

Trabajo Fin de Grado

Hidrogeles sintéticos con propiedades mecánicas
controladas
Synthetic hydrogels with controlled mechanical
properties

Autor

Irene Parra Serrano

Director/es

Carlos Sánchez Somolinos
Sandra González Lana

Ponente

Victor Sebastián Cabeza

“Hidrogeles sintéticos con propiedades mecánicas controladas”

RESUMEN

ANTECEDENTES: La matriz extracelular (MEC) es una red tridimensional estructuralmente compleja, que actúa como soporte de las células, controla el desarrollo de sus funciones básicas y desempeña un papel fundamental en la regeneración de los tejidos. Por este motivo, ha sido objeto de estudio durante los últimos años en el ámbito de la biomedicina, que trata de sintetizar andamiajes artificiales *in vitro* capaces de emular las funciones de la MEC. En este contexto, los hidrogeles han cobrado mucha importancia. Se trata de materiales constituidos por redes poliméricas tridimensionales, que poseen la capacidad de almacenar agua en su interior. Dichas propiedades los hace semejantes a los tejidos blandos del organismo, proporcionándoles cierta ventaja frente a otro tipo de materiales.

OBJETIVO: En el presente trabajo se plantea la preparación, modulación de las propiedades mecánicas y caracterización de hidrogeles basados en polietilenglicol diacrilato (PEGDA), 2,2'-(etilenedioxi) dietanetriol (EDDET) y ácido acrílico, tratando de emular la MEC de los tejidos del organismo. Finalmente, también se han llevado a cabo ensayos preliminares con el fin de estudiar la adhesión celular en este tipo de materiales.

METODOLOGÍA: La preparación de los hidrogeles se ha llevado a cabo en el departamento de Física de la Materia Condensada (Laboratorio de Manufacturación Avanzada del ICMA). La modulación de las propiedades mecánicas, se ha realizado mediante la variación estequiométrica de PEGDA y EDDET, y su posterior caracterización mecánica a través de ensayos de compresión en el I3A. La caracterización morfológica de los hidrogeles, se ha realizado, en el INA, mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Asimismo, han sido sometidos a ensayos de hinchamiento, realizados en el Laboratorio de Manufacturación Avanzada del ICMA, con el fin de estudiar la cantidad de agua que son capaces de absorber. Por último, la adhesión celular de los sistemas preparados, ha sido estudiada, en el I3A, mediante la biofuncionalización y posterior cultivo celular.

RESULTADOS: A través de la variación de la estequiometría de los macrómeros de PEGDA y EDDET que constituyen el hidrogel, es posible la modulación de las propiedades mecánicas del material. Se han sintetizado desde hidrogeles blandos y flexibles, con un valor de módulo de Young de 6 kPa, hasta hidrogeles rígidos con valores de 487 kPa. Los ensayos de hinchamiento, han mostrado que la cantidad de PBS absorbida depende, en gran medida, tanto de la relación estequiométrica de PEGDA y EDDET como de la proporción de Phosphate Buffer Saline (PBS) que contengan las muestras, llegando a absorber, algunas de ellas, un 120% respecto su peso inicial. Mediante la microscopía electrónica se ha observado que se ha trabajado con hidrogeles con superficie porosa e interior denso y compacto. Finalmente, a través de los ensayos de funcionalización y cultivo celular, se ha podido observar que la adhesión celular no ha tenido lugar. No obstante, no es posible sacar conclusiones firmes a partir de dicho resultado, ya que el ensayo se ha realizado únicamente en dos muestras de condiciones distintas. Para obtener resultados significativos sería necesario repetir el proceso con un mayor número de muestras.

ÍNDICE GENERAL

MEMORIA

1.- Introducción	1
2.- Materiales y técnicas experimentales	7
2.1.- Materiales y preparación de mezclas.....	7
2.1.1.- Materiales	7
2.1.2.- Preparación de mezclas	8
2.2.- Técnicas experimentales	9
2.2.1.- Fotopolimerización	9
2.2.2.- Ensayos de hinchamiento.....	9
2.2.3.- Ensayos mecánicos	10
2.2.4.- Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	11
2.2.5.- Biofuncionalización	11
2.2.6.- Cultivo celular	12
3.- Resultados y discusión	14
3.1.- Hinchamiento.....	14
3.2.- Ensayos de compresión.....	15
3.2.1.- Ensayos de fatiga.....	18
3.3.- Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	19
3.4.- Biofuncionalización y cultivo celular	21
4.- Resumen y conclusiones	23
5.- Acrónimos y abreviaturas de compuestos químicos	24
6.- Bibliografía	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Matriz de mezclas estudiadas	8
Tabla 2: Porcentaje final (%) de absorción de PBS en las muestras T:A-PBS 50-50(%) a 37°C	14
Tabla 3: Porcentaje final (%) de absorción de PBS en las muestras T:A-PBS 30-70(%)a 37°C	15
Tabla 4: Mezclas seleccionadas para ensayos posteriores	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Módulos de Young en distintos tejidos del cuerpo humano	2
Figura 2: Esquema del proceso de fotopolimerización radicalaria ^[4]	3
Figura 3: a) Cadenas poliméricas libres. b) Estructura de cadenas poliméricas libres entrecruzadas	3
Figura 4: Molécula de PEGDA	4
Figura 5: Formación de hidrogeles de PEGDA por fotopolimerización	4
Figura 6: Esquema de la reacción tiol:acrilato mediante adición de Michael	5
Figura 7: Esquema del proceso de biofuncionalización ^[9]	5
Figura 8: Molécula de Irgacure 2959	7
Figura 9: Hidrogeles de T:A-PBS tras el proceso de fotopolimerización	9
Figura 10: Curva tensión-deformación	10
Figura 11: Esquema a nivel molecular del proceso de biofuncionalización ^[9]	12
Figura 12: Cámara de recuento celular de Neubauer ^[17]	13
Figura 13: Gráficas de los ensayos de hinchamiento a 37°C. a) Curvas pertenecientes a los ensayos de hinchamiento de las muestras T:A (50-50)(%). b) Curvas pertenecientes a los ensayos de hinchamiento de las muestras T:A (30-70)(%)	14
Figura 14: Módulo de Young(E) para las mezclas de T:A-PBS (50-50)(%) a 37°C	16
Figura 15: Módulo de Young(E) para las mezclas de T:A-PBS (30-70)(%) a 37°C	17
Figura 16: curvas de esfuerzo-deformación obtenidas a partir de los ensayos de fatiga para los hidrogeles a)1:1,04 30-70 (%) y b)1:1,06 30-70 (%)	18

Figura 17: Conjunto de pruebas previas a la microscopía electrónica, a) muestras de 1:1,06 30-70 (%) y 1:1,04 30-70 (%) respectivamente tras el proceso de liofilización, b) muestras cortadas y recubiertas metálicamente 19

Figura 18: Imágenes obtenidas con microscopía electrónica de hidrogeles de la mezclas de 1:1,04(30-70)(%). a) Superficie del hidrogel, b) línea que divide la superficie y el interior del hidrogel, c) interior del hidrogel, d) cavidades formadas en el interior del hidrogel 20

Figura 19: Imágenes obtenidas con microscopía electrónica de hidrogeles de la mezclas de 1:1,06(30-70)(%). a) Línea que divide la superficie y el interior del hidrogel, b) interior del hidrogel 20

Figura 20: Fibroblastos adheridos a la superficie de la placa Petri 22

MEMORIA

1.- Introducción

La matriz extracelular (MEC) es una red tridimensional de macromoléculas que proporciona soporte físico y estructural a los diferentes tipos celulares. Su composición es específica de cada órgano o tejido pero mayoritariamente está compuesta por agua, proteínas y polisacáridos. La MEC, no solo actúa como soporte para los diferentes tejidos y células, sino que además, sus componentes establecen un diálogo bioquímico y biofísico con las células con las que tiene contacto. Esta interacción es fundamental en el desarrollo y regulación de los procesos celulares: migración, proliferación, diferenciación, apoptosis¹ y homeostasis^{2[1]}. Es por ello que la matriz extracelular no debe ser considerada como un elemento pasivo con función de soporte, sino como un sistema que influye en el comportamiento y función de las células.

Durante los últimos años el estudio de la MEC ha cobrado especial relevancia en el campo de la biomedicina. Se intenta reproducir en modelos *in vitro* las propiedades físico-químicas observadas *in vivo* para la MEC de distintos tejidos. Tradicionalmente, los modelos de cultivo celular *in vitro*, han consistido en modelos bidimensionales (2D), basados en una monocapa celular sobre una placa Petri. No obstante, se trata de modelos que no favorecen el desarrollo celular, al no propiciar un entorno adecuado en el que estas puedan llevar a cabo sus funciones específicas. Este hecho, ha sugerido la preparación de modelos tridimensionales (3D) mediante la síntesis de andamiajes artificiales capaces de emular, en mayor medida, la complejidad de la matriz extracelular^{[2][3]}. Es evidente que la síntesis de un andamiaje artificial es una tarea compleja y son muchas las características que han de tenerse en cuenta. En primer lugar, ha de tener unas propiedades bioquímicas determinadas, de modo que se simule el entorno biológico y se posibilite la proliferación, diferenciación celular y, finalmente, la producción de una nueva matriz extracelular^{[4],[5]}. Más allá de las propiedades químicas, es de suma relevancia que las células encuentren un entorno con unas propiedades mecánicas adecuadas^[6]. Cada tejido tiene sus propias particularidades en este respecto, con lo cual, el andamiaje ha de diseñarse teniendo como objetivo el tejido en cuestión. Éste ha de ser capaz de soportar los esfuerzos correspondientes al movimiento del organismo, por lo que tiene que ofrecer unas propiedades mecánicas similares a las del tejido que va a tratar de emularse. La rigidez de un tejido puede caracterizarse mecánicamente mediante el módulo de Young o módulo elástico. Se trata de un parámetro que mide la resistencia de un material frente a la deformación elástica. Valores elevados del módulo de Young, indican que se trata de tejidos rígidos que ofrecen poca deformación elástica, mientras que valores bajos corresponden a tejidos más elásticos.

En la figura 1 se representan los valores de módulo de Young para diferentes tejidos del organismo.

¹ Apoptosis: tipo de muerte celular provocada por el propio organismo con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento.

² Homeostasis: conjunto de fenómenos de autorregulación para mantener estables las condiciones internas del organismo.

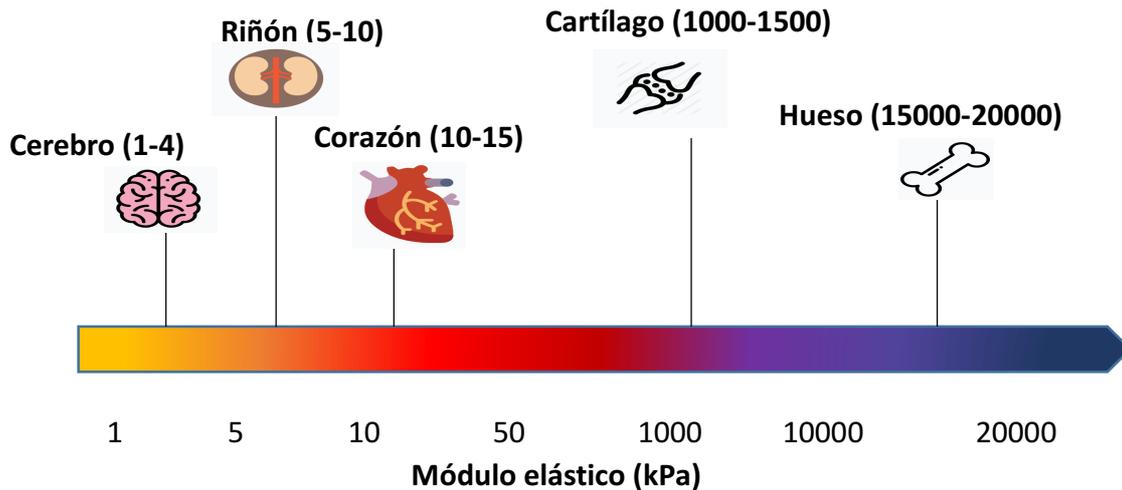


Figura 1: Módulos de Young en distintos tejidos del cuerpo humano.

Otro aspecto crucial a la hora de tratar de emular la MEC, es la biodegradabilidad del material. Esto es de gran importancia en aplicaciones de ingeniería de tejidos, donde se hace uso de un andamiaje artificial para restaurar las funciones de un tejido dañado. A medida que la actividad celular tiene lugar, éste deberá disminuir su masa para ser reemplazado por el tejido nuevo. Por lo que es conveniente que los materiales empleados para emular la MEC sean sensibles a mecanismos físico-químicos como la hidrólisis o la acción enzimática producto de la actividad celular^[7].

Atendiendo a las propiedades bioquímicas y mecánicas que ha de tener un andamiaje capaz de emular la matriz extracelular, es evidente que el biomaterial que la constituya contará con un alto grado de sofisticación. El término biomaterial hace referencia a aquellas sustancias capaces de interactuar con los sistemas biológicos del organismo. Los hidrogeles son materiales formados generalmente a partir de un polímero hidrófilo entrecruzado. La estructura polimérica de estos materiales, junto con la capacidad que poseen para albergar agua en su interior^{[3][4]}, propician la creación de un entorno tridimensional similar al de los tejidos blandos, que permite tanto la difusión de los nutrientes, como de los desechos celulares a través de la red tridimensional. Estas características han hecho que los hidrogeles hayan sido estudiados de forma intensiva, y utilizados para la fabricación de andamiajes capaces de sustentar cultivos celulares, logrando la reparación y regeneración, en muchos casos, de una gran variedad de tejidos como el cartilaginoso y el vascular^[8].

Según su origen polimérico, los hidrogeles pueden clasificarse en dos grupos, naturales o sintéticos. Los hidrogeles naturales están constituidos por materiales basados en polímeros naturales presentes en la MEC, como colágeno, fibrina o ácido hialurónico. Mientras que los sintéticos, son aquellos basados en polímeros que no se encuentran en el medio de forma natural, como el poliácido acrílico (PAA) o el polietilenglicol (PEG)^[8].

Los hidrogeles, pueden ser sintetizados mediante el entrecruzamiento físico o químico. En el entrecruzamiento físico la unión se realiza mediante enlaces iónicos, cristalización o puentes de hidrógeno. El entrecruzamiento químico, tiene lugar cuando se establecen enlaces covalentes entre las cadenas poliméricas. Una de las técnicas más empleadas en la síntesis de polímeros sintéticos es el foto-entrecruzamiento (figura 2). Se trata de un tipo de entrecruzamiento químico de monómeros que se realiza en presencia de radiación lumínica, agentes de entrecruzamiento y fotoiniciadores^[4]. Los fotoiniciadores son sustancias capaces de generar radicales libres al ser irradiados con una longitud de onda determinada, transformando la energía luminosa en energía química. Los radicales libres, tienen la capacidad de transferirse a monómeros, de modo que pueden unirse a su vez, a otros monómeros, pasando el radical al último monómero añadido^[9].

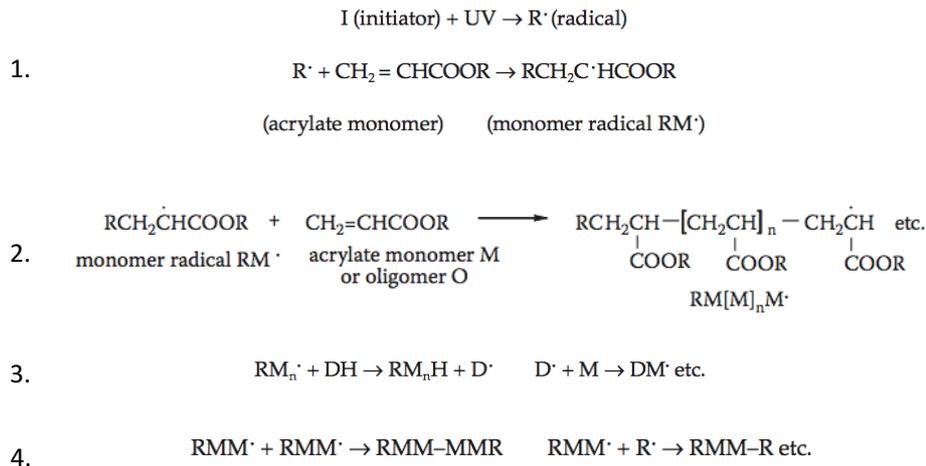


Figura 2: Esquema del proceso de fotopolimerización radicalaria^[9].

Una de las ventajas principales de la fotopolimerización radicalaria es la posibilidad de controlar la estructura final del andamiaje del material^[8]. En la figura 3 se representa, por una parte, la estructura de cadenas poliméricas sueltas, y por otra, la estructura de cadenas poliméricas entrecruzadas.

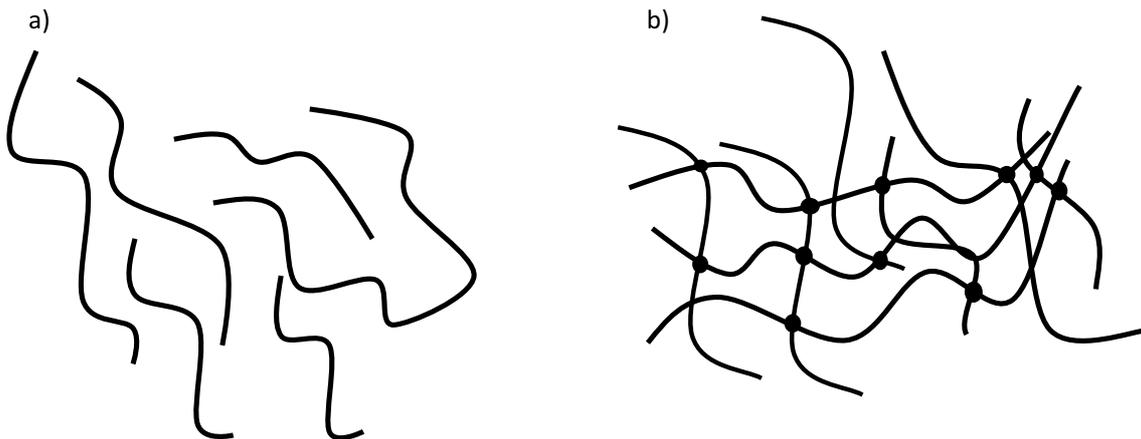


Figura 3: a) Cadenas poliméricas libres. b) Estructura de cadenas poliméricas libres entrecruzadas.

El gran potencial que presentan los hidrogeles como biomateriales, se debe en mayor parte, a sus propiedades, las cuales merecen ser explicadas con mayor detalle.

Las propiedades mecánicas de estos materiales son fácilmente modulables. Las características de los monómeros, es decir, el tipo de unidades que los forman, y el grado de entrecruzamiento, serán factores importantes en las propiedades mecánicas finales del hidrogel. Asimismo, pueden ser controladas variando el peso molecular o la concentración de los polímeros, o introduciendo diferentes tipos de monómeros en la cadena^{[10],[11]}. Este último proceso, recibe el nombre de copolimerización.

Las redes poliméricas de los hidrogeles tienen tanto grupos hidrófilos como hidrófobos. La naturaleza hidrófila de los hidrogeles se debe a la compatibilidad entre el medio acuoso y los grupos hidrófilos de la red entrecruzada, como podrían ser los grupos hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), amida (-CONH₂) o sulfónico (SO₃H)^[11]. Esto explica la capacidad de los hidrogeles para absorber grandes

cantidades de agua, proceso que recibe el nombre de hinchamiento. Este proceso finaliza cuando se llega a un estado de equilibrio. El estado de equilibrio resulta de un balance entre las fuerzas osmóticas que causan que el medio acuoso penetre entre las cadenas del polímero hidrófilo y las fuerzas cohesivas existentes entre estas cadenas que oponen resistencia a la expansión ^[12].

De entre la gran variedad de monómeros existentes para la síntesis de hidrogeles, en este proyecto se ha escogido el polietilenglicol diacrilato (PEGDA)(figura 4). Se trata de un compuesto reportado y utilizado en numerosos estudios^[10]. El PEGDA presenta un grupo acrilato en cada extremo, es altamente hidrófilo, biocompatible y no tóxico a partir de pesos moleculares por encima de 400 Da. Además es fácilmente eliminado por el organismo^[10]. Al ser irradiado con luz UV en presencia de agua y un fotoiniciador, el PEGDA polimeriza dando lugar a hidrogeles (figura 5). Debido a estas propiedades, el PEGDA es ampliamente investigado y reconocido como uno de los materiales más exitosos para aplicaciones de ingeniería de tejidos ^[4].

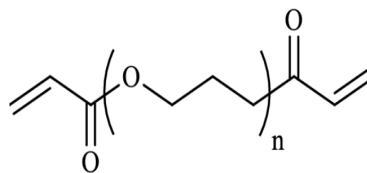


Figura 4: Molécula de PEGDA.

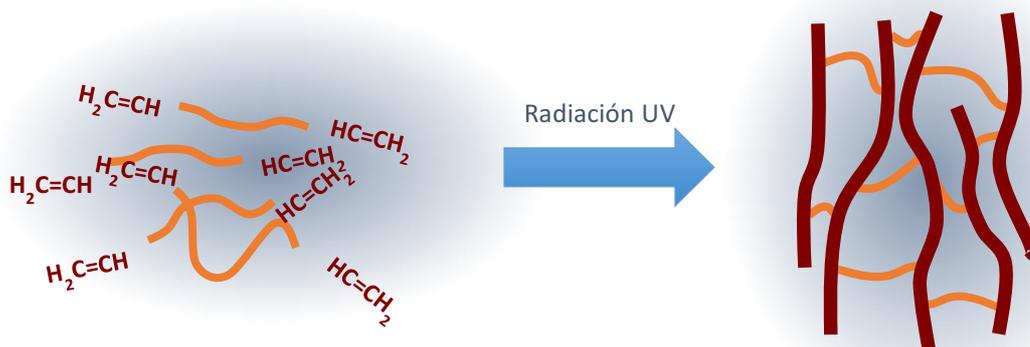


Figura 5: Formación de hidrogeles de PEGDA por fotopolimerización.

Sin embargo, una de las desventajas del PEGDA, es su resistencia inherente a la adhesión de proteínas^[4]. Al no tener grupos que establezcan unión de manera natural con proteínas de adhesión celular, presenta una actividad biológica intrínseca nula y no proporciona un ambiente idóneo para las células. Para proporcionar sitios reactivos en la superficie del hidrogel, la adición de ácido acrílico a la reacción de polimerización proporciona grupos carboxilo que pueden conjugarse, mediante enlaces peptídicos, con proteínas de matriz extracelular.

Otra de las desventajas de los hidrogeles basados en moléculas de PEGDA, es su degradación. Requiere largos periodos de tiempo, como podrían ser meses e incluso años^[13]. Esto supone un inconveniente. No obstante, el PEGDA, puede ser alterado con el fin de favorecer la degradación mediante la incorporación de segmentos degradables como el poliéster, el poli (fumarato de propileno) (PPF) o disulfuro^[8]. De manera análoga, la biodegradación también puede favorecerse haciendo uso de la reacción tiol:acrilato (T:A) mediante adición de Michael para la sintetizar macrómeros con enlaces tioéter (sulfuro)(figura 5)^[8].

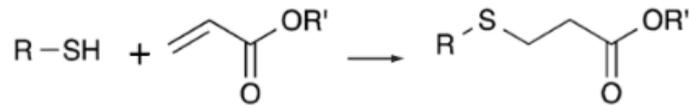


Figura 6: Esquema de la reacción tiol:acrilato mediante adición de Michael.

En este trabajo de fin de grado, se persigue **la síntesis de hidrogeles** basados en macrómeros de tiol:acrilato en diferentes proporciones **tratando de modular las propiedades mecánicas del material**. Para ello, se introduce una molécula denominada 2,2'-(Etilenedioxi) dietanetiol (EDDET) con el fin de favorecer la reacción tiol:acrilato, y ácido acrílico para la posterior biofuncionalización de los hidrogeles. La preparación de estos materiales se plantea mediante un proceso que tiene lugar en dos etapas (*two-stage*). Para ello, se emplea PEGDA, EDDET y ácido acrílico, con un exceso estequiométrico de acrilato frente al tiol. El PEGDA, al presentar un grupo acrilato en cada extremo, se puede incorporar al polímero por dos puntos. Sus grupos acrilato pueden reaccionar, bien por la adición de Michael de la primera etapa, donde se forman los macrómeros, o en la fotopolimerización radicalaria de la segunda etapa, donde fotopolimerizan los grupos acrilato y se forma la red polimérica entrecruzada. Debido al exceso estequiométrico de acrilato, el tiol se incorpora al polímero mediante adición de Michael formando enlaces tioéter que pueden favorecer la degradación. Si la segunda etapa se lleva a cabo en presencia de agua, ésta queda retenida en la red tridimensional.

La preparación de un andamiaje con las propiedades mecánicas adecuadas para que ejerza de soporte de los cultivos celulares, es esencial. Sin embargo, la aplicación biomédica del material, exige una mayor complejidad a la hora de sintetizarlo, ya que son más los aspectos que han de considerarse. Tal y como se ha explicado anteriormente, es importante que las células puedan adherirse a dicho material. Para ello, es necesario la biofuncionalización del material^[14].

Ésta consiste en la unión entre dos moléculas, generalmente, gracias a la presencia de enlaces covalentes, mediante un agente bioconjugante (figura 7)^[15]. En el trabajo como agente bioconjugante se utilizan dos compuestos, el EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride) y el sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide), que permiten la unión entre el hidrogel y la fibronectina mediante la interacción entre los grupos carboxilo del ácido acrílico y los grupos amina de la proteína, formando un enlace peptídico. Asimismo, las células, a través de receptores de membrana específicos para secuencias de la fibronectina se unen a la proteína. Este proceso se explica con más detalle a continuación.



Figura 7: Esquema del proceso de biofuncionalización^[15].

La adhesión celular en los sustratos y su posterior propagación están mediadas por los receptores de adhesión transmembrana y las correspondientes proteínas de la matriz extracelular (MEC). Las integrinas son las principales involucradas en las interacciones célula-matriz. Las integrinas, están vinculadas al citoesqueleto de actina por proteínas asociadas, y estos complejos de proteínas estructurales, también sirven como marco para la asociación de moléculas de señalización que regulan el comportamiento y desarrollo celular^[4].

Además de sus propiedades mecánicas, también se estudiarán otras propiedades relevantes de los hidrogeles, como su **capacidad de hinchamiento y su morfología**.

Por último, el trabajo también tiene como objetivos estudiar **la biofuncionalización de los hidrogeles** obtenidos para **el cultivo celular en su superficie**. Se estudiará la adhesión celular en este tipo de materiales. El tipo de células empleadas para hacer el cultivo celular son los fibroblastos. Los fibroblastos constituyen el principal tipo celular involucrado en la síntesis y homeostasis de la matriz extracelular.

Dada la aplicación biomédica del material que se desea preparar, tanto los ensayos de compresión, como los de hinchamiento, se han llevado a cabo a una temperatura de 37°C, con el fin de reproducir las condiciones lo más próximas a las del organismo.

2. Materiales y técnicas experimentales

2.1. Materiales y preparación de mezclas

2.1.1. Materiales

PEGDA

El polietilenglicol diacrilato (PEGDA) (Sigma Aldrich ref. 455008) está constituido por una larga cadena lineal de poliéter, con dos grupos acrilato en los extremos. En el trabajo se ha empleado PEGDA con un peso molecular de 700 Da.

El PEGDA tiene una densidad de 1,12g/mL a 25º, y su temperatura de fusión se encuentra entre 12-17ºC. Es conveniente conservarlo en un refrigerador para posteriormente trabajar en condiciones óptimas.

EDDET

El 2,2'-(Ethilenedioxi) dietanetiol (EDDET) (Sigma Aldrich ref. 465178) es una molécula de menor tamaño, 182.3 Da, con dos grupos tiol en los extremos.

TEA

La trietilamina (Sigma Aldrich ref. T0886) es una amina terciaria que se utiliza como catalizador de la adición de Michael. Se encuentra en estado líquido y se evapora rápidamente a temperatura ambiente, con lo cual, al añadirla, se recomienda que el recipiente no permanezca durante mucho tiempo abierto.

Ácido acrílico

El ácido acrílico (Sigma Aldrich ref. 147230) juega un papel fundamental para que posteriormente pueda llevarse a cabo el proceso de biofuncionalización. Los grupos carboxilo se unirán a los grupos amino de la fibronectina, que a su vez hará posible que pueda hacerse el cultivo celular. Por tanto, el ácido acrílico sirve como punto de anclaje para la fibronectina a la red tridimensional del hidrogel.

Fotoiniciador

Para que se produzca la fotopolimerización se ha hecho uso de un fotoiniciador Irgacure 2959 (Sigma Aldrich ref. 410896) (figura 8). Se trata de compuestos muy sensibles a las radiaciones ultravioleta ya que, ante su exposición, forman radicales libres, y por tanto, cumplen una función crítica en iniciar la polimerización radicalaria que tiene lugar en la segunda fase.

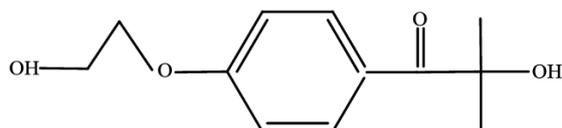


Figura 8: Molécula de Irgacure 2959.

PBS

El tampón fosfato salino o phosphate buffered saline (PBS) (Lonza ref. BE17-516F) es una solución tampón muy empleada en la investigación biológica. Se trata de una disolución que está compuesta por una combinación de sales como cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de

potasio. Además, la osmolaridad y la concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+), así como el pH es muy semejante a la matriz extracelular de los mamíferos.

Dada la aplicación biomédica que tiene como objetivo dicho trabajo, será necesario tratar de simular en todo momento las condiciones biológicas del organismo. Por ello se utilizará PBS como solución acuosa de las mezclas a realizar.

2.1.2. Preparación de mezclas

Con el objetivo de tratar de modular las propiedades mecánicas de hidrogeles de Tiol:Acrilato (T:A), se crean diez mezclas individuales con proporciones distintas de T:A y PBS (tabla 1), tal y como se muestra en la tabla que se encuentra a continuación.

Tiol:Acrilato	Tiol:Acrilato-PBS (%)	
	50-50	30-70
1:1.02	1:1.02 (50-50)(%)	1:1.02 (30-70)(%)
1:1.04	1:1.04 (50-50)(%)	1:1.04 (30-70)(%)
1:1.06	1:1.06 (50-50)(%)	1:1.06 (30-70)(%)
1:1.08	1:1.08 (50-50)(%)	1:1.08 (30-70)(%)
1:1.1	1:1.1 (50-50)(%)	1:1.1 (30-70)(%)

Tabla 5: Matriz de mezclas estudiadas.

La preparación de las mezclas se realiza en varias etapas. En primer lugar, se prepara la mezcla de Tiol:Acrilato (T:A). Los componentes de esta primera parte serán los siguientes. PEGDA y EDDT, en las proporciones indicadas en la tabla anterior. Además, cada mezcla contendrá la misma proporción de trietilamina, Irgacure 2959 y ácido acrílico, 0,8%, 0,2% y 2,5% respectivamente, sobre la cantidad añadida de PEGDA y EDDT. Una vez preparada la mezcla se deja mezclar en el agitador de rodillos durante 48 horas. Pasado este tiempo, por trabajos previos en el grupo^[16], se sabe con certeza que ha finalizado por completo la adición de Michael. Es decir, se han producido cadenas poliméricas lineales de T:A. En segundo lugar, se procede a añadir PBS a la mezcla en las proporciones que se indican en la tabla, y se deja agitar la mezcla durante 24 horas más. Finalmente se contará con diez mezclas de distintas proporciones de T:A y PBS.

Todas las mezclas se realizan en un recipiente de vidrio color topacio, de esta manera, evitamos que el fotoiniciador se descomponga, y genere radicales antes de lo deseado debido a la luz ambiental.

2.2.- Técnicas experimentales

2.2.1- Fotopolimerización

En el trabajo, para lograr el proceso de fotopolimerización, se ha utilizado la lámpara ultravioleta.

La lámpara ultravioleta es una lámpara *Exfo Omnicure S200* que emite luz ultravioleta de 320-390nm con una potencia de 10 mW/cm^2 durante 300 segundos en éste caso. Gracias a la radiación emitida por la lámpara ultravioleta, y la presencia de fotoiniciador en la mezcla, tiene lugar la segunda etapa de la reacción, en la que se produce el entrecruzamiento de cadenas poliméricas de T:A, que se unen entre sí dando lugar al hidrogel en cuestión. Asimismo, al tener lugar la fotopolimerización, el PBS presente en la mezcla queda retenido entre la red del polímero.

La estructura final de la muestra polimerizada será de gran importancia para los posteriores ensayos mecánicos. En el trabajo se polimerizan hidrogeles con forma de disco de 4 mm de altura y un diámetro de 5 mm. Para ello se utilizan unos moldes de silicona de polydimetilsiloxano (PDMS) que sirven exclusivamente para la síntesis de discos con estas características. El precursor del hidrogel se vierte en estos moldes cilíndricos, se aplica la radiación ultravioleta, y finalmente se obtiene el hidrogel con la forma cilíndrica de la cavidad del molde (figura 9).

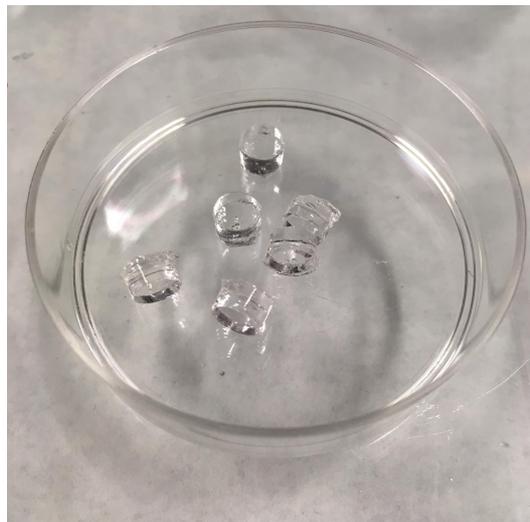


Figura 9: Hidrogeles de T:A-PBS tras el proceso de fotopolimerización.

2.2.2.- Ensayos de hinchamiento

Los ensayos de hinchamiento proporcionarán información sobre la capacidad que tienen este tipo de materiales para almacenar agua en su interior.

Las propiedades de un hidrogel hinchado y sin hinchar cambian en gran medida. Dada su aplicación biológica, un hidrogel capaz de emular la matriz extracelular del organismo se encontraría sumergidos en el líquido del organismo. Por tanto, es importante estudiar el comportamiento de

estos materiales cuando están sumergidos en exceso de PBS, con el fin de conocer la cantidad de disolución que pueden absorber y el tiempo transcurrido hasta que llegan al estado de equilibrio. Como uno de los objetivos principales del trabajo es caracterizar mecánicamente las muestras de Tiol:Acrilato y PBS en distintas proporciones, será necesario esperar a que éstas hayan alcanzado el estado de equilibrio para someterlas a ensayos de compresión.

En el trabajo los ensayos de hinchamiento tienen lugar a 37°C. Es importante simular las condiciones del entorno en el que este proceso tendría lugar, ya que la temperatura es un parámetro que influye en el proceso de hinchamiento. Para ello se hace uso de una estufa que se encuentra a temperatura constante de 37°C.

El protocolo para medir el hinchamiento de los hidrogeles es simple. Una vez preparadas las muestras, se sumergen en exceso de PBS. Transcurrido un determinado tiempo, se extraen, se elimina el exceso de agua de la superficie, y se pesan. Este proceso se repite a diferentes tiempos, hasta que el peso de las muestras no varía, lo cual significa que ya no pueden absorber más PBS.

2.2.3.- Ensayos mecánicos

La caracterización mecánica de las muestras, se lleva a cabo mediante ensayos de compresión uniaxial realizados por una máquina Instron 5548 Micro Tester. Estos, al igual que los ensayos de hinchamiento, tienen lugar a una temperatura de 37° C.

La caracterización mecánica de materiales también es posible mediante ensayos de tracción. No obstante, al trabajarse con materiales de manipulación complicada, es más sencillo realizar ensayos de compresión.

A través de la curva tensión-deformación (figura 10), podemos obtener para cada muestra ensayada el módulo de Young, que corresponde a la pendiente de la zona elástica.

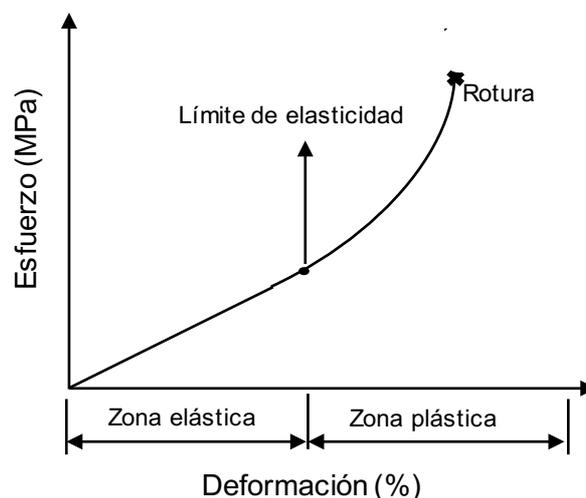


Figura 10: Curva tensión-deformación.

Una vez realizados los ensayos de compresión correspondientes, se hará una selección de dos de las diez mezclas preparadas para profundizar en la caracterización mecánica del material. Los hidrogeles correspondientes a las dos mezclas, se someten a ensayos de fatiga. Cada ensayo de fatiga, consiste en sucesivos ciclos de compresión-descompresión con el fin de estudiar la resistencia que ofrece un material ante cargas cíclicas.

2.2.4. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), es una técnica de microscopía electrónica en la que se hace uso de un haz de electrones de alta energía para formar una imagen. La interacción electrón-materia, genera la emisión de electrones secundarios, captados por un detector, que mide la intensidad de estos electrones construyendo imágenes de alta resolución, hasta 100 Å. El MEB permitirá la observación y caracterización morfológica del hidrogel.

Con el fin de poder observar el andamiaje de los hidrogeles, es necesario extraer el PBS del interior sin deformar la estructura original de las muestras. Para ello, se empleará una técnica de separación basada en la liofilización. La liofilización tiene como objetivo separar el agua del hidrogel mediante la congelación, y la posterior sublimación del hielo a presión reducida. En el trabajo, las muestras se han congelado mediante su inmersión en nitrógeno líquido, y a continuación se han colocado en el liofilizador durante 24 horas. Con el objetivo de analizar la técnica de corte y las diferentes secciones de los hidrogeles, se han llevado a cabo tres cortes distintos: un corte transversal, un corte longitudinal radial con una cuchilla y un corte longitudinal radial mediante un desgarramiento. Posteriormente, las muestras se recubren metálicamente con una capa de paladio. Este proceso es de gran relevancia para las pruebas MEB, ya que hará que los electrones secundarios que inciden en las muestras sean reflejados, lo que permite la construcción la imagen. En caso contrario, las muestras absorberían los electrones y se observarían destellos de luz. Una vez realizados todos estos pasos, las muestras se encuentran listas para observarse en el microscopio.

2.2.5.- Biofuncionalización

La biofuncionalización es un paso esencial en la síntesis de materiales con aplicación biológica. Se trata del paso previo al cultivo celular, sin el cual no podría llevarse a cabo. La presencia de ácido acrílico, hará posible que el hidrogel sintetizado pueda biofuncionalizarse.

La biofuncionalización consiste en la adición de fibronectina, mediante la reacción entre los grupos amino de ésta y los grupos carboxilo del ácido acrílico. El procedimiento experimental consta de varios pasos.

El protocolo a seguir para desarrollar el proceso de biofuncionalización es el siguiente. En primer lugar, el hidrogel a biofuncionalizar será esterilizado con etanol al 70% durante 20 minutos. Paralelamente se prepararán por separado dos disoluciones de EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride) (Sigma Aldrich ref. 03449) 0,15M y sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) (Sigma Aldrich ref. 56485) 0,12M ambas diluidas en una disolución tampón, 2[morpholino]ethanesulfonic acid] (MES) (Sigma Aldrich ref. M8250) al 0,1M, preparada anteriormente. A continuación se mezclan ambas disoluciones y se filtrarán por un tamaño de poro de 0.22 µm. Una vez filtrada la mezcla, se añade sobre los hidrogeles de manera que los cubra completamente y se incuba durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, se añade fibronectina de plasma humano diluido en PBS a una concentración final de 10µg/ml y se deja incubar durante 24 horas a 4°C. Los hidrogeles se lavan tres veces con PBS y se conservan a 4°C hasta que tenga lugar el cultivo celular.

En la figura 11 se muestra un esquema del proceso que tiene lugar a nivel molecular durante la funcionalización (figura 11). En el esquema el grupo de ácido carboxílico pertenece al ácido acrílico del hidrogel. Se observa que hasta que se forma el enlace peptídico entre el ácido acrílico y la

fibronectina, se forman dos complejos intermedios. El activo intermedio O-Acylisourea es inestable en soluciones acuosas y la adición de sulfo-NHS en presencia de EDC, resulta en la formación de un activo intermedio Sulfo-NHS éster, el cual es más eficiente para reaccionar con moléculas con grupos amino.

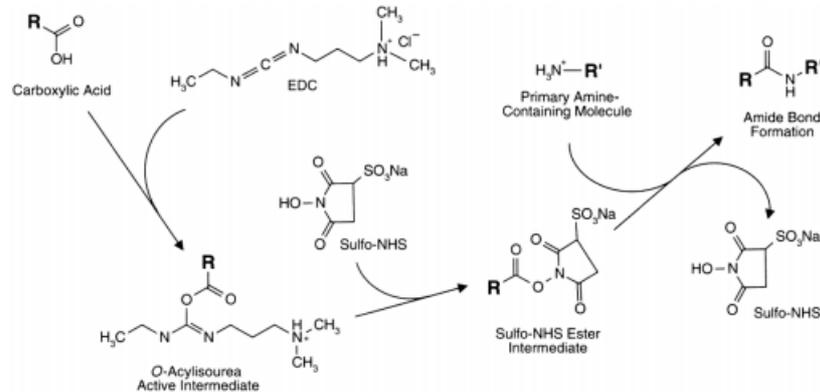


Figura 11: Esquema a nivel molecular del proceso de biofuncionalización ^[9].

La funcionalización y cultivo celular se estudia mediante la observación de las muestras al microscopio, por lo que la estructura de los discos con la que se trabaja en el resto de ensayos dificultaría el proceso. Esto sugiere la preparación de muestras de mayor superficie y menor espesor, únicamente para la funcionalización y cultivo celular.

2.2.6.- Cultivos celulares

Se parte de un frasco con fibroblastos cardiacos con aspecto alargado adheridos en su superficie. Para poder extraerlos, se añade tripsina (Lonza ref. 02-007E), enzima proteolítica que fracciona proteínas. Una vez que las células se han despegado, al observarlas al microscopio se aprecia que su morfología ha cambiado y tienen forma redonda. Ésta enzima, tras 5 minutos, debe ser inactivada mediante lavados de suero fetal bovino (SFB) (Sigma ref. F7524), ya que podría provocar un deterioro de las células. A continuación, se centrifuga la mezcla de células con SFB a 1500 rpm durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 ml de medio de cultivo DMEM (Lonza ref. BE12-614F) para llevar a cabo el conteo celular.

Con el fin de conocer la densidad de células en la suspensión preparada, se lleva a cabo un proceso de conteo de células mediante la cámara de Neubauer, a la que se añaden 10 μ l del pellet suspendido. Se trata de una cámara de 3mm x 3mm x 0,1 mm, que a su vez está dividida en nueve cuadrículas de menor tamaño de 1mm x 1mm x 0,1 mm. Cada una de las nueve cuadrículas se encuentra dividida en 16 partes, y la cuadrícula central cada una de las 16 partes está a su vez dividida en 5 partes (figura 12).

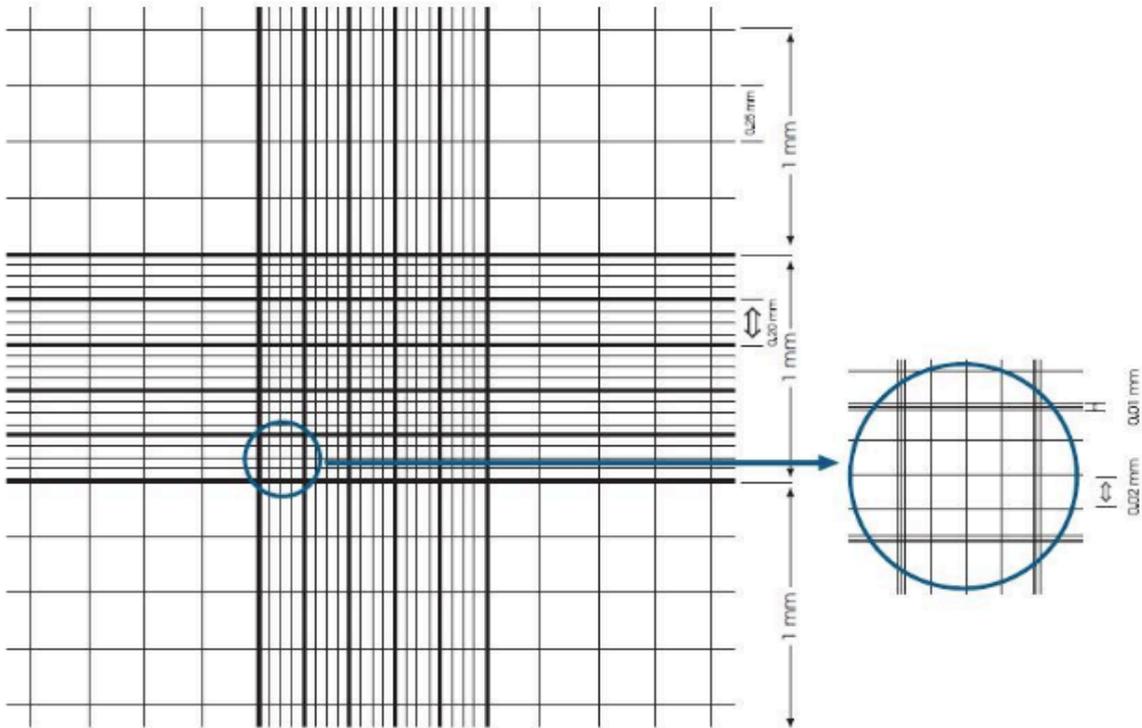


Figura 12: Cámara de recuento celular de Neubauer^[17].

Se cuentan las células de uno de los cuadrantes con el fin de conocer la densidad existente. Una vez contadas las células de cada subdivisión, se halla una media de las células contadas y se aplica la siguiente fórmula para calcular la densidad celular.

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ células contadas} \times 10000}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución}} \quad (1)$$

Una vez conocida la densidad de células en la alícuota preparada, se calcula el volumen que corresponde a la cantidad de células requeridas para la siembra. El número de células se elige en función de lo juntas o separadas que se desea que estén una vez adheridas al hidrogel. En el caso de que interesase estudiar la interacción célula-célula además de matriz-célula convendría cultivar un número elevado de células. En este caso se pretende estudiar la interacción matriz-célula y evaluar la morfología de las células adheridas. Por ello, para delimitar bien el contorno de cada célula, éstas deben estar separadas entre sí, de manera que se puede trabajar con un número menor.

Una vez añadido el volumen correspondiente de cultivo celular en el hidrogel se deja incubar durante unas 24-48 horas en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

3. Resultados y discusión

3.1. Ensayos de hinchamiento

La determinación de la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles en PBS es de gran relevancia. Como se ha explicado en la introducción, dicho proceso dependerá de varios factores que se discutirán posteriormente junto con los resultados.

El hinchamiento se ha medido tal y como se ha explicado en la parte de técnicas experimentales. Se ha realizado para ocho muestras de cada tipo de mezcla ensayada. Las muestras se han pesado para tiempo 0, 1, 2, 3, 4, 6 y 24 horas. Trabajos previos en el grupo han servido de referencia para saber con qué intervalos de tiempo era más adecuado trabajar^[10]. Al cabo de las 24 horas, se sabe que el sistema ha llegado al estado de equilibrio, por lo que no se han tomado medidas pasado este tiempo.

A continuación pueden observarse dos gráficas (figura 13) que contienen los resultados de los ensayos de hinchamiento a 37°C. Los datos corresponden al promedio de ocho muestras. La primera hace referencia a las muestras de T:A con un 50-50(%) en base de PBS, y la segunda a aquellas con un 30-70 (%). En las gráficas, se ha representado el porcentaje en masa respecto del peso inicial de las muestras frente al tiempo.

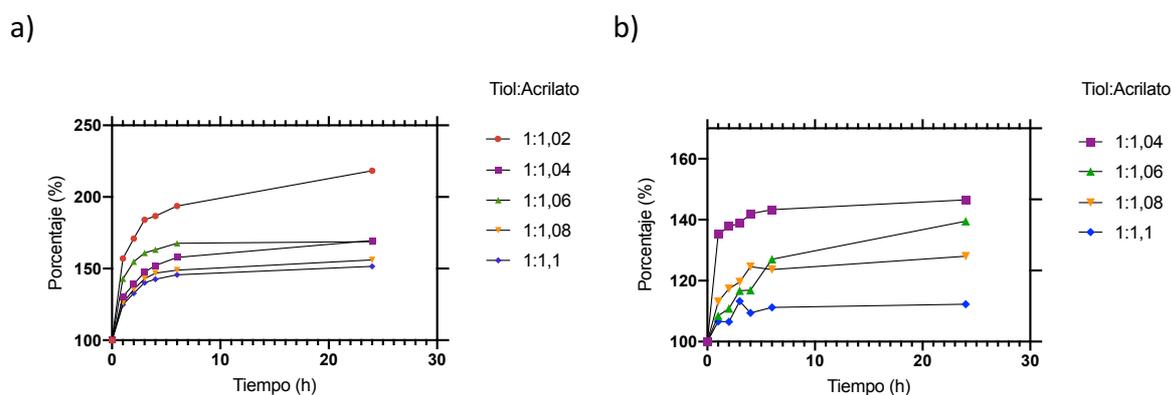


Figura 13: Gráficas de los ensayos de hinchamiento a 37°C, a) Curvas pertenecientes a los ensayos de hinchamiento de las muestras T:A (50-50)(%), b) Curvas pertenecientes a los ensayos de hinchamiento de las muestras T:A (30-70)(%).

T:A - PBS 50-50(%)				
Porcentaje final(%)				
1:1.02	1:1.04	1:1.06	1:1.08	1:1.1
220,8 ± 7,43	169,5 ± 3,13	168,87 ± 10,57	156,01 ± 3,39	151,52 ± 4,09

Tabla 6: Porcentaje final (%) de absorción de PBS en las muestras T:A-PBS 50-50(%) a 37°C.

T:A-PBS 30-70(%)			
Porcentaje final (%)			
1:1.04	1:1.06	1:1.08	1:1.1
146,54 ± 8,44	140,64 ± 3,54	128,05 ± 7,17	112,3 ± 6,11

Tabla 7: Porcentaje final (%) de absorción de PBS en las muestras T:A-PBS 30-70(%) a 37°C.

Se observa que las muestras se hinchan en gran medida durante las primeras horas. Este hinchamiento tiende a saturar al cabo de 6 horas aproximadamente, con excepción de las muestras 1:1,02 50-50(%) y 1:1,06 30-70(%), que siguen hinchándose pasado este tiempo. Sería necesario llevar a cabo ensayos adicionales con el fin de estudiar este comportamiento.

El proceso de hinchamiento depende de varios factores, el carácter de los radicales hidrófilos, las fuerzas osmóticas que causan que el solvente penetre entre las cadenas del polímero hidrófilo y las fuerzas cohesivas existentes entre estas cadenas o grado de entrecruzamiento. Asimismo, este proceso de absorción puede depender también de otros factores como la temperatura, el pH o variaciones de la concentración de electrolitos.

Por una parte, en aquellas muestras sintetizadas a partir de mezclas con menos proporción de PBS, es decir, las de 50-50 (%) (tabla 2 y 3), el grado de hinchamiento es mayor, esto puede deberse a que hay un mayor gradiente de concentraciones entre la muestra y el medio y por tanto la fuerza impulsora es más grande. Por otra parte, aquellas muestras sintetizadas a partir de mezclas de Tiol:Acrilato con proporciones más cercanas a 1:1, tendrán cadenas más largas y por tanto, un menor grado de entrecruzamiento. De modo que el sistema opondrá menos resistencia a la expansión, será más flexibles y el hinchamiento será mayor ^[11].

La temperatura produce un efecto inverso en el hinchamiento, siendo este mayor a temperaturas más bajas. Esto se debe a que los polímeros son sensibles a la temperatura ^[11]. En los ensayos podría haberse traducido en una fuente de incertidumbre, ya que las muestras se dejan reposar en una estufa a 37°C, sin embargo, para intervalos de tiempo, son extraídas para ser pesadas a temperatura ambiente, si bien el tiempo en medir es corto, algunos minutos.

Por último, se ha podido observar que no se han incluido resultados de la mezcla 1:1,02(30-70)(%). Se trata de hidrogeles tan blandos y frágiles cuya extracción y manipulación ha resultado ser imposible.

3.2. Ensayos de compresión

A través de los ensayos de compresión, será posible la caracterización mecánica de los hidrogeles sintetizados. Asimismo, permitirán estudiar en qué manera la variación en las proporciones de Tiol:Acrilato y Tiol:Acrilato-PBS (%) afectarán a las propiedades mecánicas del material.

Con el fin de poder caracterizar el comportamiento de un material elástico, y comparar fácilmente los diferentes tipos de hidrogeles, se ha escogido el módulo elástico o módulo de Young (E). Se trata de un parámetro que mide la relación entre el esfuerzo longitudinal que se aplica, y la deformación unitaria que experimenta. Para materiales elásticos lineales, el módulo de Young es constante, y viene definido por la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/S}{\Delta L/L} \quad (2)$$

σ = esfuerzo ejercido sobre el área de la sección transversal y ε = deformación unitaria.

El ensayo nos proporciona los datos de extensión frente a carga, a través de los cuales podemos obtener los de deformación frente a esfuerzo. Representando estos últimos, se obtendrá un diagrama esfuerzo-deformación, cuya tangente o pendiente perteneciente a la región elástica será equivalente al módulo de Young.

Para los ensayos mecánicos, se preparan cuatro muestras de cada tipo de mezcla. Cada muestra se analiza por separado, se obtiene el módulo de Young y se calcula el valor promedio para cada condición. A continuación se encuentran las tablas que recogen los correspondientes valores para cada estequiometría. Se han analizado, por una parte, las muestras de T:A-PBS al 50-50 (%) y por otra, las de T:A-PBS al 30-70 (%). Cada tabla va acompañada de una gráfica, para que pueda apreciarse de manera visual la tendencia creciente del módulo de Young a medida que se trabaja con estequiometrías más altas de acrilato respecto de tiol.

Módulo de Young (E) Vs. Moles de PEGDA/Moles EDDT

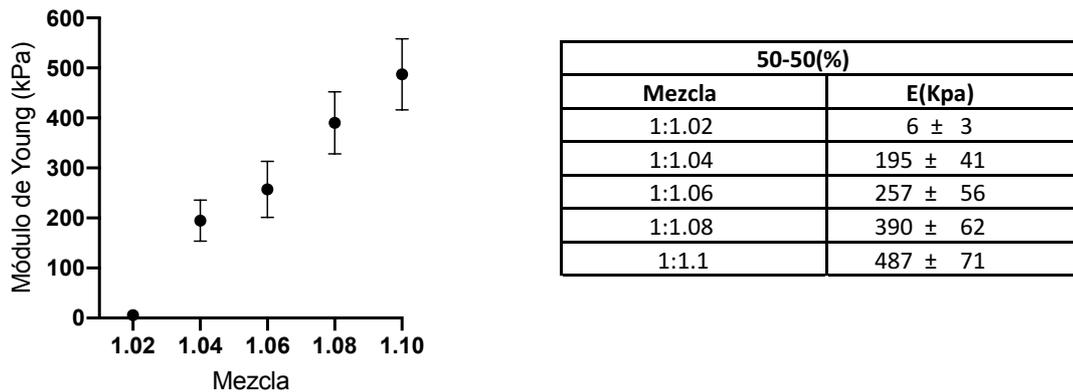


Figura 14: Módulo de Young(E) para las mezclas de T:A-PBS (50-50)(% a 37°C).

Módulo de Young (E) Vs. Moles de PEGDA/Moles de EDDT

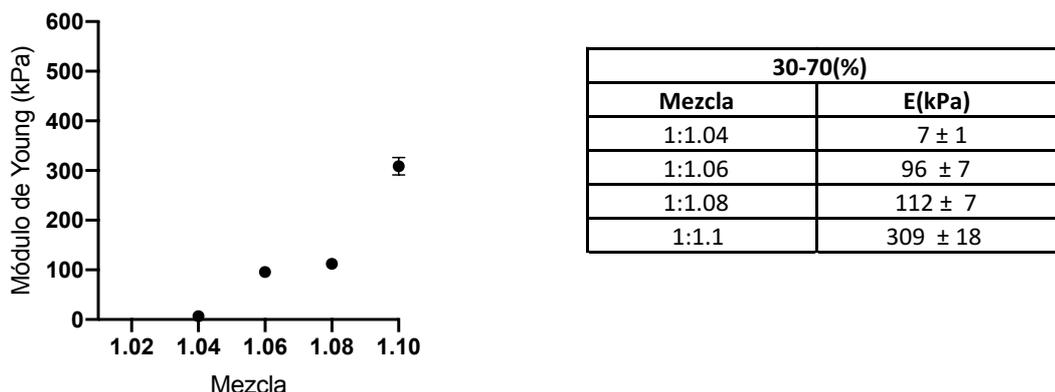


Figura 15: Módulo de Young(E) para las mezclas de T:A-PBS (30-70)(%) a 37°C.

A medida que nos alejamos de la estequiometría 1:1 de T:A y trabajamos con mayores proporciones de acrilato respecto de tiol, se forman cadenas poliméricas más cortas. Esto, tras el proceso de fotopolimerización, se traduce en una mayor densidad de entrecruzamiento y por tanto, en una mayor rigidez del material. Por ello, las muestras provenientes de mezclas 1:1,02 (T:A) tienen un módulo de Young más bajo, mientras que las de proporciones 1:1,1 (T:A) tienen un mayor módulo de Young.

Por otra parte, la proporción de PBS empleada en las mezclas también juega un papel muy importante en el comportamiento elástico final de las muestras. Por ejemplo, la mezcla 1:1,1 al 30-70 (%) tiene un módulo de Young de 309 kPa, mientras que la misma mezcla de T:A al 50-50 (%) tiene un módulo elástico de 487 kPa. Esto podría deberse, al menor contenido de sólido, que contribuye a la respuesta elástica del material.

Es importante destacar que el módulo de Young de los hidrogeles correspondientes a la mezcla de 1:1,02 al 50-50% no siguen la misma tendencia que el resto de mezclas al 50-50 (%) y tienen una consistencia pobre. Cuanto más cercana es la proporción de T:A a 1:1, más largas son las cadenas. De hecho, una mezcla ideal de 1:1 T:A estaría formada por una única cadena muy larga, de manera que no habría entrecruzamiento. Teniendo en cuenta este factor, y que los materiales empleados no son puros al 100%, cualquier impureza va a afectar más a la mezcla, y como consecuencia a las propiedades mecánicas del hidrogel resultante. Esto podría explicar que la mezcla de 1:1,02 presente un módulo de Young más bajo de lo esperado.

En conclusión, a través de los resultados anteriores, se observa, que mediante la variación de la estequiometría de la reacción Tiol:Acrilato, es posible modular las propiedades mecánicas de los hidrogeles sintetizados (figura 14 y 15). Además, el contenido en PBS de la mezcla a partir de la cual se sintetizan los hidrogeles también influye en las propiedades mecánicas finales. Proporciones elevadas de PBS, suponen una disminución del módulo de Young, mientras que con proporciones más bajas tiene lugar un aumento del módulo de Young.

Para los próximos ensayos, fatiga, MEB y cultivo celular, se ha hecho una selección de dos de las diez mezclas (tabla 4), la de 1:1,06 30-70 (%) y 1:1,04 30-70 (%).

Tiol:Acrilato	Tiol:Acrilato-PBS (%)	
	50-50	30-70
1:1.02	1:1.02 (50-50)(%)	1:1.02 (30-70)(%)
1:1.04	1:1.04 (50-50)(%)	1:1.04 (30-70)(%)
1:1.06	1:1.06 (50-50)(%)	1:1.06 (30-70)(%)
1:1.08	1:1.08 (50-50)(%)	1:1.08 (30-70)(%)
1:1.1	1:1.1 (50-50)(%)	1:1.1 (30-70)(%)

Tabla 8: Mezclas seleccionadas para ensayos posteriores.

3.2.1. Ensayos de fatiga

Con el fin de profundizar en la caracterización mecánica de los hidrogeles, concretamente los de proporciones 1:1,04 30-70 (%) y 1:1,06 30-70 (%), se someten a ensayos de fatiga con una célula de carga de 5N. La puesta en marcha del ensayo se basa en un 3% de deformación inicial del material y una posterior relajación de 3 minutos. El ensayo de fatiga ofrece información sobre el comportamiento del material ante cuatro cargas cíclicas de compresión-descompresión hasta el 20%, 40% y 60% de su deformación. Se trata de ensayos de larga duración, pues la velocidad de la máquina es de 1 mm/min. A continuación se muestran dos gráficas que contienen las curvas correspondientes a los ensayos de fatiga de los hidrogeles de 1:1,04 30-70 (%) y 1:1,06 30-70 (%) respectivamente.

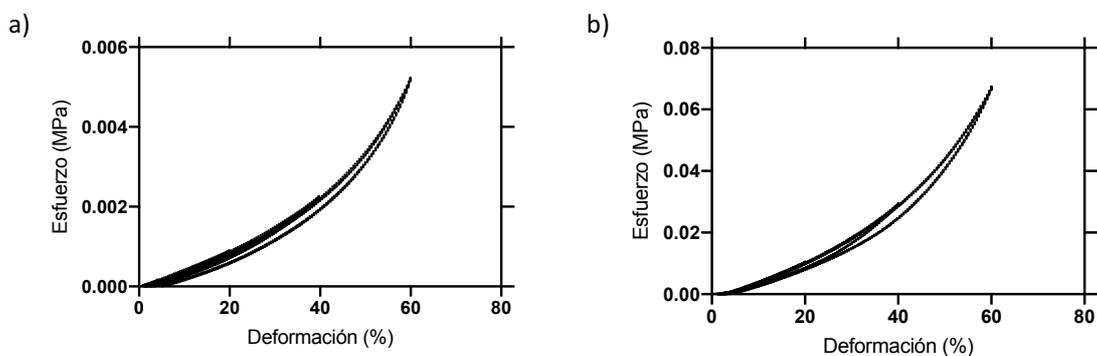


Figura 16: curvas de esfuerzo-deformación obtenidas a partir de los ensayos de fatiga para los hidrogeles a) 1:1,04 30-70 (%) y b) 1:1,06 30-70 (%).

Atendiendo a las gráficas (figura 16), puede observarse que ambos hidrogeles se comportan de manera elástica, ya que recuperan su forma tras cada carga cíclica, con una curva de descarga muy similar a la de carga. Asimismo, las curvas de deformación-esfuerzo son iguales para cada carga aplicada. Es de gran relevancia que los hidrogeles presenten este comportamiento debido a la aplicación biológica que poseen. Han de ofrecer resistencia a los continuos movimientos del organismo sin que sus propiedades mecánicas originales resulten alteradas.

3.3. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La caracterización por microscopía electrónica de los hidrogeles preparados, se llevó a cabo tal y como se ha explicado en la parte de técnicas experimentales. Esta caracterización permite llevar a cabo un estudio de la morfología del material. Al igual que para los ensayos de fatiga, sólo se han escogido muestras pertenecientes a las mezclas 1:1,04 30-70 (%) y 1:1,06 30-70 (%). Se ha trabajado con tres muestras de cada condición.

En la figura 17-a, se muestra el aspecto de los hidrogeles una vez que han sido sometidos al proceso de liofilización para extraer las moléculas de agua.

Por otro lado, en la figura 17-b se encuentran las muestras liofilizadas y recubiertas con una fina capa de paladio, para su posterior inspección en el microscopio de barrido de electrones.

a)



b)



Figura 17: Conjunto de pruebas previas a la microscopía electrónica, a) muestras de 1:1,06 30-70 (%) y 1:1,04 30-70 (%) respectivamente tras el proceso de liofilización, b) muestras cortadas y recubiertas metálicamente.

En la figura 17-a se observa que los hidrogeles de 1:1,06 30-70 (%) mantienen su forma cilíndrica original, mientras que los de 1:1,04 30-70 (%) se han desmoronado. Esto se apreciará mejor en las imágenes obtenidas a partir de la microscopía electrónica. Posteriormente se procederá a explicar el motivo por el cual ha tenido lugar este desmoronamiento.

Tal y como se ha explicado en la parte de técnicas experimentales, los hidrogeles fueron cortados transversal y longitudinalmente, y este último corte, con una cuchilla y mediante un proceso de desgarramiento, con el fin de poder observar diferencias entre las diferentes secciones y técnicas de preparación aplicadas. Tras el análisis de las muestras, no se ha apreciado diferencia alguna, por lo que las imágenes se han analizado de forma conjunta.

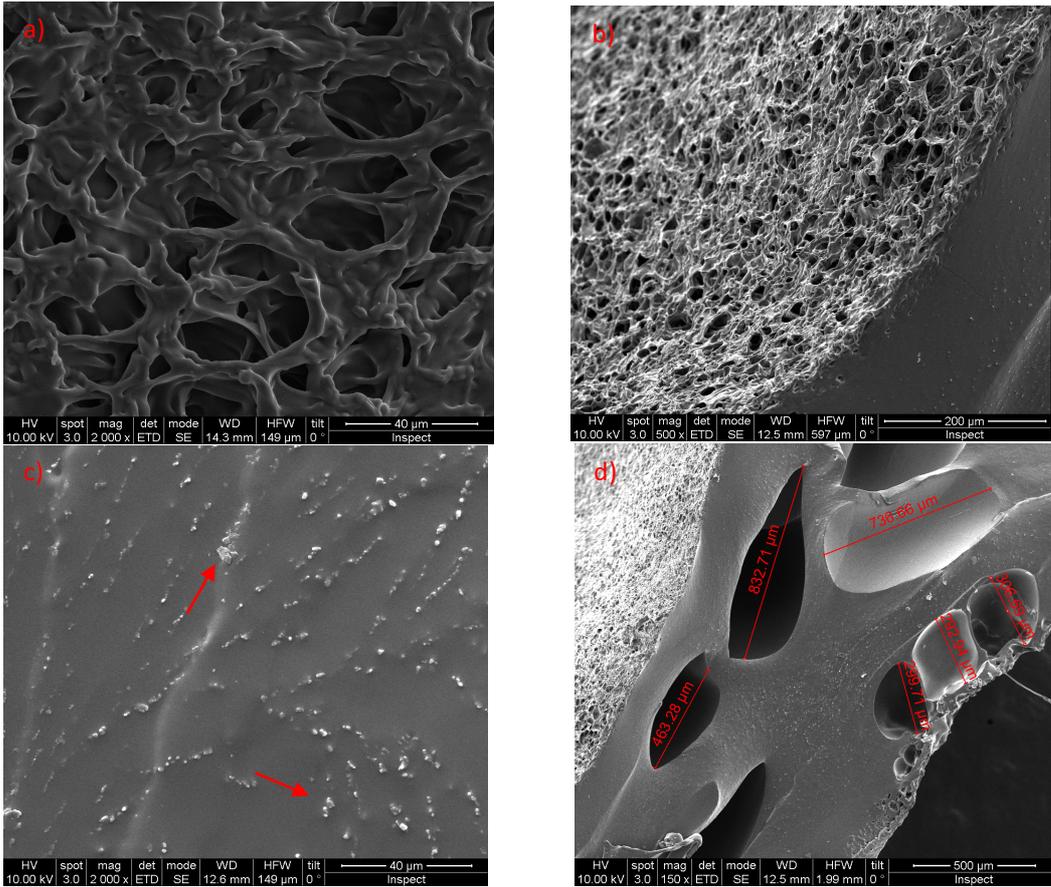


Figura 18: Imágenes obtenidas con microscopía electrónica de hidrogel de la mezcla de 1:1,04(30-70)(%). a) Superficie del hidrogel, b) línea que divide la superficie y el interior del hidrogel, c) interior del hidrogel, d) cavidades formadas en el interior del hidrogel.

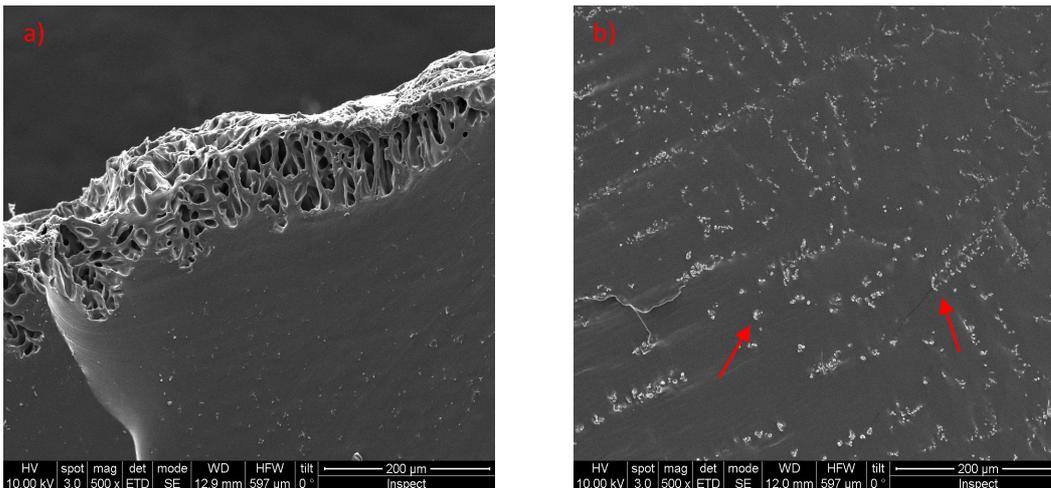


Figura 19: Imágenes obtenidas con microscopía electrónica de hidrogel de la mezcla de 1:1,06(30-70)(%). a) Línea que divide la superficie y el interior del hidrogel, b) interior del hidrogel.

Las imágenes obtenidas con la MEB (figuras 18 y 19), permiten llevar a cabo una caracterización morfológica. Se trata de materiales que presentan una superficie porosa propia de los hidrogeles, ya que al eliminarse el agua queda la estructura tridimensional de las cadenas poliméricas. Por otro lado, se aprecia que el interior es mucho más denso y compacto que el exterior. Sería necesario llevar a cabo ensayos adicionales con el fin de estudiar el porqué de la morfología compacta del interior del hidrogel.

En los hidrogeles de ambas condiciones, pueden observarse los cristales de sal procedentes del PBS (figura 18-c y figura 19-b). Durante el proceso de liofilización, tiene lugar la sublimación del hielo, pero las sales quedan retenidas en el hidrogel.

Asimismo, en las imágenes pertenecientes a las muestras de 1:1,04(30-70)(%), pueden apreciarse grandes cavidades (figura 18-d), que podrían tener su origen en aire ocluido durante el proceso de preparación del hidrogel.

3.4. Biofuncionalización y cultivo celular

Los resultados de la biofuncionalización y cultivo celular se analizan de forma conjunta, ya que la manera idónea de corroborar que la funcionalización ha tenido lugar con éxito es observando que las células se han adherido correctamente. Estos ensayos, al igual que el de fatiga y la caracterización con microscopía electrónica, solo se llevaron a cabo en hidrogeles procedentes de las mezclas de 1:1,04(30-70)(%) y 1:1,06(30-70)(%), en concreto en una muestra de cada tipo.

El procedimiento seguido para la funcionalización y cultivo celular ha sido el descrito en la parte de técnicas experimentales.

Es importante destacar que en el trabajo no se pretende estudiar las interacciones entre célula-célula, sino las resultantes entre la célula y el hidrogel, por ello a la hora de hacer el cultivo, se ha trabajado con bajas concentraciones de fibroblastos. Mediante el método de conteo de Neubauer, fue posible conocer la densidad de células con la que se estaba trabajando, 46.250 células/mL.

Al observarse al microscopio el material tras la siembra, se pudo apreciar que las células no se habían adherido a la superficie del hidrogel. Por el contrario, estas se encontraban pegadas a la superficie de la placa Petri (figura 20).

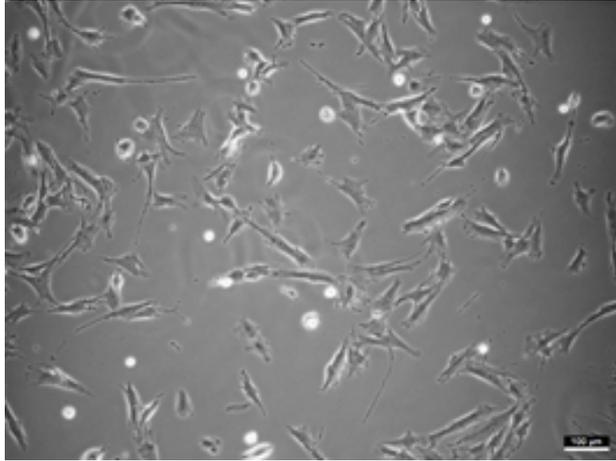


Figura 20: Fibroblastos adheridos a la superficie de la placa Petri.

Estos resultados reflejan que la biofuncionalización no ha tenido lugar correctamente. Debido al ajustado esquema de trabajo y el hecho de haberse realizado únicamente un ensayo con dos muestras, no es posible sacar conclusiones robustas al respecto. Será necesario repetir el experimento para poder determinar la causa de estos resultados.

4. Resumen y conclusiones

En el presente trabajo, se ha perseguido la síntesis de hidrogeles basados en monómeros de PEGDA, EDDT y ácido acrílico, mediante un proceso de dos etapas. Una primera etapa en la que tiene lugar la formación de cadenas poliméricas mediante adición de Michael, y una segunda etapa, donde mediante el proceso de fotopolimerización, tiene lugar la formación de una red tridimensional por entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, originándose el hidrogel en cuestión. Se han estudiado hidrogeles de diferentes proporciones de T:A y T:A-PBS.

Los ensayos de hinchamiento, han revelado que son varios los factores que influyen en este proceso. Una relación de T:A menor, que produce cadenas más cortas en la adición de Michael, se traduce en un mayor grado de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, que a su vez, oponen más resistencia a la expansión, y por tanto, a la absorción de PBS. Por el contrario, relaciones de T:A mayores, próximas a 1:1, dan lugar a cadenas más largas con menor grado de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, por lo que oponen menos resistencia a la expansión, experimentando un mayor hinchamiento. Por otro lado, la proporción de PBS que contengan los hidrogeles también influirá en el hinchamiento. Una menor proporción de PBS inicial, permite aceptar más PBS e hincharse en mayor medida. También se ha podido observar el efecto inverso de la temperatura en proceso. A temperaturas altas el hinchamiento es menor que a temperaturas bajas.

Los ensayos de compresión han permitido caracterizar mecánicamente al material. Se ha observado que mediante la variación de la estequiometría de la reacción de T:A es posible preparar hidrogeles con propiedades mecánicas muy diferentes entre sí. A medida que se trabaja con estequiometrías de T:A más cercanas a 1:1, se obtienen hidrogeles con módulos de Young más bajos, y en ocasiones mala consistencia. En cambio, estequiometrías más elevadas de acrilato respecto de tiol, dan lugar a hidrogeles con mayor módulo de Young y mejor consistencia. Asimismo, la proporción de PBS que contiene el hidrogel, influye de manera decisiva en las propiedades mecánicas finales del material.

Con el fin de profundizar en la caracterización mecánica del material, muestras de dos condiciones, 1:1,06 30-70 (%) y 1:1,04 30-70 (%), fueron sometidas a ensayos de fatiga. Los hidrogeles de ambas condiciones han demostrado presentar un comportamiento elástico.

El MEB ha permitido caracterizar la morfología de los hidrogeles de 1:1,04 30-70 (%) y 1:1,06 30-70 (%). Se ha observado que los hidrogeles sintetizados presentan una superficie porosa propia de este tipo de materiales, mientras que el interior es denso y compacto.

La funcionalización y cultivo celular se ha realizado en dos muestras de condiciones distintas con el fin de llevar a cabo un estudio preliminar sobre la adhesión de los fibroblastos en este tipo de materiales. La adhesión celular no ha tenido lugar, no obstante, para poder obtener resultados significativos y sacar conclusiones firmes, sería necesario repetir el ensayo para un mayor número de muestras.

5. Acrónimos y abreviaturas de compuestos químicos

MEC	Martiz extracelular
PBS	Phosphate Buffered Saline
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
UV	Ultravioleta
SFB	Suero fetal bovino
PEG	Polietilenglicol
PAA	Poli (ácido acrílico)
PEGDA	Polietilenglicol diacrilato
EDDET	2,2'-(Ethilenedioxi) dietanetiol
AA	Ácido acrílico
TEA	Trietilamina
EDC	(1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride)
Sulfo-NHS	(N-hydroxysulfosuccinimide)
MES	2[morpholino]ethanesulfonic acid
PDMS	Polydimetilsiloxane
T:A	Mezcla de Tiol:Acrilato

6. Bibliografía

- [1]. Alves,N.M., Pashkuleva,I., Reis,R.L. y Mano,J.F. Controlling cell behavior through the design of polymer surfaces. *Small*. 2010; 6(20): 2208-2220.
- [2]Raeber, G.P., Lutolf, M.P. y Hubbell, J.A. Molecularly engineered PEG hydrogels: A novel model system for proteolytically mediated cell migration. *Biophysical Journal*. 2005; 89(2): 1374-1388.
- [3] Wu,D., Yu,Y., Tan,J., Huang,L., Luo,B., Lu,L y Zhou,C. 3D bioprinting of gellan gum and poly (ethylene glycol) diacrylate based hydrogels to produce human-scale constructs with high-fidelity. *Materials and Design*. 2018; 160: 486-495.
- [4]. Hamid,Z.A.A. y Lim,K.W. Evaluation of UV-crosslinked Poly(ethylene glycol) Diacrylate/Poly(dimethylsiloxane) Dimethacrylate Hydrogel: Properties for Tissue Engineering Application. *Procedia Chemistry*. 2016; 19: 410-418.
- [5].Discher, D.E., Janmey,P., Wang, Y.L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their environment. *Science*. 2005; 10: 1139-1143.
- [6]Handorf, Andrew M. Zhou, Yaxian Halanski, Matthew A. Li, Wan Ju. Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. *Organogenesis*. 2015; 11(1): 1-15.
- [7] Cecilia.F.V. Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2015; 21(3): 488-493.
- [8]. Zhu,J. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*. 2010; 31(17): 4639-4656.
- [9]. Green.W.A (2010). Industrial Photoinitiators: A Technical Guide. Nueva York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010.
- [10]. Nemir,S., Hayenga,H.N. y West,J.L. PEGDA hydrogels with patterned elasticity: Novel tools for the study of cell response to substrate rigidity. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010; 105(3): 636-644.
- [11]. Becerra,N., Restrepo,L.M. y López,B.L. Synthesis and characterization of a biocompatible copolymer to be used as cell culture support. *Macromolecular Symposia*. 2007; 258: 30-37.
- [12]. Soto,D. y Oliva,H. Métodos Para Preparar Hidrogeles Químicos Y Físicos Basados En Almidón: Una Revisión. *Rev. LatinAm. Metal. Mat*. 2012; 32(2): 154-175.
- [13] Browning, M.B y Cosgriff-Hernandez, E. Development of a Biostable Replacement for PEGDA Hydrogels. *Biomacromolecules*. 2012; 13(3): 779-786.
- [14]. Scharnagl,N., Lee,S., Hiebl,B., Sisson,A. y Lendlein,A. Design principles for polymers as substratum for adherent cells. *Journal of Materials Chemistry*. 2010; 20(40): 8789-8802.
- [15]. Greg T.Hermanson (2013). Bioconjugate techniques. Vol 4. Tercera ed. Londres: Elsevier; 2013.
- [16]. Javier Palomo Agorreta. Trabajo de Fin de Grado: Modulación de las propiedades mecánicas de hidrogeles. 2016.

[17].Wikiwand [Internet]. Cámara de Neubauer; [cited 2019 mayo 15]. Disponible en https://www.wikiwand.com/es/Cámara_de_Neubauer