para suministrar una primera dosis farmacológica a niveles terapéuticos en el lugar específico del defecto óseo tras poco tiempo de la implantación del andamio. A continuación, la liberación más sostenida de la DEX durante el segundo estadío preservaría la concentración local del fármaco durante el siguiente

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

período de tiempo, manteniendo la bioactividad osteogénica. Las fracturas óseas normalmente se curan en 6-8 semanas, pero el período exacto dependerá del tamaño del defecto óseo producido, y puede llevar de 6 a 12 meses formar de nuevo el hueso maduro. Como se observó en un capítulo previo, las matrices de GelMA-HAMA sufren una cierta biodegradación en 3 días, lo que podría complicar ese proceso de regeneración debido a la inestabilidad mecánica de la matriz. No obstante, estos andamios incorporan DEX como factor osteogénico, que se espera acelere el proceso de reparación y, por lo tanto, se ajuste a la necesaria tasa de degradación[34]. Además, se ha demostrado que diversos andamios presentan tasas de degradación in vitro muy superiores a las medidas en in vivo debido a la formación de tejido conectivo alrededor de la matriz polimérica[35].

5.3 Citocompatibilidad y actividad osteogénica

La viabilidad de las MSC en los hidrogeles de GelMA-HAMA sin y con NPs de PLGA-DEX incorporadas en su interior se evaluó mediante dos ensayos diferentes. En el primero de ellos, se incubaron las células en presencia de los lixiviados producidos por el hidrogel de composición 10% GelMA-5% HAMA escogido como modelo y se analizó su proliferación mediante en el ensayo CCK-8. La Figura 5.4a,b confirma que los andamios sin y con NPs de PLGA-DEX incorporadas en su interior son no tóxicos para las MCS, con viabilidades celulares superiores al 90% después de 7 días de incubación. A continuación, se realizó un segundo experimento de viabilidad celular en el que las MSC se incubaron en contacto directo con los hidrogeles de 10% GelMA-5% HAMA, esto es, depositándolas en la superficie de estos e incubándolos durante 7 días y, posteriormente, analizando la viabilidad celular mediante el ensayo CCK-8. Se puede observar que, de nuevo, la viabilidad celular es muy elevada y por encima del 80% tras 7 días de incubación, lo que confirma su citocompatibilidad. Es necesario recordar que estos valores de viabilidad están referenciados a los de células depositadas sobre pozos de placa de cultivo en ausencia del material polimérico y empleadas como control negativo, Por otro lado, se puede observar que las Nps de PLGA-DEX y, por tanto, la DEX no tiene un efecto relevante en la viabilidad celular, puesto que las concentraciones empleadas para provocar la osteinducción son muy bajas, del orden de unos pocos centenares de nanogramos.

USC

La capacidad de las Nps de PLGA-DEX tanto administradas libremente como encapsuladas dentro de los hidrogeles de GelMA-HAMA para inducir la diferenciación

de las MSC a osteoblastos se analizó mediante el ensayo de actividad de ALP y el teñido con alazirina. La ALP es una enzima esencial para la mineralización de la matriz ósea que rompe los fosfatos para la deposición del calcio en el hueso. Su actividad es muy elevada antes de comenzar esta deposición del calcio[36]. Por ello, el incremento en la actividad de la ALP se toma como un marcador temprano de la diferenciación osteogénica de las MSC[37]. La Figura 5.4c muestra la producción de ALP normalizada a la concentración de proteínas celulares a 3, 7 y 14 días de incubación de las MSC en hidrogeles con composición 10% GelMA-5% HAMA. Se observa de esta figura que a los 3 y 7 días de incubación las Nps de PLGA-DEX (conteniendo dos concentraciones distintas del fármaco: 100 ng/mL, Nps PLGA-DEX100, y 400 ng/mL, Nps PLGA-DEX400) administradas directamente a las células madre los valores de actividad enzimática son ligeramente superiores a los obtenidos con los andamios que incorporan las Nps de PLGA-DEX, aunque estas no son estadísticamente significativas. Además, a partir de los 7 días de incubación el efecto osteo-inductor de la DEX es ya muy evidente. Tanto las células cultivadas en ausencia de DEX libre (control negativo) como en su presencia (control positivo) encapsulada en las Nps poliméricas que se suministran directamente a las células, o bien incorporadas en el interior de los andamios alcanzaron la máxima actividad enzimática a los 14 días de incubación aunque los niveles mostrados fueron claramente diferentes, en concordancia con resultados previos[38,39]. En particular, tras estas dos semanas se observa que la incorporación de las Nps de PLGA-DEX en los andamios parece claramente promocionar mayores actividades de ALP en comparación con el control positivo, y más importantes a mayores concentraciones de DEX en las Nps, todo ello gracias a su liberación más sostenida en el tiempo lo que asegura una concentración óptima a lo largo de mucho más tiempo. Cabe reseñar que las diferencias en la actividad de la ALP en las MSC entre los andamios con Nps y también las Nps de PLGA-DEX libres fueron estadísticamente significativas a 14 días de incubación respecto al control positivo (DEX libre), al igual que entre los andamios con las Nps que respecto a estas inyectadas libres.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

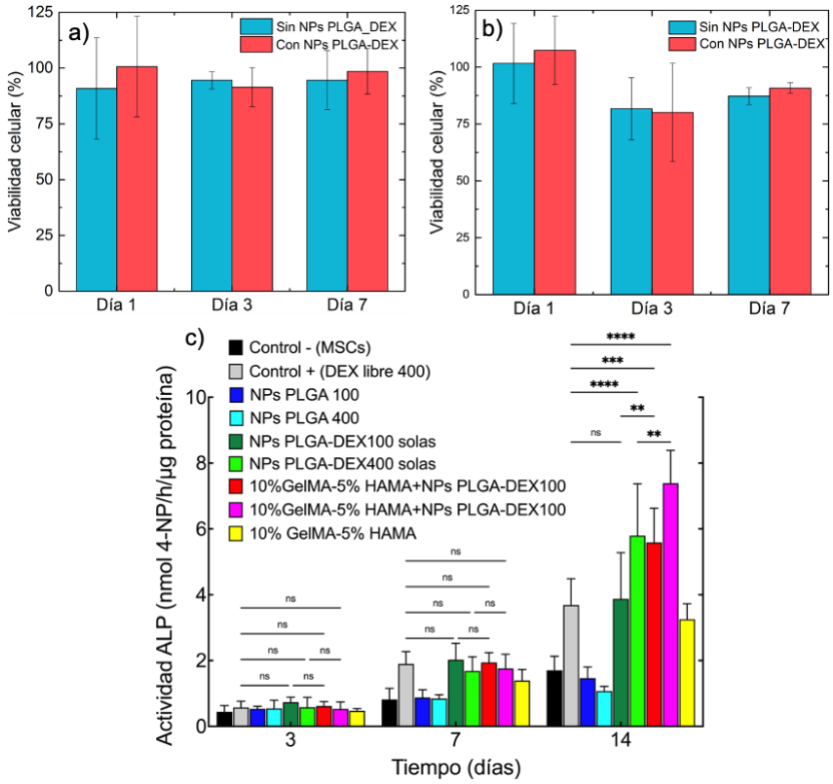


Figura 5.4.- Viabilidad celular de MSCs incubadas a) en presencia de lixiviados provenientes de la degradación de los hidrogeles y b) depositadas sobre superficie de los andamios; c) actividad de la enzima ALP producida por las MSCs incubadas con los andamios. Diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos mediante ANOVA y test de múltiple comparación; $p < 0.05$; n=4).

Además, también se observa que la concentración de DEX de 400 ng/mL es más adecuada que la de 100 ng/mL para inducir la diferenciación de las MSC. Finalmente, comentar que se observó que los andamios vacíos potenciaron la actividad de la ALP, alcanzando niveles relativamente similares a los del control positivo, hecho que está en concordancia con investigaciones previas que evidencian que la arquitectura tridimensional de los hidrogeles favorecen la diferenciación de las MSC en osteoblastos[40].

Por otra parte, la mineralización que se produce como consecuencia de la diferenciación celular de las MSC en osteoblastos gracias al efecto osteoinductor de la DEX encapsulada en los hidrogeles fue también evaluada a través del análisis del contenido en calcio de la matriz extracelular después de 28 días de incubación mediante el ensayo de tinción de Rojo de Alazarina-S para andamios de composición 10% GelMA-5% HAMA que contienen Nps de PLGA-DEX con 100 y 400 ng/mL del fármaco incorporados. El contenido en calcio o mineralización es otro biomarcador de osteogénesis pero, al contrario que con la actividad de la ALP, este es considerado un marcado tardía de la diferenciación osteogénica de la MSC[41].

La Figura 5.5 corrobora los resultados del ensayo de actividad enzimática de la enzima ALP, observándose una deposición de calcio muy superior para los andamios con composición de 10% GelMA-5% HAMA que contienen Nps de PLGA-DEX400 en comparación con los que contienen Nps de PLGA-DEX 100 y aquellas incubadas en medio de diferenciación osteogénico (control positivo). Además, si se comparan los resultados obtenidos con los correspondientes a la administración libre de Nps de PLGA-DEX400 se observa que para estas los niveles de calcio parecen también ser menos elevados, lo que corrobora una vez más que una liberación sostenida de la DEX desde la Nps contenidas en la matriz del hidrogel favorecen aún más la osteogénesis y la consiguiente mineralización.

En definitiva, la incorporación de la DEX en Nps encapsuladas en el interior de matrices/andamios poliméricos es una excelente estrategia no solo para controlar los perfiles de liberación del fármaco y lograr una administración más sostenida que permita mantener la concentración farmacológica dentro de los límites adecuados de actividad

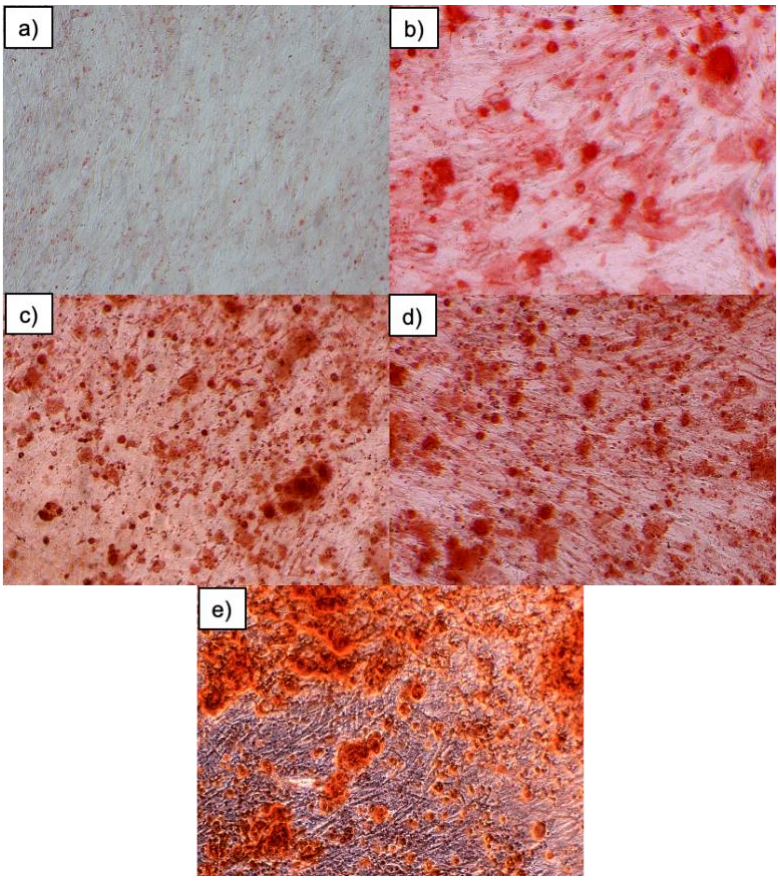


Figura 5.5.- Teñido con Rojo de Alizarina S de las MSCs incubadas durante 28 días a) en ausencia y b) presencia de medio de diferenciación osteogénico; c) después de la administración de NPs de PLGA-DEX400; en scaffolds de 10%GelMA-5% HAMA que incorporan d) NPs de PLGA-DEX100 y e) NPs de PLGA-DEX400.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

biológica, sino también para proveer al mismo tiempo con un entorno tridimensional con las propiedades estructurales y físicas adecuadas que permitan una adecuada incorporación y proliferación celular. Además, las características de este entorno ayudan a regular las señales bioquímicas necesarias, y en ocasiones, a estimularlas adicionalmente para inducir la diferenciación celular hacia un linaje específico que permita la recuperación/regeneración del tejido dañado.

5.4 Conclusiones

La presente investigación demuestra la efectividad de emplear Nps e hidrogeles para liberar de forma localizada uno o más agentes bioactivos en el tejido objetivo. Por ello, se ha llevado a cabo la encapsulación del glucocorticoide DEX en Nps de PLGA seguido de su posterior incorporación en el seno de hidrogeles basados en GelMA y HAMA para controlar su liberación, al mismo tiempo que se emplea la mínima cantidad de fármaco, puesto que los esteroides poseen efectos adversos a dosis elevadas, además, de proveer de un ambiente tridimensional que facilite la adhesión, proliferación y diferenciación celular de MSC.

De acuerdo a los análisis estructurales y físico-químicos, las Nps de PLGA no experimentan cambios apreciables en ausencia y presencia de la DEX incorporada manteniendo su tamaño y carácter monodispersos, consiguiéndose una gran eficiencia de encapsulación del fármaco en su interior. Las Nps muestran un perfil de liberación de dos fases, permitiendo que hasta un 60% aproximadamente de la DEX se libere al medio circundante en poco más de 3 días. Por otro parte, se fabricaron andamios poliméricos 3D de GelMA y HAMA mediante fotopolimerización, que han demostrado importantes aplicaciones en el campo de la regeneración tisular, ya que suministran receptores de señalización y unas propiedades mecánicas adecuadas para diversas aplicaciones en regeneración tisular. Por ello, se incorporaron las Nps de PLGA con DEX encapsulada en este tipo de hidrogeles para proveer de un entorno adecuado para la adhesión y proliferación celular de MSC que se diferenciarán en osteoblastos gracias al control adicional sobre la liberación de la DEX de forma localizada en el seno de la matriz polimérica. La cantidad de Nps de PLGA-DEX incorporadas en el hidrogel ha sido aquella que se encuentre en el rango donde este glucocorticoide se ha mostrado efectivo en promover el mecanismo de diferenciación celular de células madre. Se ha observado que la incorporación de las Nps no altera las propiedades físicas de los andamios,

USC DE COMPOSTELA

lográndose una liberación más sostenida del fármaco al medio externo promovido tanto por el control adicional sobre la degradación de las Nps como a través de incremento del camino difusivo del fármaco a través de la estructura del hidrogel. Asimismo, se ha confirmado la citocompatibilidad de estos hidrogeles híbridos, y se ha verificado su capacidad para dotar de un ambiente adecuado y de promover de manera efectiva la diferenciación de MSC a osteoblastos, como se ha podido comprobar por los incrementos muy notables de la actividad de la enzima ALP, así como a partir de la detección de depósitos de calcio, claves en el proceso de calcificación ósea y su regeneración. En particular, estas actividades han sido bastante superiores en el caso de los hidrogeles que incorporan las Nps de PLGA-DEX en comparación con la administración libre de estas Nps, gracias a esa liberación más sostenida del fármaco y a un ambiente tridimensional más adecuado que estimular adicionalmente la señalización bioquímica celular.

5.5 Referencias

1. Ulbrich, K., Subr, V., Podpěrová, P. & Burešová, M. Synthesis of novel hydrolytically degradable hydrogels for controlled drug release. *J. Control. Release* **34**, 155–165 (1995).

2. Nguyen, Q. V., Huynh, D. P., Park, J. H. & Lee, D. S. Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: A review. *Eur. Polym. J.* **72**, 602–619 (2015).

3. Hoare, T. R. & Kohane, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* **49**, 1993–2007 (2008).

4. Huang, Q. *et al.* Hydrogel scaffolds for differentiation of adipose-derived stem cells. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 6255–6275 (2017).

5. Moya-Ortega, M. D., Alvarez-Lorenzo, C., Sigurdsson, H. H., Concheiro, A. & Loftsson, T. γ-Cyclodextrin hydrogels and semi-interpenetrating networks for sustained delivery of dexamethasone. *Carbohydr. Polym.* **80**, 900–907 (2010).

6. Mousavi Nejad, Z. *et al.* Synthesis, physicochemical, rheological and in-vitro characterization of double-crosslinked hyaluronic acid hydrogels containing dexamethasone and PLGA/dexamethasone nanoparticles as hybrid systems for specific medical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **126**, 193–208 (2019).

7. Lü, J.-M. *et al.* Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **9**, 325–341 (2009).

8. Ghitman, J., Biru, E. I., Stan, R. & Iovu, H. Review of hybrid PLGA nanoparticles:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Future of smart drug delivery and theranostics medicine. *Materials and Design* **193**, 108805 (2020).

9. Makadia, H. K. & Siegel, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel).* **3**, 1377–1397 (2011).

10. Rodrigues de Azevedo, C. *et al.* Modeling of the burst release from PLGA micro- and nanoparticles as function of physicochemical parameters and formulation characteristics. *Int. J. Pharm.* **532**, 229–240 (2017).

11. Peters, T. *et al.* Evaluation of polyesteramide (PEA) and polyester (PLGA) microspheres as intravitreal drug delivery systems in albino rats. *Biomaterials* **124**, 157–168 (2017).

12. Mountziaris, P. M., Spicer, P. P., Kasper, F. K. & Mikos, A. G. Harnessing and modulating inflammation in strategies for bone regeneration. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* **17**, 393–402 (2011).

13. Zhao, C. & Ikeya, M. Generation and Applications of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International* **2018**, 9601623 (2018).

14. Chen, M. *et al.* Tetraphenylpyrazine-based AIEgens: Facile preparation and tunable light emission. *Chem. Sci.* **6**, 1932–1937 (2015).

15. Lima, A. C., Puga, A. M., Mano, J. F., Concheiro, A. & Alvarez-Lorenzo, C. Free and copolymerized γ-cyclodextrins regulate the performance of dexamethasone-loaded dextran microspheres for bone regeneration. *J. Mater. Chem. B* **2**, 4943–4956 (2014).

16. Rodríguez Villanueva, J., Bravo-Osuna, I., Herrero-Vanrell, R., Molina Martínez, I. T. & Guzmán Navarro, M. Optimising the controlled release of dexamethasone from a new generation of PLGA-based microspheres intended for intravitreal administration. *Eur. J. Pharm. Sci.* **92**, 287–297 (2016).

17. Rençber, S., Aydın Köse, F. & Karavana, S. Y. Dexamethasone loaded PLGA nanoparticles for potential local treatment of oral precancerous lesions. *Pharm. Dev. Technol.* **25**, 149–158 (2020).

18. Gasmi, H. *et al.* Towards a better understanding of the different release phases from PLGA microparticles: Dexamethasone-loaded systems. *Int. J. Pharm.* **514**, 189–199 (2016).

19. Saeedi Garakani, S. *et al.* Fabrication of chitosan/polyvinylpyrrolidone hydrogel scaffolds containing PLGA microparticles loaded with dexamethasone for biomedical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **164**, 356–370 (2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

20. Domingos, R. F. *et al.* Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: Multimethod determination of particle sizes. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 7277–7284 (2009).

21. Ali, H., Kalashnikova, I., White, M. A., Sherman, M. & Rytting, E. Preparation, characterization,and transport of dexamethasone-loaded polymeric nanoparticles across a human placental in vitro model. *Int. J. Pharm.* **454**, 149–157 (2013).

22. Topete, A. *et al.* NIR-light active hybrid nanoparticles for combined imaging and bimodal therapy of cancerous cells. *J. Mater. Chem. B* **2**, 6967–6977 (2014).

23. Zolnik, B. S. & Burgess, D. J. Evaluation of in vivo-in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres. *J. Control. Release* **127**, 137–145 (2008).

24. Ritger, P. L. & Peppas, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release* **5**, 23–36 (1987).

25. Parsa, P., Paydayesh, A. & Davachi, S. M. Investigating the effect of tetracycline addition on nanocomposite hydrogels based on polyvinyl alcohol and chitosan nanoparticles for specific medical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **121**, 1061–1069 (2019).

26. Fulcher, G. R., Hukins, D. W. & Shepherd, D. E. Viscoelastic properties of bovine articular cartilage attached to subchondral bone at high frequencies. *BMC Musculoskelet. Disord.* **10**, 61 (2009).

27. Mountcastle, S. E. *et al.* Dynamic viscoelastic characterisation of human osteochondral tissue: Understanding the effect of the cartilage-bone interface. *BMC Musculoskelet. Disord.* **20**, 575 (2019).

28. Ronca, D. *et al.* Critical analysis on dynamic-mechanical performance of spongy bone : the effect of acrylic cement. *Thaum. $ Orthop. Tissue* **11**, 1–7 (2014).

29. Vanderhooft, J. L., Alcoutlabi, M., Magda, J. J. & Prestwich, G. D. Rheological properties of cross-linked hyaluronan-gelatin hydrogels for tissue engineering. *Macromol. Biosci.* **9**, 20–28 (2009).

30. Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M. & Caplan, A. I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* **13**, 81–88 (1992).

31. Bagher, Z. *et al.* Wound healing with alginate/chitosan hydrogel containing hesperidin in rat model. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **55**, (2020).

32. Bagher, Z., Ehterami, A., Nasrolahi, M., Azimi, M. & Salehi, M. Hesperidin promotes peripheral nerve regeneration based on tissue engineering strategy using alginate/chitosan hydrogel: in vitro and in vivo study. *Int. J. Polym. Mater. Polym.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Biomater. **70**, 299–308 (2021).

33. Holtorf, H. L., Jansen, J. A. & Mikos, A. G. Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stromal cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone. in *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **72**, 326–334 (John Wiley & Sons, Ltd, 2005).

34. Woodruff, M. A. *et al.* Bone tissue engineering: From bench to bedside. *Materials Today* **15**, 430–435 (2012).

35. Ellä, V., Annala, T., Länsman, S., Nurminen, M. & Kellomäki, M. Knitted polylactide 96/4 L/D structures and scaffolds for tissue engineering: shelf life, in vitro and in vivo studies. *Biomatter* **1**, 102–113 (2011).

36. Anderson, H. C. *et al.* Impaired Calcification Around Matrix Vesicles of Growth Plate and Bone in Alkaline Phosphatase-Deficient Mice. *Am. J. Pathol.* **164**, 841–847 (2004).

37. Seyedjafari, E., Soleimani, M., Ghaemi, N. & Sarbolouki, M. N. Enhanced osteogenic differentiation of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells on electrospun nanofibers. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **22**, 165–174 (2011).

38. Arpornmaeklong, P., Brown, S. E., Wang, Z. & Krebsbach, P. H. Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell-verived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* **18**, 955–968 (2009).

39. Farto-Vaamonde, X., Auriemma, G., Aquino, R. P., Concheiro, A. & Alvarez-Lorenzo, C. Post-manufacture loading of filaments and 3D printed PLA scaffolds with prednisolone and dexamethasone for tissue regeneration applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **141**, 100–110 (2019).

40. Persson, M. *et al.* Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem cells in a 3D Woven Scaffold. *Sci. Rep.* **8**, (2018).

41. Ardeshirylajimi, A. *et al.* Comparison of osteogenic differentiation potential of human adult stem cells loaded on bioceramic-coated electrospun poly (L-lactide) nanofibres. *Cell Prolif.* **48**, 47–58 (2015).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6 Inducción de anisotropía en la estructura de hidrogeles para regeneración tisular

Tal y como se ha estado comentando a lo largo de los diferentes capítulos de esta Tesis, la ingeniería de tejidos basada en hidrogeles trata de reparar tejidos dañados reduciendo el tiempo de curación y los efectos secundarios de otro tipo de tratamientos. A pesar de todas las ventajas comentadas hasta el momento, los hidrogeles presentan una estructura isotrópica, que limita su aplicación en la ingeniería de muchos de los tejidos del cuerpo humano, ya que estos tejidos están formados estructuras complejas que presentan una organización anisótropas desde la nanoescala a la macroescala[1–5], lo que les confiere propiedades mecánicas, físicas y ópticas particulares[6]. Para la creación de hidrogeles anisótropos, este trabajo doctoral se ha basado en la síntesis de hidrogeles con respuesta a estímulos magnéticos. En este caso, la respuesta magnética se consiguió a través de nanopartículas superparamagnéticas (SPIONs) embebidas en microfibras electrohiladas de policaprolactona (PCL) y en partículas poliméricas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). Estas estructuras híbridas con respuesta magnética se añadieron a disoluciones precursoras de hidrogeles de gelatina, evaluando la generación de estructuras anisótropas con potencial aplicación en la ingeniería de diferentes tejidos mediante la aplicación de campos magnéticos externos. Estas aproximaciones metodológicas se basan en las siguientes estrategias:

- La realizada previamente por Omidinia-Arkoli *et al.*, y que se comentó en el Capítulo 1. En ella, estos autores añadieron MNPs a una disolución de PLGA para preparar microfibras poliméricas cortas mediante la técnica de electrohilado/microcortado. Posteriormente, estas fibras poliméricas se incorporaron a una matriz de fibrina, alineando las microfibras bajo la aplicación de un campo magnético externo de ~300 mT. La organización estructural anisótropa conseguida permitió la modificación de las propiedades mecánicas de los hidrogeles así como el crecimiento direccional de las células encapsuladas[7].
- La realizada por Kim *et al.*, quienes prepararon topografías uniaxiales en el seno de andamios de Matrigel o ácido hialurónico gracias a la orientación controlada

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de Nps de poliestireno dopadas con MNPs y funcionalizadas con proteínas como, por ejemplo, la laminina para asegurar la adhesión celular bajo la acción de campos magnéticos de intensidad y orientación adecuada[8].

Así, en esta parte del trabajo de tesis se realizará un análisis detallado de las propiedades físicas de las MNPs obtenidas, tanto de óxido de hierro como dopadas con zinc, prestando especial atención a la influencia de las características estructurales de las partículas sobre su respuesta magnética, factor clave de cara a su potencial aplicación en el desarrollo de hidrogeles anisótropos manipulables a través de la aplicación de campos magnéticos externos. Se sintetizarán MNPs de tamaño reducido, con un diámetro inferior a 15nm, de forma que estas presentarán un comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente[9]. Tal y como se comentó, en este régimen, las MNPs tienen unas características adecuadas para su uso en el ámbito biomédico debido a su escasa tendencia a la agregación bajo un campo magnético externo aplicado como consecuencia de su baja magnetización remanente[10,11]. A continuación, se evaluará el empleo de las MNPs para dotar a las partículas y microfibras electrohiladas de origen polimérico con una respuesta magnética lo suficientemente intensa como para lograr su alineamiento dentro de hidrogeles de gelatina a través de la aplicación de campos magnéticos externos de baja intensidad. Se evaluarán las características de los campos magnéticos requeridos para lograr la correcta alineación de las estructuras híbridas, así como el efecto de la cantidad de fibras o partículas sobre la interdistancia generada entre las mismas tras ser alineadas en el seno de los hidrogeles.

6.1 Influencia de las condiciones sintéticas y caracterización de las MNPs

Se efectuaron diferentes síntesis basadas en la descomposición térmica de diferentes precursores metálicos en forma de acetilacetonatos ($Fe(acac)_3$y $Zn(acac)_2$) en el seno de un disolvente de alto punto de ebullición (éter bencílico) y en presencia de compuestos reductores (1,2-hexadecanediol) y surfactantes-estabilizantes (ácido oleico y oleilamina). Mediante variaciones en las razones entre estos elementos y en las condiciones de las reacciones se lograron sintetizar MNPs de distintas características físico-químicas[12].

USC

Así, en una síntesis típica como la descrita en la sección de Materiales y Métodos, se obtienen MNPs de óxido de hierro de morfología esférica con un diámetro de ~9 nm. Las

MNPs logradas son altamente monodispersas, con una distribución de tamaños muy estrecha y con un grado de agregación prácticamente nulo (Figura 6.1). Su estructura cristalina fue determinada mediante la técnica de difracción de rayos X, obteniéndose un patrón cuyos picos indican que la fase cristalina predominante es la magnetita, Fe_3O_4. Nótese que los espectros de difracción de rayos X de las estructura de magnetita y maghemita son muy similares, con los picos de mayor tamaño en posiciones idénticas, pero la ausencia de ciertos picos menores característicos de la estructura maghemita indica que las MNPs sintetizadas son principalmente Fe_3O_4, esto es, magnetita (Figura 6.2)[13]. Por otra parte, resulta evidente la diferencia de contraste que se observa entre distintas MNPs en las imágenes de TEM, apareciendo unas con un color mucho más oscuro que otras. Este efecto puede ser debido a diferentes causas: i) la existencia de MNPs de composición no uniforme, previsiblemente con una mayoría de óxido de hierro y pequeñas partes de hierro metálico; ii) la presencia de MNPs parcialmente oxidadas debido a los procesos de lavado, que fueron efectuados en ausencia de atmósfera inerte; o iii) simplemente a la posición de las MNPs, que pueden encontrarse orientadas según diferentes planos cristalográficos.[14]

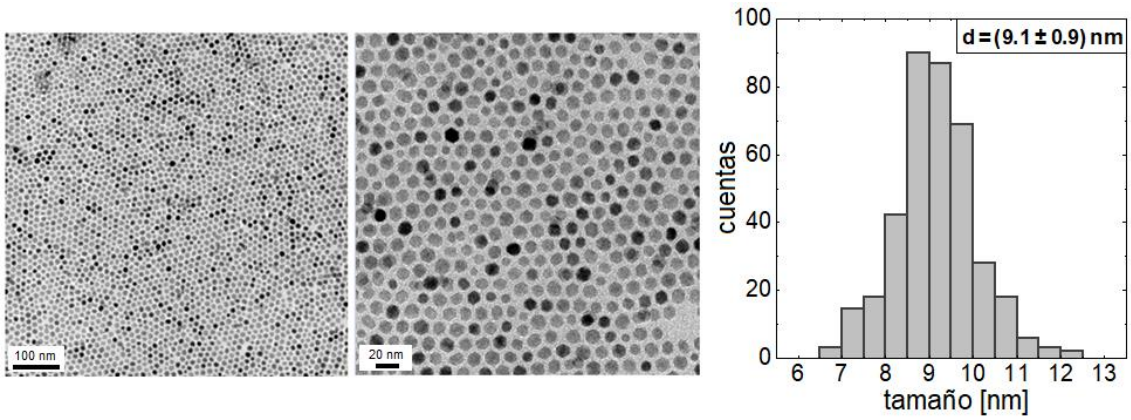


Figura 6.1.- a-b) Imágenes TEM con diferentes magnificaciones, y c) histograma de la distribución estadística de tamaños de las MNPs de óxido de hierro esféricas resultantes de una síntesis típica.

Con el objetivo de modificar las características físico-químicas de las MNPs y obtener sistemas con una mayor potencia magnética, se han ensayado dos estrategias diferentes: la preparación de MNPs de óxido de hierro de mayor tamaño dentro del rango superparamagnético y el dopaje de MNPs de óxido de hierro con zinc.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

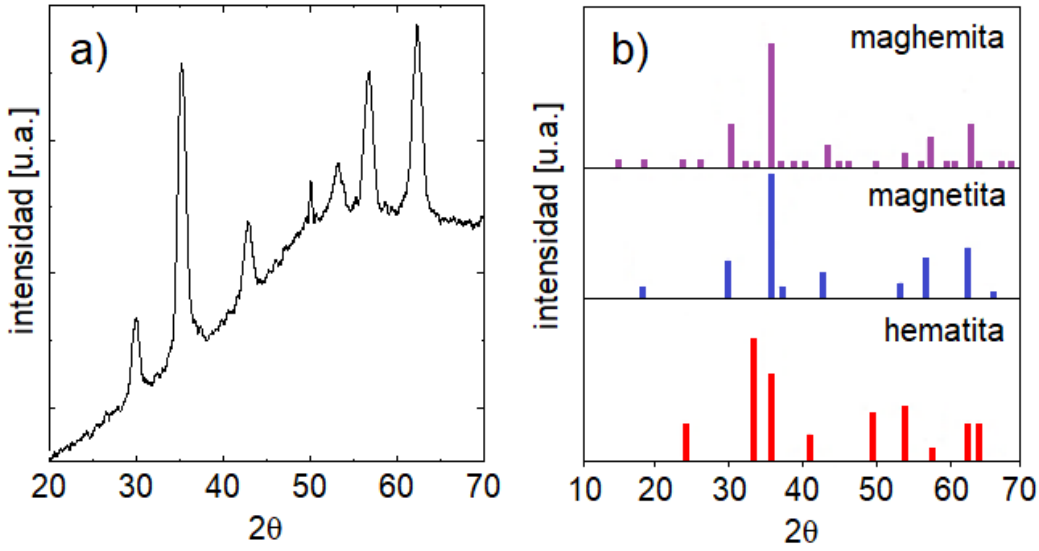


Figura 6.2.- a) Difractograma de rayos X de las MNPs de óxido de hierro esféricas resultantes de una síntesis típica. b) Posiciones típicas de los picos en los espectros de XRD de diferentes formas de óxido de hierro: maghemita, magnetita y hematita.

De cara a variar el tamaño de las MNPs, se ha estudiado cómo afecta a la formación de las partículas con la variación de la concentración del precursor férrico, $Fe(acac)_3$. Esta concentración se ha modificado variando el volumen de éter bencílico utilizado en la síntesis, manteniendo invariantes las cantidades de precursor férrico y de los agentes estabilizantes y reductores (ácido oleico, oleilamina y 1,2-hexadecanediol) que se emplearon en la síntesis típica. A fin de obtener MNPs con un mayor tamaño, aparte de la concentración de 150 mM empleada en dicha síntesis típica (3 mmol de precursor en 20 ml de éter bencílico), se ensayó una concentración de 300 mM disminuyendo, para ello, el volumen de éter bencílico a 10 ml. De este modo, se observó que el tamaño de las MNPs aumenta al incrementar la concentración de $Fe(acac)_3$ en la disolución precursora, conservando intactas las características morfológicas de las partículas, presentando las nuevas MNPs un diámetro de 13.2 ± 1.0 nm (Figura 6.3 a-b). Se ve, por tanto, que la modificación de este parámetro nos ofrece la posibilidad de obtener MNPs con mayores tamaños.

Por otra parte, también está establecido que el dopaje de MNPs de óxido de hierro con zinc es una estrategia eficiente para incrementar la potencia magnética de las partículas. Bajo este enfoque, se ha estudiado la influencia de la substitución parcial del precursor de hierro por $Zn(acac)_2$ sobre las características físico-químicas de las MNPs obtenidas. Para ello, se sintetizaron MNPs usando como precursores metálicos 2.4 mmol de $Fe(acac)_3$ y 0.6 mmol de $Zn(acac)_2$, manteniendo invariantes las cantidades de los demás

USC DE COMPOSTELA

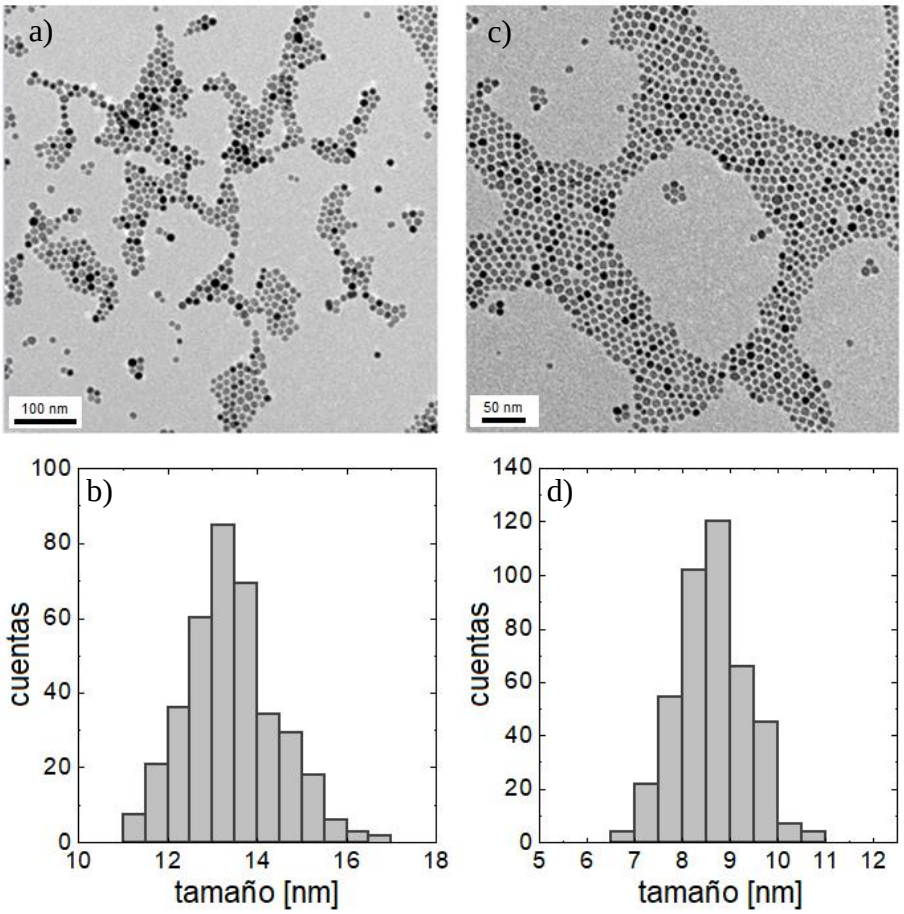


Figura 6.3.- Imágenes TEM e histogramas de las distribuciones estadísticas de tamaños de a-b) MNPs de óxido de hierro sintetizadas usando una concentración de $Fe(acac)_3$ de 300 mM y c-d) MNPs de óxido de hierro dopadas con zinc de composición $Zn_{0.3}Fe_{2.7}O_4$.

reactivos especificadas para una síntesis típica. Las MNPs obtenidas presentan la misma morfología esférica y el tamaño muy próximo a 9 nm que se había observado en las MNPs sin dopaje (Figura 6.3c-d). Sin embargo, las medidas de ICP-MS demuestran la incorporación de zinc en la estructura cristalina de las partículas, teniendo estas una composición estequiométrica de $Zn_{0.3}Fe_{2.7}O_4$.

El estudio de la respuesta magnética de las MNPs obtenidas anteriormente demuestra que tanto el aumento de tamaño de las partículas con la incorporación de átomos de zinc en su estructura cristalina son estrategias eficientes de cara a incrementar la magnetización de saturación de los sistemas magnéticos. Como se puede observar en la Figura 6.4a, las MNPs de óxido de hierro con un diámetro de ~9 nm resultantes de la llamada síntesis típica presentan un comportamiento totalmente superparamagnético a temperatura

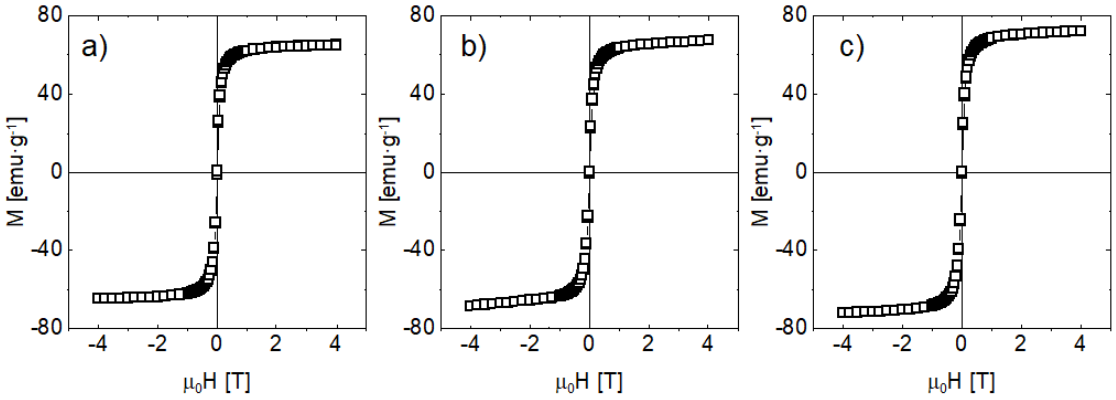


Figura 6.4.- Ciclos de histéresis magnética a 300 K de a) MNPs de óxido de hierro de ~9 nm, b) MNPs de óxido de hierro de ~13.2 nm y c) MNPs de composición $Zn_{0.3}Fe_{2.7}O_4$ de ~9 nm.

ambiente, alcanzando una magnetización de saturación de 66.1 emu·g^{-1}. Con los otros dos tipos de MNPs sintetizadas, las medidas de magnetometría muestran ligeros incrementos en la potencia magnética de las partículas. Así, las MNPs de óxido de hierro de 13 nm muestran una magnetización de saturación a temperatura ambiente de 67.1 emu·g^{-1}, lo que supone una mínima variación con respecto a la magnitud medida en las MNPs de 8 nm (Figura 6.4b). En las MNPs dopadas con zinc, en cambio, esta magnetización de saturación se incrementa hasta 74.1 emu·g^{-1}, lo cual supone un incremento notable con respecto a las MNPs de igual tamaño de óxido de hierro puro (Figura 6.4c). De esta forma, de las dos variaciones sintéticas previamente explicadas, el dopaje con zinc se demuestra como una estrategia más eficaz que el incremento de tamaño de cara a aumentar la potencia magnética de las partículas. Tal y como era de esperar debidos a los reducidos tamaños de partículas, estos dos sistemas presentan el mismo comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente observado en las MNPs de ~9 nm sin dopaje, con ciclos de histéresis de área despreciable en las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado (Figura 6.4 y Tabla 6.1).

Tabla 6.1.- Magnetizaciones de saturación (M_S), magnetizaciones remanentes (M_R) y campos coercitivos (H_C) de los tres sistemas de MNPs sintetizados obtenidos de sus ciclos de histéresis magnéticos.

	M_S [emu·g^{-1}]	**M_R [emu·g^{-1}]**	**H_C [mT]**
Fe_3O_4MNPs – 9.1 nm	66.1	0.8	1.5
Fe_3O_4MNPs - 13.2 nm	67.1	0.6	1.5
$Zn_{0.3}Fe_{2.7}O_4$MNPs- 8.9 nm	74.1	0.5	1.3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El incremento de la potencia magnética de las MNPs cuando se aumenta su tamaño se atribuye a que se reduce el porcentaje de átomos situados en lugares superficiales de las partículas, cuya contribución a la magnetización de las MNPs es menor que la de aquellos situados en las partes más internas de las nanoestructuras magnéticas, debido a efectos de borde. De este modo, la magnetización de saturación de las MNPs aumenta progresivamente con su tamaño hasta alcanzar valores máximos de la magnetita macroscópica.

Por su parte, el incremento de la magnetización de saturación al efectuar la substitución parcial del hierro por zinc está relacionado con la distribución de los átomos de este último elemento en la estructura cristalina de las MNPs. La estructura de espinela de las MNPs de magnetita consiste en una disposición de cationes Fe^{2+} y Fe^{3+}con ordenamiento ferrimagnético, situados en posiciones cristalográficas que pueden ser de dos tipos según su coordinación con los átomos de oxígeno: tetraédricas u octaédricas[15]. La celda unidad tiene un total de 8 átomos de hierro en posiciones tetraédricas y 16 en posiciones octaédricas, de modo que la estructura de la magnetita puede describirse de la forma $(Fe^{3+})^{tet}(Fe^{2+}Fe^{3+})^{oct}\ O_4$. Los momentos magnéticos de los cationes de Fe^{3+} en posiciones tetraédricas y octaédricas se cancelan, siendo la magnetización de las MNPs debida únicamente a los cationes Fe^{2+} situados en posiciones octaédricas[16]. La contribución positiva de los dopajes con zinc sobre las magnetizaciones de saturación de las MNPs proviene de la disposición de estos átomos metálicos en las posiciones tetraédricas de la estructura de espinela de las ferritas, generando una estructura de espinela normal. De esta forma, la presencia de este elemento dopante rompe la cancelación total entre los momentos de los cationes Fe^{3+} situados en posiciones tetraédricas y octaédricas; es decir, al sustituir parte del Fe^{3+} tetraédrico por zinc, la parte equivalente del Fe^{3+} octaédrico deja de sufrir el efecto de cancelación de su momento magnético. Esto se traduce en una contribución positiva a la magnetización de las MNPs, la cual da lugar a un incremento de las magnetizaciones de saturación a medida que se incrementa la cantidad de zinc presente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En los sucesivos experimentos que se llevarán a cabo se emplearán las MNPs de ~9 nm de composición $Zn_{0.3}Fe_{2.7}O_4$, dado que su mayor valor de magnetización permitirá proporcionar respuesta magnética a las microfibras poliméricas electrohiladas añadiendo menores cantidades de MNPs, así como su posterior manipulación remota utilizando campos magnéticos de menor intensidad, disminuyendo los riesgos biomédicos a nivel de toxicidad/seguridad asociados con el uso de altas concentraciones de MNPs y la aplicación de radiaciones magnéticas intensas. La alta potencia magnética de estas nanoestructuras dopadas con zinc se demostró cualitativamente aproximando un imán de neodimio a una disolución de MNPs en tolueno de concentración 2 $mg \cdot ml^{-1}$. Tal y como se puede observar en la secuencia de imágenes de la Figura 6.5, las MNPs, que inicialmente estaban homogéneamente dispersas en el disolvente, fueron rápidamente atraídas por el imán, precipitando completamente al cabo de apenas unos segundos.

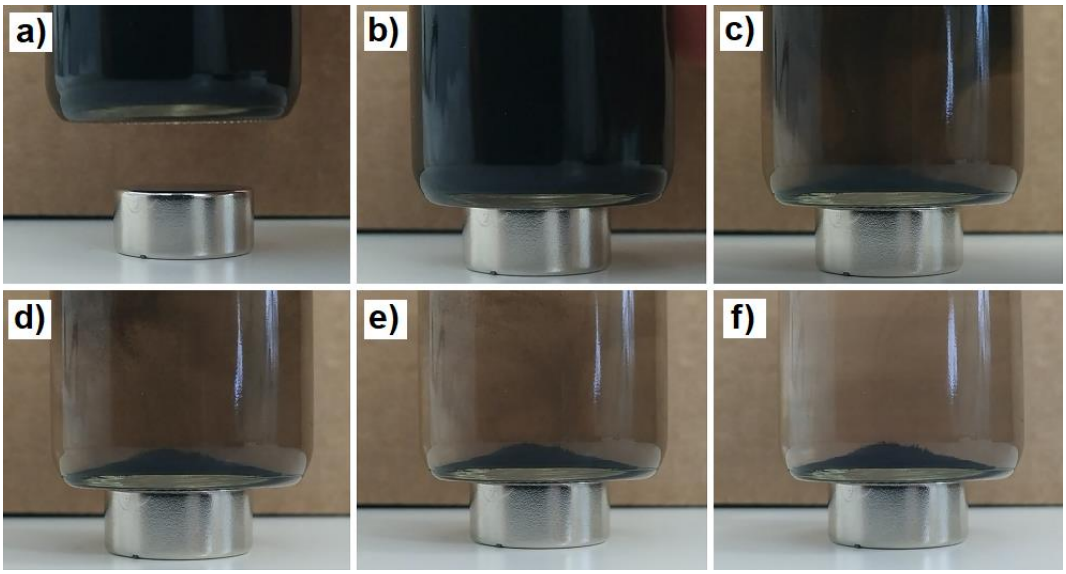


Figura 6.5.- Imágenes de una disolución de MNPs de composición Zn0.3Fe2.7O4 en presencia de un imán de neodimio. Las sucesivas imágenes se tomaron cada 3 s, demostrándose la alta potencia magnética de las partículas.

6.2 Diseño de microfibras electrohiladas con respuesta magnética

Las MNPs de óxido de hierro dopadas con zinc sintetizadas en al apartado anterior se emplearon para proporcionar respuesta magnética a fibras de policaprolactona electrohiladas, siguiendo el protocolo detallado en la sección 2.2.6. Se llevó a cabo una optimización de los parámetros de preparación de las microfibras, siendo necesario variar los mismos para obtener fibras homogéneas en función de la cantidad de MNPs incorporadas en la disolución precursora (Tabla 6.1).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Se prepararon fibras con tres cantidades diferentes de MNPs: 1, 5 y 10% (p/p) (porcentaje en peso con respecto a la masa de polímero). Manteniendo un flujo constante de 1 $ml \cdot h^{-1}$ y una distancia entre la punta de la aguja de la jeringa con la disolución de PCL+MNPs y la superficie colectora de 12.5 cm, fue necesario incrementar la diferencia de potencial de 11 a 11.5, 13.1 y 13.7 kV a medida que se incrementaba la cantidad de MNPs a 1, 5 y 10 % (p/p), respectivamente, para de esta forma lograr un proceso de electrohilado continuo y obtener fibras homogéneas. Esta necesidad de incrementar los voltajes para lograr procesos de electrohilado continuos cuando la cantidad de MNPs en las disoluciones precursoras es mayor se atribuye al aumento de viscosidad de las disoluciones cuando se incorporan las nanopartículas. Como se puede ver en la Figura 6.6, si los procesos de electrohilado se efectúan a voltajes menores que los anteriormente indicados, se interrumpe el proceso de hilado y se forman gotas en el colector. Dado la inclusión de las MNPs en la disolución polimérica precursora, se asume que estas se incorporan con un rendimiento del 100% en las fibras producidas.



Figura 6.6.- Muestra obtenida mediante un proceso de electrohilado utilizando una disolución de PCL con un 5% (p/p) de MNPs bajo una diferencia de potencial entre punta y colector de 11 kV (condición previamente optimizada para obtener membranas fibrosas de PCL sin MNPs). El proceso de electrohilado fue discontinuo, formándose gotas de disolución precursora en el colector, y siendo necesario incrementar el voltaje a 13.1 kV para solucionar este problema.

Visualmente, las membranas poliméricas obtenidas presentaban un aspecto diferente en función de la cantidad de MNPs añadidas, variando desde un color blanco en el caso de las fibras de PCL sin MNPs hasta un color marrón oscuro cuando el porcentaje de MNPs incorporadas ascendía a un 10% (p/p) con respecto a la cantidad de PCL (Figura 6.7). En todos los casos, las imágenes de microscopía óptica demuestran la correcta formación de fibras durante los procesos de electrohilado y la elevada homogeneidad de estas (Figura 6.8).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

De cara a futuros ensayos, en los que las fibras híbridas se incorporarán dentro de hidrogeles poliméricos junto con células para tratar de generar nuevos sistemas híbridos con capacidad de regeneración tisular, se evaluó la posibilidad de dotar a las fibras

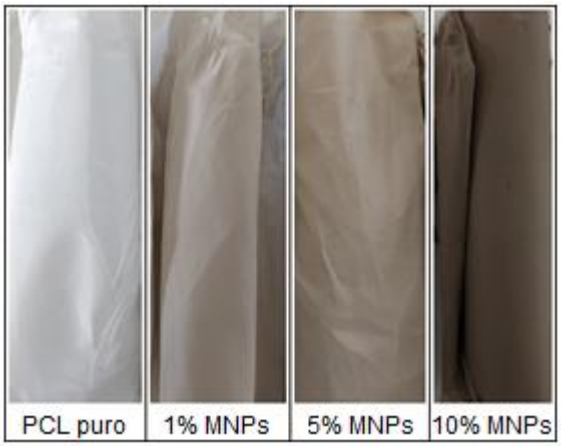


Figura 6.7.- Fotografías de las membranas de PCL electrohiladas incorporando diferentes cantidades de MNPs. El color de las membranas es más oscuro cuando la concentración de partículas en las mismas es mayor.

magnéticas con respuesta fluorescente, característica que permitiría una mejor observación conjunta de ambos tipos de estructuras mediante técnicas como la microscopía confocal. Para ello, se evaluó la adición de dos compuestos diferentes en la disolución precursora utilizada para la producción de las fibras mediante la técnica de electrohilado: isotiocianato de rodamina B y fluoresceinamina isómero I. Debido a la solubilidad de estos compuestos, ambos fueron disueltos en DMF previamente a la preparación de la disolución polimérica precursora, en ambos casos a una concentración de 0.1% p/p respecto a la masa de polímero (PCL). Las disoluciones con las sondas fluorescentes se protegieron de la luz solar durante todo el proceso de preparación de las fibras poliméricas. Tal y como se puede ver en la Figura 6.9, la síntesis de microfibras modificadas con rodamina proporcionó unos resultados más satisfactorios, observándose el compuesto fluorescente completamente incorporado en la estructura de las microfibras. En el caso de la fluoresceinamina, sin embargo, esta no se incorpora totalmente en las fibras poliméricas, pudiendo verse en las imágenes muchas microestructuras sin la respuesta fluorescente deseada y gran parte de la sonda fluorescente localizada fuera de las mismas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

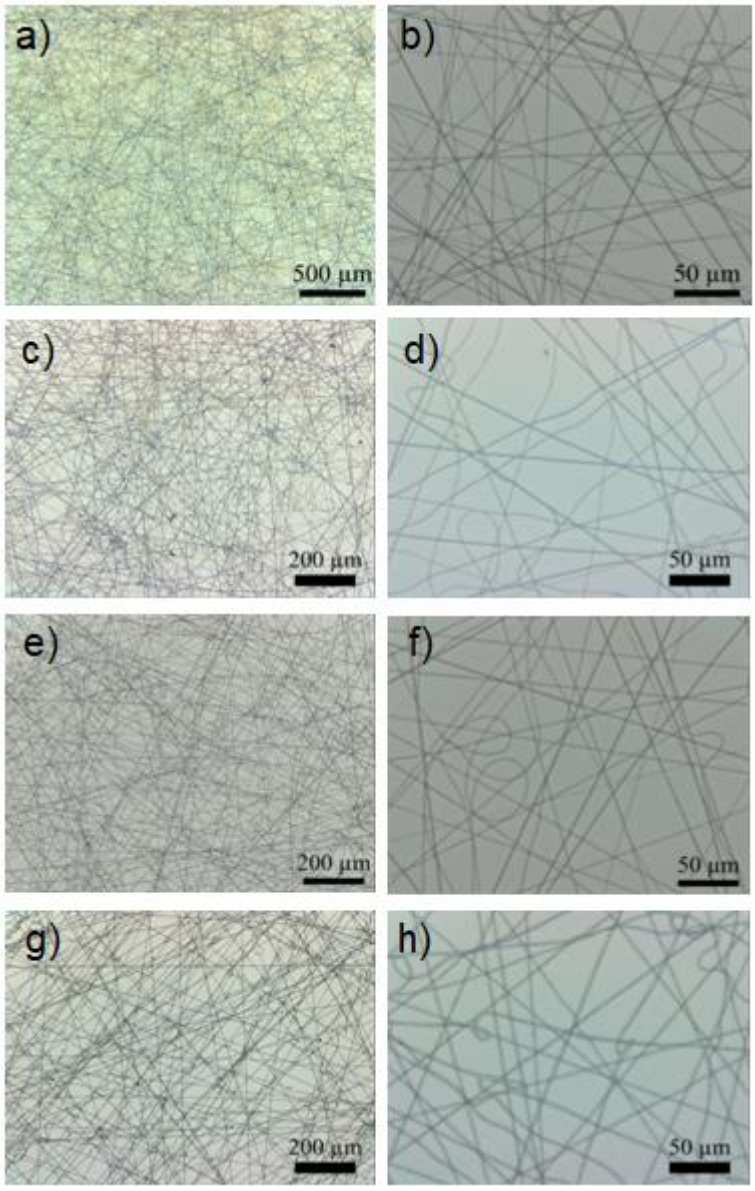


Figura 6.8.- Imágenes de microscopía óptica obtenidas a diferentes magnificaciones de las membranas fibrosas de PCL con una concentración de MNPs de a-b) 0%, c-d) 1%, e-f) 5% y g-h) 10% (p/p).

Este ensayo demuestra, por tanto, que la incorporación de rodamina es una estrategia eficiente de cara a dotar a las microfibras con respuesta fluorescente y permitirá una monitorización de los procesos de alineamiento magnético de manera efectiva, además de ayudar a una co-localización en el momento en el que se incorporen sistemas celulares a estos andamios magnéticos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

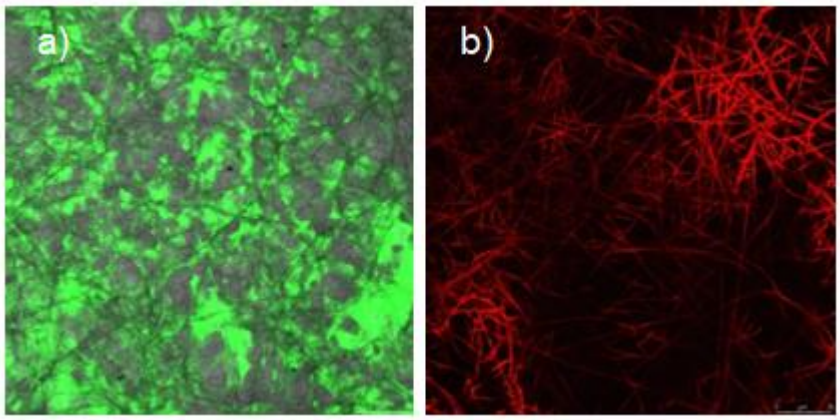


Figura 6.9.- Imágenes de microscopía confocal de fibras de PCL - 5% (p/p) MNPs electrohiladas modificadas con a) fluoresceinamina (verde) y b) rodamina (rojo). Se observa una mejor incorporación de este último compuesto en la estructura interna de las microestructuras magnéticas.

Por otro lado, a fin de evaluar la correcta incorporación de las MNPs en la estructura de las fibras poliméricas, se llevó a cabo la caracterización magnética de las muestras con diferentes concentraciones magnéticas mediante la determinación de sus ciclos de histéresis a temperatura ambiente, a semejanza de cómo se hizo con las partículas en apartados anteriores. Tal y como era de esperar, las fibras de PCL-MNPs muestran una respuesta magnética de una intensidad proporcional a la cantidad de material magnético incorporado en las mismas. De este modo, las fibras con un 1% p/p de MNPs presentan una magnetización de saturación de aproximadamente 0.7 emu·g^{-1}, valor próximo a la centésima parte de la magnetización de saturación medido para las MNPs antes de su incorporación en las fibras. Esta relación de proporcionalidad también se mantiene de forma aproximada en el caso de las fibras con cantidades relativas de MNPs de un 5 y un 10% (p/p), alcanzando saturaciones de 3.5 y 6.8 emu·g^{-1}, respectivamente. Por otra parte, todos los sistemas híbridos sintetizados presentan un comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente, esto es, magnetizaciones remanentes y campos coercitivos prácticamente nulos (Figura 6.10 y Tabla 4). Este resultado también está en consonancia con las medidas magnéticas de las MNPs efectuadas previamente, en las que se demostraba su comportamiento superparamagnético, el cual no cambia al ser incorporadas en el seno de las fibras poliméricas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

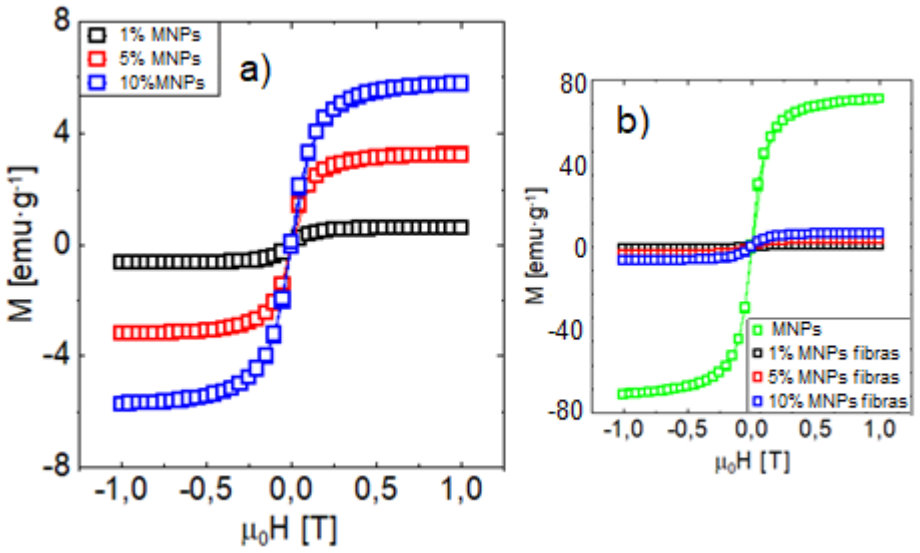


Figura 6.10.- a) Ciclos de histéresis magnética a 300 K de las fibras de PCL electrohiladas con diferentes concentraciones de MNPs: 1% (curva negra), 5% (curva roja) y 10% (p/p) (curva azul). c) Comparativa de los ciclos de histéresis de las fibras magnéticas con el de las MNPs previamente a su incorporación en la estructura de las fibras poliméricas (curva verde).

Tabla 6.2.- Magnetizaciones de saturación (M_S), magnetizaciones remanentes (M_R) y campos coercitivos (H_C) de las fibras de PCL electrohiladas con diferentes concentraciones de MNPs, obtenidos de sus ciclos de histéresis magnéticos.

	M_S [emu·g^{-1}]	M_R [emu·g^{-1}]	H_C [mT]
Fibras PCL-1% MNPs	0.7	0.01	1.0
Fibras PCL-5% MNPs	3.5	0.05	1.9
Fibras PCL-10% MNPs	6.8	0.06	1.9

Una vez caracterizadas las fibras poliméricas con diferente respuesta magnética en función de la cantidad de MNPs incorporadas, se llevó a cabo un proceso de micro-corte para lograr fibras de longitudes micrométricas para después poder ser incorporadas dentro de hidrogeles y alineadas magnéticamente para dirigir la adhesión, proliferación y/o diferenciación celular. Básicamente, tal y como se ha explicado en la 2.2.6, las membranas fibrosas se encapsularon dentro de bloques de OCT y se congelaron a -20ºC, procediendo posteriormente al corte de estos bloques en láminas de distintos espesores haciendo uso de un micrótomo-criostato. Finalmente, se aplicaron pulsos de ultrasonidos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

para separar las fibras individuales de estos microcortes de las membranas. En base a trabajos previos y fundamentándonos en las dimensiones aproximadas de las estructuras celulares, decidimos ensayar dos tamaños de corte, 20 y 50 µm, utilizando las membranas de PCL sin MNPs para efectuar los ensayos preliminares.

Tal y como se puede observar en la Figura 6.11, después de los procesos de corte y redispersión las fibras cortadas con un espesor de 50 µm en el micrótomo presentan un aspecto altamente homogéneo. Sin embargo, en las membranas cortadas con un espesor de 20 µm se pueden ver abundantes agregados de fibras, resultando en muestras con un menor grado de homogeneidad. Este fenómeno lo atribuimos a las características del proceso de corte en el micrótomo-criostato, en el cual cuando los bloques de OCT se cortan a espesores muy reducidos las láminas cortadas sucesivamente tienden a doblarse y agregarse entre ellas. Se llevó a cabo una determinación estadística de la longitud promedio de las fibras cortadas, obteniendo un valor promedio de 72 ± 16 µm y 58 ± 28 µm para las fibras obtenidas en procesos de corte con espesores de 50 µm y 20 µm, respectivamente (Figura 6.12). La elevada incertidumbre calculada en la longitud de las fibras cortadas a menor espesor confirma la baja homogeneidad de esta muestra. El hecho de que esta longitud promedio de las fibras sea mayor que el espesor de corte de las membranas preparadas mediante electrohilado se debe a la orientación aleatoria de las fibras dentro de estas membranas. De este modo, si las fibras incorporadas dentro de los bloques de OCT no están orientadas en la dirección perpendicular a la dirección de corte,

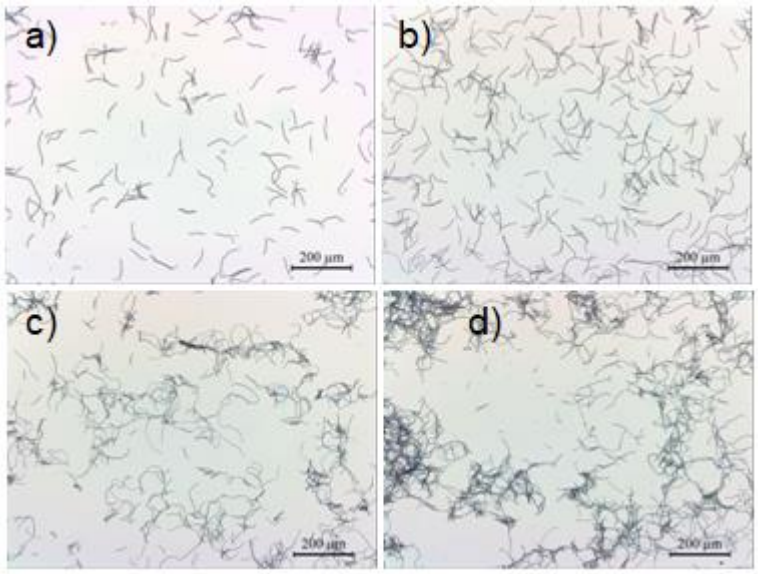


Figura 6.11.- Imágenes de microscopía óptica de las fibras de PCL tras los procesos de microcorte y redispersión aplicando espesores de corte en el micrótomo-criostato de a-b) 50 µm y c-d) 20 µm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

su longitud siempre resultará ligeramente mayor que el espesor de corte establecido. En base a los resultados obtenidos, en los sucesivos experimentos utilizaremos las fibras obtenidas empleando un espesor de corte en el micrótomo de 50 µm.

Este proceso de microcorte y redispersión ensayado en las membranas fibrosas de PCL también se efectuó en las fibras poliméricas modificadas con diferentes cantidades de material magnético preparadas en apartados anteriores. Como se ha comentado, en este caso solo se analizaron espesores de corte en el micrótomo-criostato de 50 µm, en vista de la elevada homogeneidad de las muestras obtenidas bajo esta condición. Tal y como se puede ver en la Figura 6.13, en todos los casos las fibras magnéticas obtenidas presentan características similares a nivel morfológico, con un aspecto altamente homogéneo y longitudes en torno a 70 µm (Figura 6.14).

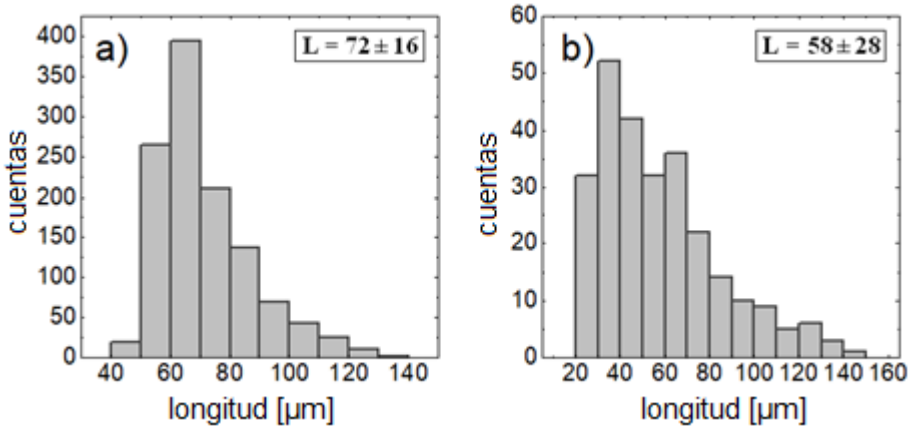


Figura 6.12.- Distribuciones estadísticas de las longitudes de las fibras de PCL obtenidas bajo espesores de corte en el micrótomo-criostato de a) 50 µm y b) 20 µm. El alto grado de polidispersidad de las fibras cortadas a 20 µm se corrobora al observar la elevada anchura de la distribución estadística, lo que da lugar a una muy alta desviación estándar del valor de longitud promedio.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

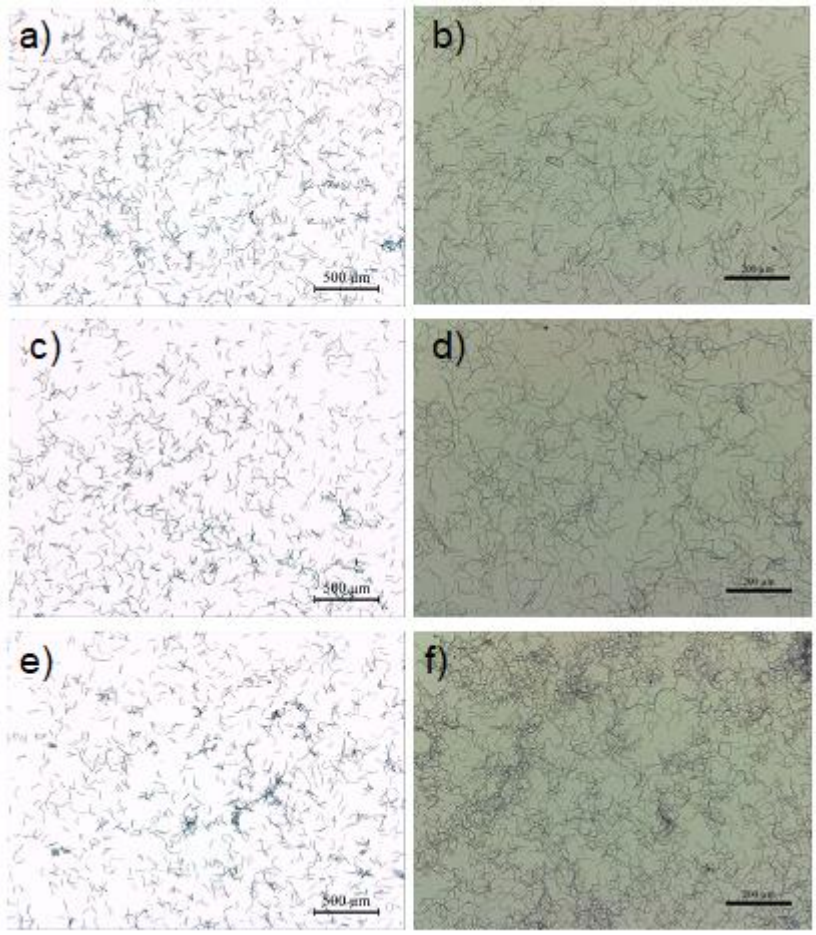


Figura 6.13.- Imágenes de microscopía óptica a diferentes magnificaciones de las fibras magnéticas tras los procesos de microcorte a 50 µm y redispersión; a-b) fibras PCL-1% MNPs, c-d) fibras PCL-5% MNPs y e-f) fibras PCL-10% MNPs.

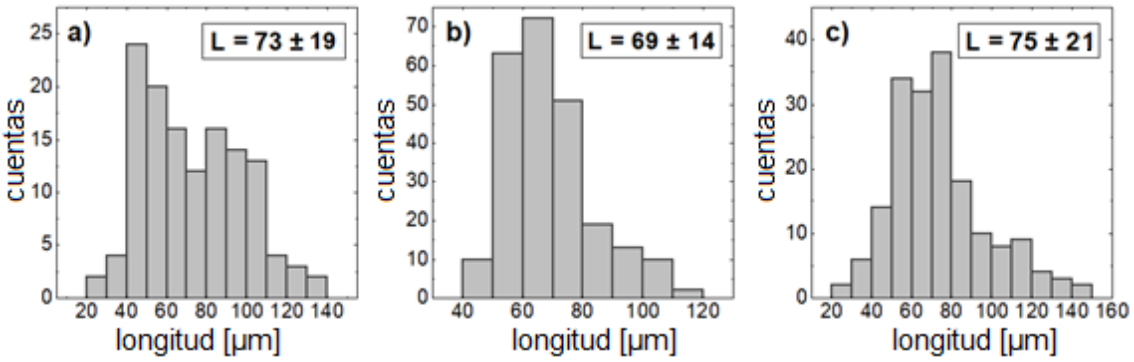


Figura 6.14.- Distribuciones estadísticas de las longitudes de las fibras magnéticas cortadas a 50 µm en el micrótomo con concentraciones de MNPs de a) 1%, b) 5% y c) 10% p/p.

6.3 Diseño de partículas de PLGA modificadas con MNPs

Como estrategia alternativa a la preparación de microfibras electrohiladas con respuesta magnética, también se sintetizaron partículas poliméricas de PLGA modificadas con MNPs para, posteriormente, ser utilizadas como rellenos en hidrogeles poliméricos y proveer a los mismos con estructura anisotrópica a través de la aplicación de campos magnéticos externos.

Las partículas de PLGA con carga magnética se sintetizaron mediante un proceso de emulsión siguiendo el protocolo expuesto en la sección 2.2.5. Se utilizaron, al igual que se hizo en el caso de las microfibras electrohiladas, las MNPs de óxido dopadas con zinc como nanoelementos para proporcionar respuesta magnética a las estructuras híbridas gracias a la ya comentada mayor magnetización de saturación de este tipo de nanopartículas. De este modo, se obtuvieron partículas de PLGA con diferentes cantidades relativas de MNPs: 5, 10, 25 y 50% (p/p) - porcentaje en peso de la masa de MNPs con respecto a la masa de PLGA. Es necesario hacer notar que en la última preparación ensayada con la cantidad más alta de MNPs se observó una pequeña cantidad de material magnético precipitado después del proceso de sonicación de la disolución de PLGA-MNPs. Se efectuaron diversas síntesis aumentando ligeramente el tiempo de sonicación de la muestra que no evitaron la aparición de esta precipitación, de lo que se deduce que la estrategia desarrollada no permite una incorporación de las estructuras magnéticas dentro de las partículas de PLGA superior al 50% (p/p).

Tal y como se puede ver en las imágenes de SEM, las partículas de PLGA obtenidas presentan en todos los casos un alto grado de monodispersidad y una forma esférica bien definida. La incorporación de las diferentes cantidades relativas de MNPs no afecta de forma significativa a al tamaño y morfología de las nanopartículas poliméricas híbridas, observándose en los cuatro tipos de partículas preparadas una forma esférica, presentando todas ellas un diámetro promedio de 130-140 nm (Figuras 6.15-6.16).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

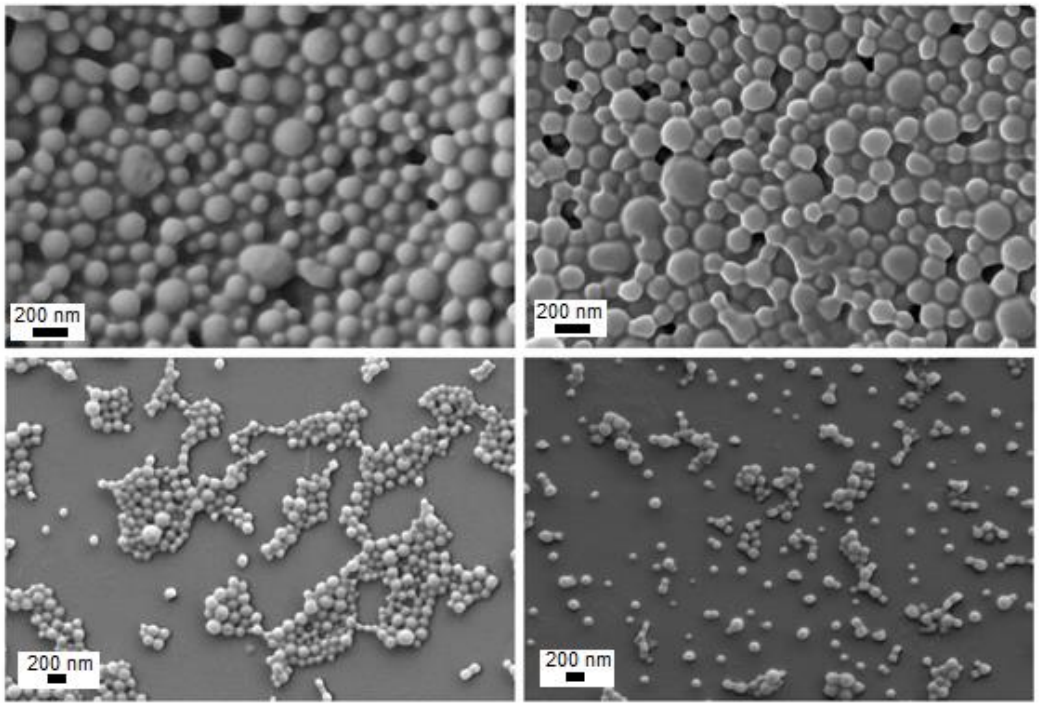


Figura 6.15.- Imágenes de SEM a diferentes magnificaciones de las partículas de PLGA con cantidades relativas de MNPs incorporadas de a) 5%, b) 10%, c) 25 y d) 50% p/p.

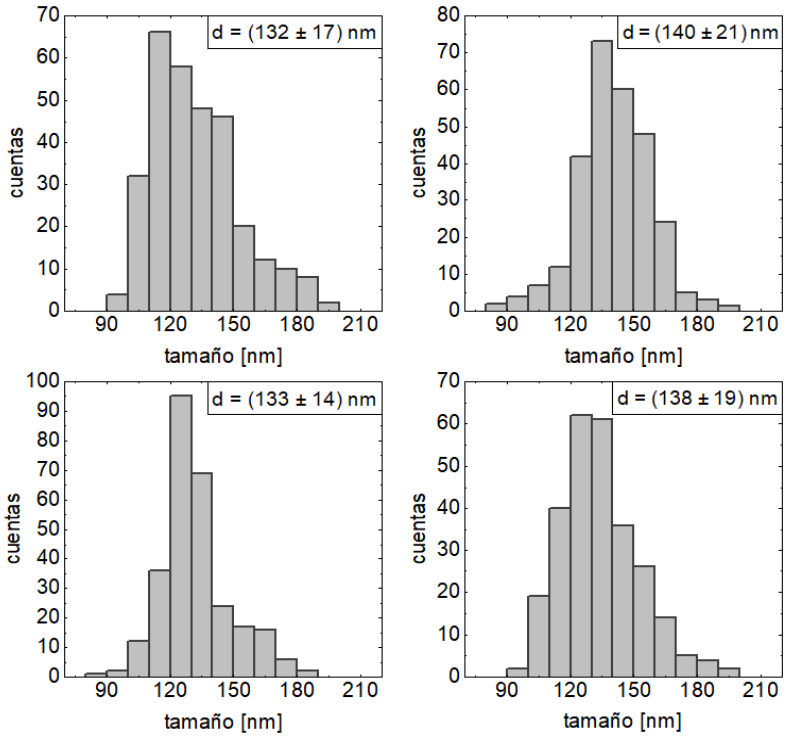


Figura 6.16.- Distribuciones estadísticas de los diámetros de las partículas de PLGA con cantidades relativas de MNPs incorporadas de a) 5%, b) 10%, c) 25 y d) 50% p/p.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por otra parte, las nanopartículas híbridas sintetizadas también fueron caracterizadas mediante medidas de DLS a fin de obtener su diámetro hidrodinámico y evaluar la hipotética agregación de las partículas constituyentes. En este caso, dado que en las imágenes de microscopía se observa que todas las partículas híbridas preparadas presentan dimensiones muy similares independientemente de la cantidad de MNPs incorporadas, tan solo se estudió a modo de ejemplo el sistema de partículas de PLGA modificadas con un 10% (p/p) de MNPs. En la Figura 6.17 se muestra la distribución estadística de los tamaños hidrodinámicos de las partículas. Se observa en esta Figura que la distribución de tamaños presenta un solo pico bastante estrecho, lo cual confirma la existencia de una sola población de partículas con un alto grado de monodispersidad y sin problemas relevantes de agregación. El valor promedio del tamaño hidrodinámico obtenido es de 225 ± 58 nm, el cual es compatible con los tamaños previamente determinados a partir de las imágenes de SEM e indicativo, nuevamente, de un bajo grado de agregación de las partículas híbridas. Nótese que, además del tamaño del corazón PLGA-MNPs de las partículas, hay que considerar el recubrimiento con el agente surfactante utilizado para la estabilización de las mismas (PVA). Por otro lado, debe tenerse en cuenta que, al encontrarse los sistemas de partículas en disolución acuosa, se produce un fenómeno de estiramiento de las cadenas hidrófilas de PVA, lo que da pie a un aumento de varios nanómetros en los valores del tamaño hidrodinámico. En base a todo ello, se puede concluir que la medida de DLS efectuada es altamente consistente con el hecho de que las partículas híbridas preparadas son altamente monodispersas en disolución acuosa.

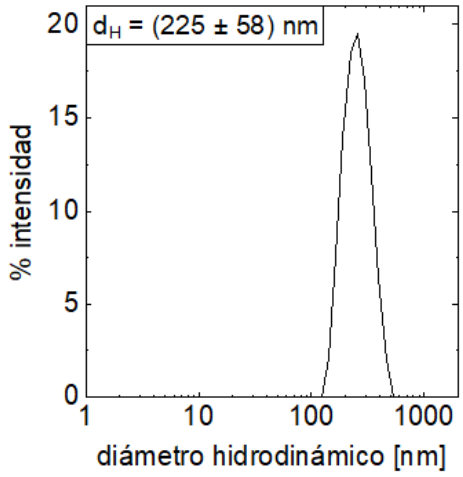


Figura 6.17.- Distribución estadística de los tamaños hidrodinámicos de las partículas híbridas de PLGA con un 10% (p/p) de MNPs, como ejemplo, determinada mediante medidas de DLS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La leve atracción inducida cuando se aproxima un imán a las partículas sintetizadas anteriormente nos indica de forma preliminar la correcta incorporación de las MNPs dentro de las de PLGA. De cara a confirmar la formación de las partículas híbridas y la forma en que las MNPs se distribuyen dentro de las partículas poliméricas se efectuó un análisis mediante TEM. Las imágenes de microscopía electrónica obtenidas demuestran

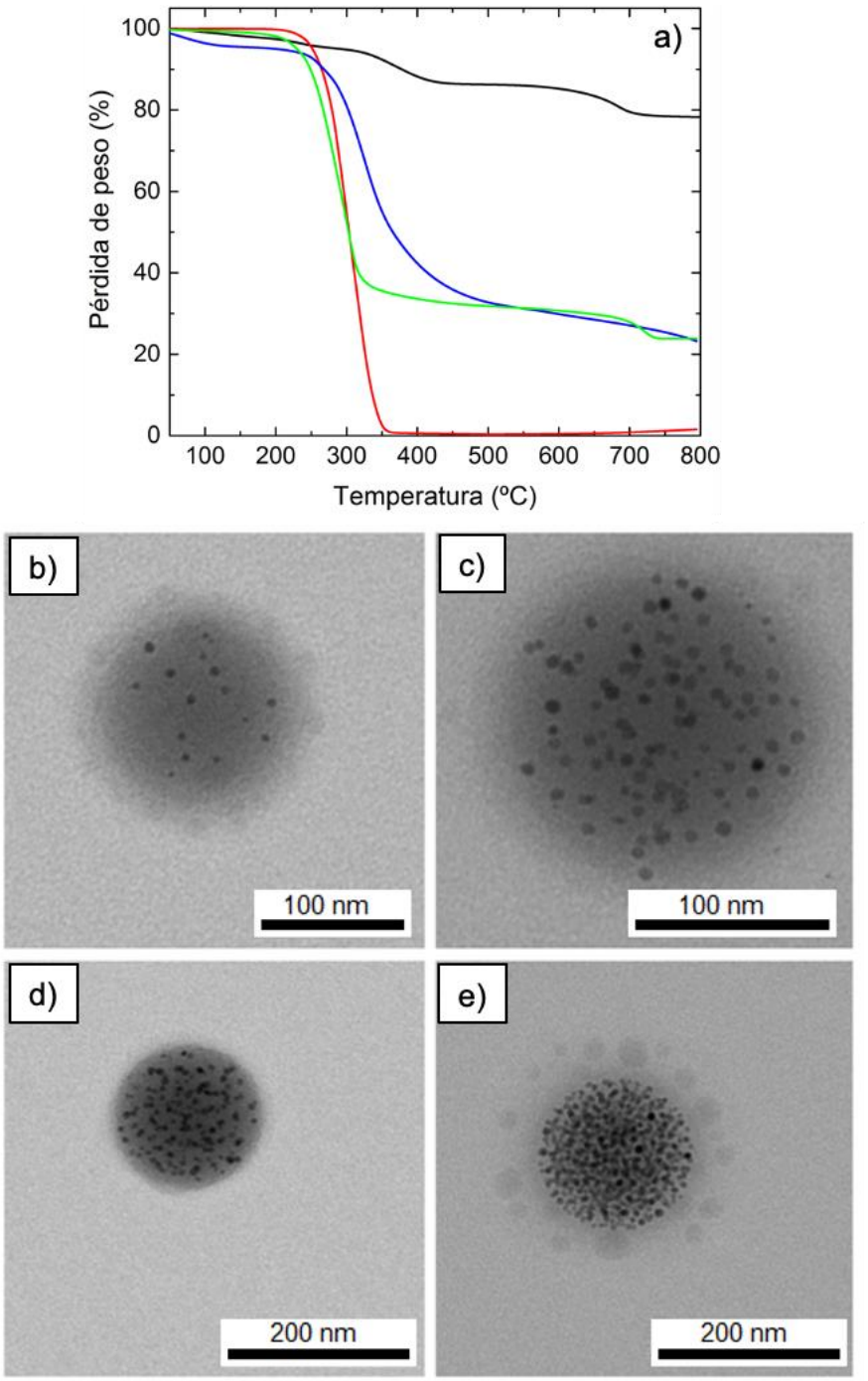


Figura 6.18.- a) Curvas de TGA de MNPs (—), NPs de PLGA (—), NPs MNPs@PLGA (—) y NPs MNPs@PLGA introducidas en hidrogel de gelatina (—), con una carga inicial de MNPs del 50% (w/w). Imágenes de TEM de las partículas de PLGA con cantidades relativas iniciales de MNPs incorporadas de b) 5%, c) 10%, d) 25 y e) 50% (p/p).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que el protocolo desarrollado permite la preparación de partículas poliméricas con MNPs incorporadas en su seno y distribuidas de forma altamente homogénea (Figura 6.18). Además, tal y como se esperaba, también se comprueba que la densidad de MNPs en el interior de las partículas de PLGA aumenta a medida que se incrementa la cantidad de MNPs empleadas en la disolución precursora. Las medidas de TGA confirman este comportamiento (Figura 6.18a), comprobándose que la proporción de material magnético incorporada efectivamente respecto a la inicial adicionada en el seno de los andamios con las Nps MNPs@PLGA es del 100%, 100%, 87% y 69% para las composiciones relativas iniciales de MNPs incorporadas de a) 5%, b) 10%, c) 25 y d) 50% (p/p), respectivamente.

Finalmente, de igual forma que se procedió en apartados anteriores con las microfibras electrohiladas de PCL con MNPs incorporadas, se llevó a cabo la caracterización magnética de las partículas híbridas sintetizadas a través del análisis de sus curvas de magnetización frente al campo magnético aplicado. Al igual que sucedía con las citadas microfibras, las partículas de PLGA modificadas con MNPs también muestran un comportamiento completamente superparamagnético a temperatura ambiente, es decir, presentan ciclos de histéresis con un área prácticamente nula cuando se representa la magnetización frente a campo magnético (Figura 6.19). Cabe recordar que estos valores despreciables de campo coercitivo y magnetización remanente, directamente derivados de los previamente determinados en las MNPs antes de su incorporación en las partículas de PLGA, permiten un mayor control magnético remoto sobre las estructuras magnéticas híbridas y previenen su agregación durante y tras la aplicación de campos magnéticos externos, característica de suma importancia de cara a la última aplicación que se pretende.

Por otra parte, y también a semejanza del comportamiento observado en las microfibras electrohiladas con respuesta magnética, las magnetizaciones de saturación medidas en los sistemas de partículas híbridas de PLGA-MNPs son proporcionales a la cantidad de material magnético incorporado (Figura 6.19 y Tabla 6.3). Así, por ejemplo, las partículas de PLGA modificadas con un 5 y un 10% (p/p) de MNPs presentan saturaciones de 3.4 y 6.6 emu·g^{-1}, que se corresponden de forma muy aproximada con los valores esperados en base a la magnetización de saturación de las MNPs puras (74.1 emu·g^{-1}) y a la cantidad de las mismas que se incorporó en las estructuras híbridas. En el caso de las partículas de PLGA en las que se incorporaron un 25% y un 50% (p/p) de MNPs las magnetizaciones de saturación son ligeramente menores de las esperadas, especialmente en este último

USC DE COMPOSTELA

caso (12.5 y 17.5 emu·g^{-1}, respectivamente). Este fenómeno está en consonancia con el hecho previamente comentado de que en la preparación de este tipo de partículas se

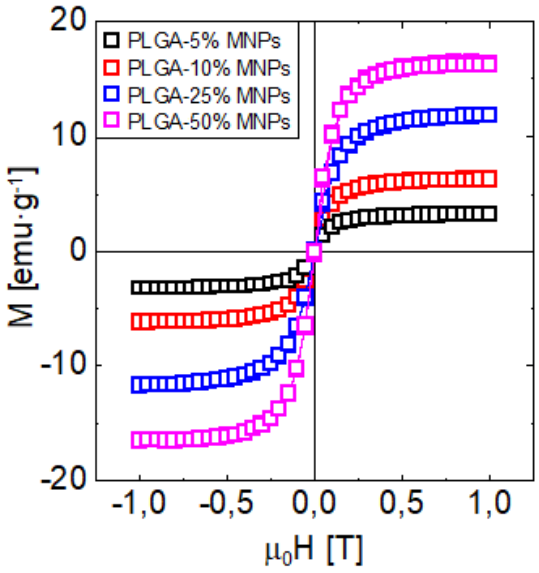


Figura 6.19.- a) Ciclos de histéresis magnética a 300 K partículas de PLGA con diferentes cantidades relativas de MNPs incorporadas: 5% (curva negra), 10% (curva roja), 25% (curva azul) y 50% p/p (curva rosa).

observaban MNPs precipitadas durante el proceso de síntesis de las Nps de PLGA, confirmándose así la incompleta incorporación de todas las MNPs dentro de las NPs poliméricas cuando la cantidad relativa de material magnético que se añade es elevada. A este respecto es necesario remarcar, por ejemplo, que en el caso de las nanopartículas de PLGA con un 50% (p/p) de MNPs la magnetización de saturación esperada, despreciando la masa del PVA usado para estabilizar las partículas híbridas, sería de ~24.7emu·g^{-1} (la saturación medida en las MNPs puras multiplicada por el cociente 50/150). Comparándolo con el valor determinado de forma experimental se concluye que en este caso concreto el porcentaje de MNPs que se encapsulan correctamente dentro de las partículas de PLGA es ligeramente superior al 70%. Este valor asciende a ~85% en las partículas de PLGA híbridas con un 25% (p/p) de MNPs, y es prácticamente del 100% en los sistemas con menores cantidades de material magnético.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6.3.- Magnetizaciones de saturación (M_S), magnetizaciones remanentes (M_R) y campos coercitivos (H_C) de las partículas de PLGA con diferentes cantidades relativas de MNPs incorporadas, obtenidos de sus ciclos de histéresis magnéticos.

	M_S [emu·g^{-1}]	M_R [emu·g^{-1}]	H_C [mT]
PLGA-5% MNPs	3.4	0.02	1.2
PLGA-10% MNPs	6.6	0.09	1.6
PLGA-25% MNPs	12.5	0.07	1.5
PLGA-50% MNPs	17.5	0.10	1.7

6.4 Generación de hidrogeles anisótropos a través de la incorporación y alineamiento remoto de estructuras híbridas con respuesta magnética

En este apartado se evaluará la incorporación de las estructuras híbridas polimérico-magnéticas preparadas anteriormente (microfibras electrohiladas de PCL y partículas de PLGA modificadas con MNPs) dentro de hidrogeles de gelatina, así como su posterior organización remota a través de la aplicación de campos magnéticos externos. El objetivo último es la obtención de hidrogeles con una arquitectura anisótropa uniaxial de cara a su potencial futura aplicación el ámbito de la ingeniería de tejidos.

Se evaluará en primer lugar, la incorporación de las microfibras híbridas electrohiladas, llevando a cabo, en este caso, un estudio detallado de las características de los campos magnéticos aplicados necesarios para lograr el alineamiento de las mismas dentro de los hidrogeles. Posteriormente, a pesar de las diferentes características de ambos tipos de estructuras híbridas, esta información sobre los estímulos magnéticos requeridos será utilizada como punto de partida para evaluar la potencial organización remota de las partículas de PLGA con respuesta magnética en el seno de los hidrogeles de gelatina.

6.4.1 Alineamiento remoto de microfibras electrohiladas de PCL-MNPs

USC DE COMPOSTELA

En los sucesivos experimentos para determinar el potencial de alineamiento magnético de las microfibras magnéticas dentro de hidrogeles de gelatina, se utilizarán de modo preliminar las fibras de PCL modificadas con un 5% p/p de MNPs. Sin embargo, como

ya se ha comentado previamente, se debe desarrollar un protocolo estandarizado que permita alcanzar un compromiso entre el empleo de la menor cantidad de material magnético y la aplicación de intensidades de campo magnético mínimas con el objetivo de reducir los potenciales riesgos biológicos que se pueden derivar de estos parámetros (toxicidad a corto, medio y largo plazo, respuestas inmunogénicas, *etc*). Por ello, en el momento de redacción de esta Tesis Doctoral estamos en proceso de realización de estos experimentos utilizando las fibras con las otras cantidades de MNPs preparadas anteriormente, 1% y 10% p/p.

Tal y como se expuso en la sección 2.2.8, los campos magnéticos se aplicaron haciendo uso de un sistema de dos imanes de neodimio dispuestos de forma paralela que, en función de la distancia entre los mismos, nos permitieron generar campos magnéticos desde 24 ± 3 hasta 638 ± 12 mT. Para evaluar el efecto del campo magnético sobre el comportamiento de las microfibras dentro de hidrogeles de gelatina, se prepararon disoluciones de fibras de PCL de concentración 0.05 mg ml^{-1} que se mezclaron con disoluciones de 10% (p/v) gelatina en un ratio 1:1 (v:v). Estas mezclas se efectuaron sobre un portamuestras de vidrio colocado entre los dos imanes paralelos, manteniendo en todo momento los sistemas a una temperatura de 37ºC, lo que aseguraba el estado líquido de la gelatina y permitía la movilidad de las fibras magnéticas. Después de ensayar diferentes intensidades y tiempos de aplicación del estímulo magnético, se indujo la gelificación de las muestras y la consecuente formación de los hidrogeles mediante un rápido descenso de la temperatura (muestras sometidas a 4ºC), permaneciendo las fibras con la orientación proporcionada por el campo magnético.

En el experimento control, en dónde las fibras fueron incorporadas dentro de un hidrogel pero no se aplicó ningún tipo de estímulo magnético, se puede ver que estas se distribuyen uniformemente a lo largo de la muestra polimérica sin ningún tipo de orientación (Figura 6.20). Sin embargo, cuando las disoluciones precursoras de los hidrogeles con microfibras

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

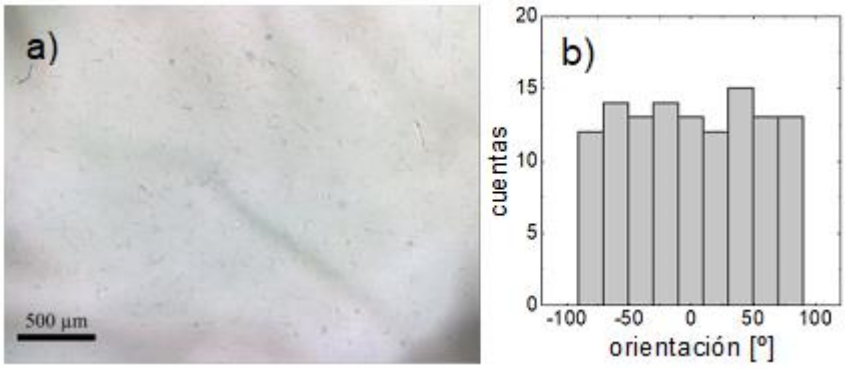


Figura 6.20.- a) Imagen de microscopía óptica de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de un hidrogel de gelatina en ausencia de campo magnético aplicado; y b) distribución estadística de la orientación angular de las fibras.

incorporadas se someten a un campo magnético externo, este orienta las fibras proporcionando a los hidrogeles una arquitectura altamente anisótropa. Como se puede observar en las Figuras 6.21-6.23 y en la Tabla 6.4, en la práctica total de los casos las fibras se alinean según la dirección del campo magnético y conservan esta orientación dentro de los hidrogeles de gelatina. Dentro de las condiciones ensayadas, solo cuando el campo aplicado tiene la intensidad mínima de las analizadas (24 ± 3 mT) y el tiempo de aplicación es inferior a 15s, las microfibras no se orientan adecuadamente en la dirección del campo magnético. En los demás casos, un porcentaje muy elevado de las microfibras magnéticas se orientan en la dirección del estímulo magnético externo aplicado.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

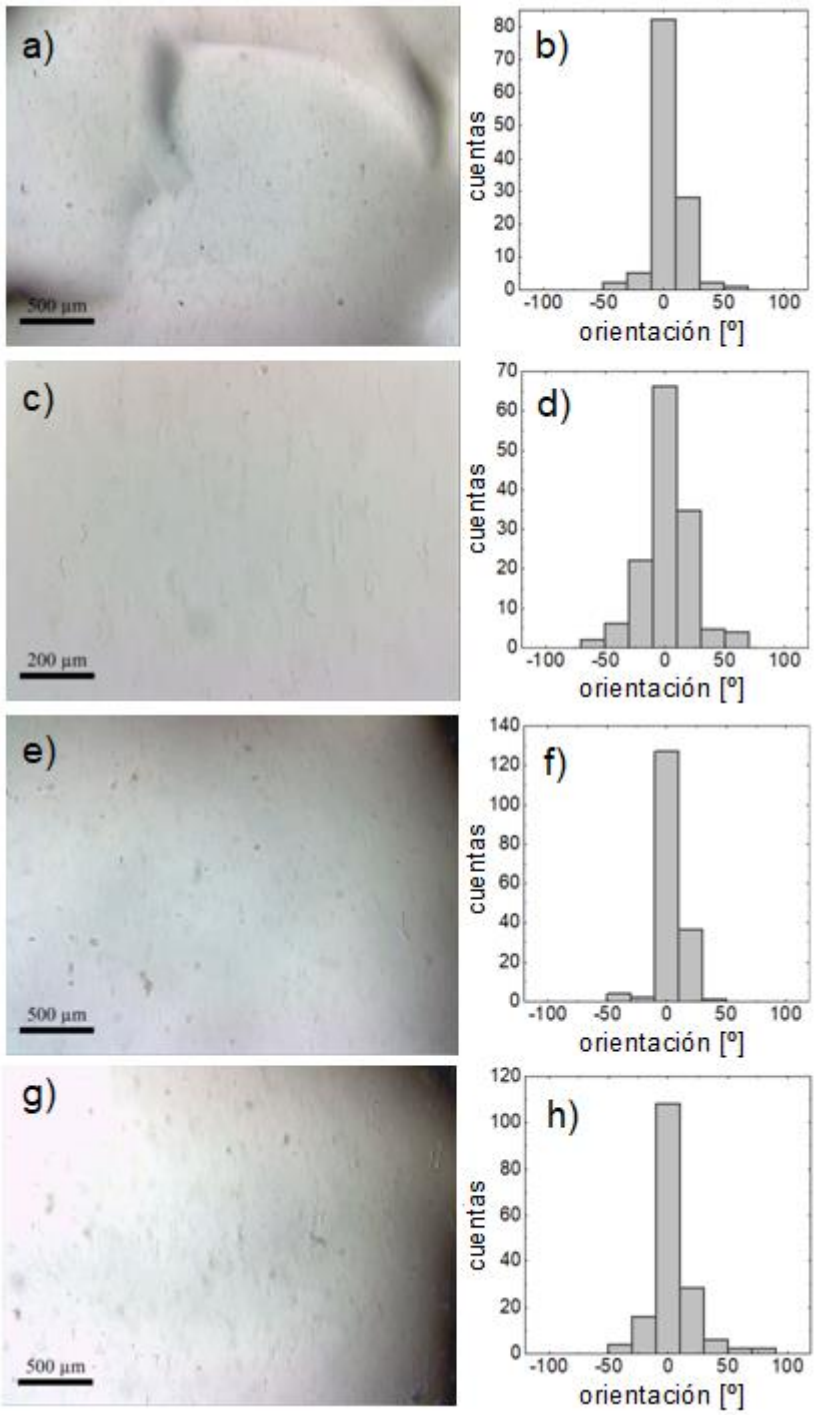


Figura 6.21.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de hidrogeles de gelatina, y distribución estadística de la orientación angular de las fibras (0º: orientadas según la dirección del campo, vertical en las imágenes) bajo estímulos magnéticos aplicados de a-b) 208 ± 9 mT-5 min, c-d) 126 ± 6 mT-5 min, e-f) 66 ± 7 mT-5 min, y g-h) 66 ± 7 mT-1 min.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

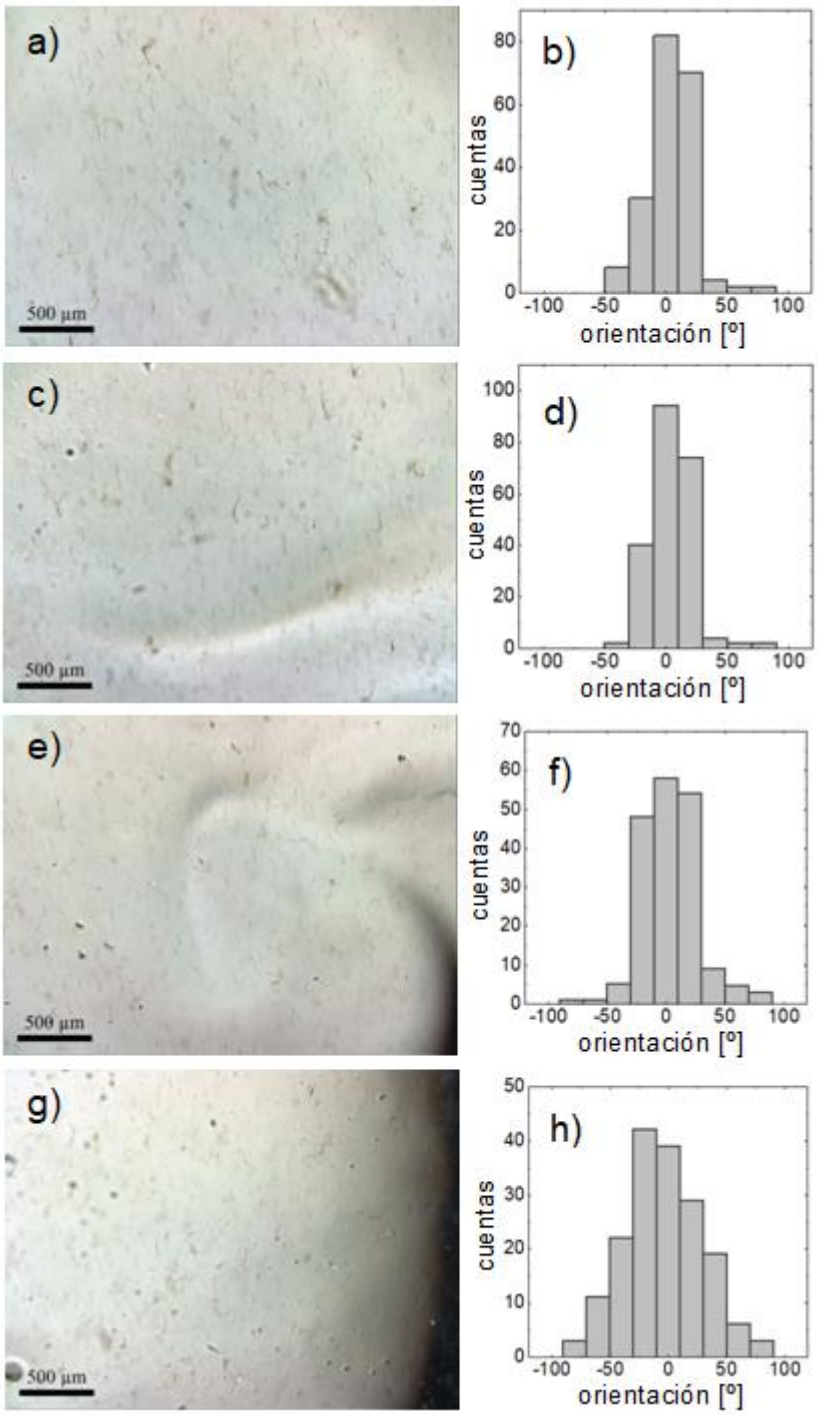


Figura 6.22.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de hidrogeles de gelatina, y distribución estadística de la orientación angular de las fibras (0º: orientadas según la dirección del campo, vertical en las imágenes) bajo estímulos magnéticos aplicados de a-b) 40 ± 4 mT-30 s, c-d) 24 ± 3 mT-2 min, e-f) 24 ± 3 mT-1 min y g-h) 24 ± 3 mT-30 s.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

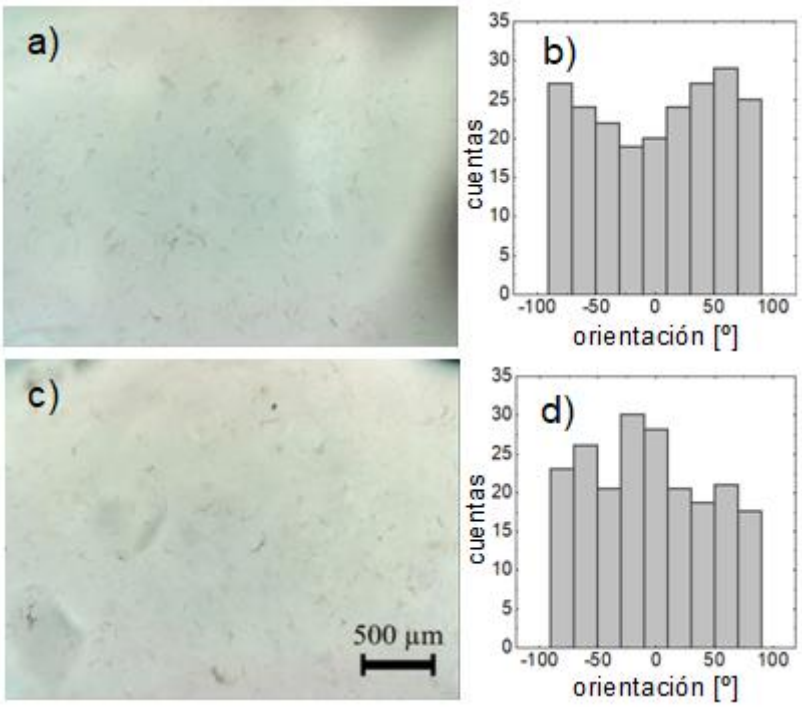


Figura 6.23.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de hidrogeles de gelatina, y distribución estadística de la orientación angular de las fibras (0º: orientadas según la dirección del campo, vertical en las imágenes) bajo estímulos magnéticos aplicados de a-b) 24 ± 3 mT-10 s y c-d) 24 ± 3 mT-5 s.

A pesar de resultar útil como prueba de concepto para evaluar el ordenamiento de las microfibras magnéticas en el seno de hidrogeles poliméricos, el uso de frío para inducir el entrecruzamiento y gelificación de la gelatina es una estrategia que no podría ser llevada a cabo cuando también se incorporen células en los andamios. En este caso, será necesario mantener las muestras a temperatura biológica de forma continua a fin de preservar la viabilidad de los sistemas celulares. A este respecto, para superar esta cuestión existen varias alternativas ya previstas como, por ejemplo, el entrecruzamiento de la gelatina a 37ºC inducido mediante la incorporación de un agente entrecruzante como la transglutaminasa, o bien, su modificación con grupos metacrilato como se ha hecho en capítulos anteriores para inducir su fotopolimeración mediante la aplicación de radiación UV.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6.4.- Compilación de los ensayos efectuados de alineamiento de las fibras magnéticas dentro de hidrogeles de gelatina bajo diferentes condiciones de campo magnético aplicado (0º: fibras orientadas según la dirección del campo).

Distancia imanes	Intensidad B [mT]	Tiempo B	% fibras orientadas				FIBRAS ALINEADAS
			<10º	**10º-30º**	**30º-50º**	**>50º**	
Control			11%	22%	24%	43%	**NO**
		15 min	69%	27%	3%	1%	**SI**
2.5 cm	208 ± 9	5 min	75%	22%	3%	-	**SI**
		1 min	47%	45%	4%	4%	**SI**
		15 min	49%	40%	7%	4%	**SI**
4.2 cm	126 ± 6	5 min	65%	27%	6%	2%	**SI**
		1 min	39%	56%	4%	1%	**SI**
		5 min	35%	54%	10%	1%	**SI**
6.0 cm	66 ± 7	1 min	47%	46%	6%	1%	**SI**
		30 s	45%	51%	4%	-	**SI**
7.7 cm	40± 4	1 min	53%	39%	7%	1%	**SI**
		30 s	41%	51%	6%	2%	**SI**
		2 min	43%	52%	3%	2%	**SI**
		30 s	33%	57%	8%	2%	**SI**
8.7 cm	24 ± 3	15 s	24%	41%	22%	13%	**MEDIO**
		10 s	12%	26%	21%	41%	**NO**
		5 s	9%	20%	23%	48%	**NO**

A modo de estudio preliminar, se replicó el protocolo expuesto anteriormente para preparar hidrogeles de gelatina cargados con microfibras magnéticas alineadas, pero en esta ocasión añadiendo además una cantidad de transglutaminasa de 20 U/g gelatina (20 ul de una disolución de transglutaminasa en agua de concentración 200 $mg \cdot ml^{-1}$). Tras esto, se permitió al sistema gelificar a 37ºC bajo un campo magnético externo aplicado de 24 mT, y demorando aproximadamente 10 min. en producirse la gelificación completa de la muestra. Tal y como se puede ver en la Figura 6.24, las fibras incorporadas en el hidrogel de gelatina entrecruzado usando esta estrategia también se observan completamente alineadas según la dirección del campo magnético aplicado, demostrándose la eficiencia de este enfoque para la creación de hidrogeles anisótropos en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

los que también pueden ser incorporadas células, dado que se mantuvo en todo momento la muestra a temperatura biológica.

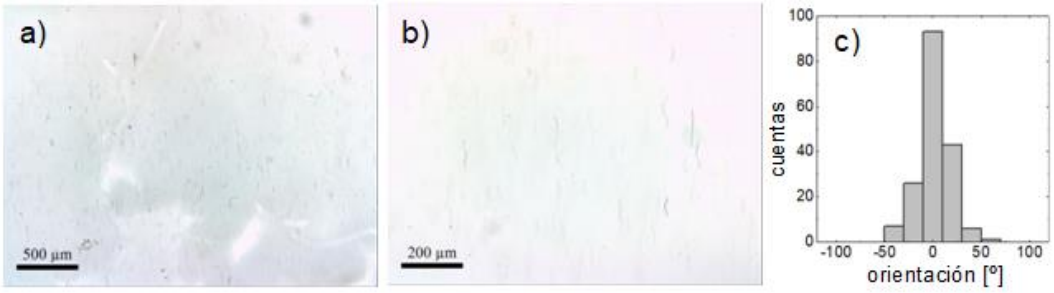


Figura 6.24.- a-b) Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de hidrogeles de gelatina entrecruzados con transglutaminasa bajo la aplicación de un campo magnético externo de 24 ± 3 mT, y c) distribución estadística de la orientación angular de las fibras (0º: orientadas según la dirección del campo, vertical en las imágenes).

6.4.1.1 Efecto de la densidad de microfibras magnéticas en los hidrogeles

Hasta el momento hemos establecido el tipo de nanopartículas magnéticas más adecuado en función de su respuesta magnética y estructura de entre las sintetizadas, así como la cantidad de MNPs necesaria para proveer a las fibras poliméricas electrohiladas con comportamiento magnético y las características de los campos externos requeridos para lograr el alineamiento de dichas fibras dentro de hidrogeles de gelatina. A continuación, vamos a relacionar la cantidad de fibras incorporadas dentro de los hidrogeles poliméricos con las interdistancias creadas entre ellas una vez alineadas. Esta distancia entre fibras es un parámetro fundamental de cara a, posteriormente, poder controlar el comportamiento de las células incorporadas dentro de los hidrogeles, pudiendo ejercer una importante influencia sobre su crecimiento, proliferación, diferenciación, *etc.* Como resulta intuitivo, en caso de que las fibras poliméricas híbridas tengan una separación entre ellas muy superior a las dimensiones de las células, la influencia que ejercerán sobre estas será mínima. En el caso opuesto, si la distancia entre fibras es considerablemente menor que el tamaño celular, esto podría revertir en efectos adversos en su viabilidad[17].

De este modo, en este apartado se sintetizarán hidrogeles de gelatina cargados con diferentes cantidades de fibras híbridas con el objetivo de lograr sistemas en los que las inter-distancias entre estas microestructuras magnéticas sean semejantes o ligeramente superiores a las dimensiones celulares típicas una vez orientadas uniaxialmente mediante la aplicación de campos magnéticos externos. Para ello, se prepararon disoluciones de

fibras magnéticas de concentraciones 0.04, 0.30, 0.80 y 1.50 mg·ml^{-1} (Figura 6.25). Siguiendo los protocolos previamente comentados, estas disoluciones se mezclaron en una razón volumétrica 1:1 con disoluciones de gelatina de concentración 10% p/v bajo el efecto de un campo magnético externo aplicado de 24 ± 3mT durante 30s. De este modo, los hidrogeles obtenidos después de inducir térmicamente el entrecruzamiento de la gelatina presentaban concentraciones de fibras de 0.02, 0.15, 0.40 y 0.75 mg·ml^{-1}.

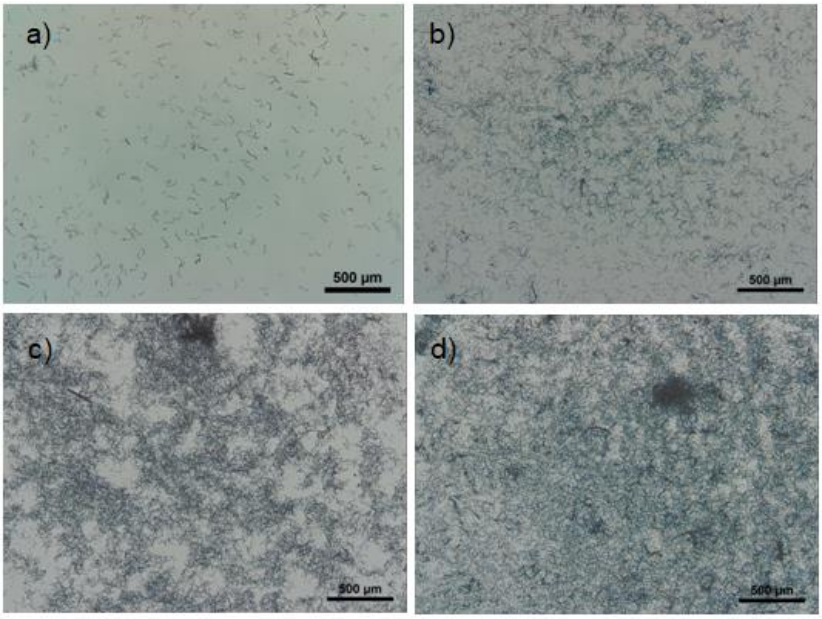


Figura 6.25.- Imágenes de microscopía óptica de las disoluciones de fibras magnéticas con concentración a) 0.04 mg·mL^{-1}, 0.30 mg·mL^{-1}, c) 0.80 mg·mL^{-1} y d) 1.50 mg·mL^{-1}.

En primer lugar, se puede observar que, a pesar de que en algunas de las muestras la cantidad de fibras es sensiblemente superior con respecto a la utilizada en los ensayos de optimización (recordemos, 0.10 mg·ml^{-1}), las fibras se alinean perfectamente dentro del seno de los hidrogeles debido al efecto del campo magnético externo. En lo que respecta a la densidad de fibras se observa que, tal y como era de esperar, la inter-distancia entre ellas es menor cuanto mayor es la cantidad de fibras incorporada en el hidrogel (Figuras 6.26-6.27). Así, en los hidrogeles con una concentración de 0.02 mg·ml^{-1} de microfibras magnéticas incorporadas la distancia promedio entre las mismas es de casi 80 µm, descendiendo este valor hasta apenas 20 µm cuando la concentración se aumenta a 0.75 mg·ml^{-1} (Figuras 6.28-6.29). De este modo, comprobamos que el protocolo desarrollado permite la creación de hidrogeles de gelatina con una estructura anisótropa uniaxial controlada, pudiendo establecer la distancia entre fibras mediante variaciones en las concentraciones añadidas.

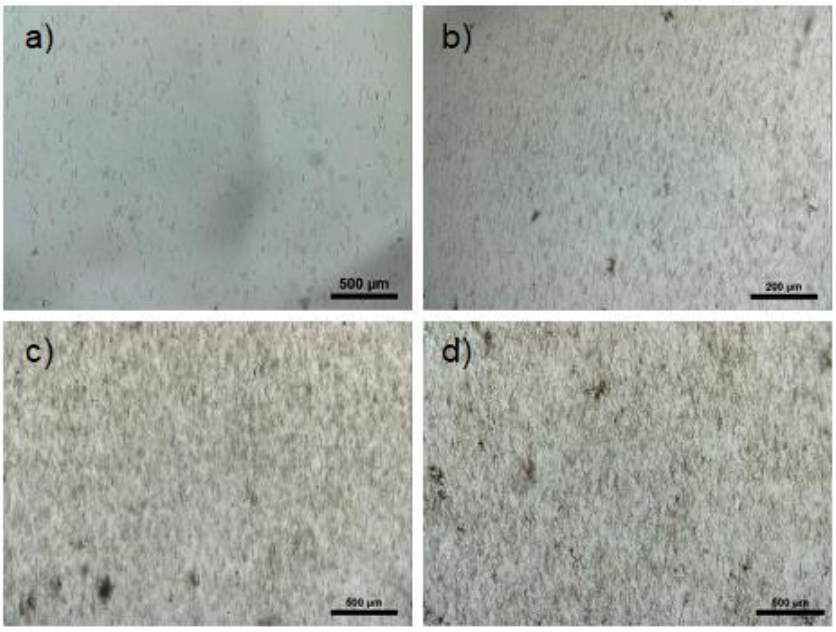


Figura 6.26.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de hidrogeles de gelatina entrecruzados bajo la aplicación de un campo magnético externo de 24±3 mT con concentraciones de fibras de a) 0.02 mg·ml^{-1}, 0.15 mg·ml^{-1}, c) 0.40 mg·ml^{-1} y d) 0.75 mg·ml^{-1}.

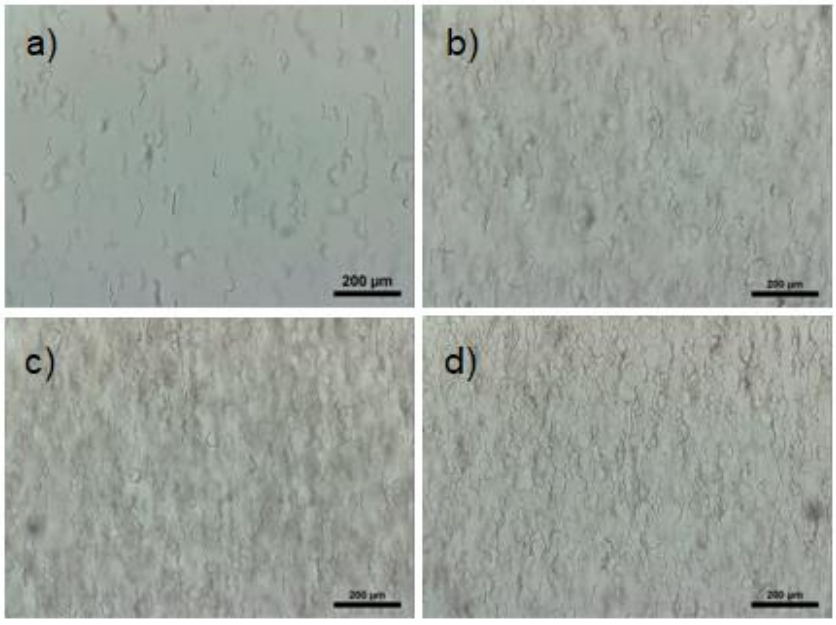


Figura 6.27.- Imágenes de microscopía óptica de alta magnificación de la distribución de las fibras magnéticas en el seno de hidrogeles de gelatina entrecruzados bajo la aplicación de un campo magnético externo de 24±3 mT con concentraciones de fibras de a) 0.02 mg·ml^{-1}, 0.15 mg·ml^{-1}, c) 0.40 mg·ml^{-1} y d) 0.75 mg·ml^{-1}.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

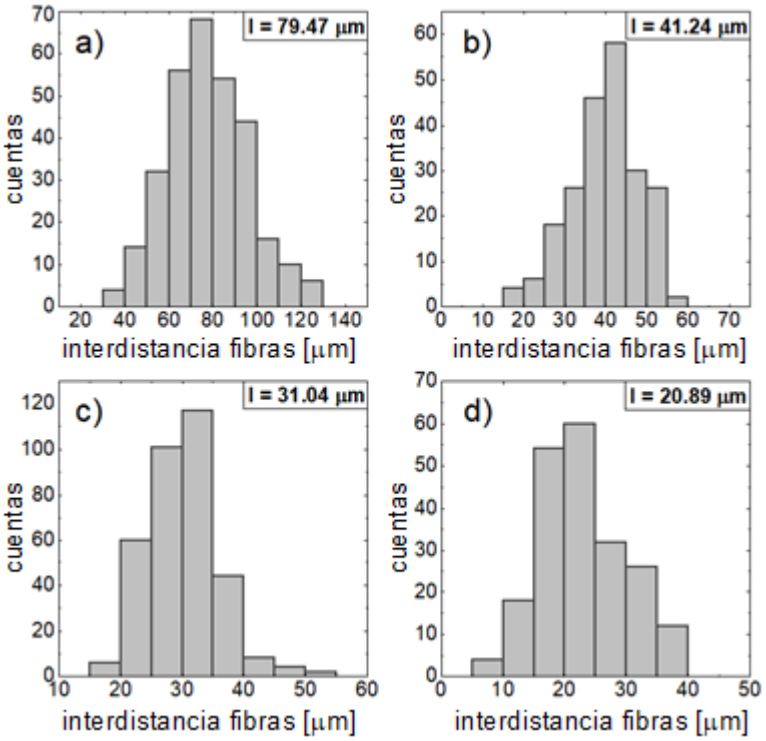


Figura 6.28.- Distribuciones estadísticas de la interdistancia entre las microfibras magnéticas alineadas en el seno de hidrogeles de gelatina con concentraciones de fibras de a) 0.02 mg·ml^{-1}, 0.15 mg·ml^{-1}, c) 0.40 mg·ml^{-1} y d) 0.75 mg·ml^{-1}.

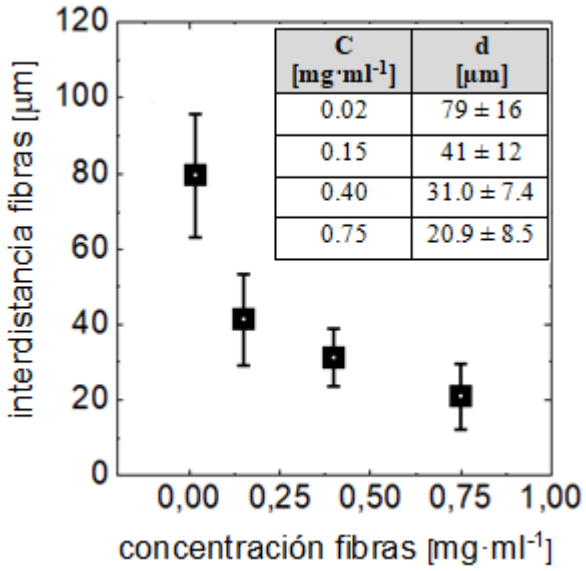


Figura 6.29.- Representación gráfica de la inter-distancia entre las fibras magnéticas alineadas en los hidrogeles de gelatina en función de la concentración de aquellas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.4.2 Alineamiento remoto de partículas de PLGA con respuesta magnética

De igual forma que se procedió con las microfibras electrohiladas de PCL-MNPs, en este apartado se evaluará el potencial alineamiento de las partículas híbridas de PLGA con MNPs incorporadas en el seno de hidrogeles de gelatina. En los citados experimentos llevados a cabo con las microfibras híbridas comprobamos su potencial para ser organizadas remotamente mediante estímulos magnéticos incluso cuando la intensidad y la duración de estos eran extremadamente bajas. Este hecho demuestra la alta potencia magnética de las MNPs sintetizadas y su capacidad para proporcionar a las estructuras híbridas con una muy alta sensibilidad bajo la aplicación de campos magnéticos externos.

Basándonos en estos resultados previos, reduciremos el número de condiciones analizadas limitándonos, en este caso, a la aplicación de campos de baja intensidad y cortos tiempos de aplicación. Es importante comentar que el uso de radiaciones magnéticas lo más débiles posibles es un aspecto fundamental de cara a la potencial traslación de los experimentos a la práctica clínica, por lo que de ser necesarios campos magnéticos de muy alta intensidad para lograr el alineamiento de las partículas híbridas de PLGA-MNPs, deberemos concluir que el empleo de las microfibras electrohiladas es una mejor estrategia de cara a la aplicación final de este estudio.

Sin embargo, dadas las menores dimensiones de las partículas híbridas de PLGA en comparación con las dimensiones de las microfibras electrohiladas, es previsible que sean necesarias fuerzas magnéticas ligeramente mayores para lograr su alineamiento remoto dentro de los hidrogeles. Por este motivo, se prepararon partículas híbridas de PLGA con mayores cantidades relativas de MNPs que las empleadas en las microfibras de PCL, tratando de encontrar el compromiso entre la menor cantidad de material magnético y la menor intensidad de campo magnético posibles para lograr el alineamiento de las estructuras híbridas, a fin de evitar los riesgos de toxicidad/seguridad asociados con estos dos parámetros comentados con anterioridad.

Las partículas híbridas de PLGA con MNPs en su interior fueron incorporadas dentro de hidrogeles de gelatina siguiendo el protocolo detallado en la sección 2.2.5. Como primer ensayo, se evaluó la organización remota de las partículas de PLGA con diferentes cantidades de material magnético (5-50% p/p) en su interior cuando se introducen en el seno de un hidrogel y, a continuación, se aplica un campo magnético de 126 ± 6 mT aplicado durante 1 min. Tal y como se puede ver en la Figura 6.30, en las imágenes de

microscopía óptica correspondientes a los hidrogeles con partículas híbridas con un 5% y un 10% p/p de MNPs no se observa claramente ningún tipo de organización anisotrópica, mientras que en las muestras con partículas modificadas con mayores cantidades de MNPs (25% y 50% p/p) sí puede observase como estas se disponen en forma de agregados que se alinean uniaxialmente, esto es se forman cadenas de partículas, en la dirección del campo magnético aplicado. Este resultado nos permite descartar para los experimentos sucesivos las partículas híbridas de PLGA modificadas con las dos cantidades relativas más bajas de MNPs ya que, aunque previsiblemente se podría lograr su alineamiento mediante la aplicación de campos magnéticos más intensos como ya se ha comentado, nos interesa el uso de radiaciones magnéticas los más débiles posibles.

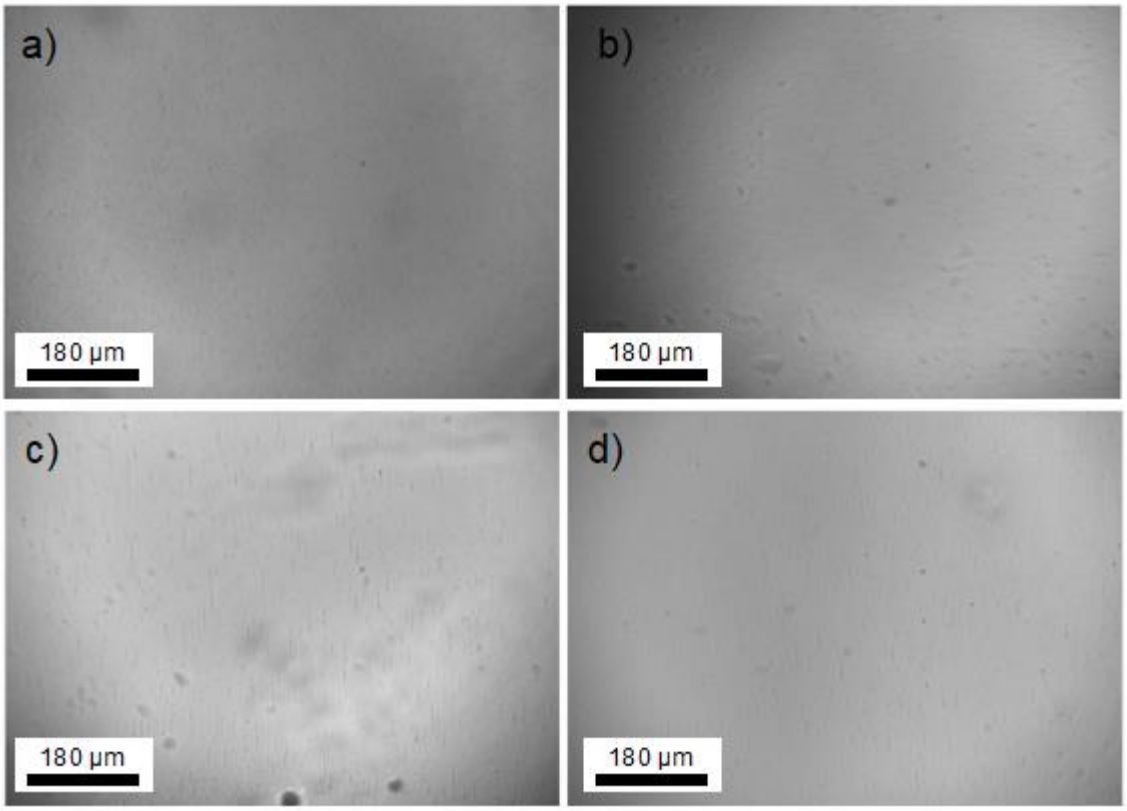


Figura 6.30.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las partículas de PLGA con a) 5%, b) 10%, c) 25% y d) 50% p/p MNPs en el seno de hidrogeles de gelatina entrecruzados bajo la aplicación de un campo magnético externo de 126±6 mT.

Una vez determinada la cantidad mínima de material magnético que es necesario incorporar en las nanopartículas de PLGA para que estas puedan ser manipuladas remotamente dentro de los hidrogeles de gelatina, se evaluaron a continuación la intensidad y el tiempo de aplicación necesarios de los campos magnéticos aplicados para

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

lograr el alineamiento de las partículas híbridas con un 25% y un 50% p/p de MNPs. Así, se observó que es necesario aplicar un campo magnético de 81 ± 5 mT durante al menos ~1 min. para lograr la organización uniaxial de las partículas polimérico-magnéticas dentro de los hidrogeles de gelatina. Tal y como era de esperar, se trata de una radiación magnética más intensa de la que es necesaria para alinear las microfibras híbridas electrohiladas analizadas en el apartado anterior. Si bien la cantidad relativa de MNPs incorporada en las partículas de PLGA es mayor que la incorporada en las microfibras (25-50% frente a 5% p/p), las dimensiones globales de las estructuras generadas son mucho menores (~150 nm frente a ~70 µm), por lo que parece lógico la necesidad de campos magnéticos más intensos para su control remoto. Sin embargo, la diferencia de intensidad entre los campos necesarios para lograr la organización anisótropa uniaxial de ambos tipos de estructuras es notablemente reducida (81 mT frente a 24 mT), por lo que *a priori* este hecho no debería ser un factor clave de cara a la preferencia por una u otra estrategia de fabricación para la preparación de los andamios anisótropos pretendidos.

6.4.2.1 Efecto de la concentración de nanopartículas híbridas magnéticas en los hidrogeles

A continuación, de igual forma que se procedió con las microfibras electrohiladas en apartados anteriores, se evaluó el efecto de la concentración de partículas de PLGA-MNPs incorporadas en los hidrogeles sobre la interdistancia entre los agregados magnéticos con anisotropía uniaxial generados tras la aplicación del estímulo externo. Para llevar a cabo esta prueba de concepto se utilizaron las partículas híbridas de PLGA modificadas con un 50% p/p de MNPs. Si bien las partículas con una cantidad relativa de MNPs de un 25% p/p también mostraron su alta sensibilidad al alineamiento bajo la aplicación de campos magnéticos en los experimentos anteriores, los hidrogeles obtenidos utilizando partículas con la mayor cantidad de material magnético parecen mostrar una arquitectura más homogénea que servirá para determinar con mayor precisión las citadas interdistancias. De este modo, se prepararon disoluciones precursoras de los hidrogeles de gelatina incorporando en las mismas diferentes concentraciones de partículas de PLGA-MNPs: 0.25, 0.50, 1.00 y 2.00 $mg \cdot ml^{-1}$. Tras el entrecruzamiento térmico de los hidrogeles de gelatina respectivos bajo un campo magnético aplicado de 81 ± 5mT, se observó que las partículas híbridas con respuesta magnética adquirían una organización uniaxial dentro de los hidrogeles, dotando a los mismos con la estructura altamente anisótropa que se pretendía. En las imágenes de

USC DE COMPOSTELA

microscopía óptica obtenidas a diferentes magnificaciones se comprueba claramente la correcta organización inducida de las nanopartículas híbridas, así como la diferente densidad de las mismas en función de la concentración empleada en las disoluciones precursoras (Figuras 6.31-6.32).

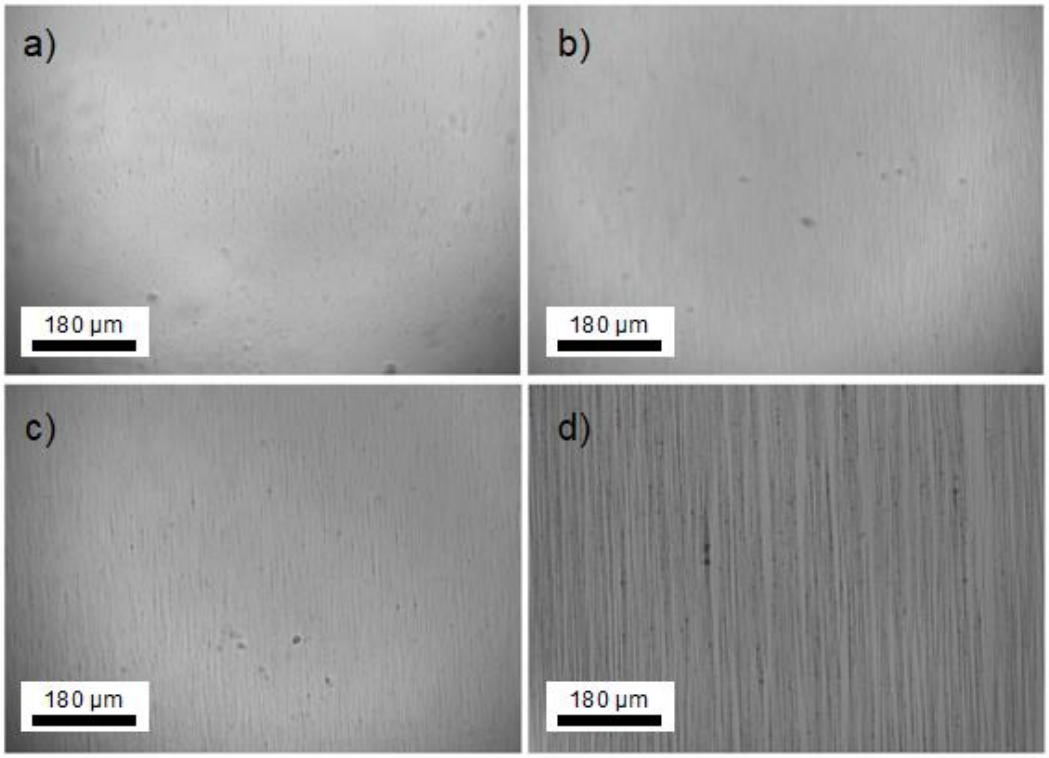


Figura 6.31.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las partículas de PLGA-MNPs con concentración a) 0.25 mg·ml^{-1}, b) 0.50 mg·ml^{-1}, c) 1.00 mg·ml^{-1} y d) 2.00 mg·ml^{-1} en el seno de hidrogeles de gelatina entrecruzados bajo la aplicación de un campo magnético externo de 81±5 mT.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

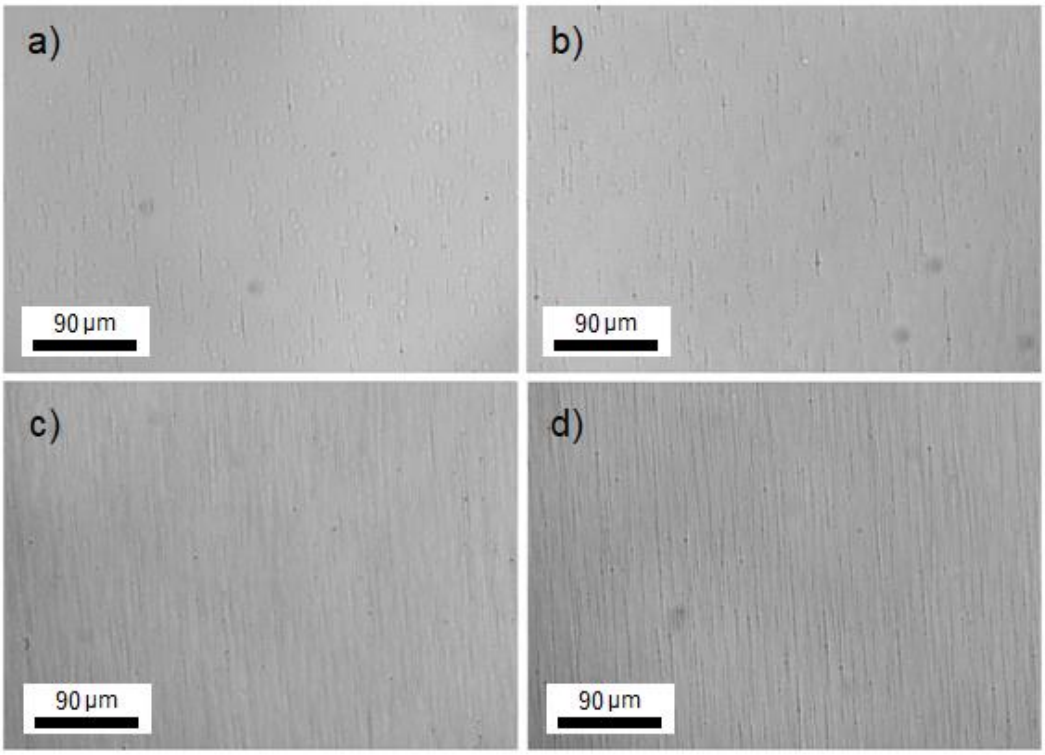


Figura 6.32.- Imágenes de microscopía óptica de a mayor magnificación de la distribución de las partículas de PLGA-MNPs con concentración a) 0.25 mg·ml^{-1}, b) 0.50 mg·ml^{-1}, c) 1.00 mg·ml^{-1} y d) 2.00 mg·ml^{-1} en el seno de hidrogeles de gelatina entrecruzados bajo la aplicación de un campo magnético externo de 81±5 mT.

En el rango de concentraciones de partículas de PLGA-MNPs analizado se consigue variar la interdistancia entre los agregados magnéticos generados remotamente entre ~10 y 30 µm (Figura 6.33). Se trata de un intervalo de interdistancias menor que el obtenido en los estudios llevados a cabo con las microfibras electrohiladas, si bien en aquel caso se utilizaron concentraciones de estructuras híbridas más bajas a fin de obtener interdistancias entre las mismas mayores después de su alineamiento remoto. En el momento de redacción de esta Tesis Doctoral se está analizando si, tal y como es presumible, la disminución de la concentración de partículas de PLGA-MNPs incorporadas en los hidrogeles de gelatina inferior a la más baja ensayada hasta el momento da lugar a sistemas con una arquitectura anisótropa menos densa. Nótese, sin embargo, que de cara a futuros ensayos en los que se encapsularán células dentro de estos hidrogeles anisótropos, el rango de interdistancias entre las partículas híbridas generado usando esta estrategia es de sumo interés. Las dimensiones de estas interdistancias son similares a las dimensiones típicas de las estructuras celulares, por lo que las estructuras

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

anisótropas generadas en los hidrogeles estarían en contacto directo con las células incorporadas y podrían influenciar de forma directa su comportamiento.

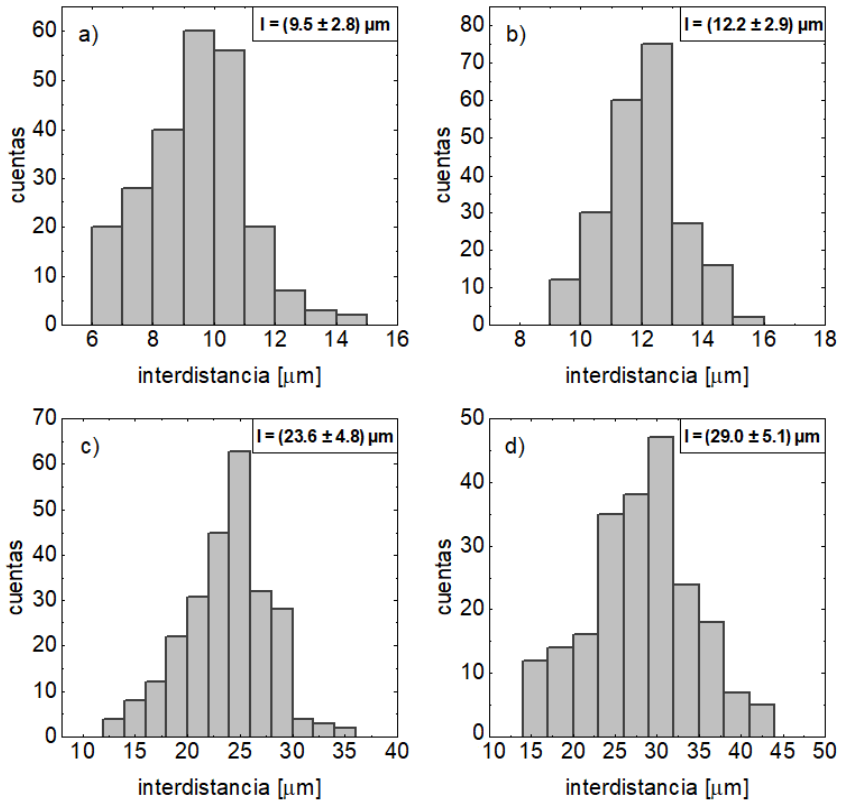


Figura 6.33.- Distribuciones estadísticas de la interdistancia entre las partículas de PLGA-MNPs alineadas en el seno de hidrogeles de gelatina con concentraciones de partículas de a) 2.00 mg·ml^{-1}, b) 1.00 mg·ml^{-1}, c) 0.50 mg·ml^{-1} y d) 0.25 mg·ml^{-1}.

6.4.2.2 Fabricación de hidrogeles de doble capa con anisotropía ortogonal

Finalmente, y a modo de prueba de concepto, se usó la estrategia de incorporación de partículas de PLGA modificadas con MNPs en el seno de hidrogeles de gelatina para intentar generar sistemas con dos capas con ordenamiento uniaxial ortogonal entre las mismas. Esto es, usar las estrategias ordenamiento magnético remoto previamente optimizadas para crecer dos capas de hidrogel cargadas con partículas de PLGA-MNPs adyacentes, teniendo la primera de ellas una arquitectura anisotrópica uniaxial perpendicular a la observada en la segunda de ellas.

Esta aproximación podría resultar de sumo interés para la IT complejos como, por ejemplo, los cartílagos, constituidos por fibras de colágeno que presentan diferente ordenamiento según la profundidad tisular: en la parte más externa, estas fibras de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

colágeno se orientan paralelamente a la superficie, mientras que en la zona intermedia tienen una organización aleatoria y en la capa más profunda, próxima a la intersección con el tejido óseo, se muestran alineadas perpendicularmente a la superficie del cartílago[18].

El proceso de preparación de estos hidrogeles bicapa cargados con partículas híbridas de PLGA-MNPs consistió simplemente en repetir dos veces el protocolo de fabricación típico para hidrogeles simples, pero variando la dirección del campo magnético aplicado durante el entrecruzamiento de una y otra capa. Así, en primer lugar, se generó una capa de hidrogel con ordenamiento anisótropo a través del entrecruzamiento térmico de la gelatina con estructuras magnéticas incorporadas bajo la aplicación de un campo magnético externo. Posteriormente, se colocó una segunda capa de disolución precursora sobre el hidrogel ya formado, y se indujo su gelificación bajo un campo magnético aplicado de dirección perpendicular al que se había aplicado anteriormente, constituyéndose de esta forma el sistema bicapa ortogonal. En ambas capas se incorporaron las partículas de PLGA modificadas con un 50% p/p de MNPs en una concentración de 1.00 $mg \cdot ml^{-1}$.

En la Figura 6.34 se muestran imágenes de microscopía óptica obtenidas en diferentes planos del hidrogel multicapa preparado que demuestran el éxito de la estrategia propuesta. Tal y como se pretendía, el ordenamiento uniaxial de las partículas de PLGA-MNPs inducido mediante la aplicación de los campos magnéticos externos varía 90º de la primera capa de hidrogel con respecto a la segunda. Se intentó tomar una fotografía en un plano focal próximo al de separación entre ambas capas en el que pudiesen observarse de forma simultánea ambos ordenamientos, pero no resultó posible enfocar las estructuras magnéticas ordenadas de ambas capas de forma más nítida que la mostrada en la Figura 6.35.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

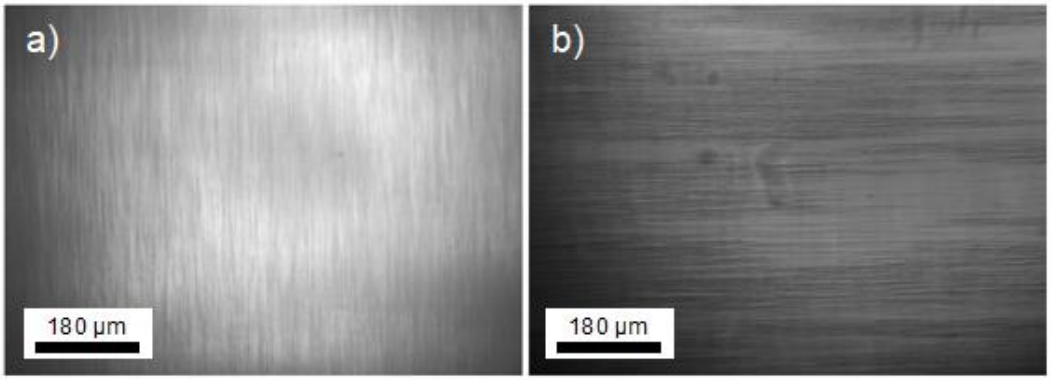


Figura 6.34.- Imágenes de microscopía óptica de la distribución de las partículas de PLGA-MNPs en a) la primera capa y b) la segunda capa de un hidrogel de gelatina, habiendo sido entrecruzadas separadamente bajo la aplicación de campos magnéticos externos de dirección ortogonal entre sí.

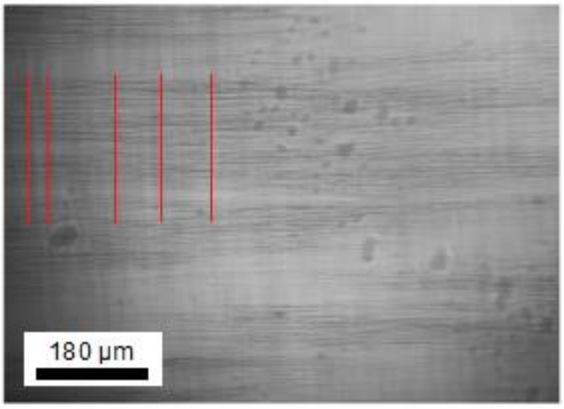


Figura 6.35.- Imagen de microscopía óptica de la distribución de las partículas de PLGA-MNPs en el hidrogel de gelatina multicapa. Se observan claramente las partículas de la primera capa ordenadas magnéticamente en la dirección horizontal de la imagen, viéndose de forma menos nítida las de la segunda capa ordenadas de forma ortogonal (dirección vertical en la imagen, marcadas con líneas rojas).

6.5 Conclusiones

En el presente capítulo se sintetizaron MNPs basadas en óxido de hierro con simetría esférica y estructura cristalina tipo magnetita, demostrándose el dopaje con zinc como una estrategia eficiente de cara a incrementar notablemente su potencia magnética. Estas MNPs fueron empleadas para la preparación de dos tipos diferentes de sistemas híbridos polimérico-magnéticos basados en microfibras electrohiladas de PCL y partículas de PLGA. En ambos casos se demostró que la incorporación de las MNPs proporcionaba a

las estructuras híbridas una respuesta magnética proporcional a la cantidad de material magnético utilizada, mostrando los sistemas los altos valores de magnetización y el comportamiento superparamagnético deseados para la aplicación pretendida. Finalmente, las micro-/nanoestructuras híbridas fueron añadidas a disoluciones de gelatina que se entrecruzaron térmicamente en presencia de campos magnético externos, dando lugar a hidrogeles con arquitecturas anisótropas. Se evaluaron las características de los campos magnéticos aplicados necesarias para lograr los grados de anisotropía deseados, observando que la elevada potencia magnética de las estructuras magnéticas obtenidas permite su manipulación mediante radiaciones de muy baja intensidad, especialmente en el caso de las microfibras de PCL-MNPs. Asimismo, se determinó la influencia de la concentración de las estructuras híbridas sobre la interdistancia generada entre las mismas en el seno de los hidrogeles anisótropos. A modo de pruebas de concepto, se demostró la posibilidad de preparar los hidrogeles anisótropos usando agentes entrecruzantes en lugar de la técnica de entrecruzamiento térmico, así como la posibilidad de preparar hidrogeles complejos consistentes en varias capas con diferente ordenamiento en cada una de ellas.

En experimentos futuros, en primer lugar, debe llevarse a cabo un análisis más exhaustivo de la influencia de los campos magnéticos sobre las estructuras híbridas modificadas con diferentes cantidades de MNPs después de su incorporación en los hidrogeles. Si bien los experimentos llevados a cabo ya han permitido determinar que las estrategias desarrolladas permiten la fabricación de hidrogeles anisótropos mediante el uso de campos magnéticos de muy baja intensidad y la incorporación de bajas cantidades de material magnético, debemos encontrar el compromiso que permita minimizar todo lo posible estos dos parámetros. De este modo, de cara a la potencial traslación a la práctica clínica de los enfoques propuestos, se evitarán los problemas de citotoxicidad asociados con el empleo de altas concentraciones de material magnético y los riesgos de seguridad relacionados con el uso de radiaciones magnéticas de alta intensidad.

Una vez optimizado este punto, se seleccionarán las condiciones más adecuadas para llevar a cabo el encapsulamiento de células dentro de los hidrogeles, previsiblemente células madre a fin de evaluar el potencial de los andamios fabricados como agentes diferenciadores. En este punto, la interdistancia entre las estructuras híbridas incorporadas y ordenadas en los hidrogeles emerge como un factor clave de cara a controlar el comportamiento celular. Dadas las dimensiones típicas aproximadas de las estructuras celulares, en el rango de las pocas decenas de micrómetros, se utilizarán en los estudios

USC DE COMPOSTELA

piloto concentraciones partículas/fibras que den lugar a canales en los hidrogeles de dimensiones inferiores a ~40-50 µm esperando lograr un alto grado de influencia sobre su crecimiento direccional, proliferación y diferenciación. Sin embargo, los hidrogeles con inter-distancias mayores entre las estructuras híbridas incorporadas también pueden resultar interesantes para controlar selectivamente a las células encapsuladas, pudiendo desarrollar de este modo hidrogeles en los que parte de las células crecerían y proliferarían libremente mientras que otras, aquellas localizadas más próximas a las fibras, tendrían un comportamiento dirigido por la arquitectura anisótropa del hidrogel, dando lugar tras el proceso de maduración a construcciones con diferentes fenotipos celulares con potencial aplicación, por ejemplo, en ingeniería de cartílago o tejido nervioso.

6.6 Referencias

1. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, 421746 (2015).

2. Chung, C., Beecham, M., Mauck, R. L. & Burdick, J. A. The influence of degradation characteristics of hyaluronic acid hydrogels on in vitro neocartilage formation by mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **30**, 4287–96 (2009).

3. Schmidt, C. E. & Leach, J. B. Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **5**, 293–347 (2003).

4. Vunjak-Novakovic, G. *et al.* Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **16**, 169–187 (2010).

5. Wang, J. H. C., Guo, Q. & Li, B. Tendon biomechanics and mechanobiology - A minireview of basic concepts and recent advancements. *J. Hand Ther.* **25**, 133–141 (2012).

6. Datta, P., Vyas, V., Dhara, S., Chowdhury, A. R. & Barui, A. Anisotropy Properties of Tissues: A Basis for Fabrication of Biomimetic Anisotropic Scaffolds for Tissue Engineering. *J. Bionic Eng.* **16**, 842–868 (2019).

7. Omidinia-Anarkoli, A. *et al.* An Injectable Hybrid Hydrogel with Oriented Short Fibers Induces Unidirectional Growth of Functional Nerve Cells. *Small* **13**, 1702207 (2017).

8. Kim, J., Staunton, J. R. & Tanner, K. Independent Control of Topography for 3D Patterning of the ECM Microenvironment. *Adv. Mater.* **28**, 132–137 (2016).

9. McKeehan, L. W. Physical theory of ferromagnetic domains [37]. *Physical Review*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

79, 745 (1950).

10. Jin, R., Lin, B., Li, D. & Ai, H. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy: Design considerations and clinical applications. *Current Opinion in Pharmacology* **18**, 18–27 (2014).

11. Weinstein, J. S. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Diagnostic magnetic resonance imaging and potential therapeutic applications in neurooncology and central nervous system inflammatory pathologies, a review. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **30**, 15–35 (2010).

12. Hühn, J. *et al.* Selected standard protocols for the synthesis, phase transfer, and characterization of inorganic colloidal nanoparticles. *Chem. Mater.* **29**, 399–461 (2017).

13. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. & Kim, W. S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials* **16**, 023501 (2015).

14. Pardo, A. *et al.* Analysis of the influence of synthetic paramaters on the structure and physico-chemical properties of non-spherical iron oxide nanocrystals and their biological stability and compatibility. *Dalt. Trans.* **45**, 797–810 (2016).

15. Huda, N. SPINELS (Normal or Inverse) - All about Chemistry. (2016). Available at: http://www.chemohollic.com/2016/07/spinels-normal-or-inverse.html.

16. Cornell, R. M. & Schwertmann, U. *The Iron Oxides*. *The Iron Oxides* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003). doi:10.1002/3527602097

17. Zhao, Y. Z. *et al.* Magnetic PLGA microspheres loaded with SPIONs promoted the reconstruction of bone defects through regulating the bone mesenchymal stem cells under an external magnetic field. *Mater. Sci. Eng. C* **122**, (2021).

18. Rose, J. C. *et al.* Biofunctionalized aligned microgels provide 3D cell guidance to mimic complex tissue matrices. *Biomaterials* **163**, 128–141 (2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7 Conclusiones

Se han obtenido hidrogeles basados en polímeros naturales como el quitosano, el ácido hialurónico, la gelatina y el colágeno por distintas metodologías como el autoensamblado por complejación iónica y la fotopolimerización dando lugar a estructuras tridimensionales poliméricas porosas, andamios poliméricos, con propiedades físicas-químicas y mecánicas adecuadas para su empleo en regeneración tisular.

La estructura y propiedades de estos andamios poliméricos se han podido modificar según el método de producción escogido, así como por los polímeros que lo conforman, sus concentraciones, peso molecular y grado de sustitución.

En particular, se han obtenido hidrogeles híbridos formados por quitosano y ácido hialurónico por complejación iónica, en los que sus propiedades físicas se han modulado según el tipo y concentración de polímero, su peso molecular y la inclusión de un tercer componente como el colágeno, que dota a la estructura con grupos de adhesión celular.

Se ha observado que estos hidrogeles de quitosano-ácido hialurónico presentan elevados niveles de porosidad, superior al 85%, y son mecánicamente más estables si se emplean concentraciones de biopolímero más altas, polímeros de mayor peso molecular y/o se optimiza la relación quitosano:ácido hialurónico. Esta estabilidad se refleja también en tasas de degradación enzimática más reducidas, así como niveles de retención de agua ligeramente inferiores, consecuencia de una leve disminución de la porosidad. Todos los hidrogeles muestran una elevada citocompatibilidad, permitiendo de manera adecuada una elevada proliferación celular.

La inclusión de colágeno en la composición de estos hidrogeles conlleva una cierta desestabilización de la estructura y, por consiguiente, de sus propiedades mecánicas. Sin embargo, este hecho lleva asociado una mayor capacidad de retención de agua así como un incremento de su biodegradación. Además, se muestra que su citocompatibilidad es incluso superior a la de los que no presentan la proteína en su composición.

Como alternativa a los anteriores andamios poliméricos, y en la búsqueda de propiedades mecánicas superiores y un mayor número de receptores que faciliten la adhesión celular, se han desarrollado hidrogeles basados en gelatina y ácido hialurónico mediante la técnica

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de fotopolimerización. Para ello, se han modificado ambos biopolímeros con grupos metacrilo que permiten la formación de enlaces químicos entre tales grupos inducidos por radiación UV tras la incorporación de un fotoiniciador.

Los grados de sustitución de la gelatina metacrilada (GelMA) y el ácido hialurónico metacrilado (HAMA) fueron del 40 y el 11%, respectivamente. Esta diferencia se debe a la distinta facilidad de sustitución de los grupos químicos de ambos biopolímeros, siendo esta muy superior para los grupos amina presentes en las lisinas de la estructura de la gelatina. Como consecuencia, y al contrario de lo que ocurre con los andamios donde predomina la gelatina en su composición, que por ejemplo presentan problemas de estabilidad y resistencia mecánica, los hidrogeles híbridos de GelMA-HAMA en los que predomina la presencia del primer polímero en su composición presentaron las mayores estabilidades térmicas y mecánicas, a expensas de una menor porosidad e interconectividad, sin ser alarmante, con valores alrededor del 70-80%. Por el contrario, aquellos hidrogeles en los que la concentración de HAMA se acercó a la de GelMA en su composición, mostraron mayor fragilidad estructural y biodegradabilidad, pero también un pequeño incremento de su porosidad y capacidad de retención acuosa. No obstante, en general, los hidrogeles híbridos de GelMA y HAMA presentaron en conjunto propiedades físico-químicas superiores que los andamios formados exclusivamente por estos biopolímeros puros.

Los andamios formados por GelMA-HAMA demostraron ser totalmente citocompatibles, confirmándose que el entorno tridimensional otorgado por el hidrogel favorece en cierta medida la proliferación celular. Así mismo, se evaluó el potencial empleo de este tipo de hidrogeles como reservorios para la liberación de agentes bioactivos que ayuden a controlar la diferenciación celular. Para ello, se incorporaron nanopartículas de PLGA cargadas con el glucocorticoide dexametasona (DEX) en los andamios con el objetivo de regular adicionalmente el perfil de liberación del fármaco. Este fármaco, empleado en el rango de concentraciones adecuado, se utiliza para inducir la diferenciación de célula madre mesenquimales en linaje de osteoblastos y, por tanto, la inclusión de las NP con la DEX en los hidrogeles permite controlar adicionalmente la diferenciación de las células madre.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

La incorporación de las Nps de PLGA con el fármaco encapsulado no modificó las propiedades físicas de los hidrogeles, ya que la cantidad incorporada fue muy pequeña

gracias a la elevada eficiencia de encapsulación de la DEX. Además, se comprobó que el perfil de liberación del fármaco es mucho más sostenido desde el interior de los andamios gracias a la modificación de la hidrólisis ácida del PLGA por la estructura porosa del hidrogel, como por el mayor camino de difusión a recorrer por el fármaco, Esta liberación más sostenida se traduce en unos mayores niveles de diferenciación celular respecto a los experimentos control (medio de diferenciación osteogénico y adición de Nps de PLGA-DEX libres al medio), como se demuestra en los incrementos de la actividad de la encima ALP -biomarcador temprano del proceso de diferenciación a osteoblastos, como por la detección de depósitos de calcio -biomarcador tardía.

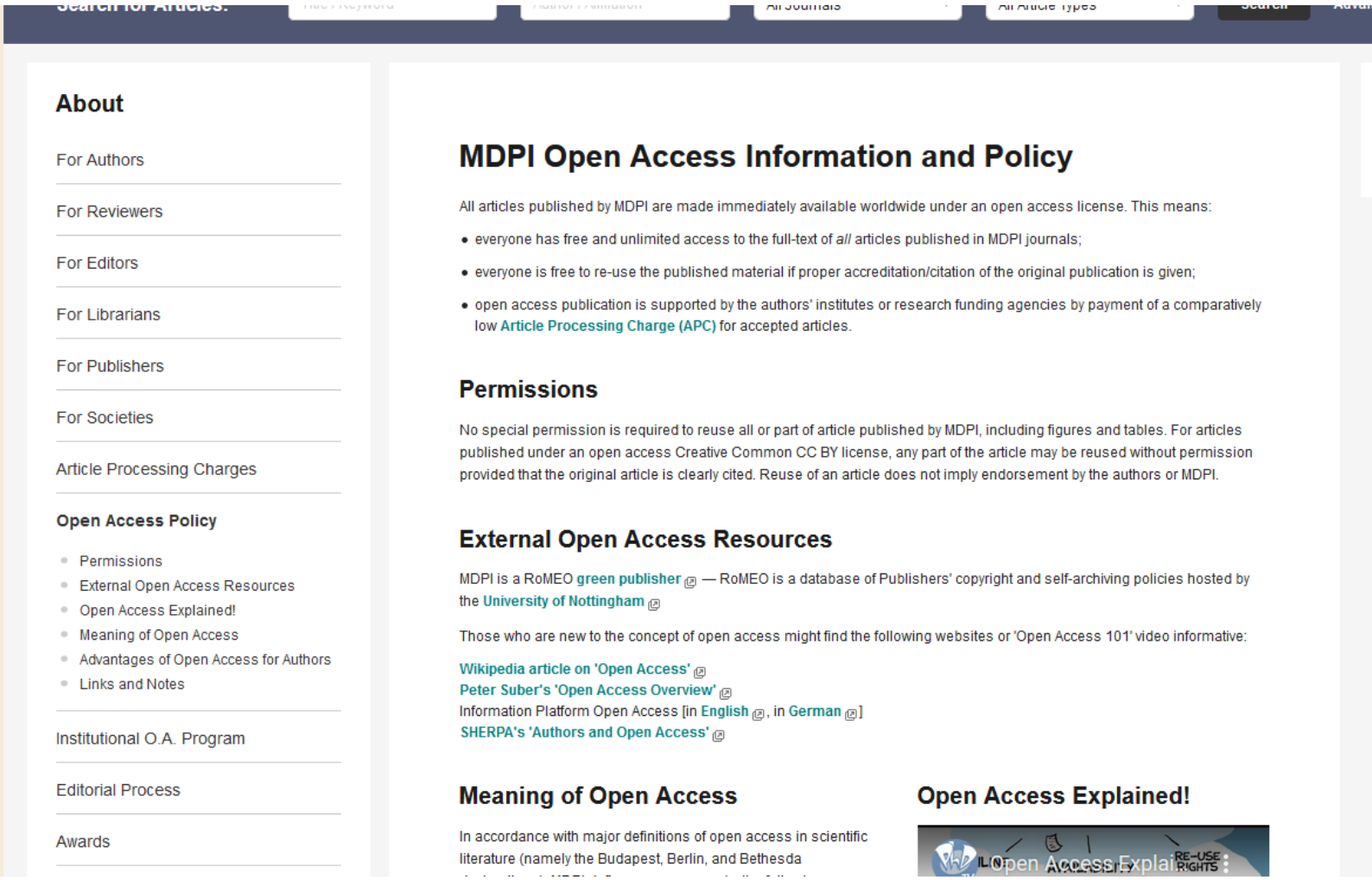
Finalmente, para controlar adicionalmente la señalización celular y, por tanto, para manipular procesos como la adhesión, proliferación, expansión y diferenciación celular entre otros, se procedió a controlar la nano y microestructura de los hidrogeles mediante la incorporación de anisotropía en su interior. Para ello, se recurrió a un estímulo externo como los campos magnéticos para inducir una estructuración ordenada de materiales magnéticos en el interior de los hidrogeles. En particular, se emplearon dos aproximaciones/tipos de material magnético: micropartículas de celulosa de simetría elongada dopadas con nanopartículas magnéticas incorporadas en fibras de (poli)caprolactona obtenidas por electrohilado, y nanopartículas de PLGA con partículas magnéticas encapsuladas en su interior. Ambos tipos de sistemas magnéticos se incorporaron en el interior de matrices de gelatina previa su polimerización térmica, y se orientaron mediante la aplicación de un campo magnético externo. Una vez conseguida la orientación deseada se polimerizó la matriz térmicamente para filar las estructuras.

Se ha comprobado que, de esta manera, se han podido producir estructuras anisótropas en la forma de fibras alargadas y de cadenas de nanopartículas, respectivamente. Estas estructuras alargadas recuerdan a las presentadas en diversos tejidos como el neuronal o el de tendón, por ejemplo, que poseen estructuras celulares y/o fibrilares alargadas. La longitud y distancia de separación de las estructuras anisótropas creadas se comprobó que depende tanto de la intensidad de campo magnético aplicado como de la concentración de material magnético incorporado en la matriz. Además, se comprobó que modificando la dirección de aplicación del campo magnético es posible cambiar la orientación del material magnético, pudiendo fabricar andamios que con distintas estructuras/arquitecturas anisótropas en su interior.

USC DE COMPOSTELA

Anexos

Permiso Figuras 1.1, 1.2, 1.6 y Figuras y parte del texto del Capitulo 4 de la presente Tesis Doctoral publicado en la revista International Journal of Molecular Sciences con el Título “Hybrid Methacrylated Gelatin and Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds. Preparation and Systematic Characterization for Prospective Tissue Engineering Applications”, 2021, 22, 6758.



About

For Authors

For Reviewers

For Editors

For Librarians

For Publishers

For Societies

Article Processing Charges

Open Access Policy

- Permissions
- External Open Access Resources
- Open Access Explained!
- Meaning of Open Access
- Advantages of Open Access for Authors
- Links and Notes

Institutional O.A. Program

Editorial Process

Awards

MDPI Open Access Information and Policy

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

- everyone has free and unlimited access to the full-text of *all* articles published in MDPI journals;
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given;
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low Article Processing Charge (APC) for accepted articles.

Permissions

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

External Open Access Resources

MDPI is a RoMEO green publisher — RoMEO is a database of Publishers' copyright and self-archiving policies hosted by the University of Nottingham

Those who are new to the concept of open access might find the following websites or 'Open Access 101' video informative:

Wikipedia article on 'Open Access'
Peter Suber's 'Open Access Overview'
Information Platform Open Access [in English, in German]
SHERPA's 'Authors and Open Access'

Meaning of Open Access

In accordance with major definitions of open access in scientific literature (namely the Budapest, Berlin, and Bethesda

Open Access Explained!

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jul 05, 2021

This Agreement between university of Santiago de Compostela -- Silvia Barbosa ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5102440371412
License date	Jul 05, 2021
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Carbohydrate Polymers
Licensed Content Title	Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review
Licensed Content Author	Hamid Hamedi,Sara Moradi,Samuel M. Hudson,Alan E. Tonelli
Licensed Content Date	Nov 1, 2018
Licensed Content Volume	199
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	16
Start Page	445
End Page	460
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Desarrollo de hidrogeles poliméricos y su aplicación en medicina regenerativa
Institution name	USC
Expected presentation date	Aug 2021
Portions	1
Requestor Location	university of Santiago de Compostela Physics Faculty, Santiago de Compostela Santiago De Compostela, other 15782 Spain Attn: university of Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

INTRODUCTION

USC DE COMPOSTELA

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at

http://myaccount.copyright.com).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk here). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

USC
UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all

claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation**: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website**: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx or the Elsevier homepage for books at http://www.elsevier.com; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at http://www.elsevier.com . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
    - via their non-commercial person homepage or blog
    - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
    - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
    - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
    - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
    - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
    - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation**: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by/4.0.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. **Other Conditions**:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso para Figura 1.11

This is an open access article published under an ACS AuthorChoice License, which permits copying and redistribution of the article or any adaptations for non-commercial purposes.

Perspective

pubs.acs.org/Biomac

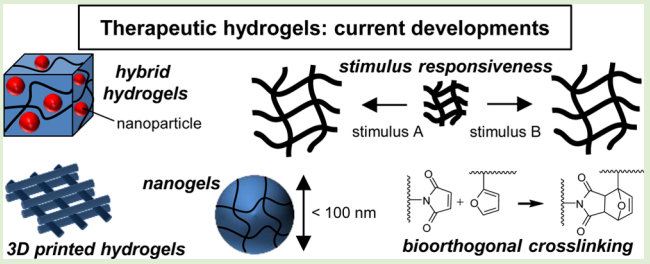
Hydrogels for Therapeutic Delivery: Current Developments and Future Directions

Sytze J. Buwalda,[†] Tina Vermonden,[‡] and Wim E. Hennink*[,‡]

[†]Institute of Biomolecules Max Mousseron, Department of Artificial Biopolymers, Faculty of Pharmacy, UMR 5247, CNRS-University of Montpellier-ENSCM, Montpellier, France

[‡]Department of Pharmaceutics, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

ABSTRACT: Hydrogels are attractive materials for the controlled release of therapeutics because of their capacity to embed biologically active agents in their water-swollen network. Recent advances in organic and polymer chemistry, bioengineering and nanotechnology have resulted in several new developments in the field of hydrogels for therapeutic delivery. In this Perspective, we present our view on the state-of-the-art in the field, thereby focusing on a number of exciting topics, including bioorthogonal cross-linking methods, multi-component hydrogels, stimuli-responsive hydrogels, nanogels, and the release of therapeutics from 3D printed hydrogels. We also describe the challenges that should be overcome to facilitate translation from academia to the clinic and last, we share our ideas about the future of this rapidly evolving area of research.



1. INTRODUCTION

Hydrogels are polymeric networks based on hydrophilic macromonomers that are able to retain large amounts of water.[1−5] Hydrogels generally exhibit excellent biocompatibility and their mechanical properties can be designed in such a way that they match those of many soft biological tissues. Furthermore, their soft and rubbery nature minimizes inflammatory reactions of the surrounding cells and tissues.[6] Hydrogels may be classified as natural, synthetic or hybrid, depending on the source of the constituting polymers. Hydrogels can be physically cross-linked by noncovalent interactions, chemically cross-linked by covalent bonds, or cross-linked by a combination of both. After their discovery in the 1960s by Wichterle and Lim, hydrogels were first successfully applied as contact lenses.[7] In the following decades, researchers also started to investigate the use of hydrogels for the localized and sustained release of therapeutic agents as a strategy to decrease the number of drug administrations, protect the drug from (enzymatic) degradation, and allow for therapeutic drug concentrations for prolonged times.[2] Initially, hydrogel research focused on relatively simple, chemically cross-linked networks of synthetic polymers, such as poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA), poly(ethylene glycol) (PEG), and poly(vinyl alcohol) (PVA), which straightforward network structures were also well-suited for fundamental characterization and modeling of various physicochemical hydrogel properties including swelling, solute diffusivity, and cross-link density. Hydrogels were mainly prepared either by polymerization of water-soluble monomers in the presence of a multifunctional cross-linker or by cross-linking of hydrophilic polymers. In the beginning of the 1970s the focus in hydrogel research shifted from simple, water-swollen macromolecular networks to hydrogels capable of responding to a change in environmental conditions such as pH or temperature to evoke specific events, including in situ gel formation and drug release. Initially these physical hydrogels, often based on PEG-polyester copolymers or poly(*N*-isopropylacrylamide) (pNIPAAm), were cross-linked via hydrophobic interactions, but from the 1990s onward other physical interactions, such as stereocomplexation and inclusion complexation, were also exploited as cross-linking methods that offered the possibility to enhance and finely tune the release properties. In the 21st century, advances in organic and polymer chemistry, bioengineering and nanotechnology have resulted in hydrogels that possess unprecedented levels of structural organization and novel properties, which can be tailored precisely for the desired delivery application.[2,5,8] In this Perspective, we present an overview of several recent developments that may, in our opinion, generate major steps forward in the field of hydrogels for therapeutic delivery. We highlight representative examples, identify challenges the field is currently facing and last, we give our view on the future directions of this rapidly advancing area of research. It should be noted that the choice of topics in this Perspective reflects our view on the state-of-the-art; as such, this manuscript does not pretend to provide a comprehensive overview of all current topics in therapeutic hydrogel research. The reader is therefore referred to several excellent reviews that focus on specific areas in research concerning hydrogels for therapeutic delivery.[8−17]

Received: November 1, 2016
Revised: December 23, 2016
Published: December 27, 2016

ACS Publications © 2016 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01604
Biomacromolecules 2017, 18, 316−330

Downloaded via UNIV DE SANTIAGO DE COMPOSTELA on June 17, 2021 at 10:17:48 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

Permiso Figura 1.12

https://www.scirp.org/journal/publicat_ethics_statement.aspx?journalid=230

Journals Menu

- Articles
- Archive
- Indexing
- Aims & Scope
- Editorial Board
- For Authors
- Publication Fees

Open Special Issues

Published Special Issues

Special Issues Guideline

Special Issues

- Biomaterials and Applications (Due: 7/14/2021)

Follow SCIRP

Contact us



Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology

ISSN Print: 2158-7027

ISSN Online: 2158-7043

www.scirp.org/journal/jbnb

E-mail: jbnb@scirp.org

Google-based Impact Factor: 268

Submission Citations h5-index & Ranking

Publication Ethics & OA Statement

Publication Ethics Statement

SCIRP is committed to maintaining high standards through a rigorous peer-review together with strict ethical policies. Any infringements of professional ethical codes, such as plagiarism, fraudulent use of data, bogus claims of authorship, should be taken very seriously by the editors with zero tolerance.

SCIRP follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct.

The submitted manuscript should not have been previously published in any form and must not be currently under consideration for publication elsewhere.

Please find further information on Publication Ethics at SCIRP on
- Information for Authors
- In the Authors' Guidelines for each journal (Menu item "For Authors")

Open Access Statement

All articles from **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology (JBNB)** have "free availability on the public internet, permitting any users to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of these articles, crawl them for indexing, pass them as data to software, or use them for any other lawful purpose, without financial, legal, or technical barriers other than those inseparable from gaining access to the internet itself." (From the BOAI Definition of Open Access)

Please find further information about Open Access at SCIRP on
- SCIRP's Open Access Page
- About SCIRP ("What is Open Access?", " How Open is SCIRP on the 'Open Access Spectrum'?")

JBNB Journal Stats

Publication years: 2010-2021

Publication count: 349

Citation count: 6962

h5-index: 14

h-index: 40

Impact Factor: 2.68

Downloads: 1.649.506

Views: 2.472.150

Downloads/article: 4726,4

Citations/article: 19.9

Most cited

Most downloaded

E-Mail Alert

JBNB Subscription

Publication Ethics & OA Statement

Frequently Asked Questions

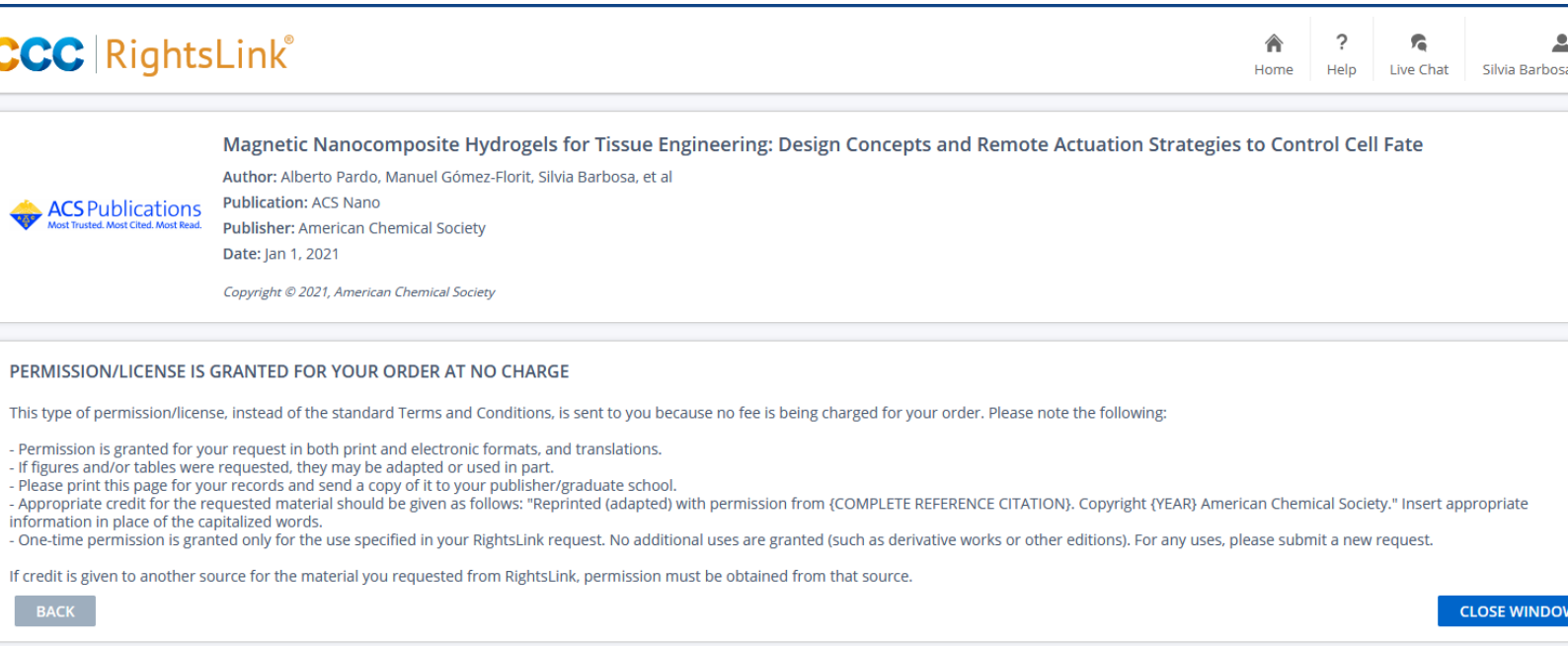
Recommend to Peers

Recommend to Library

Contact us

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso para las Figuras 1.13 y 1.16



CCC | RightsLink®

Home | Help | Live Chat | Silvia Barbosa

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Magnetic Nanocomposite Hydrogels for Tissue Engineering: Design Concepts and Remote Actuation Strategies to Control Cell Fate

Author: Alberto Pardo, Manuel Gómez-Florit, Silvia Barbosa, et al
Publication: ACS Nano
Publisher: American Chemical Society
Date: Jan 1, 2021

Copyright © 2021, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

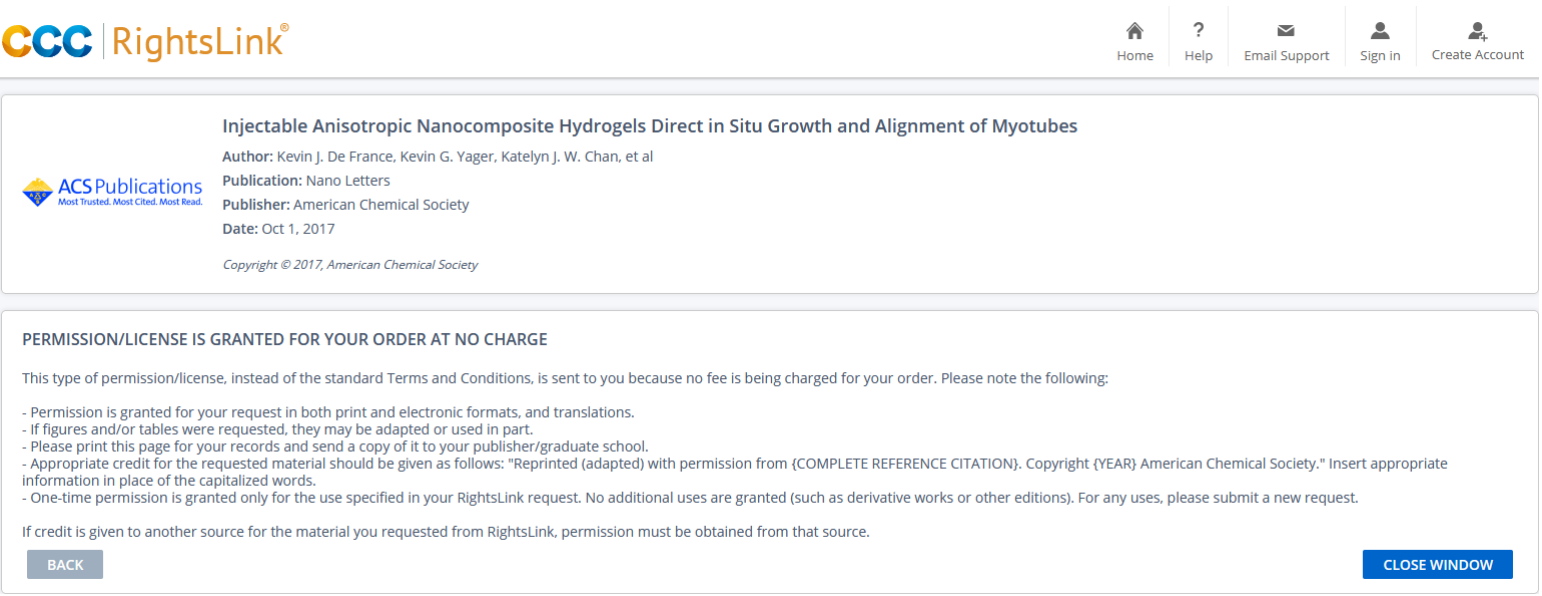
- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK | CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso para Figura 1.14a



CCC RightsLink®

Home | Help | Email Support | Sign in | Create Account

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Injectable Anisotropic Nanocomposite Hydrogels Direct in Situ Growth and Alignment of Myotubes

Author: Kevin J. De France, Kevin G. Yager, Katelyn J. W. Chan, et al
Publication: Nano Letters
Publisher: American Chemical Society
Date: Oct 1, 2017

Copyright © 2017, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK | CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jul 05, 2021

This Agreement between university of Santiago de Compostela -- Silvia Barbosa ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5102550539459
License date	Jul 05, 2021
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Advanced Functional Materials
Licensed Content Title	A Stimuli-Responsive Nanocomposite for 3D Anisotropic Cell-Guidance and Magnetic Soft Robotics
Licensed Content Author	Tiziano Serra, Gabriele Giancane, David Eglin, et al
Licensed Content Date	Dec 18, 2018
Licensed Content Volume	29
Licensed Content Issue	9
Licensed Content Pages	10
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Title	Desarrollo de hidrogeles poliméricos y su aplicación en medicina regenerativa
Institution name	USC
Expected presentation date	Aug 2021
Portions	Figura 3a
Requestor Location	university of Santiago de Compostela Physics Faculty, Santiago de Compostela Santiago De Compostela, other 15782 Spain Attn: university of Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or

to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by

you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Permiso para Figura 1.14c

This is an open access article published under an ACS AuthorChoice License, which permits copying and redistribution of the article or any adaptations for non-commercial purposes.

NANO LETTERS

Letter

pubs.acs.org/NanoLett

Nerve Cells Decide to Orient inside an Injectable Hydrogel with Minimal Structural Guidance

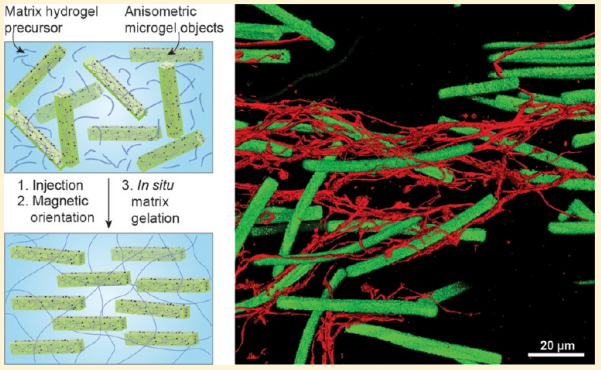
Jonas C. Rose,[†] María Cámara-Torres,[†] Khosrow Rahimi,[†] Jens Köhler,[†] Martin Möller,[†,‡] and Laura De Laporte*[,†]

[†]DWI – Leibniz-Institute for Interactive Materials, 52074 Aachen, Germany

[‡]Institute for Technical and Macromolecular Chemistry, RWTH, 52062 Aachen, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Injectable biomaterials provide the advantage of a minimally invasive application but mostly lack the required structural complexity to regenerate aligned tissues. Here, we report a new class of tissue regenerative materials that can be injected and form an anisotropic matrix with controlled dimensions using rod-shaped, magnetoceptive microgel objects. Microgels are doped with small quantities of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (0.0046 vol %), allowing alignment by external magnetic fields in the millitesla order. The microgels are dispersed in a biocompatible gel precursor and after injection and orientation are fixed inside the matrix hydrogel. Regardless of the low volume concentration of the microgels below 3%, at which the geometrical constrain for orientation is still minimum, the generated macroscopic unidirectional orientation is strongly sensed by the cells resulting in parallel nerve extension. This finding opens a new, minimal invasive route for therapy after spinal cord injury.



KEYWORDS: *Nerve growth, tissue regeneration, injectable hydrogel, anisotropy, magnetic alignment, microgels, magnetic nanoparticles*

In vivo, cells are surrounded by an extracellular matrix (ECM) that provides biological, mechanical, and structural support. The ECM functions as a spatiodynamic bioscaffold, which is created and maintained by the surrounding cells and in return influences the cellular signaling, architecture, and functionality.[1] In the case of irreversible tissue damage, an artificial matrix can be applied for healing. This matrix needs to address and mimic the conditions of the respective cell niche(s) in order to induce and support the regenerative capacity of endogenous surrounding and invading cells, or cell transplants.[2] Therefore, micron-scale and modular approaches are developed to fabricate complex functional biomaterial structures.[3] Moreover, multiple implantable constructs with aligned channels[4] or fibers[5] have been designed and applied to provide cell guidance, for example, for the purpose of spinal cord injury. However, depending on the type of damaged tissue, the severity of the disorder, and the time after injury, the application of either a preformed implant or an injectable liquid that forms a matrix in situ is desired. Injectable matrices are minimally invasive and are especially suitable to support healing of acute trauma-induced injuries of sensitive tissues, such as spinal cord,[6] myocardium,[7] and brain,[8] as remaining functional tissue should not be further impaired.[9] The advantage of injectable materials is that they can adopt any desired shape for the regeneration of various tissues, including bone,[10] cartilage,[11] and wound healing.[12]

As tissues comprise a complex, anisotropic, and hierarchical structure, regenerative matrices have to provide the correct architecture to guide cell organization during the healing process.[2b,13] In the case of peripheral and spinal nervous tissue, linear structures need to be designed. This can be achieved by aligning diamagnetic ECM–protein hydrogels, such as collagen or fibrin, in high magnetic fields (>4.5 T).[14] In vivo, Tranquillo et al. demonstrated more regenerating nerve cells in the peripheral nervous system when filling the hollow collagen tubes from Integra Life Sciences with a collagen gel that was aligned in a magnetic field of 9.4 T.[15] In contrast, most current injectable materials lack the ability to template complex tissue structures with directionally organized functions and mechanical properties. To our knowledge, only a few examples have been proposed for injectable materials that provide directional control. On the one hand, peptide hydrogels with monodomain regions of oriented fiber bundles, as introduced by Zhang et al.,[16] demonstrated aligned neurite outgrowth of dorsal root ganglions (DRGs) in vitro.[17] On the other hand, composite hydrogels have been described with polydisperse magnetically aligned chains of spherical iron oxide particles in Matrigel, supplying structure for orientation of single fibroblasts and PC12 neuron-like cells, both parallel and perpendicular to the

Received: March 16, 2017
Published: March 22, 2017

ACS Publications © 2017 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.nanolett.7b01123
Nano Lett. 2017, 17, 3782–3791

Downloaded via 81.34.218.140 on July 5, 2021 at 15:19:52 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jul 05, 2021

This Agreement between university of Santiago de Compostela -- Silvia Barbosa ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5102551127928
License date	Jul 05, 2021
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Small
Licensed Content Title	An Injectable Hybrid Hydrogel with Oriented Short Fibers Induces Unidirectional Growth of Functional Nerve Cells
Licensed Content Author	Laura De Laporte, Tamás Haraszti, Jonas C. Rose, et al
Licensed Content Date	Aug 7, 2017
Licensed Content Volume	13
Licensed Content Issue	36
Licensed Content Pages	8
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Title	Desarrollo de hidrogeles poliméricos y su aplicación en medicina regenerativa
Institution name	USC
Expected presentation date	Aug 2021
Portions	Figure 1e,f
Requestor Location	university of Santiago de Compostela Physics Faculty, Santiago de Compostela Santiago De Compostela, other 15782 Spain Attn: university of Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at

http://myaccount.copyright.com).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED

WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives,

and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jul 05, 2021

This Agreement between university of Santiago de Compostela -- Silvia Barbosa ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5102460506099
License date	Jul 05, 2021
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Pharmacological Research
Licensed Content Title	From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications
Licensed Content Author	Albert Figuerola,Riccardo Di Corato,Liberato Manna,Teresa Pellegrino
Licensed Content Date	Aug 1, 2010
Licensed Content Volume	62
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	18
Start Page	126
End Page	143

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Desarrollo de hidrogeles poliméricos y su aplicación en medicina regenerativa
Institution name	USC
Expected presentation date	Aug 2021
Portions	Figure 3
Requestor Location	university of Santiago de Compostela Physics Faculty, Santiago de Compostela Santiago De Compostela, other 15782 Spain Attn: university of Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms

and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk here). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation**: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website**: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx or the Elsevier homepage for books at http://www.elsevier.com; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at http://www.elsevier.com . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following

clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
    - via their non-commercial person homepage or blog
    - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
    - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
    - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
    - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
    - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
    - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation**: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by/4.0.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. **Other Conditions**:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FE DE ERRATAS

Indicios de calidad de la publicación derivada de la tesis titulada "**Desarrollo de Hidrogeles Poliméricos y su Aplicación en Medicina Regenerativa**" realizada Por Brenda Velasco Rodríguez.

Velasco-Rodríguez, B., Diaz-Vidal, T., Rosales-Rivera, L. C., García-González, C.A., Alvarez-Lorenzo, C., Al-Modlej, A., Domínguez-Arca, V., Prieto, G., Barbosa, S., Soltero Martínez, J. F.A., Taboada, P. *Hybrid Methacrylated Gelatin and Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds. Preparation and Systematic Characterization for Prospective Tissue Engineering Applications*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021** 22, 6758.

Revista Open Access. IF: 5.923 (2020), Q1: 67/297 en Área de Bioquímica & Biología Molecular

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA