Comportamiento reológico de geles biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa

F. REYES ORTEGA¹, G. RODRÍGUEZ¹, M. ROSA AGUILAR¹,
J. GARCÍA-SANMARTÍN², A. MARTÍNEZ², J. SAN ROMÁN¹

¹Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros. CSIC.

²Centro de Investigación Biomédica de La Rioja.

Resumen

Los hidrogeles (HG) poliméricos son redes macromoleculares tridimensionales constituidas por elementos básicos conectados entre sí física o químicamente e hinchados por un disolvente. Los HG poliméricos tienen múltiples aplicaciones, entre ellas su utilización en el desarrollo de materiales para regeneración de tejidos gracias a su alta biocompatibilidad y su uso frecuentemente como sistemas de liberación de fármacos debido a su capacidad para retener líquidos y compuestos bioactivos. En este trabajo se han preparado HG poliméricos formados por dos componentes altamente biocompatibles como son la gelatina y el ácido hialurónico, estabilizados con distintas concentraciones de genipina, consiguiendo diferentes grados de entrecruzamiento. Para comprobar la resistencia mecanodinámica y la estabilidad de estos hidrogeles, se realizaron ensayos termogravimétricos, estudios reológicos y estudios de hinchamiento de los mismos utilizando distintos medios tamponados. El uso de estos HG como sistema portador de fármacos se ha ensayado en un modelo experimental in vivo de ratón, utilizando el péptido N-terminal de 20 aminoácidos de la proadrenomedulina (PAMP) que posee propiedades angiogénicas, re-epitalizantes y antimicrobianas.

Abstract

Hydrogels (HG) are polymeric three-dimensional macromolecular networks formed by basic elements physically or chemically interconnected and swollen by a solvent. Polymeric HG have multiple applications, including their use in developing materials for tissue regeneration due to their excellent biocompatibility and their frequent use as drug delivery systems because of their ability to hold liquids and bioactive compounds. In this work, polymeric HG have been prepared with two highly biocompatible components such as gelatin and hyaluronic acid, stabilized with different concentrations of genipin, achieving different degrees of crosslinking. The mechanodynamic resistance and the stability of these hydrogels were tested with thermogravimetric assays, rheological tests and swelling measurements using various buffered media. The use of these HG as a drug carrier system has been tested in an experimental in vivo mouse model, using the 20 aminoacid N-terminal peptide of proadrenomedullin (PAMP) with angiogenic, antimicrobial and re-epithelizing properties.

Correspondencia:

Felisa Reyes Ortega
Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros. CSIC
C/ Juan de la Cierva 3. 28006 Madrid
felireyes@ictp.csic.es

Introducción

La descripción de nuevos biomateriales y sistemas utilizados en medicina regenerativa, que sean fisiológicamente eficaces y mecánicamente funcionales, se ha desarrollado en las últimas décadas de forma vertiginosa, en aplicaciones como injertos vasculares, portadores para liberación controlada de fármacos, stents, etc. El estudio de estos biomateriales requiere la investigación y caracterización tanto de su estructura como de sus propiedades mecánicas, definiendo parámetros que permitan evaluar las interacciones entre un biomaterial con un sistema biológico y analizando su comportamiento tras la implantación¹. Los requisitos que debe cumplir un biomaterial para poder ser utilizado en medicina regenerativa son: 1) ser biocompatible, aceptado por el organismo receptor, 2) ser químicamente estable y biodegradable, al menos durante el tiempo programado para su uso, 3) tener la resistencia, propiedades mecánicas y peso molecular adecuados, 4) presentar un adecuado diseño, tamaño y forma para ser implantado, 5) tener un proceso de fabricación reproducible, fácil procesamiento para su producción en gran escala y precio reducido.

Los hidrogeles (HG) son materiales poliméricos entrecruzados, de origen natural o sintético, en forma de red tridimensional que cuando entran en contacto con el agua se hinchan y forman compuestos elásticos, blandos, flexibles y que además retienen una cantidad significativa de esa misma estructura, pero sin disolverse.² Los HG poliméricos tienen múltiples aplicaciones en el campo de los biomateriales, entre ellas su utilización en el desarrollo de materiales para regeneración de tejidos gracias a su alta biocompatibilidad y su uso frecuentemente como sistemas de liberación de medicamentos debido a su capacidad para retener una amplia gama de compuestos bioactivos.^{3,4} La flexibilidad en las cadenas que poseen los sólidos poliméricos los convierte en aptos para formar geles, ya que permite que difundan moléculas de disolvente en su interior, formando así una estructura tridimensional. Estos geles, se pueden clasificar en varios tipos, siempre teniendo en cuenta la naturaleza de las uniones que posee la red que los constituye. Los geles físicos, son aquellos que poseen una red tridimensional formada por uniones iónicas o de tipo Van der Waals, dando lugar a redes reversibles,⁵ es decir, una vez formados (transcurrida la transición *sol-gel*) pueden sufrir la transición inversa (*gel-sol*) sin degradarse. Por su parte, reciben la denominación de geles químicos, aquellos en los que la red está formada por enlaces

covalentes, originándose una red irreversible, en la que es necesario su degradación para volver al estado *sol* inicial.

Los HG que presentan ambos tipos de entrecruzamiento, físico y químico, dan lugar a redes semi-interpenetradas (SINP). Este tipo de redes poseen la capacidad de sufrir deformaciones temporales cuando se les aplica un esfuerzo externo de intensidad limitada. Dicha deformación desaparece cuando el esfuerzo cesa, y el HG recupera parcialmente su estructura inicial, mientras que otra parte del esfuerzo aplicado se disipa en forma de calor. A este comportamiento se le denomina viscoelástico y es característico de los polímeros. El estudio de estas propiedades viscoelásticas se puede llevar a cabo por reología, a partir de ensayos dinámicos de esfuerzo-deformación.⁶

Los componentes elegidos en este trabajo para llevar a cabo la preparación de estas redes semi-interpenetradas han sido el ácido hialurónico y la gelatina, componentes biodegradables y biocompatibles de origen natural que proporcionan un entorno similar a la matriz extracelular y además presentan propiedades adecuadas (flexibilidad, hidrofilia, etc.) para su utilización en regeneración de tejidos (figura 1).

El ácido hialurónico (AH), un glucosaminoglicano no sulfatado de alto peso molecular que contiene grupos funcionales de ácido carboxílico, es uno de los componentes principales de la matriz extracelular del tejido conectivo, el líquido sinovial, el humor vítreo y la piel, entre otros órganos y tejidos. También cumple un papel antiinflamatorio mediante la inhibición de la destrucción tisular, favoreciendo los procesos de cicatrización.⁷ El AH tiene propiedades higroscópicas y viscoelásticas únicas. Cuando el AH se incorpora en un medio acuoso, se producen puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo y N-acetil adyacentes, lo cual le permite mantener la rigidez y retener agua.⁸ Por sus propiedades viscoelásticas puede ralentizar la penetración de los virus y bacterias, algo que reviste especial interés en la regeneración tisular, por ejemplo en el tratamiento de las enfermedades periodontales.⁹ Tiene múltiples funciones estructurales y fisiológicas en los tejidos, como las interacciones celulares, interacciones con los factores de crecimiento, regulación de la presión osmótica y la lubricación tisular, lo cual contribuye a mantener la integridad homeostática y estructural de los tejidos.¹⁰

La gelatina es una proteína compleja que se obtiene a partir de la degradación térmica o enzimática del colágeno. En su estructura química apare-

cen residuos de lisina o glutamina que presentan grupos amino libre que pueden actuar como puntos de entrecruzamiento y así obtener un gel mucho más estable. La gelatina es un biopolímero biodegradable con una excelente bioafinidad, por lo que se utiliza muy activamente en aplicaciones farmacéuticas y oftalmológicas.¹¹ Sin embargo la gelatina se disuelve rápidamente en ambientes húmedos, lo que limita sus aplicaciones biomédicas. El entrecruzamiento físico o químico de la gelatina mejora la estabilidad del material frente a degradaciones enzimáticas que se pueden dar en el organismo.¹² El entrecruzamiento físico que se puede producir por radiación UV o deshidratación presenta el inconveniente de que es difícil controlar la densidad de entrecruzamiento de la matriz polimérica.¹³ En cambio, con un entrecruzamiento químico podemos controlar fácil y eficazmente la densidad de entrecruzamiento de la red tridimensional en función de la concentración de agente entrecruzante, obteniendo una matriz formada a partir de enlaces covalentes que proporciona una mayor estabilidad mecánica.⁶ El entrecruzante químico convencional utilizado para entrecruzar matrices de gelatina

ha sido el glutaraldehído (GTA) (figura 1),^{14,15} sin embargo, estudios previos han demostrado su alta toxicidad y los posteriores problemas de calcificación que presenta.^{16,17}

La genipina es un producto natural extraído de la flor de jazmín que desde hace tiempo se usa en la medicina tradicional china para tratar la diabetes (figura 1). Este reactivo surge como una alternativa a los agentes entrecruzantes convencionales empleados para la gelatina, debido a su buena biocompatibilidad y baja toxicidad.^{18,19,20}

En este trabajo se han preparado y caracterizado hidrogeles poliméricos estabilizados con genipina, con distinto grado de entrecruzamiento. Estos HG formados por dos componentes altamente biocompatibles como son la gelatina y el hialuronato sódico, han sido cargados con una molécula biológicamente activa, como es el péptido *N*-terminal de 20 aminoácidos de la proadrenomedulina (PAMP) que posee propiedades angiogénicas, re-epitalizantes y antimicrobianas^{21, 22} con el fin de estudiar y desarrollar un sistema portador de fármacos para su aplicación en regeneración de tejidos.

Figura 1. Esquema de las estructuras químicas de la gelatina, el hialuronato sódico, la genipina y el glutaraldehído.

Materiales y métodos

Materiales

La gelatina (GE) de cerdo tipo A de 300 bloom se obtuvo de Sigma-Aldrich, el hialuronato sódico (HA) grado oral de peso molecular 100 kDa se obtuvo de Bioibérica, la genipina se obtuvo de Challenge Bioproducts Co. Estos reactivos se utilizaron sin previa purificación. El péptido *N*-terminal de 20 aminoácidos de la proadrenomedulina (PAMP) se adquirió de Phoenix Pharmaceuticals (Mw=2460.87) y para su utilización se disolvió en una solución tampón fosfatado (PBS) pH=7.4. El tampón fosfato (PBS) a pH=7.4 (140 mM NaCl, 10 mM tampón fosfato, 3 mM KCl), el tampón a pH=2 (citrato / ácido clorhídrico) y el tampón a pH=10 (ácido bórico / cloruro potásico / hidróxido sódico) se obtuvieron en Merck-Millipore en forma de polvo y se disolvieron en 1 L, 0.5 L y 0.5 L de agua destilada respectivamente, para su uso.

Métodos

La preparación de los hidrogeles de gelatina e hialuronato sódico se llevó a cabo por el método de casting o evaporación del disolvente. Para ello se preparó una mezcla directa a partir de las disoluciones acuosas de ambos componentes: 6 mL de una disolución acuosa de gelatina (100 mg/ml) y 8 mL de una disolución acuosa de hialuronato sódico (50 mg/ml). A dicha mezcla polimérica se le añadieron diferentes concentraciones de genipina (0.5, 1, 2 y 5 % en peso respecto a la mezcla polimérica) para obtener distintos grados de entrecruzamiento del hidrogel. La mezcla con todos los componentes se agitó a 200 rpm durante 10 min, se le aplicó ultrasonidos durante 5 min y rápidamente se depositó en un molde de teflón donde se dejó evaporar el agua a temperatura ambiente. El hidrogel seco se lavó con agua destilada varias veces (3-5) durante 2h, cambiando el agua cada 20 minutos para eliminar cualquier resto de genipina que hubiera quedado sin entrecruzar. Finalmente los hidrogeles se secaron a temperatura ambiente y se troquelaron para obtener discos de 1 cm de diámetro.

La incorporación del PAMP dentro del hidrogel se llevó a cabo depositando sobre el xerogel (hidrogel seco completamente) de 1 cm de diámetro, entrecruzado con un 1% de genipina, una disolución de PAMP (0.5 ml, 2 mM) y manteniendo durante 24h el sistema en atmósfera saturada de agua para favorecer la difusión del PAMP en el HG. Tras 24h, el hidrogel se dejó secar a temperatura ambiente. Se prepararon 2 tipos de muestras:

muestra control (HG sin PAMP) y muestra cargada (HG cargado con 1nmol de PAMP).

Ensayos in vivo del HG cargado con PAMP: modelo animal de ratón

Los ensayos in vivo se llevaron a cabo en el Centro de Investigación Biomédica de la Rioja (CIBIR), perteneciente a la Fundación Rioja Salud. Se utilizó la línea de ratones C57BL/6 Tg OTO, siguiendo el ensayo aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal del CIBIR (CEEa-CIBIR) 01-09. Las dos muestras de hidrogeles (muestra cargada con 1 nmol de PAMP y muestra control que no contiene PAMP) preparadas fueron colocadas en un bolsillo practicado en la dermis dorsal de dichos ratones modificados genéticamente que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) en los vasos sanguíneos. Después de 5 días, las membranas fueron extraídas y fijadas en formalina tamponada.

Para realizar el bolsillo en la dermis dorsal, los ratones recibieron anestesia inhalatoria con isoflurano. El dorso de los animales fue afeitado y se hizo una pequeña incisión en la piel, a través de la cual y con la ayuda de tijeras de punta roma, se practicó un bolsillo en la dermis capaz de albergar el disco de hidrogel. El HG se hidrató con PBS y se insertó en el bolsillo con la capa que contiene el PAMP dirigida hacia el animal. Una vez insertado el disco, se cerró la incisión con hilo de sutura y los animales se devolvieron a sus jaulas. Después del tiempo de incubación indicado en cada caso, se volvieron a anestesiarse los ratones y se extrajeron los discos. Éstos fueron fijados en formol tamponado al 10% y observados al microscopio confocal.

Algunos HG fueron incluidos en parafina, cortados de manera transversal a la superficie del disco, y teñidos con hematoxilina-eosina para obtener la imagen histológica del corte.

Caracterización

La caracterización por ATR-FTIR se llevó a cabo colocando el hidrogel seco entre dos cristales de CaF₂ de 2 mm de espesor y 25 mm de diámetro. Se utilizó un equipo Perkin-Elmer Spectrum One, realizando un barrido de 4000 a 600 cm⁻¹. Se realizaron 32 barridos con una resolución de 4 cm⁻¹.

Para la determinación del grado de hinchamiento en distintos medios tamponados (pH=2, 7.4 y 10), se pesaron los discos del hidrogel entrecruzado (10-30 mg) y se sumergieron en recipientes con 10 mL del tampón correspondiente y

se pusieron en un baño termostático a 37 °C. El hinchamiento se siguió gravimétricamente, midiendo la ganancia de agua con el tiempo de inmersión. A un tiempo determinado, se saca el disco, se seca cuidadosamente su superficie con un papel de filtro, se pesa y se devuelve al recipiente. Las medidas se hicieron por triplicado, tomando el valor promedio con su correspondiente desviación estándar (SD) para el cálculo del porcentaje del grado de hinchamiento a partir de la ecuación:

$$\%H = [(W_t - W_0) / W_0] \cdot 100$$

Donde H es el grado de hinchamiento (gramos de agua/gramo de hidrogel), W_t es el peso del disco hinchado en el tiempo t y W_0 es el peso del disco seco.

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en un equipo TGA Q500 (TA) entre 25 y 600 °C en atmósfera de nitrógeno a 10 °C/min.

Las medidas de reología se llevaron a cabo en un reómetro oscilatorio de esfuerzo controlado de TA Instruments modelo ARG2, utilizando una geometría de platos paralelos. Las muestras en disolución se midieron utilizando un plato superior de polimetacrilato de metilo de 40 mm de diámetro. Para las muestras en estado gel se usó un plato superior de acero de 20 mm de diámetro. Se realizaron ensayos dinamomecánicos, fijando el porcentaje de deformación en un 2% y manteniendo la fuerza normal inicial constante para todas las muestras. De esta forma se obtuvieron las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles, definidas a partir de su módulo de almacenamiento (G') y su módulo de pérdidas (G'').

Resultados y discusión

El entrecruzamiento de los hidrogeles de gelatina e hialuronato sódico involucra la formación de enlaces covalentes entre las cadenas de gelatina con las moléculas de genipina, dando lugar a una matriz entrecruzada químicamente que contiene cadenas de hialuronato sódico distribuidas aleatoriamente, a través de interacciones tipo Van der Waals (enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas, etc). Esta matriz da lugar a una red semi-interpenetrada como se muestra en la figura 2a, que es capaz de hincharse aumentando varias veces su peso en seco. Cuando el hidrogel está seco (xerogel) las cadenas poliméricas se encuentran sin estirar. En presencia de agua las cadenas que conforman la red se estiran y el hidrogel se expande hasta alcanzar el hinchamiento en el equilibrio, y éste es el resultado de un balance entre

las fuerzas osmóticas que causan que el disolvente penetre entre las cadenas del polímero hidrófilo y las fuerzas cohesivas existentes entre estas cadenas que oponen resistencia a la expansión (Figura 2b).

A través de la técnica de espectroscopía infrarroja se puede observar el proceso de la reacción de entrecruzamiento (figura 3) a través de la disminución de intensidades de las bandas características de los grupos funcionales ($\nu_{OH} = 3600 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{NH2} = 3400 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{CO} = 1660 \text{ cm}^{-1}$) del hidrogel en el espectro ATR-FTIR. Cuando se produce el entrecruzamiento a través de enlaces de hidrógeno entre los grupos OH, COOH y NH₂, se observa un ensanchamiento y una disminución en la intensidad de las bandas características. Además al aumentar el tiempo de reacción, se observa la aparición de una segunda señal de un grupo carbonilo ($\nu_{CO} = 1620 \text{ cm}^{-1}$) que se debe al entrecruzamiento químico que se produce entre la gelatina y la genipina, que da lugar a nuevos enlaces carbonilo con distinto entorno químico que los originales que presentan los polímeros sin entrecruzar ($\nu_{CO} = 1660 \text{ cm}^{-1}$).

Grado de Hidratación

La relación de entrecruzamiento es uno de los factores más importantes que afectan al hinchamiento de los hidrogeles y se define como la relación entre los moles de agente entrecruzante y los de las unidades de polímero que forman el hidrogel. Cuanto mayor es la cantidad de agente entrecruzante incorporado en la estructura del hidrogel, mayor es el entrecruzamiento, dando lugar a hidrogeles con una estructura más compacta, y que se hinchan menos. El grado de hidratación de los hidrogeles preparados se midió a 37 °C utilizando medios acuosos a distintos pH (2, 7.4 y 10). En la figura 4 se puede observar el perfil de hidratación de los hidrogeles entrecruzados con distintas concentraciones de genipina e hinchados a pH=7.4. En todos los sistemas, el hidrogel mostró un máximo de hidratación y luego disminuye hasta alcanzar un valor estable, que es lo que denominamos el grado de hinchamiento en equilibrio (W_e), y este comportamiento se debe a una respuesta viscoelástica del hidrogel. Al principio el sistema se encuentra en estado sólido (xerogel), formando una red rígida. Cuando el sistema empieza a hidratarse las cadenas poliméricas se hinchan y adquieren mayor flexibilidad, alcanzando el máximo grado de hidratación. Sin embargo, el sistema tiende con el tiempo a un estado de mínima energía, de forma que las cadenas empiezan a relajarse y contraen, expulsando moléculas de agua que habían penetrado en la red

Figura 2. a) Esquema de la formación de la capa de hidrogel compuesta por 60% en peso de gelatina y 40% en peso de hialuronato sódico entrecruzado con 1% en peso genipina, b) Fotografía obtenidas de los xerogeles y los hidrogeles hinchados en agua.

Figura 3. Espectros ATR-FTIR del sistema gelatina-hialuronato sódico entrecruzado con 5% en peso de genipina a distintos tiempos de reacción.

polimérica, hasta alcanzar un grado de hidratación estable. Este efecto es menor cuanto mayor es el grado de entrecruzamiento y es característico de los hidrogeles viscoelásticos.

El grado de hidratación en el equilibrio alcanzado por cada uno de los hidrogeles entrecruzados con distintas concentraciones de genipina e hinchados a distintos pH se representa en la figura 5. Se observa que conforme aumenta la concentración de agente entrecruzante disminuye el máximo de hidratación alcanzado en el equilibrio. Esto se debe a que el hidrogel presenta un mayor grado de entrecruzamiento, por tanto es más compacto y el disolvente penetra menos en la estructura polimérica. El grado de hidratación en el equilibrio de los geles entrecruzados con genipina varía entre 1200% para

los hidrogeles preparados con un 5% de entrecruzante y 3000% para aquellos preparados sólo con un 0.5%.

Además se observó que a pH=7.4 los hidrogeles presentan un mayor grado de hidratación que a pH=2 y pH=10 y además comienzan a degradarse antes. Así, los hidrogeles entrecruzados con un 1% de genipina comenzaron a degradarse a las 48 h a pH=7.4 mientras que a pH=2 y pH=10 la degradación del hidrogel comenzó a partir del sexto y séptimo día respectivamente. Esto se debe a que a pH=2 los grupos amino no entrecruzados de la gelatina están protonados ($pK_a=4.8$) y por ello van a interactuar iónicamente con los grupos carbonilos que hay presentes en la matriz polimérica, dando lugar a interacciones iónicas que proporcionan

Figura 4. Perfil de hinchamiento de los hidrogeles formados por gelatina: Hialuronato sódico (60:40) entrecruzados con distintas concentraciones de genipina en PBS (pH =7.4).

Figura 5. Grado de hidratación alcanzado en el equilibrio de los hidrogeles formados por gelatina:hialuronato sódico (60:40) entrecruzados con distintas concentraciones de genipina (%p/p genipina/polímero) e hinchados a distintos pH.

un mayor grado de entrecruzamiento de la estructura del hidrogel. A pH=10 los grupos carbonilos (pK_a=9.4) están cargados negativamente y pueden interaccionar con los grupos amino libres presentes en la estructura. Sin embargo, a pH=7.4 los grupos iónicos están parcialmente cargados y la interacción iónica que existe entre ellos es de menor fuerza, esto permite una mayor penetración de las moléculas de agua en la matriz, lo que conlleva un mayor grado de hidratación y más rápida degradación.

Grado de Entrecruzamiento

Un hidrogel entrecruzado que se encuentra formando una malla o red tridimensional, puede resistir esfuerzos mucho mayores sin perder su forma original, puesto que los enlaces intermoleculares evitan el desplazamiento de unas cadenas con respecto a otras. Cuando un hidrogel está hinchado se convierte en un material blando que presenta baja resistencia a la tracción y al desgarro. Aunque el contenido de agua tiene una gran influencia en las propiedades mecánicas, el comportamiento elástico y la rigidez de los hidrogeles depende de su estructura molecular, de la densidad de entrecruzamiento, de la formación de enlaces covalentes y de las fuerzas de interacción iónica, polares y/o estéricas. La determinación de estos parámetros se pueden llevar a cabo a partir de los estudios de hinchamiento de los hidrogeles, aplicando la teoría del equilibrio de Flory-Rhener, que nos conduce a la siguiente expresión para determinar el peso molecular promedio entre nudos (M_c) teniendo en cuenta que en el equilibrio la suma de energías libres es igual a cero:

$$\frac{1}{M_c} = \frac{2}{M_n} - \frac{\bar{V}}{V_1} \left[\ln(1 - v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi v_{2,s}^2 \right] \frac{v_{2,s}^2}{2}$$

Donde M_n es el peso molecular promedio en número del polímero lineal $\bar{V}$ es el volumen específico del polímero seco, V₁ corresponde al volumen molar del disolvente, v_{2,s} es la fracción en volumen del polímero en el equilibrio de hinchamiento, y χ es el parámetro de interacción polímero-disolvente.²³

A partir de los valores de peso molecular promedio entre nudos (M_c) podemos calcular la densidad de entrecruzamiento (ρ_x), que se define como el número promedio de unidades de polímero entre dos nudos consecutivos. Una densidad de entrecruzamiento baja permite tener una red más abierta, y un mayor grado de hinchamiento, en cambio, una alta densidad de entrecruzamiento implica un menor grado de hinchamiento y un hidrogel menos deformable.

$$\rho_x = \frac{1}{\bar{V} \cdot M_c}$$

Con el objetivo de establecer una comparación entre diferentes valores de M_c en función de la concentración de entrecruzante, se aplicó el modelo de Flory-Rhener para hidrogeles hinchados en PBS (pH=7.4), considerando el volumen molar del agua V₁=18.1 (mL/mol), el peso molecular promedio de la gelatina M_n=50000, la densidad de la gelatina a 25 °C, ρ_{GE}=1.44 g/mL y el parámetro de interacción gelatina-agua tabulado en bibliografía, χ_{GE}=0.49 ± 0.05.²³ Los resultados obtenidos de M_c así como de la densidad de entrecruzamiento (ρ_x) se recogen en la tabla 1. Se observa que al aumentar la concentración de agente entrecruzante, el peso molecular promedio entre nudos disminuye, es decir, la longitud de las cadenas poliméricas entre dos puntos de unión es menor, mientras que la densidad de entrecruzamiento aumenta, dando lugar a una matriz más compacta.

HG	M _c	ρ _x
0,5 % genipina	408 ± 48	0.17 ± 0.02
1 % genipina	224 ± 15	0.30 ± 0.02
2 % genipina	166 ± 31	0.41 ± 0.08
5 % genipina	103 ± 10	0.65 ± 0.06

Tabla 1. Peso molecular promedio entre nudos y densidad de entrecruzamiento de los hidrogeles de gelatina e hialuronato sódico entrecruzados con distintas concentraciones de genipina.

Estabilidad Mecánica

Los estudios reológicos nos permiten determinar y cuantificar las propiedades mecánicas de los HG cuando éstos sufren una deformación determinada. Para determinar las propiedades viscoelásticas de los HG preparados se realizaron ensayos dinamo-mecánicos de deformación, tiempo y frecuencia para determinar los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') de cada sistema entrecruzado y estimar la transición sol-gel de cada sistema.

- Barridos de deformación

Los barridos de deformación se llevaron a cabo para determinar el rango de viscoelasticidad lineal del sistema gelatina: hialuronato sódico (60:40). Este rango se define como el rango en el que el HG cumple la ley de elasticidad de Hooke (σ = G • γ, siendo σ el esfuerzo aplicado, G el módulo de relajación y γ la deformación que sufre el material), y es el rango en el que el sistema presenta un comportamiento viscoelástico. El barrido de deformación se realizó entre 1•10⁻³ y 1000 por ciento de deformación, fijando la frecuencia y la temperatura a 0.5 Hz y 25 °C respectivamente. El

rango de viscoelasticidad lineal obtenido osciló entre 1•10⁻³ y 3 % de deformación para todas las concentraciones de genipina utilizadas (figura 6).

- Barridos de tiempo

Los barridos de tiempo se llevaron a cabo fijando un 2% de deformación y 0.5 Hz a 25°C. En la figura 7 se observa la transición de los hidrogeles de gelatina-hialuronato sódico entrecruzados con distintas concentraciones de genipina, desde su estado en disolución (estado sol) hasta su estado sólido viscoelástico (estado gel). Esta transición se da en el transcurso de la reacción, lo que permite estudiar la evolución de las propiedades del material durante la cinética de la reacción de entrecruzamiento. Se observa el incremento del módulo de almacenamiento (G') en función del tiempo, indicando el aumento del carácter sólido del material.

Los barridos dinámicos de tiempo se realizaron a dos temperaturas distintas (25 y 37°C), y se obtuvo en cada caso un determinado tiempo relativo a la temperatura, en el que se produce la transición sol-gel para los HG entrecruzados a distinta con-

Figura 6. Barrido dinámico de deformación de los HG de gelatina:hialuronato sódico (60:40) entrecruzados con distintas concentraciones de genipina. En el eje Y de la izquierda se representa los valores del módulo de almacenamiento (G'), y en el de la derecha el módulo de pérdidas (G'').

	Gel Control (0% Genipina)	Genipina 0.5%	Genipina 1%	Genipina 2%	Genipina 5%
t (min)	177 ± 3	106 ± 5	88 ± 2	45 ± 2	39 ± 1

Tabla 2. Tiempo medio (25 y 37°C) en el que el módulo de almacenamiento (G') corta al módulo de pérdidas (G'') en el barrido de tiempo realizado a 2% de deformación y 0.5 Hz.

centración. La media de ambos valores se muestra en la tabla 2. Se observa como al aumentar el grado de entrecruzamiento, disminuye el tiempo que tarda en producirse la transición sol-gel.

- Barridos de frecuencia

El barrido de frecuencia se realizó con un 2% deformación entre 0.01 y 100 Hz a 25°C. La estabilización de G' hacia las etapas finales (Figura 8) nos define las propiedades viscoelásticas del gel formado. Se observa como al aumentar la concentración de entrecruzante, el valor del módulo de almacenamiento y el módulo de pérdidas aumenta (Tabla 3), indicándonos una mayor estabilidad del gel. En el gel control (el que no contiene agente entrecruzante) no se alcanzó la estabilidad lineal en el valor de ambos módulos (G' y G''), indicándonos que esta estructura gel no es estable.

Estabilidad Térmica

Se realizaron análisis termogravimétricos (TGA) de los sistemas entrecruzados con genipina

na y se compararon con el gel sin entrecruzar (HG control). Al aumentar la concentración del entrecruzante, la temperatura máxima de degradación así como la temperatura a la que se ha degradado el 10% del sistema aumentan debido a un mayor entrecruzamiento y estabilidad del gel (Tabla 4).

Ensayos in vivo del sistema HG cargado con PAMP: modelo animal de ratón

Se hicieron fotografías de las membranas con microscopio confocal y se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 9 a y b. Se observó la diferencia entre el hidrogel que no llevaba PAMP (9a) en el que no se observan vasos sanguíneos, y uno que sí lo llevaba (9b) en el que se observa la neo-formación de vasos sanguíneos. Las imágenes de microscopía óptica con tinción de hematoxilina-eosina corresponden a los discos extraídos tras 14 días de implantación e incluidos en parafina (Figura 9c y d). Se observa una mayor formación de vasos sanguíneos en la zona del implante que contiene los discos cargados con PAMP (Figura 9d).

Figura 7. Barrido dinámico de tiempo de los HG de gelatina: hialuronato sódico (60:40) entrecruzados con distintas concentraciones de genipina. El punto donde se cortan ambos módulos (G' y G'') se considera el tiempo al que tiene lugar la transición sol-gel.

	Gel Control (0% Genipina)	Genipina 0.5%	Genipina 1%	Genipina 2%	Genipina 5%
G' (Pa)	378	1060	3740	6400	20120
G'' (Pa)	61	94	212	385	1300

Tabla 3. Valores de los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') en estado gel.

Figura 8. Barridos de frecuencia del sistema gelatina: hialuronato sódico (60:40) utilizando distintas concentraciones de genipina como agente entrecruzante.

MUESTRA	$T_{10\%}$ (°C) ¹	T_{max} (°C) ²
HG CONTROL	105	312
HG Genipina 0.5%	105	314
HG Genipina 1%	110	317
HG Genipina 2%	135	319
HG Genipina 5%	140	322

(1) $T_{10\%}$ =Temperatura a la que se ha degradado el 10% del sistema.
(2) T_{max} =Temperatura a la cual la velocidad de degradación es máxima, según la derivada de la curva del termograma.

Tabla 4. Temperaturas de degradación del sistema gelatina:hialuronato sódico (60:40) entrecruzado con distintas concentraciones de genipina.

Figura 9. Imágenes obtenidas con el microscopio confocal (a,b) y de campo claro (c,d) de los hidrogeles insertados bajo la piel de los ratones. a) micrografía del hidrogel control (formado por el hidrogel sin PAMP), b) micrografía del hidrogel que contiene 1 nmol PAMP, después de haber sido injertados durante 5 días bajo la piel de los ratones. c) imagen del corte histológico transversal del tejido teñido con hematoxilina-eosina tras 14 días de implantación del sistema control, d) imagen del corte histológico transversal del tejido con sistema que contiene PAMP implantado. Barras de aumento: a,b = 75 μ m; c,d = 150 μ m.

Conclusiones

Se prepararon redes poliméricas semi-interpenetradas de gelatina e hialuronato sódico entrecruzadas con distintas concentraciones de genipina. La caracterización de estos hidrogeles por reología y los estudios de hinchamiento permitieron determinar su estabilidad mecánica y propiedades viscoelásticas del sistema entrecruzado. Se ha observado que la densidad de entrecruzamiento del sistema aumenta con el aumento de concentración de la genipina, y esto permite modular el grado de hinchamiento alcanzado en el equilibrio. El hin-

chamiento es dependiente del pH del medio, siendo mayor a pH fisiológico lo que hace que estos sistemas puedan ser muy útiles como sistemas portadores de fármacos y en ingeniería de tejidos.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación de los proyectos MAT2010-18155, SAF-2009-13240-C02-01 y del CIBER-BBN. Felisa Reyes Ortega agradece la adjudicación de un contrato del CSIC JAE-predocctoral.

Referencias

1. **Hutmacher, D. W.; Sitter, M.; Risbud, M. V.**, Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends in Biotechnology* 2004, 22 (7), 354-362.
2. **Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E.**, Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules* 2011, 12 (5), 1387-1408.
3. **Hoare, T. R.; Kohane, D. S.**, Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 2008, 49 (8), 1993-2007.
4. **Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F.**, Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54 (1), 13-36.
5. **Jeong, B.; Kim, S. W.; Bae, Y. H.**, Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54 (1), 37-51.
6. **Vanderhoff, J. L.; Alcoutlabi, M.; Magda, J. J.; Prestwich, G. D.**, Rheological Properties of Cross-Linked Hyaluronan-Gelatin Hydrogels for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience* 2009, 9 (1), 20-28.
7. **Muzzarelli, R. A. A.; Greco, F.; Busilacchi, A.; Sollazzo, V.; Gigante, A.**, Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydrate Polymers* 2012, 89 (3), 723-739.
8. **Collins, M.; Birkinshaw, C.**, Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2008, 19 (11), 3335-3343.
9. **Gontiya, G.; Galgali, S.**, Effect of hyaluronan on periodontitis: A clinical and histological study. 2012; Vol. 16, p 184-192.
10. **Yoo, H. S.; Lee, E. A.; Yoon, J. J.; Park, T. G.**, Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2005, 26 (14), 1925-1933.
11. **Pal, K.; Banthia, A. K.; Majumdar, D. K.**, Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. *AAPS PharmSciTech* 2007, 8 (1).
12. **Peng, H. T.; Martineau, L.; Shek, P. N.**, Hydrogel-elastomer composite biomaterials: 3. Effects of gelatin molecular weight and type on the preparation and physical properties of interpenetrating polymer networks. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2008, 19 (3), 997-1007.
13. **Zandi, M.; Mirzadeh, H.; Mayer, C.**, Effects of concentration, temperature, and pH on chain mobility of gelatin during the early stages of gelation. *Iranian Polymer Journal (English Edition)* 2007, 16 (12), 861-870.
14. **Matsuda, S.; Iwata, H.; Se, N.; Ikada, Y.**, Bioadhesion of gelatin films crosslinked with glutaraldehyde. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999, 45 (1), 20-27.
15. **Ai, H.; Mills, D.; Jonathan, A.; Jones, S.**, Gelatin-glutaraldehyde cross-linking on silicone rubber to increase endothelial cell adhesion and growth. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 2002, 38 (9), 487-492.
16. **Gough, J. E.; Scotchford, C. A.; Downes, S.**, Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002, 61 (1), 121-130.
17. **Wang, C.; Lau, T. T.; Loh, W. L.; Su, K.; Wang, D.-A.**, Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker—Genipin with therapeutic model cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2011, 97B (1), 58-65.
18. **Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Roveri, N.; Rubini, K.**, Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* 2002, 23 (24), 4827-4832.
19. **Nickerson, M. T.; Farnworth, R.; Wagar, E.; Hodge, S. M.; Rousseau, D.; Paulson, A. T.**, Some physical and microstructural properties of genipin-crosslinked gelatin-maltodextrin hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules* 2006, 38 (1), 40-44.
20. **Yoo, J. S.; Kim, Y. J.; Kim, S. H.; Choi, S. H.**, Study on genipin: A new alternative natural crosslinking agent for fixing heterograft tissue. *Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2011, 44 (3), 197-207.
21. **Eto, T.**, A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides* 2001, 22 (11), 1693-1711.
22. **Martínez, A.; Bengoechea, J. A.; Cuttitta, F.**, Molecular Evolution of Proadrenomedullin N-Terminal 20 Peptide (PAMP): Evidence for Gene Co-Option. *Endocrinology* 2006, 147 (7), 3457-3461.
23. **Bohidar, H. B.**, Hydrodynamic properties of gelatin in dilute solutions. *International Journal of Biological Macromolecules* 1998, 23 (1), 1-6.