

**Hidrogeles Magnéticos para Aplicaciones  
Biomédicas:  
Estudio de su Biocompatibilidad  
y Propiedades Viscoelásticas**

**TESIS DOCTORAL**

Programa Oficial de Doctorado en Física y Ciencias del Espacio

**Ana Belén Bonhome Espinosa**



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

**Directores**

Juan de Dios García López-Durán  
Modesto Torcuato López López

Grupo de Física de Interfases y Sistemas Coloidales  
Departamento de Física Aplicada

2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autora: Ana Belén Bonhome Espinosa  
ISBN: 978-84-9163-765-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/49415>

La doctoranda / *The doctoral candidate* Ana Belén Bonhome Espinosa y los directores de la tesis / *and the thesis supervisors*: Juan de Dios García López-Durán, Catedrático del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada y Modesto Torcuato López López, Profesor Titular del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada.

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta dónde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the supervisors and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.*

Granada a 23 de noviembre de 2017

Los Directores de la Tesis / *Thesis supervisors*:

Fdo: Juan de Dios García López-Durán    Fdo: Modesto Torcuato López López

Doctoranda / *Doctoral candidate*

Fdo.: Ana Belén Bonhome Espinosa



# Agradecimientos

---

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mis directores, sin ellos esta tesis no hubiera sido posible. A Modesto, gracias por tu confianza desde aquella primera entrevista en la que, sin conocerme siquiera, pensaste que yo podría hacer una tesis como esta. Además de todo lo que me has enseñado sobre investigación, llevo conmigo tu amistad sincera. A Juan de Dios, muchas gracias por la paciencia que has tenido conmigo. Me has enseñado a tener calma cuando era necesario y, sobre todo, siempre has tenido tiempo para resolver cualquier duda. Muchas gracias a los dos, sin vuestra dedicación esta tesis no hubiera terminado nunca.

En segundo lugar, quisiera dar las gracias a todos los que formáis parte del grupo de Física de Interfases y Sistemas Coloides. Nada más llegar me di cuenta que sois como una gran familia y estoy encantada de poder formar parte de ella. Muchísimas gracias a todos, a Fernando, Silvia, Guillermo, Marisa, Paloma, María del Mar Ramos, María del Mar Fernández, Alejandro, Cristina, Felisa, Luna, Julio y todas las demás personas que durante el tiempo que ha durado mi tesis han pasado por aquí, por hacer más divertidos los días de trabajo. A Felisa, María del Mar Fernández y Paloma, gracias por vuestra amistad. En especial, a Laura, porque aunque solo pudimos trabajar juntas unos meses, para mí fue muy importante todo lo que me enseñaste tanto a nivel profesional como personal. También a Mariem, por haberte conocido, porque te has sabido ganar un hueco en el grupo y te considero una amiga. Y por último, Ángel, muchísimas gracias por estar siempre disponible para cualquier doctoranda que vaya a tu despacho y por ofrecerme siempre tu ayuda.

Debido al carácter multidisciplinar de esta tesis quisiera agradecer la colaboración de dos grupos de investigación de la Universidad de Granada que han sido muy importantes para el desarrollo de este trabajo. Quisiera agradecer a Miguel Alaminos haberme permitido trabajar con el grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología. En particular, a Sebas e Ismael quisiera agradecerles todo lo que me ha enseñado sobre biocompatibilidad, ha sido un placer trabajar con vosotros. También, a todos los miembros del grupo con los que he compartido laboratorio, Dani, Fernando, Boris, Laura y a los estudiantes de máster (Jesús, Ana, Pedro). Por otro

lado, quisiera agradecerle a Luis Álvarez Cienfuegos, del grupo de Materiales Orgánicos Funcionales del Departamento de Química Orgánica, el gran equipo que hemos formado los últimos años y, en especial, quisiera agradecer a Rafa su contagioso entusiasmo para trabajar en el laboratorio.

Agradezco a Pavel Kuzhir haberme acogido en el Laboratorio de Física de la Materia Condensada durante mi estancia en la Universidad de Niza Sophia Antipolis, muchísimas gracias por lo que he aprendido contigo y por tu hospitalidad. También a todas las personas que forman parte de ese grupo, en especial a Céline, Audrey y Jessica. También quiero dar las gracias a Hinda, sin ella la estancia no hubiera merecido tanto la pena.

También quisiera agradecerle a Andrey Zubarev de la Universidad Federal de los Urales (Ekaterimburgo, Rusia) su inestimable contribución a mi trabajo.

Durante este tiempo, he tenido la oportunidad de conocer a gente maravillosa, con la que he compartido inquietudes, risas, cenas y un sinfín de cosas más. Nico, Irene, Leo, Elisa, Aixa, José Alberto, Adri, Javi, Pedro, Migue, Álvaro, Pablo, Guillermo, Keshvad y José Rafael, os agradezco muchísimo todos los momentos divertidos y algún que otro agobio que hemos pasado juntos.

Quisiera agradecer a mi hermana, Almudena, su apoyo continuo y su interés por saber de qué va esta tesis (sé que la leerás), porque siempre hemos sabido encontrar un hueco para vernos, ya sea en Niza, en Dubai o en casa.

A mis padres, Milagros y José Manuel, solo les puedo expresar mi amor más sincero. Habéis sido un pilar fundamental para mí, demostrándome vuestro apoyo incondicional. Desde el primer momento en el que decidí empezar esta aventura habéis estado conmigo. Muchísimas gracias a los dos por hacerme sentir que todo lo que hago es importante. Porque sé que esta tesis la vais a sentir tan vuestra como mía.

Finalmente, muchas gracias David por tu gran apoyo, porque has sido siempre el motor principal que me impulsa a conseguir los imposibles. Espero que sigamos ayudándonos a superarnos día a día, como hemos hecho hasta ahora.

# Financiación

---

La investigación que ha conducido a la realización de esta tesis doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) mediante el proyecto FIS2013-41821-R.

La estancia de investigación realizada en el *Laboratoire de Physique de la Matière Condensée* (LPMC) de la Universidad de Niza Sophia Antipolis ha sido financiada por la Universidad de Granada y el CEI BioTic Granada, convocatoria 2016/2017.







# Índice

---

<b>Capítulo 1. Introducción</b> .....	15
1.1 Polímeros entrecruzados.....	17
1.2 Hidrogeles .....	19
1.1.1 Propiedades de los hidrogeles .....	21
1.1.2 Aplicaciones de los hidrogeles.....	25
1.3 Hidrogeles magnéticos.....	28
1.4 Hipótesis y objetivos.....	31
1.5 Organización de la tesis .....	33
1.6 Bibliografía.....	34
<b>Capítulo 2. Hidrogeles con partículas magnéticas compuestas.</b>	
<b>Biocompatibilidad <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i></b> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2.1 Introducción .....	41
2.2 Materiales y métodos .....	42
2.2.1 Síntesis de partículas elipsoidales núcleo-recubrimiento.....	42
2.2.2 Síntesis de nanocompuestos esféricos núcleo-capa .....	46
2.2.3 Caracterización físico-química de las partículas nanocompuestas.....	47
2.2.4 Declaración ética.....	48
2.2.5 Cultivo primario de fibroblastos de mucosa oral.....	49
2.2.6 Preparación de los tejidos magnéticos.....	49

2.2.7 Evaluación <i>ex vivo</i> de los compuestos Poli@Mag y Poli@Mag@PEG y de los tejidos magnéticos artificiales .....	50
2.2.8 Evaluación <i>in vivo</i> de los compuestos Poly@Mag@PEG y de los tejidos magnéticos artificiales .....	52
2.3 Resultados y discusión.....	53
2.3.1 Síntesis y caracterización de partículas elipsoidales núcleo-recubrimiento .....	53
2.3.2 Biocompatibilidad <i>ex vivo</i> de las partículas Poli@Mag y Poli@Mag@PEG y de los tejidos artificiales.....	61
2.3.3 Biocompatibilidad <i>in vivo</i> de las suspensiones y de los tejidos artificiales que contienen Poli@Mag@PEG .....	65
2.4 Conclusiones .....	69
2.5 Bibliografía .....	70

### **Capítulo 3. Hidrogeles con partículas magnéticas. Reología y**

<b>Biocompatibilidad <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> .....</b>	<b>37</b>
3.1 Introducción .....	77
3.2 Materiales y métodos .....	79
3.2.1 Materiales.....	79
3.2.2 Preparación de los hidrogeles no magnéticos y magnéticos.....	80
3.2.3 Estructura macroscópica de los hidrogeles.....	81
3.2.4 Hidratación de los hidrogeles .....	81
3.2.5 Estructura microscópica de los hidrogeles .....	82
3.2.6 Caracterización reológica de los hidrogeles.....	83
3.2.7 Cinética de gelificación mediante medidas reológicas.....	84
3.2.8 Ensayos de biocompatibilidad <i>ex vivo</i> .....	85
3.2.9 Análisis de biocompatibilidad <i>in vivo</i> .....	86
3.3 Resultados.....	87
3.3.1 Estructura macroscópica de los hidrogeles .....	87
3.3.2 Hidratación de los hidrogeles.....	88
3.3.3 Microestructura de los hidrogeles.....	89

3.3.4 Caracterización reológica de los hidrogeles.....	90
3.3.5 Cinética de gelificación mediante medidas reológicas .....	95
3.3.6 Biocompatibilidad <i>ex vivo</i> .....	96
3.3.7 Biocompatibilidad <i>in vivo</i> .....	97
3.4 Discusión y teoría.....	98
3.4.1 Modelo teórico para el módulo de rigidez .....	100
3.5 Conclusiones.....	104
3.6 Bibliografía .....	105

<b>Capítulo 4. Hidrogeles sustitutivos de cartílago. Reología y Biocompatibilidad <i>ex vivo</i></b> .....	<b>156</b>
4.1 Introducción .....	113
4.2 Materiales y métodos .....	114
4.2.1 Diseño experimental .....	114
4.2.2 Cultivo celular de condrocitos: aislamiento y expansión.....	115
4.2.3 Preparación de tejidos artificiales de fibrina-agarosa.....	115
4.2.4 Caracterización reológica de los hidrogeles.....	116
4.2.5 Ensayos de citotoxicidad celular .....	117
4.2.6 Análisis histológico .....	118
4.2.7 Declaración ética .....	119
4.3 Resultados y discusión .....	120
4.3.1 Cultivo celular de condrocitos .....	120
4.3.2 Preparación de hidrogeles y tejidos en matriz de fibrina-agarosa.....	120
4.3.3 Caracterización reológica .....	120
4.3.4 Análisis de citotoxicidad celular .....	125
4.3.5 Análisis histológico.....	127
4.4 Conclusiones.....	131
4.5 Bibliografía .....	132

<b>Capítulo 5. Hidrogeles supramoleculares compuestos por péptidos y nanopartículas magnéticas. Reología</b> .....	135
5.1 Introducción .....	137
5.2 Materiales y métodos.....	140
5.2.1 Materiales.....	140
5.2.2 Recubrimiento de las nanopartículas de hierro con PEG.....	140
5.2.3 Caracterización de las nanopartículas de hierro .....	141
5.2.4 Preparación de hidrogeles de péptidos .....	141
5.2.5 Medidas de magnetización .....	142
5.2.6 Reología de los hidrogeles supramoleculares .....	142
5.2.7 Estructura de los hidrogeles.....	144
5.3 Resultados y discusión.....	144
5.3.1 Caracterización de las nanopartículas de hierro.....	144
5.3.2 Medidas de magnetización de hidrogeles magnéticos .....	147
5.3.3 Reología de los hidrogeles de péptidos.....	148
5.3.4 Estructura de los hidrogeles .....	153
5.4 Conclusiones.....	155
5.5 Bibliografía .....	156
<b>Capítulo 6. Hidrogeles de alginato con partículas magnéticas. Reología bajo tracción</b> .....	157
6.1 Introducción .....	161
6.2 Materiales y métodos.....	163
6.2.1 Materiales.....	163
6.2.2 Preparación de hidrogeles de alginato.....	163
6.2.3 Medidas de densidad .....	164
6.2.4 Medidas de magnetización .....	165
6.2.5 Caracterización mecánica de los hidrogeles de alginato bajo esfuerzo de tracción.....	165
6.3 Resultados y discusión.....	166

---

6.3.1 Preparación de hidrogeles de alginato.....	166
6.3.2 Medidas de densidad .....	168
6.3.3 Medidas de magnetización.....	169
6.3.4 Caracterización reológica .....	170
6.4 Conclusiones.....	175
6.5 Bibliografía .....	176
<b>Capítulo 7. Conclusiones .....</b>	<b>179</b>
<b>Capítulo 8. Summary and Conclusions .....</b>	<b>185</b>
8.1 Introduction.....	187
8.1.1 Hydrogels.....	187
8.1.2 Properties of hydrogels .....	187
8.1.3 Applications.....	188
8.1.4 Magnetic hydrogels .....	189
8.2 Magnetic hydrogels based on magnetic core-shell particles. <i>Ex vivo</i> and <i>in vivo</i> biocompatibility.....	191
8.2.1 Experimental .....	191
8.2.2 Results and discussion .....	195
8.3 Hydrogels with magnetic particles. Rheology and <i>ex vivo</i> and <i>in vivo</i> biocompatibility.....	203
8.3.1 Introduction.....	203
8.3.2 Materials and Methods .....	204
8.3.3 Results .....	207
8.3.4 Discussion and theory.....	213
8.4 Generation of cartilage-substitute tissues. Rheology and <i>ex vivo</i> biocompatibility.....	218
8.4.1 Materials and methods.....	218
8.4.2 Results and discussion.....	220
8.5 Supramolecular hydrogels consisting of peptides and magnetic nanoparticles. Rheology .....	226

---

8.5.1 Methods.....	227
8.5.2 Results.....	228
8.6 Alginate hidrogels reinforced with magnetic particles. Rheology under tensile forces .....	232
8.6.1 Experimental.....	232
8.6.2 Results and discussion .....	233
8.7 Conclusions .....	237
8.8 References .....	240

# Capítulo 1

Introducción





## 1.1 Polímeros entrecruzados

En la vida cotidiana es muy frecuente el uso de materiales poliméricos entrecruzados, aunque frecuentemente no seamos conscientes de ello. La mayoría de envases para alimentación, el nailon para la fabricación de tejidos, las siliconas, neumáticos, lentes de contacto, tuberías, botellas y otros productos similares están formados por polímeros. Estos están constituidos por largas cadenas de unidades monoméricas, unidas por enlaces covalentes, que a su vez se pueden asociar mediante interacciones químicas o físicas. Además, teniendo en cuenta la gran diversidad de polímeros existentes, parece evidente que se pueden obtener materiales con propiedades físicas, químicas, mecánicas, y con biodegradabilidad y biocompatibilidad muy diferentes. A grandes rasgos, estos materiales se pueden clasificar en elastómeros, resinas, fibras y polímeros superabsorbentes. Este trabajo se centrará en el estudio de polímeros superabsorbentes, de los que hablaremos más adelante y explicaremos en qué consisten.

Además de todos estos materiales, que ya encontramos en forma de sólidos (visco)elásticos, también es muy común utilizar materiales poliméricos que experimentan una transición de líquido a sólido como, por ejemplo, cuando mezclamos los componentes de un pegamento epoxi. Este fenómeno, conocido como gelificación, se debe al entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas causado por interacciones físicas (p. ej. electrostáticas) o por enlaces químicos. Así, en el caso de la mezcla epoxi, las cadenas se unen mediante enlaces covalentes, dando lugar a una red tridimensional de cadenas que se extiende a todo el volumen de la resina.

El entrecruzamiento entre cadenas permite obtener, de manera progresiva, polímeros finitos ramificados, esto es, en los que el entrecruzamiento se ha producido solo en algunas zonas localizadas. Esta mezcla polidispersa de polímeros finitos ramificados se conoce como “sol”, puesto que en este estadio las moléculas todavía son solubles. Luego, a medida que el proceso de entrecruzamiento continúa, estos polímeros ramificados se hacen cada vez más extensos hasta que se obtiene una enorme molécula que ocupa todo el espacio disponible y que no puede disolverse en el medio líquido y, si el medio es acuoso, tendremos un polímero muy hidratado. La estructura formada se conoce como gel y está saturada de polímeros entrecruzados, formando lo que se conoce como un “polímero infinito” –ver la Figura 1.1. La transición de un sistema con polímeros finitos ramificados en disolución (sol) a un sistema que contiene una molécula infinita (gel), se conoce como gelificación o transición sol-gel y el tiempo crítico necesario para que se forme el gel se conoce como tiempo de gelificación.

La gelificación o transición sol-gel es un proceso muy importante en este tipo de materiales y, por ello, a lo largo de los años se han desarrollado teorías para explicarlo. Flory y Stockmayer formularon las primeras teorías cuantitativas en la década de los 40 del siglo pasado.<sup>1, 2</sup> Después, en la década de los 70, se aplicó con éxito la teoría de la percolación crítica. A partir de ese momento ha ido creciendo el número de modelos teóricos para describir los aspectos cinéticos de la agregación y la gelificación. En el capítulo 3 de esta tesis, se propone un modelo teórico para explicar la cinética de gelificación en hidrogeles compuestos que contienen fibrina y nanopartículas magnéticas.

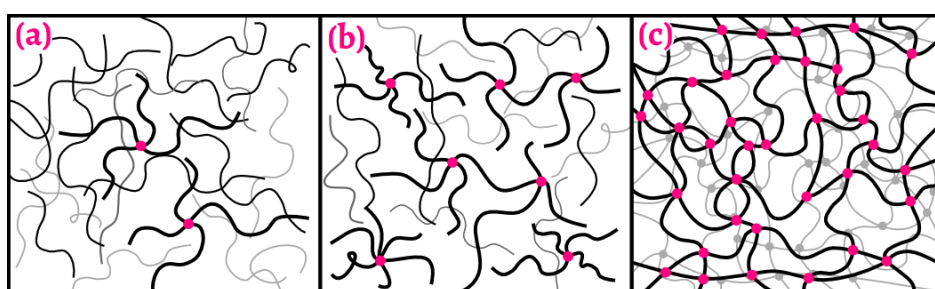


Figura 1.1. Entrecruzamiento progresivo de cadenas poliméricas lineales, las líneas negras representan las cadenas lineales poliméricas y los puntos rosas representan los puntos de entrecruzamiento. En (a) se empieza a producir entrecruzamiento entre algunas cadenas lineales obteniéndose una disolución de polímeros lineales y algunos “polímeros ramificados finitos”. En (b) se observa que, con el transcurso del tiempo, aumenta el número de polímeros ramificados finitos presentes en el “sol”, con el consiguiente cambio de viscosidad. En (c) se observa que todas las cadenas poliméricas se encuentran entrecruzadas formando un “polímero infinito” (se extiende a todo el volumen ocupado por el polímero) o gel (sólido viscoelástico).

Muchos polímeros se pueden comportar como geles, dado que un gel consiste en una red de cadenas flexibles entrecruzadas que ocluyen un líquido en su interior y mantienen su forma como ocurre en un sólido. Además, en determinadas condiciones mecánicas, un gel puede llegar a fluir como un líquido. Debemos tener en cuenta que no solo los polímeros poseen la capacidad de formar geles; es conocido que también las suspensiones coloidales de partículas de arcillas (como la montmorillonita o la sepiolita),<sup>3</sup> o de partículas de sílice,<sup>4</sup> pueden formar una red tridimensional por interacciones de tipo físico dando lugar a un gel.

Como dijimos anteriormente, este trabajo se centrará en el estudio de polímeros superabsorbentes. Estos materiales, conocidos como hidrogeles, poseen la capacidad de hincharse absorbiendo agua, disoluciones salinas o fluidos fisiológicos hasta 10 - 1000 veces su propio peso.<sup>5</sup> Actualmente, este tipo de materiales se emplean en la industria de productos para higiene personal (p. ej. pañales). Entre los polímeros

superabsorbentes comerciales de mayor interés encontramos los siguientes: sales sódicas de ácido poliacrílico o poliacrilamidas entrecruzadas, copolímeros de ácido acrílico o acrilonitrilo con almidón o celulosa y copolímeros con anhídrido maleico.<sup>5</sup> Dada la gran versatilidad en sus propiedades, la investigación en este campo avanza continuamente y actualmente se están investigando nuevos compuestos hidrofílicos capaces de formar hidrogeles.

## 1.2 Hidrogeles

Los hidrogeles son geles hidrofílicos que poseen la capacidad de contener una gran cantidad de agua sin que los polímeros que los componen se disuelvan. Están formados por una red tridimensional de cadenas flexibles dispersa en un medio acuoso. La red se forma por el entrecruzamiento, a través de enlaces químicos o físicos, de una gran variedad de polímeros, como por ejemplo polisacáridos o proteínas. Además, en los últimos años se ha desarrollado una nueva generación de hidrogeles, llamados geles supramoleculares, que están formados por péptidos que contienen entre 2 y 12 aminoácidos.<sup>6,7</sup> En estos geles, los péptidos se auto-asocian mediante interacciones físicas, formando una red tridimensional de nanofibras (diámetro del orden de 10 nm) que puede ocluir más de un 99 % de su peso en agua.

El carácter hidrofílico de las cadenas que componen la red se debe a la presencia de grupos químicos hidrófilos como por ejemplo hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH) o amida (-CONH-),<sup>8</sup> aunque también se pueden preparar hidrogeles que contengan una cantidad significativa de grupos hidrofóbicos, mediante combinación de compuestos (polímeros o moléculas) hidrofílicos e hidrofóbicos.

Como actualmente existe una gran diversidad de hidrogeles, la clasificación de los mismos puede atender a distintos criterios tales como el origen de los polímeros que los componen, el modo de preparación del gel o el comportamiento físico-químico del material resultante. A continuación describiremos las clasificaciones más comunes, atendiendo a distintos criterios.

1) *Según el origen de los polímeros.* Según este criterio, se pueden clasificar en naturales, sintéticos e híbridos. (i) Los hidrogeles naturales están formados por polímeros que han sido extraídos de fuentes naturales como algas, cultivo bacteriano o fluidos biológicos. Se utilizan ampliamente en aplicaciones biomédicas porque habitualmente son biocompatibles y biodegradables,<sup>9</sup> aunque tiene el inconveniente de que poseen una baja resistencia a la acción de esfuerzos mecánicos. La agarosa, el ácido hialurónico, el alginato o la fibrina son ejemplos de hidrogeles naturales. (ii) Los hidrogeles sintéticos están formados por grandes moléculas obtenidas por polimerización en el laboratorio. Esto permite que sean fácilmente modificables puesto

que existe un gran número de monómeros disponibles. Uno de sus mayores inconvenientes puede ser la ausencia de biocompatibilidad. Entre ellos, se encuentran los hidrogeles de poliacrilamida, polietilenglicol y de péptidos sintéticos. (iii) Los hidrogeles híbridos están formados por dos tipos de moléculas diferentes, una de origen natural y otra de origen sintético; la ventaja que presentan estos hidrogeles es que permite aunar en un único material las ventajas de los hidrogeles naturales (biocompatibilidad) y de los sintéticos (versatilidad).<sup>10</sup>

2) *Según la naturaleza del proceso de entrecruzamiento.* Se clasifican en hidrogeles químicos o físicos. (i) Los hidrogeles físicos son aquellos en que la red flexible, formada por cadenas poliméricas o por pequeñas moléculas, como es el caso de los geles supramoleculares, se entrecruza mediante interacciones físicas entre las entidades individuales. Se pueden obtener mediante cristalización, interacción iónica, enlaces de hidrógeno o agregación inducida por calentamiento. (ii) Los hidrogeles químicos, consisten en una red flexible formada por enlaces covalentes entre distintas cadenas. Existen distintas formas para preparar hidrogeles químicos, siendo las más importantes el entrecruzamiento mediante reacción de grupos químicos complementarios, reacción enzimática, radiación de alta energía y mediante polimerización con radicales libres.<sup>11, 12</sup>

3) *Según la composición y estructura química.* Se pueden clasificar en homopoliméricos, copoliméricos, de red semi-compenetrada y de red compenetrada (véase Figura 1.2).<sup>13</sup> (i) Los hidrogeles homopoliméricos están formados por redes poliméricas derivadas de un solo tipo de monómero hidrofílico.<sup>14</sup> (ii) Los hidrogeles copoliméricos están formados por cadenas poliméricas, compuestas por combinación de dos tipos de monómeros, que se entrecruzan formando una única red polimérica, donde al menos uno de los monómeros es de naturaleza hidrofílica. (iii) Los hidrogeles de red semi-compenetrada se forman por penetración de un polímero lineal dentro de una red polimérica entrecruzada, no existiendo entre la red polimérica y el polímero lineal ningún tipo de enlace químico, pero sí interacciones físicas.<sup>15</sup> En último lugar, (iv) los hidrogeles de red compenetrada consisten en una red polimérica entrecruzada covalentemente que posee en su interior otra red polimérica también entrecruzada por enlaces covalentes.<sup>16, 17</sup>

4) *Según su sensibilidad a un estímulo.* Se pueden clasificar entre aquellos que responden a un estímulo físico o a un estímulo químico o bioquímico. (i) Los hidrogeles que responden a un estímulo físico pueden cambiar sus propiedades físicas, como su volumen, o sufrir una transición de fase sol-gel de manera reversible. Esto puede ocurrir cuando hay un cambio en la temperatura (p. ej. hidrogel de quitosano-plurónico)<sup>18</sup>, o se aplica un campo eléctrico (p. ej. ácido hialurónico/polivinil alcohol)<sup>19</sup>, o se ejerce un esfuerzo mecánico (p. ej. hidrogel supramolecular de lignina)<sup>20</sup>, o por

exposición a la luz (gel híbrido de alginato-poliacrilamida con iones férricos)<sup>21</sup>, o bien se aplica un campo magnético (p. ej. hidrogel de fibrina-agarosa con nanopartículas magnéticas).<sup>22</sup> (ii) Por otro lado, los hidrogeles que responden a un estímulo químico o bioquímico son aquellos capaces de cambiar sus propiedades físicas de manera reversible cuando se produce un cambio de pH (poli-(4-vinilpiridina)),<sup>23</sup> o un reconocimiento molecular específico (p. ej. hidrogeles que responden a la presencia de glucosa),<sup>24</sup> en el medio circundante.

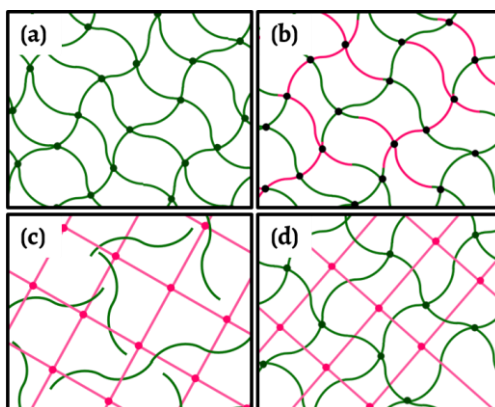


Figura 1.2. Esquema de los distintos tipos de hidrogeles que se pueden obtener según su composición y estructura. (a) Hidrogeles homopoliméricos: con cadenas entrecruzadas formadas por un solo monómero. (b) Hidrogeles poliméricos: cadenas poliméricas formadas por dos monómeros diferentes (en rosa y en verde). (c) Hidrogeles de red semicompenetrada: polímeros lineales (verde) interpenetran una red polimérica entrecruzada covalentemente (rosa). (d) Hidrogel de red compenetrada: una red entrecruzada covalentemente (rosa) alberga otra red distinta también entrecruzada covalentemente (verde).

### 1.2.1 Propiedades de los hidrogeles

Una vez preparados los hidrogeles, será necesario determinar sus propiedades, tales como el grado de hinchamiento y las propiedades reológicas, para modificarlas, en su caso, dependiendo de la aplicación particular que se desee. En este sentido, los hidrogeles son muy versátiles porque, por ejemplo, cambiando el método de preparación se puede conseguir un gel resultante con propiedades físicas muy variadas.

Como hemos mencionado, los hidrogeles son capaces de retener una gran cantidad de agua sin disolverse. Su capacidad de hidratación depende de varios factores. Uno de estos, es el balance hidrofílico/hidrofóbico de los compuestos químicos que los forman. En este caso, la hidratación se favorece por la presencia de grupos hidrofílicos, que se pueden alterar por cambios en el pH del medio o la presencia de iones. Otro factor relevante es el grado de entrecruzamiento y porosidad del hidrogel. Así,

un hidrogel entrecruzado en exceso poseerá menor porosidad ya que el empaquetamiento más compacto de las fibras que forman la red deja menos espacio para retener agua. Por tanto, para conseguir una adecuada capacidad de hinchamiento, es muy importante controlar el grado de entrecruzamiento de las cadenas de la red polimérica.

Es importante destacar que, dado que los hidrogeles están constituidos principalmente por agua, pequeños cambios en el grado de hidratación pueden suponer alteraciones considerables en sus propiedades mecánicas. Esto representa un problema al manipular las muestras, ya que una ligera presión aplicada sobre el hidrogel implica una pérdida inmediata de agua. Es un problema común a todos los denominados materiales blandos y húmedos ("*soft and wet materials*") y es muy acusado en el caso de los hidrogeles.

Por otra parte, los hidrogeles suelen comportarse desde el punto de vista mecánico como materiales viscoelásticos, es decir, que la relación entre esfuerzo mecánico y la subsiguiente deformación no cumple las ecuaciones constitutivas lineales correspondientes a un fluido newtoniano o a un sólido elástico.

Recordemos brevemente que un fluido newtoniano es un material que bajo la acción de un esfuerzo de cizalla se deforma instantánea e indefinidamente y, al cesar el esfuerzo, no recupera la forma inicial, es decir, no existen fuerzas elásticas recuperadoras. La ecuación constitutiva general (ecuación de Stokes) de los fluidos newtonianos establece una relación lineal entre el tensor de esfuerzos y el tensor de velocidades de deformación. No obstante, en los viscosímetros y reómetros convencionales, el fluido se somete habitualmente a un esfuerzo de cizalla simple, de manera que la ecuación tensorial de Stokes degenera en la conocida ecuación escalar de Newton:

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} \quad \text{Ec. (1.1)}$$

donde  $\sigma$  es el esfuerzo de cizalla,  $\gamma$  es la deformación transversal,  $\dot{\gamma}$  la velocidad de deformación (o gradiente transversal de velocidad) y  $\eta$  es la viscosidad.

Por otra parte, podemos definir un sólido elástico como un material que por acción de un esfuerzo sufre una deformación instantánea y finita de forma que, al cesar el esfuerzo aplicado, se recupera la forma inicial por la acción de fuerzas internas recuperadoras. Los sólidos elásticos cumplen la ley general de Hooke, que establece una relación lineal entre el tensor de esfuerzos y el tensor de deformaciones. De forma análoga a lo que se hace en fluidos, los sólidos elásticos se suelen caracterizar experimentalmente actuando sobre ellos mediante un esfuerzo de cizalla simple o

mediante un esfuerzo normal simple. La ecuación general de Hooke se transforma entonces en una ecuación escalar lineal:

$$\sigma = k\gamma \quad \text{Ec. (1.2)}$$

en la que  $\gamma$  es la deformación transversal o longitudinal (esfuerzo de cizalla o esfuerzo normal, respectivamente) y  $k$  es una constante igual al módulo de rigidez ( $G$ ) o al módulo de Young ( $E$ ), según el esfuerzo sea de cizalla o sea un esfuerzo normal, respectivamente.

Los hidrogeles que se han estudiado en este trabajo se comportan como sólidos viscoelásticos blandos. Esto quiere decir que bajo la acción de un esfuerzo mecánico estacionario, el intervalo de esfuerzo-deformación para el que se cumple la ley de Hooke es muy reducido y enseguida se llega a la región de comportamiento plástico (o viscoelástico, o viscoplástico), en la que no hay relación lineal esfuerzo-deformación y después, finalmente, a la rotura del material. Por tanto, para obtener el correspondiente módulo elástico ( $G$  o  $E$ ) es necesario realizar un barrido de deformaciones (o esfuerzos) con una velocidad de deformación muy pequeña para tener acceso experimental a la región elástica inicial y poder hacer una estimación fiable del correspondiente módulo elástico (véase un ejemplo en la Figura 1.3).

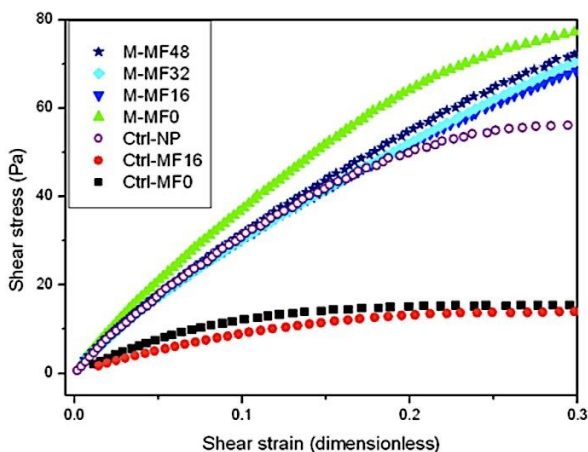


Figura 1.3. Resultado típico de un experimento para estimar el módulo de rigidez de un sólido viscoelástico blando. En este caso, con hidrogeles de fibrina-agarosa, con y sin nanopartículas magnéticas ocluidas, sometidos o no a la acción de campos magnéticos durante el proceso de gelificación. Véase explicación más detallada en M. T. López-López y cols. (2015).<sup>25</sup>

Cuando se trata de caracterizar un material viscoelástico es muy frecuente someterlo a la acción de un esfuerzo oscilante sinusoidal, para obtener una información

más completa sobre su comportamiento mecánico, puesto que de esta forma se pueden cuantificar tanto el grado de respuesta elástica como viscosa que ese material posee. Para ello, como hemos dicho, se aplica un esfuerzo (de cizalla o normal) sinusoidal y se mide la correspondiente deformación del material. El hecho de que en el material se produzca, en cierto grado, una respuesta viscosa (además de elástica) hace que la deformación sinusoidal correspondiente esté desfasada respecto al esfuerzo aplicado. Es más, la deformación será sinusoidal solo si la amplitud del esfuerzo oscilante aplicado no es excesivamente grande. En este caso, se dice que el material tiene un comportamiento viscoelástico lineal. De hecho, una forma de acotar la región de comportamiento lineal consiste en representar el esfuerzo frente a la deformación, y si se obtienen las típicas figuras de Lissajous, se puede afirmar que hay respuesta lineal. En caso contrario, el comportamiento es viscoelástico no lineal.

Para caracterizar el comportamiento de materiales deformables blandos, lo más común es obtener los correspondientes módulos dentro de la zona viscoelástica lineal (ZVL). Para ello, primero hay que acotar el intervalo de amplitud de esfuerzo para el que se da dicho comportamiento, efectuando un barrido de amplitud de esfuerzo a frecuencia constante. Una vez acotada la ZVL, se procede a obtener el correspondiente espectro mecánico, variando la frecuencia del esfuerzo aplicado (con amplitud de esfuerzo constante). En estas condiciones, la ecuación constitutiva de un material bajo comportamiento viscoelástico lineal se puede escribir como:

$$\sigma^*(t, \omega) = G^*(\omega) \gamma^*(t, \omega) \quad \text{Ec. (1.3)}$$

donde  $\sigma^*(t, \omega)$  representa el esfuerzo aplicado (en función del tiempo,  $t$ , y de la frecuencia angular,  $\omega$ ) escrito en notación compleja,  $\gamma^*(t, \omega)$  representa la deformación compleja. En el caso de que el esfuerzo aplicado sea un esfuerzo de cizalla,  $G^*$  es el módulo de rigidez complejo, el cual solo depende de  $\omega$  (y no de la amplitud del esfuerzo oscilante aplicado) dentro de la ZVL. Si el esfuerzo es un esfuerzo normal, entonces tendremos el módulo de Young complejo,  $E^*$ . El módulo de rigidez complejo (y de forma análoga el de Young) se puede escribir como:

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad \text{Ec. (1.4)}$$

donde  $G'$  se denomina módulo elástico o de almacenamiento y  $G''$  módulo viscoso o de pérdidas. El primero es proporcional a la potencia elástica que, por unidad de volumen, el material almacena/devuelve en promedio en cada ciclo, mientras que  $G''$ , análogamente, es proporcional a la potencia disipada por rozamiento viscoso. Por tanto, los dos módulos mencionados ( $G'$  y  $G''$  o, en su caso,  $E'$  y  $E''$ ) cuantifican el



grado de respuesta elástica y viscosa de un material. La representación gráfica de ambos módulos en función de la frecuencia del esfuerzo aplicado es su espectro mecánico y caracteriza de forma muy precisa el comportamiento de un material. Cualquier mínimo cambio en su composición da lugar a cambios muy significativos en el correspondiente espectro: véase por ejemplo la Figura 1.4, que corresponde a un trabajo pionero en que se midieron las propiedades viscoelásticas de un tejido nativo (mucosa oral humana). Los cambios en el tejido entre personas de distintas edades, producen cambios muy considerables en los correspondientes espectros viscoelásticos. Esta figura ilustra, de paso, como las propiedades mecánicas de los tejidos biológicos nativos presentan una gran variabilidad entre distintos individuos.

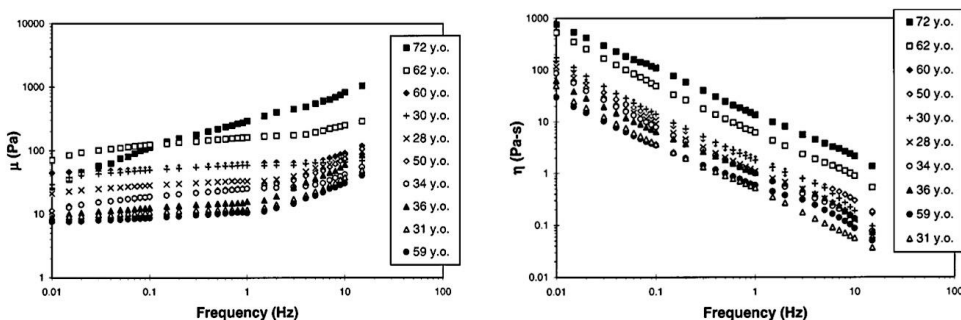


Figura 1.4. Izquierda: módulo elástico del tejido nativo de mucosa oral humana en función de la frecuencia. Derecha: se representa el módulo viscoso del mismo tejido en función de la frecuencia. Ambas figuras son para tejidos nativos de varones de distintas edades. Tomado de Chan y Titzte (1999),<sup>26</sup> con permiso de la editorial AIP Publishing LLC. La equivalencia entre la notación en este artículo (véase eje Y de las gráficas) y la que hemos empleado en esta tesis es:  $\mu = G'$  y  $\eta = G''/\omega$ .

La importancia del estudio de las propiedades reológicas de hidrogeles reside en su aplicabilidad. Así, en biomedicina los hidrogeles se suelen utilizar como matrices extracelulares para generar tejidos biológicos artificiales. Si estos se van a utilizar como substitutivos de tejidos nativos dañados, parece obvio que ambos (tejido nativo y tejido artificial) deben poseer propiedades reológicas similares. Al mismo tiempo, el estudio de estas propiedades representa un reto desde el punto de vista experimental, por su variabilidad ante cambios en la estructura a escala mesoscópica,<sup>27</sup> pérdida de disolvente<sup>28</sup> y posibles efectos de deslizamiento en las superficies de medida.<sup>28, 29</sup>

## 1.2.2 Aplicaciones de los hidrogeles

La diversidad en cuanto a métodos de preparación, composición química y propiedades mecánicas de los hidrogeles hace que sean materiales muy versátiles y, por ello, con un amplio abanico de aplicaciones tecnológicas.

Una de las aplicaciones comerciales más conocidas, es el uso de hidrogeles para fabricar lentes de contacto. En 1960 se desarrolló por primera vez un hidrogel basado en poli-2-hidroxietilmetacrilato (PHEMA) como material sintético biocompatible adecuado para lentes de contacto.<sup>30</sup> La investigación de los hidrogeles se fue desarrollando hasta que se obtuvieron mejores materiales y técnicas para la obtención de lentes de contacto para corregir problemas de visión. Después, se fue desarrollando el empleo de lentes de contacto con fines estéticos, por ejemplo, para cambiar el color del iris incorporando pequeñas partículas reflectantes embebidas en una matriz transparente coloreada.<sup>31</sup> Más adelante, se fueron desarrollando nuevas lentes de contacto para mejorar sus propiedades físicas y químicas. En concreto, Lai y Quinn desarrollaron un nuevo tipo de hidrogel basado en silicona termoplástica ópticamente transparente que presentaban una excelente permeabilidad para el oxígeno, favoreciendo la comodidad y una utilización continuada más prolongada.<sup>32</sup>

Otra aplicación comercial importante es como apósitos para heridas. Aunque lo más común es el uso de vendas, Winter en 1962 observó que, cuando la herida se encuentra en un medio húmedo, el proceso de curación es más rápido. Por ello, en los últimos años se han desarrollado hidrogeles como apósitos con una gran capacidad de hidratación (muy recomendado para heridas secas) y de oxigenación de las heridas. Además, estos hidrogeles pueden ser transparentes, lo que permite observar la herida sin necesidad de retirar el apósito, y pueden incorporar en su composición agentes antimicrobianos como yodo o plata que eviten la infección de la herida. Se han desarrollado hidrogeles con características adaptadas al tipo la herida a tratar, si es superficial, profunda, crónica, aguda, etc.<sup>33</sup>

En tercer lugar, también es conocido el uso comercial de los hidrogeles para la obtención de productos de higiene. Hace más de treinta años que se empezaron a usar polímeros superabsorbentes e hidrogeles superporosos (basados en acrilamida altamente hidrofílica) para fabricar pañales con excelente capacidad para retener agua. Después se utilizaron para otros productos como toallas sanitarias o pantalones de entrenamiento, generándose hidrogeles capaces de retener grandes cantidades de fluidos y neutralizar el mal olor (incorporan enzimas y otros aditivos).<sup>33</sup> Con ello, se extendió el uso de productos desechables (por ejemplo, pañales) y creció exponencialmente la cantidad de residuos generados.<sup>34</sup> Actualmente, la investigación en este campo se centra en la obtención de materiales con elevada capacidad de retención de agua y que sean biodegradables, como carboximetilcelulosa de sodio e hidroxietilcelulosa.<sup>33</sup>

En último lugar, mencionaremos el campo de investigación más activo de los hidrogeles, que es el de las aplicaciones biomédicas, principalmente en liberación con-

trolada de fármacos y en ingeniería tisular. En el primer caso, las propiedades absorbentes y la alta porosidad de los hidrogeles los hacen especialmente apropiados para retener fármacos y, posteriormente, liberarlos localmente allí donde se requiere su efecto terapéutico. La ventaja de usar hidrogeles para este fin es que permiten mantener una liberación controlada del fármaco, en la diana de administración, durante un largo período de tiempo.<sup>35</sup> La liberación se puede producir por distintos mecanismos como difusión controlada, hinchamiento controlado, reacción química o por cambios en el medio biológico.

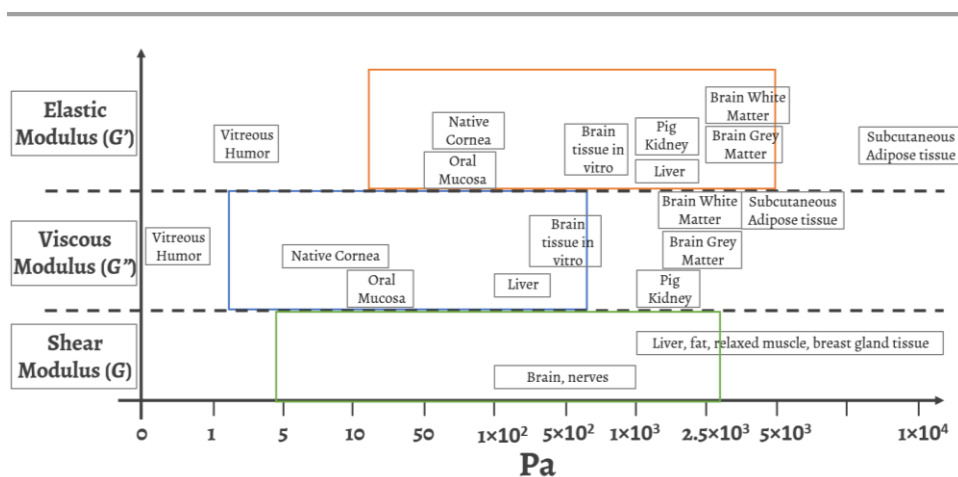
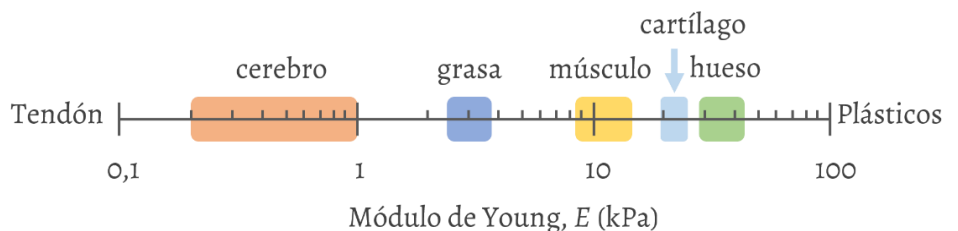


Figura 1.5. Imagen superior: módulo de Young de distintos tejidos biológicos<sup>36</sup> (reproducido con permiso de la editorial *Royal Society of Chemistry*). Imagen inferior: módulos viscoelásticos y módulo de rigidez de distintos tejidos biológicos<sup>37</sup> (con permiso de la editorial *John Wiley and Sons*). Para el cartílago articular humano  $G = 0,23$  MPa, según Stammen y cols. (2001);<sup>38</sup> otros autores dan valores entre 1 y 2 MPa, con una gran desviación típica, por ejemplo, para una velocidad de deformación baja ( $0,01$  s<sup>-1</sup>),  $G = (1,05 \pm 0,84)$  MPa.<sup>39</sup>

Por otro lado, en ingeniería tisular cada vez es más evidente la necesidad de obtener tejidos artificiales capaces de mimetizar el comportamiento de los tejidos nativos. Para esto, los hidrogeles parecen especialmente idóneos por sus propiedades mecánicas y su biocompatibilidad. Ya se han preparado tejidos artificiales capaces de imitar el comportamiento y estructura de los tejidos biológicos, generándose con

éxito sustitutos de piel o córnea que emplean matrices poliméricas.<sup>40, 41</sup> Generalmente, para esta aplicación se emplean polímeros naturales como agarosa, fibrina o ácido hialurónico que poseen implícitamente la biocompatibilidad deseada. Aun así, aún queda mucho por avanzar en este campo, pues los tejidos biológicos y órganos a tratar en medicina regenerativa son muy diversos y, más particularmente, presentan propiedades mecánicas muy variadas –véase la Figura 1.5. En los últimos años, una línea de investigación muy activa se centra en el desarrollo de hidrogeles compuestos que contienen micro- o nanopartículas sintéticas para reforzar la red polimérica y, además, conferirle algunas ventajas asociadas a las propiedades de las partículas. Concretamente, en esta tesis estudiaremos el efecto de la inclusión de partículas magnéticas en matrices poliméricas, conocidos como hidrogeles magnéticos o ferrogeles, lo que tiene la ventaja de que las propiedades mecánicas de los materiales resultantes se pueden regular por acción a distancia de campos magnéticos externos.<sup>42</sup>

### 1.3 Hidrogeles magnéticos

Los hidrogeles magnéticos son dispersiones de nano- o micropartículas ferromagnéticas (hierro, aleaciones metálicas) o ferrimagnéticas (magnetita, maghemita, ferritas) en un hidrogel. Como contienen partículas magnéticas embebidas, se pueden modificar las propiedades físicas de estos materiales, especialmente sus propiedades mecánicas, por acción de campos magnéticos externos de intensidad baja (hasta 10 kA/m) o moderada (10 - 100 kA/m).

Los hidrogeles magnéticos pertenecen a un amplio grupo de materiales denominados coloides magnéticos. Dependiendo de cómo sea la fase continua o medio portador que contiene las partículas, este tipo de coloides magnetizables pueden clasificarse en dos grandes grupos (véase la Figura 1.6). Cuando el portador es un líquido acuoso u oleoso se tienen distintos tipos de suspensiones que, en ausencia de campo magnético, se comportan como líquidos no-newtonianos, aunque por aplicación de un campo magnético de suficiente intensidad pueden llegar a convertirse en sólidos viscoelásticos muy rígidos. Se pueden clasificar en tres subtipos, como se describe a continuación.

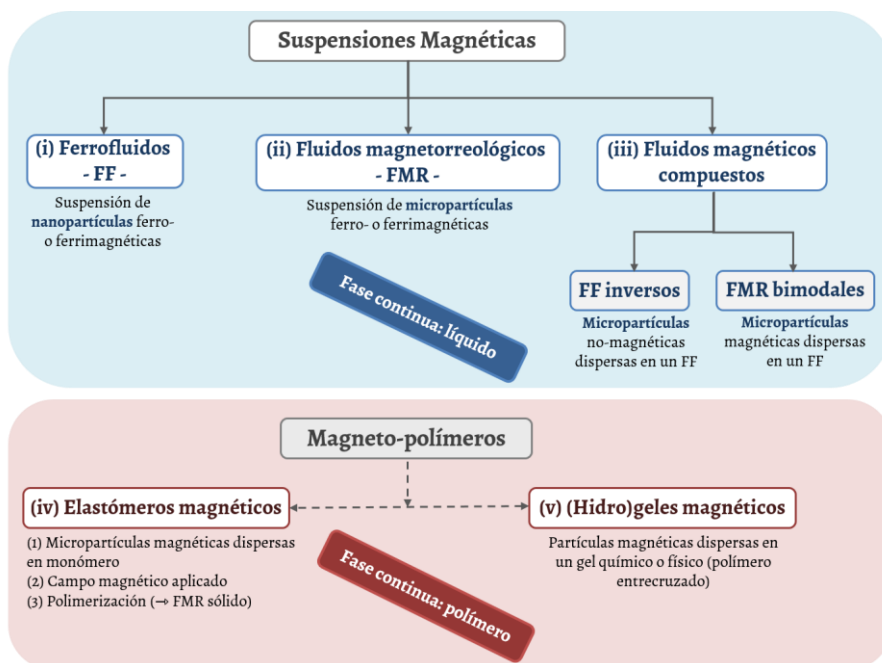


Figura 1.6. Clasificación de los coloides magnéticos.

(i) *Ferrofluidos (FF)*. Cuando las partículas magnéticas son monodominio magnético (tamaño hasta 50 nm, aproximadamente). En este caso, si la concentración de partículas es suficientemente elevada ( $\leq 10\%$  en volumen), y las partículas no están agregadas, se tiene un material líquido que es prácticamente un continuo hidrodinámico y magnético. La acción de campos magnéticos incluso intensos ( $H > 100 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ) puede dar lugar solamente a cambios leves en la viscosidad del material (efecto magnetoviscoso).<sup>43-45</sup>

(ii) *Fluidos magnetorreológicos (FMR)*. Cuando las partículas son multidominio magnético (tamaño  $10^2 - 10^3 \text{ nm}$ ). En este caso, la acción de campos incluso poco intensos o moderados puede inducir la formación de cadenas de partículas por interacción magnética, provocando la transición desde líquido no-newtoniano hasta sólido viscoelástico con módulo de rigidez muy elevado (efecto magnetorreológico).<sup>46, 47</sup>

(iii) *Fluidos magnéticos compuestos*. Estos son suspensiones que habitualmente contienen dos tipos de partículas en suspensión, pudiendo ser estas magnéticas y no-magnéticas (ferrofluidos inversos),<sup>48-50</sup> o ambas magnéticas aunque con una distribución de tamaño extremadamente bimodal (FMR bimodales).<sup>46, 51</sup>

El segundo grupo de coloides magnéticos lo constituyen los *polímeros magnéticos* (o *magneto-polímeros*) en los que el medio portador es un sólido (visco)elástico. Entre estos cabe distinguir dos tipos: elastómeros magnéticos y geles magnéticos.

(iv) *Elastómeros magnéticos*. Están constituidos por micropartículas magnéticas embebidas en un elastómero que se produce por polimerización a partir de una mezcla de monómeros y partículas. Poseen aplicaciones muy diversas, sobre todo para fabricar dispositivos para amortiguación de vibraciones.<sup>52-54</sup>

(v) *(Hidro)geles magnéticos*. Contienen partículas magnéticas, preferiblemente con tamaño mayor de 100 nm, dispersas en una red formada por un polímero entrecruzado por interacciones físicas o químicas entre las cadenas del polímero; véase una revisión sobre sus propiedades mecánicas en López-López y cols. (2016).<sup>55</sup> Entre estos, los que poseen mayor interés tecnológico son los hidrogeles, que contienen una gran proporción de agua en su composición y que, como hemos comentado en el apartado 1.2.2, poseen una amplia gama de potenciales aplicaciones, sobre todo en biomedicina.<sup>42, 56</sup>

En esta trabajo se estudiará la inclusión de nano- y micropartículas magnéticas en distintas matrices poliméricas para obtener hidrogeles magnéticos. La incorporación de partículas magnéticas proporciona a estos materiales nuevas características, por ejemplo, la fase magnética hace posible la detección y control del hidrogel mediante métodos no invasivos.<sup>25, 57-62</sup> A continuación, se enumeraran las principales ventajas que presentan los hidrogeles magnéticos en el campo de la biomedicina.

En primer lugar, la presencia de partículas magnéticas permite la visualización y seguimiento de los hidrogeles magnéticos en aplicaciones *in vivo* mediante resonancia magnética.<sup>63</sup> En segundo lugar, estudios *in vitro* sugieren que la presencia de material magnético en los hidrogeles estimula la adhesión, proliferación y diferenciación celular.<sup>64-66</sup> En tercer lugar, el uso de implantes formados por hidrogeles magnéticos *in vivo* permitiría guiar hasta ellos partículas magnéticas funcionalizadas, inyectadas en sus proximidades, mediante la acción de campos magnéticos externos.<sup>63, 65, 67</sup> Esto representa una interesante estrategia para guiar y acumular factores de crecimiento, fármacos y células adheridas a las partículas magnéticas inyectadas. Además, en tratamientos farmacológicos contra el cáncer permitiría evitar la distribución sistémica de los fármacos. Por último, en trabajos recientes de nuestro grupo de investigación, en colaboración con el de Ingeniería Tisular de la Facultad de Medicina de la UGR, se ha demostrado que se pueden preparar tejidos biológicos artificiales, basados en hidrogeles magnéticos, que poseen propiedades mecánicas modulables por campos magnéticos.<sup>25</sup> Se trata de una ventaja única con respecto a otros biomateriales: tendríamos de materiales inteligentes aptos para mimetizar a los tejidos naturales y, por tanto, con un gran potencial en este campo.

De lo anterior se desprende que el uso en biomedicina de los hidrogeles magnéticos puede suponer considerables ventajas respecto a los no magnéticos, aunque siguen existiendo aspectos que se deben mejorar. El más destacable es que, hasta el momento, la variación en sus propiedades mecánicas por aplicación de un campo magnético moderado aún no es muy elevado: el aumento en el módulo de rigidez es del orden del 10 % respecto a un hidrogel magnético en ausencia de campo aplicado.<sup>25</sup> Esta es una de las principales motivaciones de este trabajo, junto a la comprobación de su posible biocompatibilidad, y del efecto de las partículas magnéticas sobre la proliferación celular, cuando se usan como matrices extracelulares para generar tejidos biológicos artificiales, tanto *ex vivo* como *in vivo*.

## 1.4 Hipótesis y objetivos

En este trabajo, se trata de conseguir hidrogeles biocompatibles con propiedades mecánicas controlables mediante fuerzas de acción a distancia. Para tal fin se prepararán hidrogeles magnéticos que posean una fase sólida con susceptibilidad magnética suficientemente elevada para que, por acción de campos magnéticos externos, se puedan modificar los módulos (visco)elásticos del material resultante. Por ello, una parte del trabajo se centrará en la obtención de partículas magnéticas con intensa respuesta magnética y que, además, estén adecuadamente funcionalizadas para que sean biocompatibles. Un requisito adicional es que posean baja densidad para que se dispersen en la mezcla pre-gel sin que se sedimenten muy rápidamente.

Las hipótesis de partida de este trabajo son:

(1º) La inclusión de una fase magnética en una matriz polimérica biocompatible no afecta a la biocompatibilidad *ex vivo* e *in vivo* del material.

(2º) Es posible generar biomateriales cuyas propiedades mecánicas se puedan modular a distancia por aplicación de campos magnéticos de intensidad baja a moderada.

(3º) Los hidrogeles magnéticos permiten mimetizar el comportamiento reológico de tejidos biológicos que tengan que ser reparados o sustituidos.

Para comprobar estas hipótesis, se definen los siguientes objetivos específicos:

1. Sintetizar partículas magnéticas biocompatibles de baja densidad y elevada respuesta magnética. Se prepararán partículas esféricas y fibrilares compuestas por tres capas para emplearlas como fase magnética en los ferrogeles. La primera capa, será un núcleo no magnético esférico o fibrilar. La segunda, consistirá en una cubierta de magnetita que va a proporcionar a las partículas

el carácter magnético deseado. Finalmente, la superficie externa de las partículas estará compuesta por una capa polimérica encargada de conferir biocompatibilidad e inmunogenicidad a las partículas compuestas resultantes.

2. Obtener hidrogeles partiendo de distintos precursores (naturales o sintéticos) y siguiendo distintos métodos de preparación. Se prepararán hidrogeles naturales de fibrina mediante entrecruzamiento enzimático del fibrinógeno (proteína presente en el plasma sanguíneo). También se estudiarán otros compuestos que posean la capacidad de formar hidrogeles, como péptidos de cadena muy corta (fluorenilmetoxicarbonil-defenilalanina), o polímeros (alginato de sodio).
3. Preparar hidrogeles magnéticos dispersando distintos tipos de partículas magnéticas en los precursores de los hidrogeles. Se utilizarán las partículas compuestas sintetizadas (objetivo 1) y también nano- y micropartículas magnéticas de distinta composición y tamaño.
4. Caracterizar los hidrogeles, no magnéticos y magnéticos, preparados desde el punto de vista mecánico, mediante distintos tipos de ensayos reológicos. Los materiales se someterán a esfuerzos de cizalla o a fuerzas de tracción. En el caso de los hidrogeles magnéticos, lo anterior se llevará a cabo en ausencia y en presencia de un campo magnético aplicado.
5. Comprobar la biocompatibilidad *ex vivo* de las partículas compuestas, así como de los hidrogeles no magnéticos y magnéticos preparados. Para ello, se realizarán ensayos de viabilidad y proliferación celular, además de análisis histológicos.
6. Comprobar la biocompatibilidad *in vivo* de las partículas sintéticas compuestas y de los hidrogeles no magnéticos y magnéticos obtenidos. Se estudiará la biocompatibilidad, en función del tiempo, observando los cambios producidos en los órganos de animales sanos y animales intervenidos quirúrgicamente para implantar las partículas preparadas así como los hidrogeles no magnéticos y magnéticos.
7. Generar un tejido artificial por cultivo de condrocitos humanos (células presentes en el cartílago interarticular) en las matrices poliméricas no magnéticas y magnéticas preparadas.
8. Evaluar el tejido artificial obtenido mediante el estudio de sus propiedades mecánicas, pruebas de viabilidad y proliferación celular y análisis histológico.



## 1.5 Organización de la tesis

La investigación desarrollada en este trabajo se encuentra estructurada en tres apartados:

**Parte I.** En esta parte se estudian las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad de hidrogeles de fibrina-agarosa magnéticos con el objetivo de utilizarlos en la generación de un tejido que contiene fibroblastos. Esta parte se desarrolla en los **capítulos 2, 3 y 4**.

En el **capítulo 2**, se desarrollan dos métodos de síntesis para la obtención de partículas magnéticas, de morfología esférica y fibrilar, formadas por tres capas (núcleo de baja densidad, capa magnética y cubierta biocompatible). Además, se lleva a cabo un estudio *ex vivo* e *in vivo* de la biocompatibilidad de las partículas esféricas sintetizadas, así como de los hidrogeles de fibrina no magnéticos y magnéticos preparados usando como fase magnética las partículas compuestas esféricas.

En el **capítulo 3**, se lleva a cabo un estudio reológico y microestructural de hidrogeles de fibrina, con partículas magnéticas embebidas, con el objetivo de estudiar la interacción existente entre el polímero que recubre las nanopartículas magnéticas y la fibrina. En este capítulo, se investiga el origen de la diferencia observada, en las propiedades mecánicas y el grado de hidratación (hinchamiento), entre los hidrogeles de fibrina no magnéticos y los magnéticos. Se desarrolla un modelo teórico para explicar el proceso de gelificación de estos hidrogeles en presencia de nanopartículas magnéticas. Además, se realiza un ensayo *ex vivo* para comprobar la biocompatibilidad de los hidrogeles de fibrina magnéticos.

En el **capítulo 4**, se cultivan condrocitos en matrices poliméricas de fibrina-agarosa, magnéticas (con partículas de magnetita funcionalizadas) y no magnéticas. Se realiza un estudio de la variación con el tiempo en las propiedades mecánicas de los distintos tejidos artificiales generados. Por último, se llevan a cabo estudios de biocompatibilidad *ex vivo* y análisis histológicos.

**Parte II.** En esta parte se centra en el estudio reológico de nuevos hidrogeles magnéticos. Se compone de los **capítulos 5 y 6**.

En el **capítulo 5**, se lleva a cabo la caracterización reológica bajo esfuerzo de cizalla de un hidrogel formado por asociación de derivados dipeptídicos (fmoc-difenilalanina). Además, se realiza una modificación en el protocolo de preparación del gel para incorporar una fase magnética compuesta por nanopartículas de hierro. Se estudia la variación de los módulos viscoelásticos de los hidrogeles magnéticos al aumentar la fracción de volumen de nanopartículas de hierro. Además, se analiza la

estructura a escala microscópica de estos materiales en ausencia y presencia de nanopartículas de hierro.

En el **capítulo 6**, se preparan hidrogeles de alginato de calcio no magnéticos y magnéticos, con distintas concentraciones de micropartículas de hierro, para estudiar sus propiedades mecánicas bajo esfuerzos de tracción. Se determinan sus propiedades mecánicas en ausencia y presencia de campo magnético con objeto de cuantificar el incremento en el módulo de Young. También, se determinan las propiedades magnéticas de los hidrogeles preparados con distintas concentraciones de partículas de hierro.

**Parte III.** Finalmente, los **capítulos 7 y 8** incluyen, respectivamente, las principales conclusiones de la tesis y un resumen en inglés de la misma para optar a la mención internacional.

## 1.6 Bibliografía

1. P. J. Flory, *Journal of the American Chemical Society*, 1941, **63**, 3083-3090.
2. W. H. Stockmayer, *Journal of Chemical Physics*, 1944, **12**, 125-131.
3. J. D. G. Duran, M. M. Ramos-Tejada, F. J. Arroyo and F. Gonzalez-Caballero, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2000, **229**, 107-117.
4. J. de Vicente, M. T. Lopez-Lopez, F. Gonzalez-Caballero and J. D. G. Duran, *Journal of Rheology*, 2003, **47**, 1093-1109.
5. G. Martínez, in *Ciencia y Tecnología de Materiales Poliméricos*, eds. L. Garrido, L. Ibarra and C. Marco, Madrid, 2004, vol. II, ch. 7, pp. 183-196.
6. E. Beniash, J. D. Hartgerink, H. Storrer, J. C. Stendahl and S. I. Stupp, *Acta Biomaterialia*, 2005, **1**, 387-397.
7. D. J. Adams, *Macromolecular Bioscience*, 2011, **11**, 160-173.
8. F. Ganji, S. Vasheghani-Farahani and E. Vasheghani-Farahani, *Iranian Polymer Journal*, 2010, **19**, 375-398.
9. J. Zhu and R. E. Marchant, *Expert Review of Medical Devices*, 2011, **8**, 607-626.
10. M. M. Khansari, L. V. Sorokina, P. Mukherjee, F. Mukhtar, M. R. Shirdar, M. Shahidi and T. Shokuhfar, *Jom*, 2017, **69**, 1340-1347.
11. K. Varaprasad, G. M. Raghavendra, T. Jayaramudu, M. M. Yallapu and R. Sadiku, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2017, **79**, 958-971.
12. M. F. Akhtar, M. Hanif and N. M. Ranjha, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2016, **24**, 554-559.

13. F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad and H. M. Akil, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2015, **57**, 414-433.
14. T. Iizawa, H. Taketa, M. Maruta, T. Ishido, T. Gotoh and S. Sakohara, *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, **104**, 842-850.
15. J.-T. Zhang, R. Bhat and K. D. Jandt, *Acta Biomaterialia*, 2009, **5**, 488-497.
16. E. C. Muniz and G. Geuskens, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2001, **12**, 879-881.
17. E. S. Dragan, *Chemical Engineering Journal*, 2014, **243**, 572-590.
18. K. M. Park, S. Y. Lee, Y. K. Joung, J. S. Na, M. C. Lee and K. D. Park, *Acta Biomaterialia*, 2009, **5**, 1956-1965.
19. S. J. Kim, S. G. Yoon, Y. M. Lee, H. C. Kim and S. I. Kim, *Biosensors & Bioelectronics*, 2004, **19**, 531-536.
20. D. Kai, Z. W. Low, S. S. Liow, A. A. Karim, H. Ye, G. Jin, K. Li and X. J. Loh, *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 2015, **3**, 2160-2169.
21. G. E. Giammanco, B. Carrion, R. M. Coleman and A. D. Ostrowski, *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2016, **8**, 14423-14429.
22. L. Rodriguez-Arco, I. A. Rodriguez, V. Carriel, A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, P. Kuzhir, J. D. G. Duran and M. T. Lopez-Lopez, *Nanoscale*, 2016, **8**, 8138-8150.
23. A. Arizaga, G. Ibarz and R. Pinol, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, **348**, 668-672.
24. L. Y. Chu, Y. Li, J. H. Zhu, H. D. Wang and Y. J. Liang, *Journal of Controlled Release*, 2004, **97**, 43-53.
25. M. T. Lopez-Lopez, G. Scionti, A. C. Oliveira, J. D. G. Duran, A. Campos, M. Alaminos and I. A. Rodriguez, *Plos One*, 2015, **10**, e0133878.
26. R. W. Chan and I. R. Titze, *Journal of the Acoustical Society of America*, 1999, **106**, 2008-2021.
27. D. Bonn and M. M. Denn, *Science*, 2009, **324**, 1401-1402.
28. J. M. Piau, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 2007, **144**, 1-29.
29. T. Q. Jiang, A. C. Young and A. B. Metzner, *Rheologica Acta*, 1986, **25**, 397-404.
30. O. Wichterle and D. Lim, *Nature*, 1960, **185**, 117-118.
31. Patente: US4472327-A.
32. Patentes: US5969076-A; WO9960048-A1; AU9936457-A; EP1080132-A1; EP1080132-B1; DE69900791-E; JP2002515528-W; ES2171328-T3; TW476768-A; JP3615706-B2; MY133022-A.
33. E. Calo and V. V. Khutoryanskiy, *European Polymer Journal*, 2015, **65**, 252-267.

34. A. Sannino, C. Demitri and M. Madaghie, *Materials*, 2009, **2**, 353-373.
35. T. R. Hoare and D. S. Kohane, *Polymer*, 2008, **49**, 1993-2007.
36. S. Sartori, V. Chiono, C. Tonda-Turo, C. Mattu and C. Gianluca, *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, **2**, 5128-5144.
37. G. Scionti, M. Moral, M. Toledano, R. Osorio, J. D. G. Duran, M. Alaminos, A. Campos and M. T. Lopez-Lopez, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2014, **102**, 2573-2582.
38. J. A. Stammen, S. Williams, D. N. Ku and R. E. Gulberg, *Biomaterials*, 2001, **22**, 799-806.
39. R. A. Magnussen, F. Guilak and T. P. Vail, *Journal of Orthopaedic Research*, 2005, **23**, 576-583.
40. M. Alaminos, M. D. Sanchez-Quevedo, J. I. Munoz-Avila, D. Serrano, S. Medialdea, I. Carreras and A. Campos, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, **47**, 3311-3317.
41. V. Carriel, I. Garzon, J.-M. Jimenez, A.-C.-X. Oliveira, S. Arias-Santiago, A. Campos, M.-C. Sanchez-Quevedo and M. Alaminos, *Cells Tissues Organs*, 2012, **196**, 1-12.
42. Y. Li, G. Huang, X. Zhang, B. Li, Y. Chen, T. Lu, T. J. Lu and F. Xu, *Advanced Functional Materials*, 2013, **23**, 660-672.
43. P. Ilg and S. Odenbach, *Colloidal Magnetic Fluids: Basics, Development and Application of Ferrofluids*, 2009, **763**, 249-325.
44. A. Y. Zubarev and L. Y. Iskakova, *Physica a-Statistical Mechanics and Its Applications*, 2007, **376**, 38-50.
45. M. T. Lopez-Lopez, A. Gomez-Ramirez, L. Rodriguez-Arco, J. D. G. Duran, L. Iskakova and A. Zubarev, *Langmuir*, 2012, **28**, 6232-6245.
46. G. Bossis, O. Volkova, S. Lacis and A. Meunier, in *Ferrofluids*, ed. Springer, Berlin, Germany, Odenbach, S edn., 2002, pp. 202-230.
47. M. T. Lopez-Lopez, G. Vertelov, G. Bossis, P. Kuzhir and J. D. G. Duran, *Journal of Materials Chemistry*, 2007, **17**, 3839-3844.
48. B. J. de Gans, C. Blom, A. P. Philipse and J. Mellema, *Physical Review E*, 1999, **60**, 4518-4527.
49. O. Volkova, G. Bossis, M. Guyot, V. Bashtovoi and A. Reks, *Journal of Rheology*, 2000, **44**, 91-104.
50. L. Rodriguez-Arco, M. T. Lopez-Lopez, A. Y. Zubarev, K. Gdula and J. D. G. Duran, *Soft Matter*, 2014, **10**, 6256-6265.
51. M. T. Lopez-Lopez, J. de Vicente, G. Bossis, F. Gonzalez-Caballero and J. D. G. Duran, *Journal of Materials Research*, 2005, **20**, 874-881.

52. J. D. Carlson and M. R. Jolly, *Mechatronics*, 2000, **10**, 555-569.
53. Y. Li, J. Li, W. Li and H. Du, *Smart Materials and Structures*, 2014, **23**, 123001.
54. L. Irazu and M. Jesus Elejabarrieta, *Composite Structures*, 2017, **176**, 407-419.
55. M. T. Lopez-Lopez, J. D. G. Duran, L. Y. Iskakova and A. Y. Zubarev, *Journal of Nanofluids*, 2016, **5**, 479-495.
56. N. S. Satarkar, D. Biswal and J. Z. Hilt, *Soft Matter*, 2010, **6**, 2364-2371.
57. C. R. Mayer, V. Cabuil, T. Lalot and R. Thouvenot, *Advanced Materials*, 2000, **12**, 417-420.
58. S. Brule, M. Levy, C. Wilhelm, D. Letourneur, F. Gazeau, C. Menager and C. Le Visage, *Advanced Materials*, 2011, **23**, 787-790.
59. J. I. Kim, B. Kim, C. Chun, S. H. Lee and S.-C. Song, *Biomaterials*, 2012, **33**, 4836-4842.
60. R. Barbucci, D. Pasqui, G. Giani, M. De Cagna, M. Fini, R. Giardino and A. Atrei, *Soft Matter*, 2011, **7**, 5558-5565.
61. C. S. Brazel, *Pharmaceutical Research*, 2009, **26**, 644-656.
62. R. Fuhrer, E. K. Athanassiou, N. A. Luechinger and W. J. Stark, *Small*, 2009, **5**, 383-388.
63. O. Ziv-Polat, H. Skaat, A. Shahar and S. Margel, *International Journal of Nanomedicine*, 2012, **7**, 1259-1274.
64. M. Bañobre-Lopez, Y. Piñeiro-Redondo, R. De Santis, A. Gloria, L. Ambrosio, A. Tampieri, V. Dediu and J. Rivas, *Journal of Applied Physics*, 2011, **109**, 07B313.
65. N. Bock, A. Riminucci, C. Dionigi, A. Russo, A. Tampieri, E. Landi, V. A. Goranov, M. Marcacci and V. Dediu, *Acta Biomaterialia*, 2010, **6**, 786-796.
66. X.-B. Zeng, H. Hu, L.-Q. Xie, F. Lan, Y. Wu and Z.-W. Gu, *Journal of Inorganic Materials*, 2013, **28**, 79-84.
67. S. Panseri, C. Cunha, T. D'Alessandro, M. Sandri, G. Giavaresi, M. Marcacci, C. T. Hung and A. Tampieri, *Journal of Nanobiotechnology*, 2012, **10**, 32.



# Capítulo 2

Hidrogeles con partículas magnéticas compuestas. Biocompatibilidad *ex vivo* e *in vivo*\*

---

\*El contenido de este capítulo se ha publicado parcialmente –lo que corresponde a la síntesis de partículas esféricas formadas por polímero-magnetita y su biocompatibilidad– en el siguiente artículo:

L. Rodríguez-Arco, I. A. Rodríguez, V. Carriel, A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, P. Kuzhir, J. D. G. Duran and M. T. Lopez-Lopez. Biocompatible magnetic core-shell nanocomposites for engineered magnetic tissues, *Nanoscale*, 2016, **8**, 8138-8150.

## RESUMEN

En este capítulo se describe la síntesis de partículas compuestas por un núcleo no magnético recubierto por una capa magnética. Las partículas resultantes poseen forma esférica o elipsoidal. Constan de un núcleo de baja densidad, que determina la forma final de las partículas compuestas, que está formado en el caso de las partículas elipsoidales por sílice y, en el caso de las partículas esféricas, por un polímero. En ambos casos, la capa de recubrimiento está formada por nanopartículas magnetita. Para conferir la deseada biocompatibilidad a las partículas resultantes, sobre la capa magnética se adsorbió una cubierta externa de polietilenglicol.

En el contexto de esta tesis, se sintetizaron y se estudiaron las principales propiedades físico-químicas de las partículas elipsoidales de sílice-magnetita-polietilenglicol. La síntesis y caracterización físico-química de las partículas esféricas polímero-magnetita-polietilenglicol se realizó por primera vez en nuestro grupo, con anterioridad a esta tesis, y se publicó en la ref. 1. En el caso de las partículas elipsoidales, se caracterizaron utilizando diversas técnicas. Así, para determinar la forma y tamaño de las partículas elipsoidales se utilizaron las técnicas de microscopía electrónica de barrido y de transmisión. Asimismo, se determinaron las propiedades eléctricas de la interfase partícula-disolución acuosa mediante medidas de movilidad electroforética. Finalmente, las propiedades magnéticas se determinaron mediante magnetometría.

Se describe el estudio, realizado en el desarrollo de esta tesis, sobre la biocompatibilidad *ex vivo* e *in vivo* con partículas esféricas polímero-magnetita-polietilenglicol. Este estudio de biocompatibilidad representa la continuación, y culminación, de los resultados del trabajo previo antes mencionado.<sup>1</sup> Estas partículas esféricas son análogas, en cuanto a la composición química de las capas externas (magnetita-polietilenglicol), a las elipsoidales con núcleo de sílice. Se estudió la biocompatibilidad de suspensiones acuosas de las partículas esféricas, así como la de los correspondientes hidrogeles obtenidos por dispersión de las partículas en un gel de fibrina-agarosa. Se comprobó que la funcionalización con polietilenglicol confería una excelente viabilidad celular y permitía la proliferación celular *ex vivo*. Además, se comprobó que la implantación *in vivo* de los tejidos biológicos, basados en estos hidrogeles, mostraba una buena biocompatibilidad y excepcional interacción con el tejido huésped. De hecho, solo causaron una reacción inflamatoria transitoria aguda localizada en el sitio de implantación, sin afectar a otros órganos. Los resultados obtenidos sugieren que los hidrogeles magnéticos descritos en este capítulo pueden utilizarse como tejidos substitutivos de tejidos biológicos. Presentan la ventaja de que sus propiedades mecánicas pueden modificarse para adaptarlas a las del tejido nativo que se pretende sustituir o reparar. Además, la evolución de estos tejidos *in vivo* puede seguirse mediante técnicas no invasivas (resonancia magnética, MRI).



## 2.1 Introducción

En ciencia de materiales existe un creciente interés por diseñar materiales que posean una estructura interna a escala nanométrica con objeto de integrar en una sola entidad las propiedades de cada uno de sus componentes. De esta forma, es posible dotar al material resultante de características multifuncionales útiles para una amplia variedad de aplicaciones.<sup>2, 3</sup> Entre estos materiales, cabe destacar los que contienen partículas nanocompuestas por un núcleo de un material y una capa externa de otro material que lo recubre. Pueden utilizarse en distintas aplicaciones como son catálisis heterogénea, conversión de energía, depuración de aguas, optoelectrónica y aplicaciones biomédicas.<sup>3-6</sup>

En el caso de las aplicaciones biomédicas, la obtención de partículas magnéticas núcleo-recubrimiento tiene varias ventajas: (i) la densidad media de las partículas puede ser mucho menor que la de los materiales ferro- o ferrimagnéticos; (ii) sobre el recubrimiento se pueden adsorber moléculas que las doten de biocompatibilidad; (iii) las propiedades de los biomateriales resultantes, más específicamente sus propiedades mecánicas, se pueden controlar de forma no invasiva por acción a distancia. Las nanopartículas magnéticas (NPM) se pueden integrar en nanoestructuras localizándolas en el núcleo o formando la capa externa.<sup>7, 8</sup> Debido a su naturaleza magnética, las NPM se pueden guiar por fuerzas a distancia (gradiente de campo magnético externo) y, a la vez, se pueden visualizar mediante resonancia magnética (MRI, *Magnetic Resonance Imaging*) o tomografía computarizada (CT, *Computerized Tomography Scanning*). Además, como el material magnético está constituido por agregación de multitud de nanocristales posee una gran superficie específica, lo que facilita su funcionalización para diferentes fines en el campo de la biomedicina, mediante la absorción y/o adsorción de anticuerpos, fármacos, moléculas para diagnóstico, factores de crecimiento, péptidos, etc.<sup>8-10</sup> En concreto, en ingeniería tisular, el uso de NPM embebidas en biopolímeros se viene ensayando como una vía innovadora para sintetizar matrices extracelulares para tejidos artificiales en los que no se perjudique la adhesión, proliferación y diferenciación celular.<sup>11-27</sup> Asimismo, los tejidos artificiales resultantes poseen una propiedad que les hace singulares y especialmente interesantes: pueden imantarse por la aplicación de un campo magnético externo y atraer otras NPM funcionalizadas, que a su vez transporten factores de crecimiento, fármacos o células.<sup>12, 18, 23</sup>

En estudios previos sobre formación de estructuras magnéticas a escala nanométrica, se han usado NPM de un tamaño aproximado de 10 nm. Sin embargo, el uso de NPM de un tamaño mayor de 50-100 nm tiene ventajas adicionales porque la energía de interacción magnética domina sobre el movimiento browniano, incluso a campos

magnéticos bajos.<sup>28</sup> Las propiedades mecánicas de dispersiones de NPM con tamaño del orden de  $10^2$  nm, que son las que normalmente se emplean en ciencia de materiales (por ejemplo, en suspensiones, geles, espumas), se pueden cambiar de manera reversible mediante la aplicación de un campo magnético externo.<sup>28-30</sup> De hecho, en un trabajo reciente, hemos demostrado que es posible modificar, de forma reversible, las propiedades mecánicas de un tejido magnético constituido por NPM de unos 100 nm de diámetro por acción de fuerzas magnéticas externas.<sup>31</sup>

Sin embargo, las dispersiones de partículas magnéticas de 50-100 nm tienden a sedimentarse debido a la alta densidad de los materiales magnéticos. Este problema se puede solucionar, en parte, si usamos en su lugar nanocompuestos núcleo-recubrimiento. Si el material que forma el núcleo tiene baja densidad (por ejemplo, un polímero o sílice), la sedimentación es mucho más lenta ya que la densidad media del compuesto se reduce. Además, en el caso de que el material magnético esté distribuido alrededor del núcleo no magnético, se tienen ventajas adicionales. Así, en trabajos previos hemos demostrado que, para un volumen dado de material magnético y bajo campo magnético bajo o medio, la distribución en forma de corteza esférica hace que la susceptibilidad magnética sea mayor que cuando se tienen partículas macizas.<sup>32</sup>

En resumen, se han sintetizado nuevas partículas magnéticas elipsoidales compuestas por núcleo y recubrimiento. Se han estudiado las propiedades físicas y químicas de las partículas sintetizadas (morfología, composición, propiedades interfaciales, propiedades magnéticas). Se ha comprobado la biocompatibilidad que confiere la incorporación de una capa externa de polietilenglicol, tanto *ex vivo* como *in vivo*. Se han generado tejidos magnéticos que permiten una proliferación celular activa y poseen buena biocompatibilidad *in vivo*.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Síntesis de partículas elipsoidales núcleo-recubrimiento

Para sintetizar partículas magnéticas elipsoidales compuestas por núcleo y capa externa, se siguió una ruta de síntesis en tres etapas:

- i) Síntesis de núcleos de sílice (NPSi). Se sintetizaron nanopartículas elipsoidales empleando el método sol-gel.
- ii) Deposición de una capa de material magnético sobre los núcleos NPSi (NPSi@Mag). En esta etapa se depositó una capa de óxidos de hierro (fundamentalmente magnetita) sobre la superficie de los núcleos NPSi.

- iii) Recubrimiento de las partículas obtenidas en el paso (ii) con polietilenglicol (NPSi@Mag@PEG) para dotar a los nanocompuestos NPSi@Mag de biocompatibilidad.

Se utilizaron los siguientes reactivos: bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, cetyltrimethylammonium bromide, 98 %), ortosilicato de tetraetilo (TEOS, tetraethyl ortosilicate, 98 %), acetilacetato de hierro Fe(acac)<sub>3</sub>, 99,9 %, PEG-200 (polietilenglicol, peso molecular 200 g/mol), PEG-400 (polietilenglicol, peso molecular 400 g/mol), sesquiolato de sorbitan, aceite mineral, glutaraldehído al 25 % y trietilenglicol (TREG, 99 %) todos ellos suministrados por Sigma-Aldrich (EE. UU.). También se empleó n-hexano, 99 % grado reactivo, suministrado por Scharlab (España) y nitrógeno suministrado por Abelló Linde S. A. (España).

### **2.2.1.1 Síntesis de partículas de sílice (NPSi) con mesoporos**

Para obtener núcleos con forma elipsoidal se utilizó una adaptación del método sol-gel que consistía en la adición de un surfactante catiónico (CTAB, bromuro de hexadeciltrimetilamonio)<sup>33</sup>, para obtener nanopartículas alargadas de sílice. La razón por la que se eligió la sílice como material adecuado para la obtención de unos núcleos de morfología elipsoidal, reside en que su síntesis ha sido ampliamente estudiada pudiéndose obtener nanopartículas de diversas formas y tamaños.<sup>34-38</sup>

La principal función del CTAB es actuar como plantilla para obtener nanopartículas con una morfología alargada mediante la formación de micelas. El CTAB en disolución acuosa posee una concentración micelar crítica (CMC) de 0,19-1,0 mM y, por encima de esta concentración, tiene lugar una transición desde micelas esféricas a micelas alargadas.<sup>39, 40</sup> Además, las micelas de CTAB facilitan la formación de mesoporos, por lo que las nanopartículas poseen una elevada superficie específica para la absorción/adsorción de distintas moléculas.<sup>41</sup>

Para realizar la síntesis, se disolvieron 0,31 g de CTAB y 0,05 gramos de PEG-200 en 50 mL de agua de calidad Milli-Q (Millipore, Francia), con agitación mecánica y a una temperatura de 40 °C controlada con un baño termostático. El PEG actúa como co-surfactante para evitar la agregación de las partículas de sílice en el inicio de la nucleación.<sup>42</sup> La concentración de la disolución de CTAB era 17 mM, con lo que se garantizaba la formación de micelas alargadas. Una vez preparada la disolución con CTAB y PEG, se añadieron 2,6 mL de NH<sub>4</sub>OH al 28-30 %. Para determinar la cantidad de NH<sub>4</sub>OH necesaria para obtener núcleos de NPSi elipsoidales, se realizó un estudio morfológico en función del pH de la mezcla de reacción (volumen de NH<sub>4</sub>OH añadido), realizando seis síntesis con 1,8; 2,0; 2,2; 2,4; 2,8 y 3,2 mL de NH<sub>4</sub>OH al 28-30 %.

En último lugar, se añadieron gota a gota 1,5 mL de TEOS. La mezcla de reacción se dejó reaccionar durante dos horas bajo agitación mecánica a 40 °C. En los primeros 5 minutos, se observó un cambio de color de la mezcla de reacción inicial, que pasó de ser transparente a un color blanco turbio. Este cambio se debe al comienzo de la reacción de condensación de los monómeros de TEOS para dar lugar a sílice, como se explica en la Figura 2.1. Una vez transcurrido ese tiempo de reacción, se recuperaron las partículas mediante centrifugación a 10000 rpm durante 10 min usando una centrífuga Sigma® 3-30KS (Alemania). Después se lavaron con agua y etanol, realizando 4 ciclos de dispersión/centrifugación, con cada uno de los dos disolventes, para eliminar los reactivos que no hubieran reaccionado. En último lugar, se calcinaron las nanopartículas de sílice en un horno de tubo cilíndrico en el que se aplicó una rampa de calentamiento de 5 °C/min hasta alcanzar 600 °C. Esta temperatura se mantuvo durante 1 h para, posteriormente, dejar enfriar hasta temperatura ambiente.

### 1) Hidrólisis



### 2) Condensación

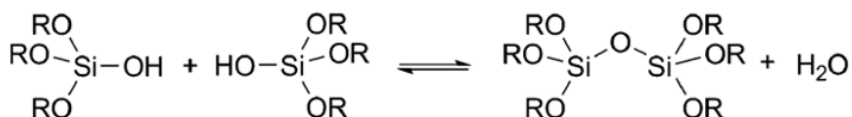


Figura 2.1. Mecanismo de polimerización del TEOS (R es etilo, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-). En la reacción 1) se produce la hidrólisis del alcóxido (TEOS) en medio básico. En la reacción 2) los grupos silanol (RO-Si-OH) polimerizan por condensación formando estructuras tridimensionales unidas por enlaces siloxano (Si-O-Si), con eliminación de agua y alcohol. En esta fase, es crítica la presencia de micelas de CTAB que actúan como plantilla y, además, originan los mesoporos. Este tensioactivo catiónico atrae las cargas negativas de las especies de sílice y las concentra alrededor de las micelas formando una estructura de sílice tubular. Las nanopartículas aumentan de tamaño hasta que la carga neta negativa, que portan las especies de sílice en el medio acuoso, es tan elevada que dejan de crecer.<sup>41</sup>

### 2.2.1.2 Síntesis de los nanocompuestos NPSi@Mag

Para sintetizar una capa magnética, compuesta por óxidos de hierro, sobre los núcleos NPSi, se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de magnetita usando el método del poliol modificado, partiendo de una suspensión que contiene los núcleos de sílice en lugar de una disolución de sal férrica en TREG. Para ello se siguió el procedimiento experimental descrito por Wan y colaboradores.<sup>43</sup>

Se dispersaron 50 mg de núcleos de NPSi en 15 mL de TREG en un matraz de fondo redondo de 500 mL con tres bocas. Se montó un sistema como el que se muestra en la Figura 2.2, dónde se situó el matraz sobre una manta calefactora. La boca central del matraz se utilizó para ajustar un sistema de agitación mecánica, en la boca derecha se situó la columna de refrigeración y la de la izquierda se usó para burbujear nitrógeno insertando una aguja conectada a una bombona de nitrógeno líquido, para crear una atmósfera inerte. Una vez montado el sistema, se dejó la columna de refrigeración con la apertura superior abierta y se mantuvo un flujo constante de nitrógeno durante 15 minutos, para asegurar la purga completa de aire. Pasado este tiempo, se selló también la parte superior de la columna con un septum dónde se situaron dos agujas, una de ellas abierta al exterior para mantener la presión y la otra conectada a un globo que permanecía hinchado con un diámetro aproximadamente constante, lo que nos permitía controlar que el flujo de nitrógeno era constante. Una vez purgado el sistema con  $N_2$ , se añaden 100 mg de  $Fe(acac)_3$  a través de la boca de la izquierda y se calienta hasta reflujo. El sistema permaneció a reflujo durante 30 min. Después, se separaron los nanocompuestos NPSi@Mag del sobrenadante mediante centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos. Se realizan varios ciclos de centrifugación/redispersión con etanol hasta eliminar todo el TREG remanente.

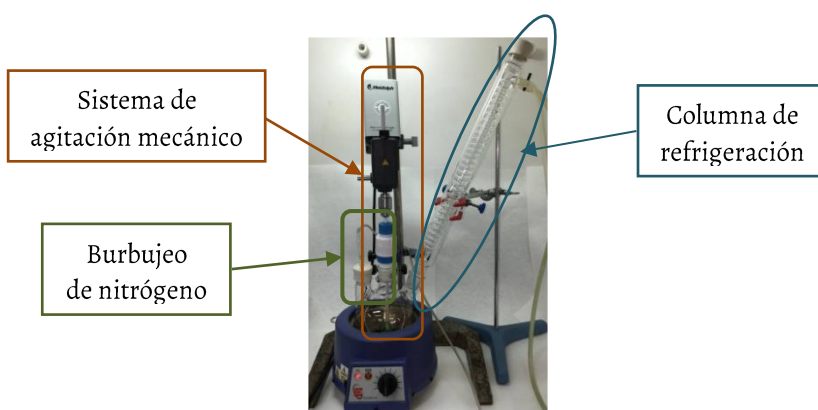


Figura 2.2. Montaje para síntesis de magnetita mediante el método del poliol.

### **2.2.1.3 Síntesis de los nanocompuestos NPSi@Mag@PEG**

Para preparar los compuestos NPSi@Mag@PEG, se empleó un método basado en la formación de una microemulsión de agua en aceite.<sup>44</sup> Para llevar a cabo la reacción se prepararon las fases acuosa y oleosa como se describe a continuación.

- i) Para la fase acuosa, se dispersó 1 gramo de PEG-400 y 0,3 g de nanocompuestos NPSi@Mag en 15 mL de agua. Se sonicó durante 7 minutos.
- ii) Para la fase oleosa, se mezclaron 450 mL de n-hexano, 150 mL de aceite mineral y 750  $\mu$ L de sesquiolato de sorbitan (tensioactivo para estabilizar la microemulsión de agua en aceite).
- iii) Ambas fases se mezclan mediante ultrasonidos durante 5 minutos, para formar una microemulsión de agua en aceite.
- iv) Inmediatamente, se añaden a la microemulsión 150 mL de glutaraldehído al 25 % y se deja bajo agitación mecánica durante dos horas.
- v) Para terminar, se separa el producto por decantación magnética y se realizan varios lavados con agua y etanol.

### **2.2.2 Síntesis de nanocompuestos esféricos núcleo-capa**

En este apartado se describe una ruta de síntesis en dos etapas para obtener partículas compuestas que poseen morfología esférica y una estructura similar a la descrita en el apartado 2.2.1. La primera etapa consiste en la deposición de la capa magnética (fundamentalmente magnetita) sobre los núcleos poliméricos para obtener los compuestos Poli@Mag. En la segunda etapa, se realiza el recubrimiento de los nanocompuestos Poli@Mag con una capa de PEG, para conferirles biocompatibilidad, y obtener los compuestos Poli@Mag@PEG.

En esta síntesis, los núcleos poliméricos internos de los nanocompuestos estaban formados por partículas PolymP-H<sup>®</sup>, que fueron suministradas por NanoMyP<sup>®</sup> (España). Estas partículas son esferas monodispersas formadas por un copolímero acrílico compuesto por ácido metacrílico y dimetacrilato de etilenglicol, funcionalizado con grupos carboxílicos (170  $\mu$ mol de COOH por gramo).

#### **2.2.2.1 Síntesis de la capa magnética**

Los reactivos químicos necesarios para la reacción de coprecipitación fueron cloruro de hierro (III) hexahidratado, sulfato de hierro (II) heptahidratado e hidróxido de amonio al 28 %, todos ellos suministrados por Sigma-Aldrich (EE. UU.). Se usó agua Milli-Q (Millipore, Francia) en todos los pasos de la síntesis.

El procedimiento experimental para preparar las partículas Poli@Mag constaba de cinco pasos que se describen a continuación.

- i) Se dispersaron 50 mg de partículas PolymP-H en 3 mL de disolución acuosa de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,1 M. El objetivo de este paso es disociar los grupos carboxílicos que hay en la superficie de las partículas, quedando estas cargadas negativamente.
- ii) Se añadió una disolución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  con una relación molar  $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}] = 0,5$  y se agitó la mezcla mecánicamente. La concentración óptima de  $\text{Fe}^{3+}$  era de 0,6 mM.
- iii) Para permitir la precipitación de los hidróxidos de hierro, se añadió a la mezcla una disolución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28-30 %) hasta que la disolución alcanza un  $\text{pH} = 12$  (aparece un precipitado negro).
- iv) La mezcla se mantuvo en agitación durante 1 hora, y posteriormente se calentó en un baño de agua hasta alcanzar una temperatura de 95 °C para promover la formación de magnetita, proceso que se conoce como envejecimiento de la magnetita.
- v) Se dejó enfriar el producto de reacción (precipitado de color negro) a temperatura ambiente. Por último, el precipitado se decantó magnéticamente y se lavó varias veces con agua hasta alcanzar pH neutro.

### **2.2.2.2 Síntesis de la capa polimérica**

Para preparar los compuestos Poli@Mag@PEG, se empleó el método descrito en el apartado 2.2.1.3, aunque en este caso se pesaron 0,3 g de nanocompuestos Poli@Mag, en lugar de los de NPSi@Mag usados anteriormente. Todas las cantidades de los demás reactivos se mantuvieron iguales.

## **2.2.3 Caracterización físico-química de las partículas nanocompuestas**

### **2.2.3.1 Microscopía electrónica**

Se analizó la morfología y composición de los nanocompuestos sintetizados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, “*Scanning Electron Microscopy*”) y microscopía electrónica de transmisión (TEM, “*Transmission Electron Microscopy*”) con microscopios Zeiss SUPRA 40 VP (FESEM) y LIBRA 120 PLUS (Carl Zeiss GmbH, Alemania), respectivamente, del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. El diámetro medio fue medido en diferentes partículas en las imágenes de TEM, correspondientes a distintas zonas de la rejilla que contenía la muestra. En el microscopio SEM, se llevó a cabo un microanálisis por Energía Dispersiva de Rayos X (EDX) con detector de gran superficie X-Max 50mm.

### **2.2.3.2 Medidas de magnetización**

Se midió la magnetización de las muestras en polvo en función de la intensidad de campo magnético, a 25 °C, en un magnetómetro de muestra vibrante VSM 4500 (EG&G Princeton Applied Research, EE. UU.).

### **2.2.3.3 Medidas de movilidad electroforética**

Para los nanocompuestos alargados se midió la movilidad electroforética, en cada uno de los pasos clave de síntesis que se describen a continuación.

- i) Los núcleos NPSi antes de ser calcinados.
- ii) Los núcleos NPSi después de ser calcinados.
- iii) Los nanocompuestos NPSi@Mag.
- iv) Los nanocompuestos NPSi@Mag@PEG.

Para cada una de las muestras, se midió la movilidad electroforética en función del pH en un rango comprendido entre pH 5 y pH 10. Las suspensiones de cada una de las muestras se prepararon en una disolución 1 mM de nitrato de sodio, para mantener la fuerza iónica constante. Para ajustar el pH, se utilizaron disoluciones de NaOH 0,1 M y de HNO<sub>3</sub> 0,1 M. El equipo para realizar las medidas fue un Nano Zs, Zetasizer (Malvern Instruments, EE.UU.). Se inyectaron suspensiones diluidas en una cubeta desechable y los experimentos se realizaron a 25 °C. Los resultados corresponden a la media ( $\pm$  desviación típica) de al menos nueve datos (tres medidas en tres muestras distintas de cada suspensión).

### **2.2.4 Declaración ética**

Los estudios de biocompatibilidad contaron con la aprobación previa del Comité Ético de la Universidad de Granada. Cada donante del tejido necesario para obtener un cultivo de fibroblastos firmó un informe de consentimiento para poder usar su muestra para el estudio. La caracterización *in vivo* se realizó siguiendo las directrices de la Unión Europea y del Gobierno de España, para el cuidado ético de animales (Directiva UE no. 63/2010, RD 53/2013). El Comité Ético de la Universidad de Granada aprobó los experimentos *in vivo*, en el marco de referencia del proyecto de investigación FIS PI14-1343, financiado por el MINECO del Gobierno de España y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



### 2.2.5 Cultivo primario de fibroblastos de mucosa oral

Para los ensayos de biocompatibilidad y la generación de tejidos magnéticos artificiales empleados en los ensayos *in vivo*, se usaron fibroblastos de mucosa oral humana. Las células se aislaron mediante biopsia de mucosa oral humana de 10 donantes sanos (Facultad de Odontología, Universidad de Granada), siguiendo los procedimientos descritos en trabajos anteriores de nuestro grupo y del grupo de Ingeniería Tisular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.<sup>31, 45, 46</sup> El tejido obtenido en las biopsias se fragmentó mecánicamente y se sometió a digestión con colagenasa I de *Clostridium histolyticum* (Gibco BRL Lofe Technologies, Karlsruhe, Alemania) a una concentración de 2 mg·mL<sup>-1</sup>. Los fibroblastos se recuperaron mediante centrifugación y se cultivaron con medio de expansión (ME) compuesto por DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium, Sigma Aldrich, EE. UU.) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal y un 1 % de disolución de antibióticos-antimicrobóticos (100 U·mL<sup>-1</sup> de penicilina G, 100 mg·mL<sup>-1</sup> de estreptomina y 0,25 mg·mL<sup>-1</sup> de anfotericina B, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Los fibroblastos se cultivaron en condiciones estándar de cultivo (37 °C y 5 % de dióxido de carbono) y el ME se renovaba cada 3 días. Para expandir los fibroblastos se usó tripsina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y una vez llevado el cultivo hasta pase 3, dichas células se emplearon para generar tejidos bioartificiales.

### 2.2.6 Preparación de los tejidos magnéticos

Para generar los tejidos magnéticos artificiales, se siguió el protocolo anteriormente descrito para preparar hidrogeles de fibrina-agarosa,<sup>47</sup> como se detalla a continuación.

(i) En primer lugar, en 3,8 mL de plasma humano se añaden 1 millón de fibroblastos de mucosa oral, que previamente se encontraban dispersos en 0,625 mL de DMEM y 75 µL de disolución de ácido tranexámico con una concentración de 0,1 g·mL<sup>-1</sup>. La concentración final de ácido tranexámico en el biomaterial fue de 1,5 mg·mL<sup>-1</sup>. El ácido tranexámico es un agente antifibrinolítico que evita la degradación de la estructura polimérica.

(ii) En segundo lugar, a la dispersión de fibroblastos se añadieron suspensiones concentradas de partículas Poli@Mag o Poli@Mag@PEG (esterilizadas previamente mediante dispersión en etanol al 70 % durante 12 h) en DMEM para obtener constructos con una concentración final de partículas del 1,1 % en volumen aproximadamente.

(iii) En tercer lugar, se añadieron 0,25 mL de una mezcla de agarosa tipo VII (peso molecular 120000 g·mol<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, EE. UU.) en PBS (*Phosphate Buffered Saline*, 0,02 g·mL<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) obteniendo una concentración final de agarosa en el constructo del 0,1 %.

(iv) En último lugar, se añadieron a la mezcla anterior 0,25 mL de disolución de  $\text{CaCl}_2$  al 2 % en peso/volumen (Sigma-Aldrich, EE. UU.) para iniciar la polimerización de la fibrina. Esta mezcla pre-gel (volumen total 5 mL) se depositó en una placa Petri de 35 mm de diámetro y se mantuvo a 37 °C hasta completar la gelificación. Se aplicó un campo magnético ( $36 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ) durante los primeros 5 minutos de gelificación con una bobina. Después de 2 h desde el inicio de la gelificación, se añadió ME a los constructos y se mantuvieron bajo condiciones estándar de cultivo durante 24 h.

Se prepararon tantas muestras como fueron necesarias para asegurar la fiabilidad estadística en los ensayos que se describen a continuación.

## **2.2.7 Evaluación *ex vivo* de los compuestos Poli@Magy Poli@Mag@PEG y de los tejidos magnéticos artificiales**

### **2.2.7.1 Ensayos de citotoxicidad de los compuestos Poli@Mag y Poli@Mag@PEG**

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad celular *ex vivo* de los nanocompuestos Poli@Mag y Poli@Mag@PEG, usando un cultivo celular primario de fibroblastos gingivales humanos. Se emplearon 24 pocillos por muestra con una densidad celular de  $2 \times 10^5$  células por 500  $\mu\text{L}$  de DMEM. El cultivo celular se expuso durante 24 h a una concentración del 1 % en volumen de cada uno de los nanocompuestos, Poli@Mag y Poli@Mag@PEG. Además, como control positivo se utilizaron fibroblastos cultivados en ausencia de nanopartículas magnéticas. Otra parte de este cultivo se trató con tritón (Tritón X-100 PRS, Panreac, España) al 2 % para usarlo como control negativo, de igual manera que en estudios anteriores.<sup>31, 45, 47</sup>

En segundo lugar, se analizó la morfología celular usando un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse Ti-U, Nikon, Japan). Las células se clasificaron como normales (cuando tenían forma elongada) o afectadas (forma irregular, redondeada o cuerpos apoptóticos) en cada una de las condiciones experimentales de cultivo.

En tercer lugar, se evaluó la permeabilidad de la membrana nuclear mediante la cuantificación del ADN liberado al medio extracelular usando un espectrofotómetro (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) a una longitud de onda  $\lambda = 260\text{-}280 \text{ nm}$ .

Por último, se midió la proliferación y viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico de la sal de tetrazolio soluble en agua (WST-1, water-soluble tetrazolium salt, Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics). El WST-1 es un colorante de tetrazolio que contiene un reactivo de acoplamiento de electrones que se escinde por acción de la enzima deshidrogenasa mitocondrial para formar un colorante de formazán. Esta reacción se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas y puede servir como marcador de la viabilidad y proliferación celular.

En los resultados se presentan los valores medios  $\pm$  la desviación estándar de 8 experimentos independientes, para cada grupo experimental y cada tipo de análisis. Se utilizaron las siguientes pruebas estadísticas: (i) test de Kruskal-Wallis, para identificar diferencias significativas entre todos los grupos objeto de estudio y (ii) test de Mann-Whitney, para identificar diferencias significativas entre solo dos grupos. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron como estadísticamente significativos en el test de dos colas.

### **2.2.7.2 Viabilidad celular en los tejidos artificiales**

Para evaluar la citotoxicidad celular, se analizó la actividad esterasa intracelular y la integridad del plasma y la membrana nuclear. Para ello, se utilizó el ensayo LIVE/DEAD™ (L/D, kit Viabilidad/Citotoxicidad; Molecular Probes, Reino Unido) siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. En este ensayo se utiliza calceína-AM, que es un colorante que se modifica por la acción metabólica de las células produciendo un compuesto que emite fluorescencia verde. Además, el kit contiene homodímero de etidio que al penetrar en el núcleo de las células muertas (no así en el de las vivas) emite fluorescencia roja. Después de 24 h de cultivo, se recogieron pequeñas muestras de cada constructo, se lavaron con PBS y se incubaron con la disolución LIVE/DEAD™ durante 30 minutos. Todas las imágenes se obtuvieron y analizaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i (Nikon, Japón).

### **2.2.7.3 Análisis histológico de los tejidos artificiales**

Tras 24 h de cultivo celular, se fijaron todas las muestras con formalina tamponada al 10 % durante 24 h, se deshidrataron y embebieron en parafina. Después, se cortaron en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor. Más adelante, esas secciones histológicas se desparafinaron, hidrataron y tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para realizar una evaluación morfológica. Para la identificación histoquímica específica de los nanocompuestos magnéticos (es decir, identificación de los iones de hierro), las secciones se tiñeron utilizando el método histológico Perl's (reacción con azul de Prusia).<sup>48</sup> Para obtener una visión general del tejido, se contrastó ligeramente el reactivo Perl's con H&E.

También se estudió la proliferación activa de fibroblastos mediante identificación del antígeno de proliferación del núcleo celular (PCNA, de sus siglas en inglés "*proliferating cell nuclear antigen*") realizando un ensayo inmuno-histoquímico indirecto, como se describe en trabajos previos.<sup>49, 50</sup> Brevemente, para este ensayo, las secciones de tejido se desparafinaron, hidrataron y pretrataron para el bloqueo antigénico (solución citrato tampón pH = 6). La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con una disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % en PBS 0,1 M. Los enlaces no específicos del

anticuerpo primario se bloquearon usando una disolución de caseína (Vector, Burlingame, CA, EE. UU.). Una vez realizados todos los bloqueos, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario de ratón anti-PCNA (Mouse anti-PCNA, clone PC10, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) 1:1000 en PBS tween-20 (tween-20 es un tensioactivo no iónico, que se usa como agente de bloqueo en los inmunoensayos) durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones se aclararon abundantemente con PBS y se incubaron con Inmunoglobulina G de caballo anti-ratón (Horse anti-mouse IgG, Vector, Burlingame, CA, EE. UU.). Por último, la reacción antígeno-anticuerpo se reveló con diaminobencidina (DAB, Vector, Burlingame, CA, EE. UU.) y se contrastó con hematoxilina de Mayer. Además, el anticuerpo primario no se usó en algunas de las láminas, para usar estas como control técnico negativo.

## **2.2.8 Evaluación *in vivo* de los compuestos Poly@Mag@PEG y de los tejidos magnéticos artificiales**

### **2.2.8.1 Animales de laboratorio y grupos experimentales**

Para los ensayos *in vivo*, se usaron ratones macho, *Mus Musculus*, de 9 semanas de edad, proporcionados y cuidados por la Unidad Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, España). Los animales se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de acepromacina (Calmo-Neosan®; 0,001 mg por gramo de peso del animal) y ketamina (Imalgene 1000®, 0,15 mg por gramo de peso del animal), después de la administración subcutánea de atropina. Los 27 animales utilizados para el experimento, se asignaron aleatoriamente a cada uno de los tres grupos experimentales ( $n = 9$  en cada grupo) que se describen a continuación.

(i) Evaluación cinética *in vivo* de las suspensiones de los nanocompuestos Poli@Mag@PEG (suspensión que llamaremos S-PMPC). Se evaluó la biodistribución y la biocompatibilidad de los nanocompuestos Poli@Mag@PEG en función del tiempo mediante la inyección de 500  $\mu\text{L}$  de una suspensión fisiológica estéril de compuestos a una concentración de 11  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en la zona interescapular de cada ratón.

(ii) Evaluación cinética *in vivo* de los tejidos magnéticos (tejidos con fibrina-agarosa y partículas a los que llamaremos FA-PMPC). Se evaluó la biocompatibilidad de los tejidos magnéticos en función del tiempo, mediante implantación subcutánea de un constructo de 500  $\mu\text{L}$  (concentración de 11  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en la zona interescapular de los animales.

(iii) Grupo control (CTR) de animales sanos sin ninguna intervención quirúrgica.

Después de la inyección de las suspensiones o de la implantación subcutánea de los tejidos, todos los animales se mantuvieron en una habitación a temperatura controlada ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad y acceso *ad libitum* a agua del grifo y comida estándar para ratones.

La biocompatibilidad histológica *in vivo* se estudió a los 7, 14 y 21 días. Cada semana se analizaron 3 animales de cada grupo ( $n = 3$ ). Los animales de cada uno de los grupos experimentales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. De cada uno de ellos, se extrajo la región interescapular (piel con hipodermis), hígado, riñones, bazo y pulmones para procesarlos y realizar los análisis histológicos.

### **2.2.8.2 Análisis histológicos**

Todas las muestras se fijaron durante 24 h en una disolución de formalina al 10 % tamponada. Posteriormente, se deshidrataron, se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor. Después, las secciones histológicas se desparafinaron, hidrataron y tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para realizar una evaluación morfológica y/o evaluaciones patológicas. Todas las muestras se tiñeron usando el método picosirius, que es específico para la evaluación del colágeno en la matriz extracelular.<sup>51</sup> Además, se usó el método histológico del ácido periódico de Schiff (PAS, “*periodic acid-Schiff*”) para evaluar el contenido en glucógeno del hígado (indicador de que el órgano funciona correctamente), de la membrana basal de los riñones (indicador de la estructura normal de estos órganos) y de la membrana basal y fibras reticulares de otros tejidos y órganos. Para identificar los nanocompuestos Poli@Mag@PEG, todos los tejidos y órganos se tiñeron con el método Perl’s antes descrito.

### **2.2.8.3 Evaluación de la respuesta magnética de muestras de órganos**

Se recogieron muestras del área del implante/inyección y del bazo, hígado, pulmones y riñones y se evaluó su respuesta magnética para identificar la presencia de nanocompuestos Poli@Mag@PEG. Para ello, las muestras se situaron cerca de un imán de neodimio que genera un gradiente magnético de  $10 \text{ mT}\cdot\text{mm}^{-1}$  y un campo máximo de 470 mT y se observó la migración, inducida por el campo magnético, de las muestras a través de las áreas de campo magnético más intenso.

## **2.3 Resultados y discusión**

### **2.3.1 Síntesis y caracterización de partículas elipsoidales núcleo-recubrimiento**

Se prepararon nanocompuestos magnéticos biocompatibles de morfología elipsoidal siguiendo una ruta de síntesis en tres etapas como se describe en la Figura 2.3. Dichas

etapas son: (i) síntesis de núcleos de sílice (NPSi) mediante el método sol-gel, (ii) deposición de una capa de magnetita sobre la superficie de los núcleos NPSi, y (iii) recubrimiento de las nanoestructuras resultantes de la etapa anterior (NPSi@Mag) con polietilenglicol (PEG) para conferir biocompatibilidad a los nanocompuestos. Además, como se ha demostrado en estudios previos, la capa de PEG reduce el ataque de los macrófagos.<sup>52-54</sup>

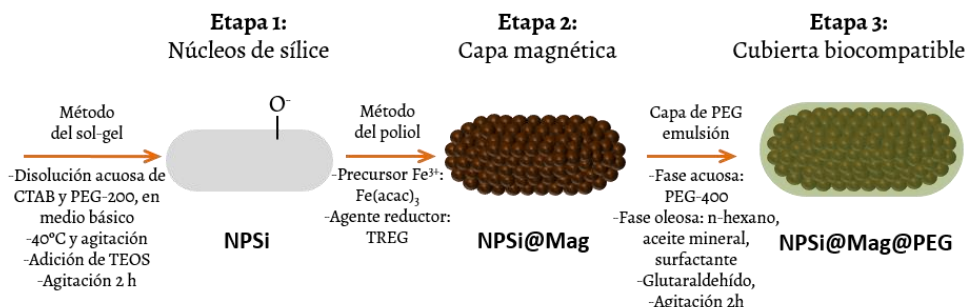


Figura 2.3. Esquema de la ruta de síntesis para nanoestructuras elipsoidales magnéticas núcleo-capa. Etapa 1: se obtienen nanopartículas elipsoidales de sílice con grupos OH en superficie. Etapa 2: sobre los grupos OH, parcialmente desprotonados ( $-\text{O}^-$ ), se adsorben iones  $\text{Fe}^{3+}$ , se producen nanocristales de magnetita por la acción del TREG a alta temperatura y se forman los nanocompuestos NPSi@Mag. Etapa 3: recubrimiento de NPSi@Mag con PEG mediante la formación de una emulsión.

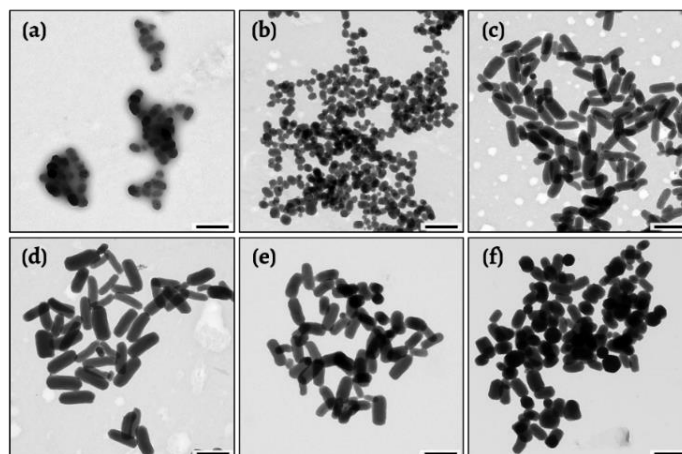


Figura 2.4. Morfología, observada mediante microscopía electrónica de transmisión, de los núcleos NPSi para distintos volúmenes (V) de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28-30 % añadido. (a) Ensayo P1, V = 1,8 mL. (b) Ensayo P2, V = 2,0 mL. (c) Ensayo P3, V = 2,2 mL. (d) Ensayo P4, V = 2,4 mL. (e) Ensayo P5, V = 2,8 mL. (f) Ensayo P6, V = 3,2 mL. Barra de escala 500 nm.

La etapa (i) del procedimiento de síntesis da lugar a núcleos de sílice monodispersos de morfología elipsoidal como los que se observan en las Figura 2.4 (c), (d) y (e). Para obtener estos núcleos, se realizaron varios ensayos variando el pH de la mezcla de reacción (pH medido antes de añadir el TEOS). Se realizaron 6 pruebas diferentes, añadiendo distintos volúmenes de hidróxido de amonio al 28 - 30 %, comprendidos entre 1,8 y 3,2 mL. Se designaron las pruebas como P1, P2, P3, P4, P5 y P6 (ver Tabla 2.1) y se observó el efecto, del volumen de hidróxido de amonio añadido, sobre la forma y tamaño de las partículas obtenidas.

En la Tabla 2.1 se aprecia que ésta síntesis es muy sensible a pequeñas variaciones de pH. Este efecto también se puede comprobar en la Figura 2.5, dónde se muestra la distribución de tamaño (diámetro y longitud) de las partículas obtenidas para cada prueba realizada. En el rango de pH comprendido entre 11,58 y 11,64, la relación de aspecto longitud/diámetro de las partículas de sílice alcanza su valor máximo (entre 2,3 y 2,7). Sin embargo, para valores de pH inferiores o superiores se forman partículas con una relación de aspecto menor.

Tabla 2.1. Morfología de los núcleos NPSi según el pH de la reacción antes de añadir TEOS. Se incluyen el diámetro y longitud medios de las partículas obtenidos en cada uno de los ensayos. En la última columna figuran las correspondientes relaciones de aspecto longitud/diámetro.

Ensayo	NH <sub>4</sub> OH V (mL)	pH	Diámetro D (nm)	Longitud L (nm)	Relación L/D
<b>P1</b>	1,8	11,52	106 ± 15	180 ± 40	1,7
<b>P2</b>	2,0	11,55	116 ± 17	160 ± 30	1,4
<b>P3</b>	2,2	11,58	145 ± 25	360 ± 50	2,5
<b>P4</b>	2,4	11,60	163 ± 22	390 ± 50	2,7
<b>P5</b>	2,8	11,64	144 ± 23	334 ± 40	2,3
<b>P6</b>	3,2	11,70	210 ± 40	354 ± 60	1,7

El objetivo era sintetizar partículas con una elevada relación de aspecto, ya que cuanto más alargadas sean las partículas se espera conseguir un efecto más intenso sobre las propiedades mecánicas de la matriz polimérica en la que se van a dispersar, en comparación con el efecto correspondiente con partículas esféricas. Si observamos en la Figura 2.4 las fotografías (a) y (b), que corresponden a las síntesis realizadas a pH inferiores al rango óptimo antes mencionado, se pueden apreciar partículas de sílice que presentan una morfología casi esférica. Sin embargo, para pH superiores al rango óptimo, se observan partículas –véase Figura 2.4 (f) – que tienden a una

forma prismática. Teniendo en cuenta que para volúmenes de  $\text{NH}_4\text{OH}$  entre 2,2 y 2,8 mL, se obtenían partículas de sílice con similar relación de aspecto, y diámetros y longitudes muy similares, se fijó en 2,6 mL el volumen de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28-30 %) para conseguir nanopartículas alargadas. Se realizó la síntesis de los núcleos de NPSi con ese volumen de 2,6 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28-30 %) y se obtuvieron partículas con diámetro ( $160 \pm 30$ ) nm y longitud ( $470 \pm 40$ ) nm). Por tanto, con una relación de aspecto mayor (2,9), ya que en este caso la longitud media es máxima.

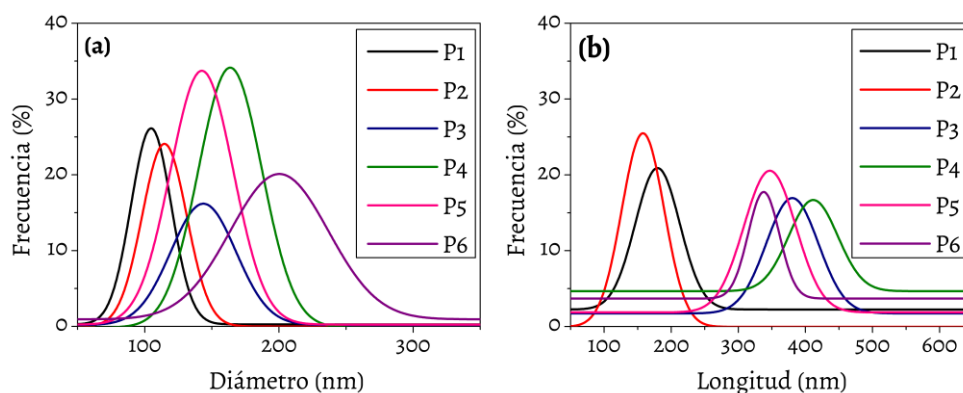


Figura 2.5. Distribución de tamaño de los núcleos NPSi para distintos valores del pH de la disolución empleada en los ensayos P1 a P6 (véase Tabla 2.1). Diámetro (a) y longitud (b) de las partículas.

Una vez determinadas las dimensiones de los núcleos NPSi, se estudiaron las propiedades eléctricas de la interfase sólido/disolución. Para ello, se midió la movilidad electroforética de las nanopartículas de sílice antes y después de calcinarlas. La calcinación se realizó para obtener nanopartículas de sílice pura, eliminando cualquier sustancia orgánica remanente de la mezcla de reacción, en particular el tensioactivo CTAB adsorbido.

Como se observa en la Figura 2.6, las partículas de sílice antes de ser calcinadas (símbolos cuadrados negros) presentan una movilidad electroforética positiva (entre  $2,5$  y  $3,8 \mu\text{S}\cdot\text{cm}\cdot\text{Vs}^{-1}$ ) en todo el rango de pH estudiado, con un valor máximo en  $\text{pH} = 9$ . Sin embargo, para las partículas calcinadas (triángulos azules), el valor de la movilidad electroforética es negativo en todo el rango de pH, es más la movilidad decrece a medida que aumenta el pH. Era lo esperado para los núcleos NPSi, ya que estas partículas poseen grupos  $\text{Si-OH}$  en superficie que, por encima del punto isoeléctrico de la sílice (situado en  $\text{pH} \leq 2$ ), se disocian progresivamente generando superficiales con carga negativa ( $\text{Si-O}^-$ ) a medida que aumenta el valor del pH. Podemos deducir que las partículas de sílice, antes de ser calcinadas, tenían CTAB (surfactante catiónico) adsorbido haciendo que los núcleos de sílice posean movilidad



positiva. Con la calcinación se elimina el CTAB remanente en los poros, quedando la superficie con carga neta negativa. Los grupos  $\text{Si-O}^-$  van a favorecer, en el siguiente paso de la síntesis de las partículas compuestas, la adsorción de cationes  $\text{Fe}^{3+}$  sobre los núcleos NPSi.

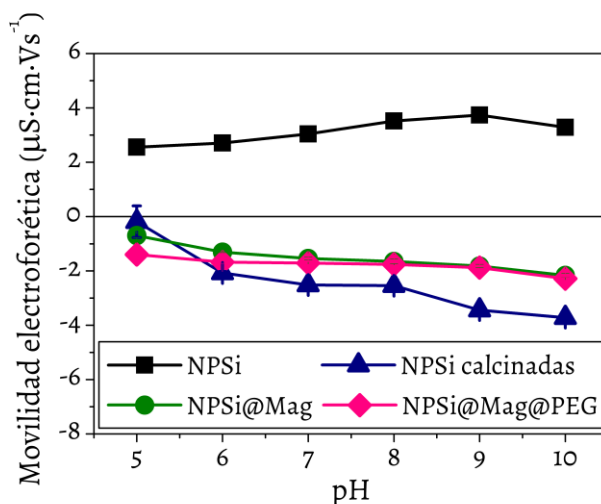


Figura 2.6. Movilidad electroforética en función del pH de las suspensiones de partículas elipsoidales. Fuerza iónica 1 mM  $\text{NaNO}_3$ . Cuadrados negros: núcleos NPSi antes de ser calcinados (con CTAB adsorbido en la superficie). Triángulos azules: núcleos NPSi después de ser calcinados. Círculos verdes: nanocompuestos NPSi@Mag. Rombos rosas: nanocompuestos NPSi@Mag@PEG.

Además, también se realizaron medidas de movilidad electroforética en suspensiones de NPSi@Mag (Figura 2.6). En general, para todo el rango de pH estudiado, poseen una movilidad electroforética menos negativa que la de los núcleos de NPSi calcinados. Por ejemplo, para  $\text{pH} = 7$  la movilidad electroforética para los núcleos calcinados era  $-2,52 \pm 0,07 \mu\text{S}\cdot\text{cm}\cdot\text{Vs}^{-1}$ , mientras que para los nanocompuestos NPSi@Mag es de  $-1,54 \pm 0,05 \mu\text{S}\cdot\text{cm}\cdot\text{Vs}^{-1}$ . Esta reducción en el valor absoluto de la movilidad nos indica que la capa magnética depositada posee una carga superficial que contrarresta, al menos parcialmente, la carga negativa de los núcleos NPSi. Esto parece lógico, si se tiene en cuenta que la magnetita tiene un punto isoeléctrico en torno a  $\text{pH} = 6,5$  (movilidad positiva para  $\text{pH} < 6,5$ ; movilidad negativa para  $\text{pH} > 6,5$ ).<sup>55</sup> Considerando que la carga superficial de los núcleos de sílice es elevada y que, como veremos a continuación, la capa de magnetita depositada no es muy gruesa, parece lógico que la curva de movilidad electroforética para los compuestos NPSi@Mag siga siendo negativa en todo el rango de pH estudiado. Finalmente, la

movilidad de las partículas NPSi@Mag es muy similar a la de las partículas recubiertas con PEG (NPSi@Mag@PEG). Se puede deducir que la adsorción de PEG apenas apantalla la carga negativa presente en las partículas NPSi@Mag.

En la segunda etapa de la síntesis se realizó la deposición de nanopartículas de magnetita para obtener los nanocompuestos NPSi@Mag. Los núcleos de NPSi estaban completamente recubiertos por nanopartículas magnéticas con un diámetro de 30-60 nm, como se puede comprobar comparando las imágenes de TEM – SEM de las partículas de sílice en la Figura 2.7 (a)-(c) con las de NPSi@Mag en la Figura 2.7 (b)-(d).

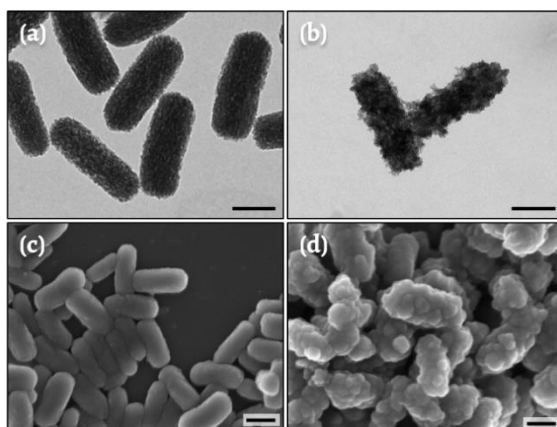


Figura 2.7. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (a,b) y de barrido (c,d) de los núcleos de las partículas de sílice NPSi (a y c) y de los nanocompuestos NPSi@Mag (c y d). Barra de escala 200 nm.

En las imágenes de TEM de los núcleos de sílice de la Figura 2.7 (a) podemos observar que la superficie de las partículas no es lisa, se observan en algunos casos líneas y en otros puntos, que se pueden atribuir a los poros que poseen las partículas a escala nanométrica, dependiendo de si se encuentran alineados o no, respectivamente, con el plano de enfoque. Esos poros no se aprecian después de depositar la capa magnética, como se puede ver en la Figura 2.7 (b), ya que la superficie de los poros también está funcionalizada con grupos Si-O<sup>-</sup> que favorecen el crecimiento de nanocristales de magnetita en su interior.

Para confirmar la presencia de una capa magnética, formada principalmente por magnetita, se realizó el microanálisis de los nanocompuestos NPSi@Mag mediante Energía Dispersiva de Rayos X (EDX) que se muestra en la Figura 2.8. En la gráfica de la Figura 2.8 (b) se representa el porcentaje en peso de cada uno de los elementos químicos presentes a lo largo de una línea recta que recorre una distancia de 1,2  $\mu\text{m}$ . Dicha línea parte en una zona de la rejilla con alta densidad de muestra (distancia inicial de 0  $\mu\text{m}$  en la Figura 2.8 (a)) y sigue hasta una zona de la rejilla donde no se

observaba muestra (distancia 1,2  $\mu\text{m}$ ). En la Figura 2.8 (b) se observa que en el comienzo (distancia 0  $\mu\text{m}$ ), existe aproximadamente un 5 % en peso de hierro en la muestra, porcentaje que empieza a disminuir a medida que se avanza hacia una zona con menor densidad de muestra. Para el oxígeno observamos una evolución similar, habiendo al principio aproximadamente un 45 % en peso de oxígeno, porcentaje que va disminuyendo con la distancia hasta alcanzar un valor del 35 % en peso. Estas tendencias para hierro y oxígeno son las esperadas ya que son elementos presentes en la muestra. En la curva correspondiente al silicio, a lo largo de la línea de análisis se obtiene que, en la zona del soporte (distancia 1,2  $\mu\text{m}$ ), el porcentaje de Si (50 %) es más elevado que en la zona de mayor densidad de muestra (40 %), lo que es lógico si tenemos en cuenta que el soporte de la muestra era de vidrio.

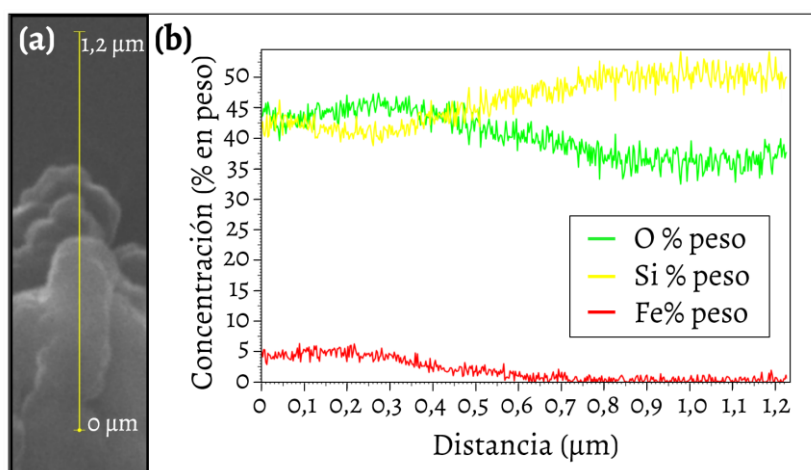


Figura 2.8. Microanálisis EDX de una muestra de NPSi@Mag. (a) Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) para la muestra estudiada, dónde la línea amarilla indica la zona en la que se realizó el perfil químico. (b) Porcentaje en peso de cada uno de los elementos presentes en la muestra a medida que nos desplazamos a lo largo de línea amarilla mostrada en la imagen (a). Ténganse en cuenta que el soporte usado para la muestra era de vidrio.

Las propiedades magnéticas de las muestras se determinaron midiendo la magnetización en función de la intensidad de campo en el intervalo aproximado entre 400 y -400  $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$  -Figura 2.9.

Para calcular la susceptibilidad magnética y la magnetización de saturación de los compuestos NPSi@Mag, a partir de los datos representados en la Figura 2.9 (a), se ajustaron los datos de la curva de primera imanación a la ley de Fröhlich-Kennelly:<sup>56</sup>

$$M = \frac{\chi_i H M_s}{M_s + \chi_i |H|} \quad \text{Ec. (2.1)}$$

Esta ecuación ajustaba bastante bien los datos obtenidos para valores de campo magnético bajo, dando un valor de susceptibilidad magnética bastante bueno ( $\chi_i = 0,105$ ). Sin embargo, para campos elevados, el ajuste daba un valor de magnetización de saturación inusualmente alto ( $M_s = 24,5 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Por ello, para determinar éste último parámetro se optó por la siguiente ley empírica:

$$M = M_s - a \left( \frac{1}{H} \right) \quad \text{Ec. (2.2)}$$

Se representó la magnetización en función de la inversa del campo magnético (Figura 2.9 (b)) y se hizo un ajuste lineal en la zona de la curva correspondiente a campo magnético elevado (línea roja). Se obtuvo un valor de la magnetización de saturación  $M_s = 19,6 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ . Teniendo en cuenta que la magnetización de saturación de la magnetita es  $M_s = 447 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ,<sup>57</sup> se estimó la fracción de volumen de magnetita en la muestra mediante la ley de mezclas, resultando que la capa magnética en los compuestos NPSi@Mag suponía un 4,4 % del volumen total.

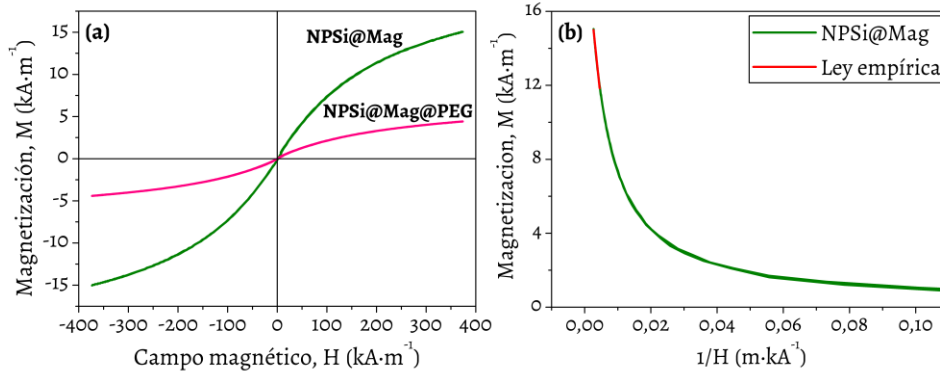


Figura 2.9. (a) Magnetización de las muestras NPSi@Mag y NPSi@Mag@PEG (líneas verde y rosa, respectivamente) frente a la intensidad de campo magnético,  $H$ . Los compuestos sin cubierta polimérica de PEG (NPSi@Mag) presentan un valor de magnetización de saturación mayor que los compuestos NPSi@Mag@PEG. (b) Magnetización frente a  $1/H$ ; la línea roja representa un ajuste a la ecuación (2.2) a los datos en la parte lineal de  $H$  elevado.

En la tercera etapa de la síntesis, se recubrieron los nanocompuestos NPSi@Mag con una capa polimérica de polietilenglicol, confiriéndoles la biocompatibilidad deseada, además de protección para la capa magnética frente a ataques ácidos como se menciona en la ref. 1. La capa de polietilenglicol era visible mediante microscopía

electrónica de transmisión (Figura 2.10): se aprecia una capa semitransparente que recubre los nanocristales de magnetita depositados en la superficie de los núcleos de sílice.

Además, la presencia de la capa de polietilenglicol se refleja en las propiedades magnéticas de los compuestos NPSi@Mag@PEG. Como podemos ver en la Figura 2.9 (a) (curva rosa), la susceptibilidad magnética (pendiente inicial de la curva) y la magnetización de saturación, son menores en estos nanocompuestos ( $\chi_i = 0,03$  y  $M_s = 5,8 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ) que en las partículas de NPSi@Mag ( $\chi_i = 0,105$  y  $M_s = 19,6 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Al depositarse una última capa polimérica sobre los compuestos NPSi@Mag se espera que la respuesta magnética de estos compuestos disminuya, de hecho ahora la ley de mezclas da una fracción de volumen de material magnético del 1,3 %.

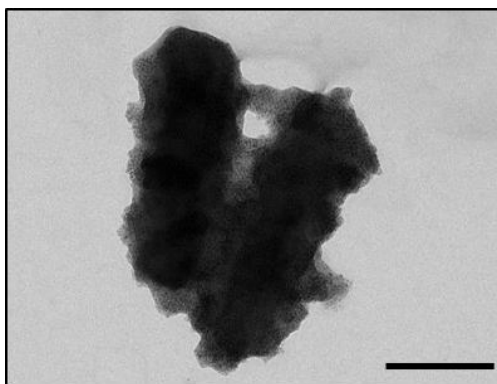


Figura 2.10. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de nanocompuestos NPSi@Mag@PEG donde se aprecia la cubierta biocompatible de polietilenglicol alrededor de la superficie de los nanocompuestos NPSi@Mag. Barra de escala 200 nm.

### **2.3.2 Biocompatibilidad *ex vivo* de las partículas Poli@Mag y Poli@Mag@PEG y de los tejidos artificiales**

#### **2.3.2.1 Ensayos de citotoxicidad de los compuestos Poli@Mag y Poli@Mag@PEG**

Para comprobar que la capa externa de PEG mejoraba la biocompatibilidad, se realizaron ensayos *ex vivo* de los nanocompuestos con las partículas esféricas polímero-magnetita (Poli@Mag).

Se cultivaron fibroblastos gingivales humanos en presencia de compuestos Poli@Mag. Las células mostraban una sustancial alteración morfológica observándose que mientras algunas células mantenían la típica forma elongada, otras parecían tener una morfología más irregular y redondeada (Figura 2.11 (c)). Estos resultados fueron parecidos, pero no comparables, a los del grupo control negativo en el que el cultivo se realizó en presencia de un agente maligno, tritón al 2% (Figura 2.11

(b)). Incluso los análisis cuantitativos de liberación de ADN (Figura 2.11 (e)) no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para el grupo Poli@Mag, en comparación con el grupo positivo (células cultivadas bajo condiciones normales (Figura 2.11 (a)). Estos resultados sugieren que los compuestos Poli@Mag alteraron la adhesión celular al frasco de cultivo, pero no la permeabilidad de la membrana celular (citoplasmática y nuclear), hecho que evidencia la ausencia de daño celular irreversible. Por otro lado, el ensayo de viabilidad celular WST-1 (Figura 2.11 (f)) reveló diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las células expuestas a compuestos Poli@Mag en comparación con el grupo control positivo.

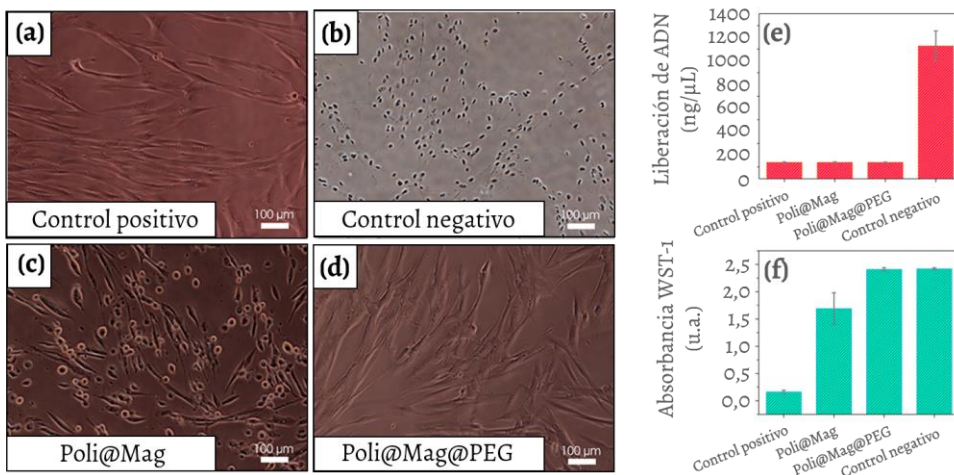


Figura 2.11. Biocompatibilidad *ex vivo* de los compuestos esféricos Poli@Mag y Poli@Mag@PEG. (a-b) Imágenes de microscopía de fibroblastos, (a) es el control positivo de cultivo celular y (b) el control negativo donde las células se cultivaron en presencia de tritón al 2 %. (c) Cultivo en presencia de Poli@Mag; algunas células conservan su característica morfología elongada y otras aparecen redondeadas como en el control negativo. (d) Cultivo de fibroblastos en presencia de Poli@Mag@PEG; las células presentan la misma morfología elongada que en el control positivo. (e) Cuantificación de la liberación de ADN debido a la desintegración de la membrana nuclear; Poli@Mag y Poli@Mag@PEG no muestran diferencias significativas con respecto al control positivo. (f) Resultados de citotoxicidad celular (WST-1); las muestras con mayor número de células viables muestran una absorbancia mayor a 450-690 nm debido a la formación de formazán; el número de células viables fue menor para Poli@Mag que para el control positivo, mientras que se mantuvo aproximadamente igual en Poli@Mag@PEG. Barra de escala: 100 μm.

En el caso de los compuestos Poli@Mag@PEG, en los dos análisis realizados (liberación de ADN y el WST-1), no se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el cultivo de fibroblastos en presencia de compuestos Poli@Mag@PEG y el control positivo, como se muestra en las Figura 2.11 (e) y (f). Las células conservaron la morfología elongada (Figura 2.11 (d)), siendo casi idénticas a las del control positivo cuya

proliferación era normal (Figura 2.11 (a)). Estos resultados apoyan la elevada biocompatibilidad *ex vivo* asociada con el recubrimiento de PEG y demuestran que los nanocompuestos Poli@Mag@PEG son excelentes candidatos para su incorporación en tejidos generados por ingeniería tisular.

### 2.3.2.2 Viabilidad celular en los tejidos artificiales

Los ensayos *Live/Dead™ ex vivo* mostraron un alto número de células metabólicamente activas en los tejidos artificiales magnéticos que contenían compuestos Poli@Mag@PEG, siendo los resultados similares a los obtenidos para el grupo control de fibrina-agarosa celular (control FA) sin compuestos Poli@Mag@PEG. En ambos casos, la microscopia de fluorescencia solo mostró células vivas, teñidas de verde (las células muertas se tiñen de rojo con esta técnica) como se muestra en la Figura 2.12 (a). Sorprendentemente, no hubo una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre la viabilidad celular en el tejidos artificial preparados con compuestos Poli@Mag@PEG ( $98,3 \pm 2,4 \%$ ) y el control de fibrina-agarosa ( $98,1 \pm 2,4 \%$ ) (Figura 2.12 (b)), lo que demostró la alta biocompatibilidad *ex vivo* de los nanocompuestos Poli@Mag@PEG.

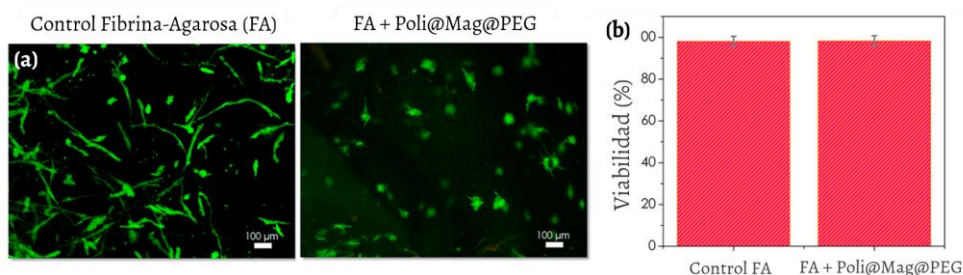


Figura 2.12. Viabilidad celular de los tejidos magnéticos artificiales. (a) Imágenes de microscopia de fluorescencia del ensayo *Live/Dead™* para un tejido artificial de fibrina agarosa (FA) control sin nanocompuestos y un tejido artificial magnético con compuestos Poli@MAG@PEG. El color verde fluorescente corresponde con las células viables. Barra de escala 100 μm. (b) Cuantificación de las células viables con la técnica *Live/Dead™*.

### 2.3.2.3 Análisis histológicos de los tejidos artificiales

Se incorporaron con éxito los compuestos Poli@Mag@PEG a los hidrogeles de fibrina-agarosa que contenían fibroblastos de mucosa oral humana para obtener tejidos magnéticos substitutivos.

Se usó la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) para examinar la morfología de las células en los tejidos magnéticos artificiales. Los fibroblastos, que se encontraron

aislados o formando clústeres celulares, mantuvieron su forma alargada y gran filopodia (flechas en la Figura 2.13). La filopodia alargada es un indicativo de la buena interacción célula-biomaterial.

El método de Perls (PERLS) permitió la identificación de los nanocompuestos Poli@Mag@PEG debido a su reacción de Azul de Prusia positiva. Las partículas nanocompuestas se distribuyeron homogéneamente en la matriz de fibrina-agarosa y se observaron, con frecuencia, cerca de la superficie celular, alrededor del citoplasma perinuclear –Figura 2.13. La imagen de gran aumento de PERLS mostró la forma esférica de las partículas Poli@Mag@PEG (flecha roja en la Figura 2.13).

En último lugar, la prueba realizada para la identificación del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), mostró una reacción inmunohistoquímica positiva de PCNA en los núcleos de fibroblastos individuales o agrupados (círculo en la Figura 2.13), que era un indicador de la proliferación celular.

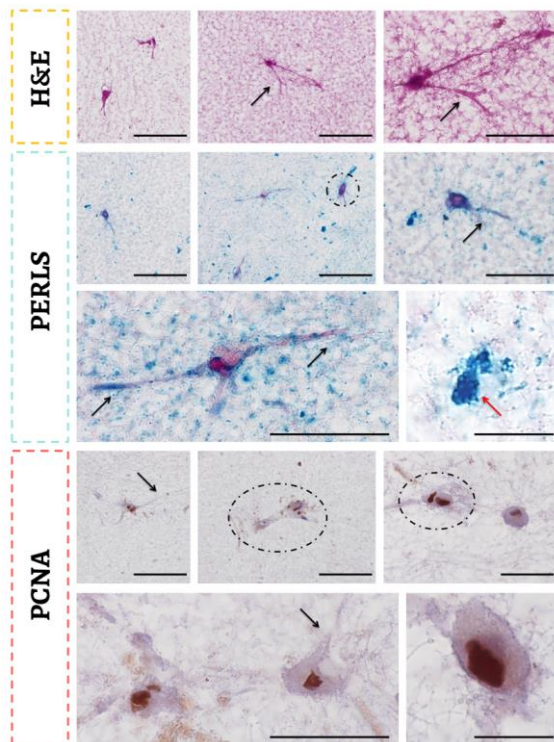


Figura 2.13. Análisis histológicos de los tejidos magnéticos artificiales (véase texto en el apartado 2.3.3.2). Barra de escala 5  $\mu$ m.



### **2.3.3 Biocompatibilidad *in vivo* de las suspensiones y de los tejidos artificiales que contienen Poli@Mag@PEG**

Se estudió la biocompatibilidad *in vivo* en función del tiempo de las partículas de Poli@Mag@PEG en suspensión y de los correspondientes tejidos artificiales magnéticos que las contienen. Las suspensiones se inyectaron en la región interescapular del ratón. Los tejidos magnéticos se implantaron quirúrgicamente en la misma zona. Cabe destacar que ninguno de los animales murió durante los 21 días que duró el experimento. Después de 21 días, los animales no mostraron signos de efectos secundarios y los cambios de peso corporal fueron similares a los observados en los animales del grupo control.

Del análisis de los ensayos *in vivo* con las suspensiones se puede deducir lo siguiente:

- i) La suspensión de Poli@Mag@PEG inyectada subcutáneamente permaneció en la zona interescapular durante todo el tiempo (21 días), sin producirse migración a los órganos distales. Las suspensiones inyectadas formaron una masa irregular y densa de agregados de nanocompuestos –Figura 2.14 (b)-(g).
- ii) La respuesta biológica del tejido huésped alrededor de esta masa consistió en una reacción inflamatoria aguda moderada formada principalmente por neutrófilos, algunas células mononucleares y macrófagos predominantemente –Figura 2.14 (b)-(g). La reacción inflamatoria fue más evidente después de la primera semana, y empezó a disminuir progresivamente desde la segunda a la tercera semana. La respuesta inflamatoria solo se observó alrededor de la región dónde se inyectaron las suspensiones.
- iii) Las células reabsorbieron progresivamente la masa, avanzando desde la parte externa hacia la parte interna. La tinción Perls' confirma la presencia de fagosomas con Poli@Mag@PEG dentro de macrófagos –Figura 2.14 (c) y (e). La masa no se reabsorbió completamente después de 21 días.
- iv) Los análisis histológicos e histoquímicos de hígado, bazo, riñones y pulmones no mostraron ninguna reacción inflamatoria. No hubo macrófagos con partículas Poli@Mag@PEG en su interior. En efecto, todos los órganos fueron normales desde el punto de vista histológico durante los 21 días (Figura 2.14 (n)-(q)). Las muestras de tejido tomadas de estos órganos no exhibieron ninguna respuesta magnética, a diferencia de las muestras obtenidas de la región interescapular que sí mostraban respuesta por la presencia de partículas –véase Tabla 2.2.

Los análisis histológicos de los tejidos magnéticos implantados demostraron su exitosa implantación subcutánea, dado que:

- i) Los constructos mostraron una morfología regular y compacta –Figura 2.14 (h)-(m). Las partículas aparecen homogéneamente distribuidos a través de la fina red de hidrogel FA, ya sea individualmente o formando pequeños agregados, a diferencia de los agregados de mayor tamaño encontrados cuando las partículas se inyectaron en suspensión –Figura 2.14 (c) y (i), respectivamente. Por tanto, el hidrogel FA evitó la agregación de las partículas y favoreció su distribución homogénea.
- ii) El hidrogel de FA también facilitó la interacción con el tejido huésped: las células huésped fueron capaces de invadir el constructo implantado desde la primera semana (Figura 2.14 (i)), a diferencia de lo ocurrido con las suspensiones inyectadas en que solo se observaron unas pocas células –Figura 2.14 (c).
- iii) Después de 21 días, los constructos no se reabsorbieron completamente. La respuesta del tejido huésped fue una inflamación local aguda entre leve y moderada, que disminuyó progresivamente a medida que pasaba el tiempo –Figura 2.14 (h)-(m).
- iv) Como en el caso de las suspensiones de Poli@Mag@PEG, se observó la formación de una delgada cápsula de tejido conectivo compuesta por fibras de colágeno y una red vascular alrededor de los implantes –Figura 2.14. (k) y (m).
- v) La reacción inflamatoria aguda local y moderada no afectó a los tejidos subyacentes ni a los órganos distales –Figura 2.14 (h)-(m) y (r)-(u).
- vi) Análogamente a lo ocurrido con las suspensiones, solo las muestras de la zona interescapular mostraron respuesta magnética (Tabla 2.2), lo que implica que no se produjo migración de las partículas de Poli@Mag@PEG hacia otros órganos durante el tiempo del experimento.

Grupos experimentales	Órganos	Tiempo		
		1 Semana	2 Semanas	3 Semanas
<b>(a) Grupo de control</b>	Interescapular	NM	NM	NM
	Hígado	NM	NM	NM
	Bazo	NM	NM	NM
	Pulmones	NM	NM	NM
	Riñones	NM	NM	NM
<b>(b) Suspensión de partículas Poly@Mag@PEG</b>	Interescapular	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>
	Hígado	NM	NM	NM
	Bazo	NM	NM	NM
	Pulmones	NM	NM	NM
	Riñones	NM	NM	NM
<b>(c) Tejidos magnéticos con Poly@Mag@PEG</b>	Interescapular	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>
	Hígado	NM	NM	NM
	Bazo	NM	NM	NM
	Pulmones	NM	NM	NM
	Riñones	NM	NM	NM

Tabla 2.2. Respuesta magnética de muestras de diferentes partes del cuerpo de los animales después de 1, 2 y 3 semanas. Las abreviaciones “NM” y “M” corresponden con “no magnético” y “magnético”, respectivamente. En la tabla se muestran los resultados para las tres grupos experimentales: (a) grupo control de ratones sanos, (b) grupo de ratones con suspensión de Poli@Mag@PEG inyectada subcutáneamente y (c) grupo de ratones con implantes de tejidos magnéticos con fibrina-agarosa y Poli@Mag@PEG.

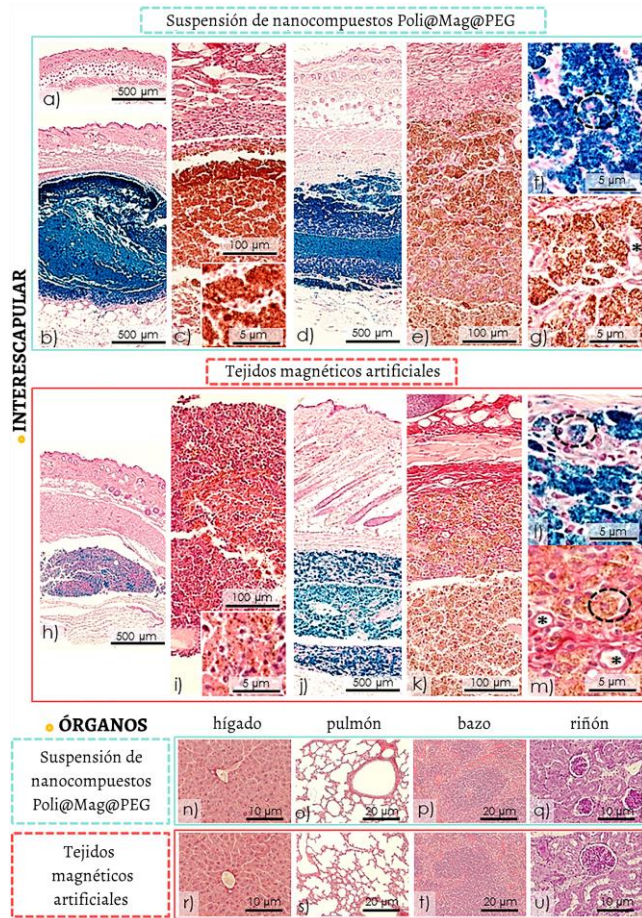


Figura 2.14. Análisis histológicos *in vivo*.

(a) **Control nativo** que presenta una epidermis, dermis e hipodermis normal.

(b-d) **Tejido de la zona interscapular** donde se inyectaron las **suspensiones Poli@Mag@PEG** transcurrida 1 semana (b y c) y 3 semanas (d-g) después de la inyección.

(h-m) **Tejido de la zona interscapular** dónde se implantaron los **tejidos magnéticos** transcurrida 1 semana (h y i) y 3 semanas (j-m) después de la implantación quirúrgica.

Las imágenes (b), (d), (f), (h), (j) y (l) muestran la reacción histoquímica de Azul de Prusia para las suspensiones (Método Perl's).

Las imágenes (c), (e), (g), (i), (k) y (m) muestran la tinción roja con picrosirius. (e) y (k) muestran la zona de degradación externa y la cápsula teñida en rojo con picrosirius. Se observa un gran número de células en el tejido magnético artificial después de la primera semana [véase imagen (i)] en comparación con las suspensiones i [véase imagen (c)].

En las imágenes (f) y (m) los círculos señalan donde hay macrófagos con partículas y los asteriscos (\*) señalan los pequeños vasos sanguíneos formados de nuevo en la cápsula inflamatoria después de 3 semanas de la implantación *in vivo*.

(n-u) Tejidos de los **órganos distales** (hígado, pulmón, bazo y riñón de los grupos experimentales con suspensión inyectada (n-q) y de los tejidos magnéticos implantados (r-u), después de tres semanas. Todos los órganos eran histológicamente normales durante el período de seguimiento de 21 días.

## 2.4 Conclusiones

En este capítulo se han sintetizado partículas magnéticas compuestas de morfología elipsoidal formadas por un núcleo inorgánico de sílice, una primera capa de nanopartículas de óxido de hierro magnético, y una capa externa de polietilenglicol (PEG). Estos compuestos se han preparado con el objetivo de utilizarlos, en trabajos futuros, como fase magnética en la preparación de tejidos biológicos artificiales que respondan a campos magnéticos externos.

Los núcleos de sílice (NPSi) elipsoidales sintetizados eran homogéneos en tamaño cuando el pH de la mezcla de reacción se mantenía en el intervalo de pH entre 11,58 y 11,64, siendo su relación de aspecto en torno a 2,5. Se eligió un volumen de 2,6 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28 - 30 % (pH dentro del rango 11,58 - 11,64) como el óptimo para obtener núcleos NPSi elipsoidales con diámetro  $160 \pm 30$  nm, longitud  $470 \pm 40$  nm y relación de aspecto 2,9. La morfología de los núcleos NPSi era muy sensible a valores de pH por encima o por debajo del rango mencionado, obteniéndose partículas con otras formas no deseadas.

Se comprobó que la calcinación de los núcleos NPSi es un paso clave para la obtención de partículas cargadas negativamente en suspensión acuosa, para facilitar la nucleación de óxidos de hierro magnéticos sobre los núcleos NPSi. Fue posible depositar una capa de material magnético sobre dichos núcleos, obteniéndose compuestos NPSi@Mag con una susceptibilidad magnética de 0,105 y una magnetización de saturación de  $19,6 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ .

Las partículas NPSi@Mag se recubrieron con polietilenglicol, obteniéndose los compuestos NPSi@Mag@PEG. Estos poseían una susceptibilidad magnética de 0,03 y una magnetización de saturación de  $5,8 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ . En un trabajo futuro, para mejorar las propiedades magnéticas de estos compuestos, sería necesario depositar una capa magnética de mayor grosor sobre los núcleos NPSi.

Para los ensayos de biocompatibilidad se emplearon partículas esféricas compuestas por núcleo y capa. La síntesis y caracterización de estas partículas corresponde a un trabajo anterior—ver la ref. 1. Los compuestos esféricos (Poli@Mag@PEG) poseen un núcleo polimérico (acrílico), una capa magnética (óxidos de hierro) y una cubierta externa biocompatible de polietilenglicol.

Los ensayos de biocompatibilidad de los compuestos esféricos Poli@Mag@PEG demuestran que la capa externa de PEG les confiere una excelente estabilidad química y biocompatibilidad, puesto que se observó un buen crecimiento y adhesión celular y no se produjo daño celular significativo.

Dada su excelente biocompatibilidad, las partículas de Poli@Mag@PEG se embebieron en hidrogeles de fibrina-agarosa que contenían fibroblastos, para obtener tejidos artificiales con células metabólicamente activas que respondan a un campo magnético.

La matriz de fibrina-agarosa promovió la interacción con el tejido huésped cuando los tejidos magnéticos se implantaron *in vivo*. Además, esta matriz evitó la agregación de las partículas, frente a la situación observada cuando se inyectaron subcutáneamente en forma de suspensión acuosa. En ambos casos (implantación de tejido; inyección de suspensiones), se produjo únicamente una reacción inflamatoria aguda localizada y transitoria, sin afectar a los órganos distales. En definitiva, tanto las suspensiones de partículas Poli@Mag@PEG como los tejidos magnéticos que los contienen, mostraron buena biocompatibilidad *in vivo*. Después de 21 días, los compuestos y los constructos tisulares no se reabsorbieron completamente y, además, mantenían su respuesta magnética.

En vista de los resultados, podemos concluir que se han obtenido partículas nanocompuestas con propiedades magnéticas y biocompatibilidad idóneas para futuras aplicaciones en el campo de la ingeniería tisular. Una de sus aplicaciones más prometedoras es la generación de tejidos artificiales cuyas propiedades mecánicas sean modulables a distancia mediante campos magnéticos externos.

## 2.5 Bibliografía

1. L. Rodriguez-Arco, I. A. Rodriguez, V. Carriel, A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, P. Kuzhir, J. D. G. Duran and M. T. Lopez-Lopez, *Nanoscale*, 2016, **8**, 8138-8150.
2. J. Gao, H. Gu and B. Xu, *Accounts of Chemical Research*, 2009, **42**, 1097-1107.
3. K. Chatterjee, S. Sarkar, K. J. Rao and S. Paria, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2014, **209**, 8-39.
4. P. Hu, J. V. Morabito and C.-K. Tsung, *ACS Catalysis*, 2014, **4**, 4409-4419.
5. S. Thatai, P. Khurana, J. Boken, S. Prasad and D. Kumar, *Microchemical Journal*, 2014, **116**, 62-76.
6. M. R. Kim, Z. Xu, G. Chen and D. Ma, *Chemistry-a European Journal*, 2014, **20**, 11256-11275.
7. V. Salgueiriño-Maceira and M. A. Correa-Duarte, *Advanced Materials*, 2007, **19**, 4131-4144.
8. S. Behrens, *Nanoscale*, 2011, **3**, 877-892.
9. M. Colombo, S. Carregal-Romero, M. F. Casula, L. Gutierrez, M. P. Morales, I. B. Boehm, J. T. Heverhagen, D. Prosperi and W. J. Parak, *Chemical Society Reviews*, 2012, **41**, 4306-4334.

10. J. K. Oh and J. M. Park, *Progress in Polymer Science*, 2011, **36**, 168-189.
11. M. Bañobre-Lopez, Y. Piñeiro-Redondo, R. De Santis, A. Gloria, L. Ambrosio, A. Tampieri, V. Dediu and J. Rivas, *Journal of Applied Physics*, 2011, **109**, 07B313.
12. N. Bock, A. Riminucci, C. Dionigi, A. Russo, A. Tampieri, E. Landi, V. A. Goranov, M. Marcacci and V. Dediu, *Acta Biomaterialia*, 2010, **6**, 786-796.
13. B. Das, M. Mandal, A. Upadhyay, P. Chattopadhyay and N. Karak, *Biomedical Materials*, 2013, **8**, 035003.
14. A. Gloria, T. Russo, U. D'Amora, S. Zeppetelli, T. D'Alessandro, M. Sandri, M. Banobre-Lopez, Y. Pineiro-Redondo, M. Uhlarz, A. Tampieri, J. Rivas, T. Herrmannsdoerfer, V. A. Dediu, L. Ambrosio and R. De Santis, *Journal of the Royal Society Interface*, 2013, **10**, 20120833.
15. H. Hu, W. Jiang, F. Lan, X. Zeng, S. Ma, Y. Wu and Z. Gu, *RSC Advances*, 2013, **3**, 879-886.
16. K. Lai, W. Jiang, J. Z. Tang, Y. Wu, B. He, G. Wang and Z. Gu, *RSC Advances*, 2012, **2**, 13007-13017.
17. H. Liu, C. Wang, Q. Gao, X. Liu and Z. Tong, *Acta Biomaterialia*, 2010, **6**, 275-281.
18. S. Panseri, C. Cunha, T. D'Alessandro, M. Sandri, G. Giavaresi, M. Marcacci, C. T. Hung and A. Tampieri, *Journal of Nanobiotechnology*, 2012, **10**, 32.
19. H. Skaat, O. Ziv-Polat, A. Shahar, D. Last, Y. Mardor and S. Margel, *Advanced Healthcare Materials*, 2012, **1**, 168-171.
20. A. Tampieri, E. Landi, F. Valentini, M. Sandri, T. D'Alessandro, V. Dediu and M. Marcacci, *Nanotechnology*, 2011, **22**, 015104.
21. X. B. Zeng, H. Hu, L. Q. Xie, F. Lan, W. Jiang, Y. Wu and Z. W. Gu, *International Journal of Nanomedicine*, 2012, **7**, 3365-3378.
22. Y. Zhu, F. Shang, B. Li, Y. Dong, Y. Liu, M. R. Lohe, N. Hanagata and S. Kaskel, *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, **1**, 1279-1288.
23. O. Ziv-Polat, H. Skaat, A. Shahar and S. Margel, *International Journal of Nanomedicine*, 2012, **7**, 1259-1274.
24. S.-H. Hu, T.-Y. Liu, C.-H. Tsai and S.-Y. Chen, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007, **310**, 2871-2873.
25. A. Tampieri, T. D'Alessandro, M. Sandri, S. Sprio, E. Landi, L. Bertinetti, S. Panseri, G. Pepponi, J. Goettlicher, M. Banobre-Lopez and J. Rivas, *Acta Biomaterialia*, 2012, **8**, 843-851.
26. N. H. A. Ngadiman, A. Idris, M. Irfan, D. Kurniawan, N. M. Yusof and R. Nasiri, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2015, **49**, 90-104.
27. M. R. Dзамukova, E. A. Naumenko, E. V. Rozhina, A. A. Trifonov and R. F. Fakhrullin, *Nano Research*, 2015, **8**, 2515-2532.
28. G. Bossis, O. Volkova, S. Lacis and A. Meunier, *Ferrofluids: Magnetically Controllable Fluids and Their Applications*, 2002, **594**, 202-230.

29. J. D. Carlson and M. R. Jolly, *Mechatronics*, 2000, **10**, 555-569.
30. J. de Vicente, D. J. Klingenberg and R. Hidalgo-Alvarez, *Soft Matter*, 2011, **7**, 3701-3710.
31. M. T. Lopez-Lopez, G. Scionti, A. C. Oliveira, J. D. G. Duran, A. Campos, M. Alaminos and I. A. Rodriguez, *Plos One*, 2015, **10**, e0133878.
32. L. Rodriguez-Arco, M. T. Lopez-Lopez, P. Kuzhir, G. Bossis and J. D. G. Duran, *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2013, **5**, 12143-12147.
33. C. M. Lin, Y. H. Song, F. Gao, X. Q. Zhou, Y. Sheng, Z. Shi and H. F. Zou, *Journal of Luminescence*, 2015, **158**, 456-463.
34. H. Chen and J. He, *Chemical Communications*, 2008, 4422-4424.
35. H. Chen and J. He, *Dalton Transactions*, 2009, 6651-6655.
36. X. Du and J. He, *Dalton Transactions*, 2010, **39**, 9063-9072.
37. X.-J. Wu, Y. Jiang and D. Xu, *Journal of Physical Chemistry C*, 2011, **115**, 11342-11347.
38. T. Yu, A. Malugin and H. Ghandehari, *Acs Nano*, 2011, **5**, 5717-5728.
39. M. Sharma, P. Jain, A. Mishra, A. Mehta, D. Choudhury, S. Hazra and S. Basu, *Materials Letters*, 2017, **194**, 213-216.
40. M. Salarian, M. Solati-Hashjin, S. S. Shafiei, A. Goudarzi, R. Salarian and A. Nemati, *Materials Science-Poland*, 2009, **27**, 961-971.
41. M. C. Llinàs and D. Sánchez-García, *Afinidad LXXI*, 2014, **565**, 20-31.
42. Y. S. Lin and C. L. Haynes, *Chemistry of Materials*, 2009, **21**, 3979-3986.
43. J. Wan, W. Cai, J. Feng, X. Meng and E. Liu, *Journal of Materials Chemistry*, 2007, **17**, 1188-1192.
44. J. Chatterjee, M. Bettge, Y. Haik and C. J. Chen, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, **293**, 303-309.
45. I. A. Rodriguez, G. Lopez-Gonzalez, M. A. Rodriguez, F. Campos-Sanchez and M. Alaminos, *Journal of Adhesive Dentistry*, 2011, **13**, 375-381.
46. S. San Martin, M. Alaminos, T. M. T. Zorn, M. C. Sanchez-Quevedo, I. Garzon, I. A. Rodriguez and A. Campos, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2013, **7**, 10-19.
47. M. Alaminos, M. D. Sanchez-Quevedo, J. I. Munoz-Avila, D. Serrano, S. Medialdea, I. Carreras and A. Campos, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, **47**, 3311-3317.
48. J. A. Kiernan, *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*, ed. D. J. Dries, Scion, Oxfordshire, 2008.
49. M. A. Rodriguez, M. T. Lopez-Lopez, J. D. G. Duran, M. Alaminos, A. Campos and I. A. Rodriguez, *Cryobiology*, 2013, **67**, 355-362.
50. V. Carriel, G. Scionti, F. Campos, O. Roda, B. Castro, M. Cornelissen, I. Garzón and M. Alaminos, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2017, **11**, 1412-1426.



- 
51. V. Carriel, I. Garzon, M. Alaminos and A. Campos, *Histochemistry and Cell Biology*, 2011, **136**, 709-717.
  52. R. A. Petros and J. M. DeSimone, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, **9**, 615-627.
  53. M. Arruebo, M. Galan, N. Navascues, C. Tellez, C. Marquina, M. R. Ibarra and J. Santamaria, *Chemistry of Materials*, 2006, **18**, 1911-1919.
  54. H. Otsuka, Y. Nagasaki and K. Kataoka, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, **64**, 246-255.
  55. C. Galindo-Gonzalez, J. de Vicente, M. M. Ramos-Tejada, M. T. Lopez-Lopez, F. Gonzalez-Caballero and J. D. G. Duran, *Langmuir*, 2005, **21**, 4410-4419.
  56. D. C. Jiles, *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials*, Chapman & Hall, London, 1991.
  57. S. J. Kemp, R. M. Ferguson, A. P. Khandhar and K. M. Krishnan, *Rsc Advances*, 2016, **6**, 77452-77464.



# Capítulo 3

Hidrogeles con partículas magnéticas.  
Reología y Biocompatibilidad *ex vivo* e  
*in vivo*.<sup>†</sup>

---

<sup>†</sup> El contenido de este capítulo ha sido publicado en:

M. T. Lopez-Lopez, I. A. Rodriguez, L. Rodriguez-Arco, V. Carriel, A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, A. Zubarev, and J. D. G. Duran. Synthesis, characterization and *in vivo* evaluation of biocompatible ferrogels, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2016, **431**, 110–114.

A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, I. A. Rodriguez, V. Carriel, J. A. Marins, A. Zubarev, J. D. G. Duran, and M. T. Lopez-Lopez. Effect of particle concentration on the microstructural and macro-mechanical properties of biocompatible magnetic hydrogels, *Soft Matter*, 2017, **13**, 2928–2941.

### RESUMEN

En este capítulo, se estudia el efecto de la concentración de nanopartículas magnéticas sobre las propiedades físicas de hidrogeles magnéticos. Estos hidrogeles magnéticos consisten en una red polimérica de fibras de fibrina, con nanopartículas magnéticas unidas a las fibras. Se preparan mediante polimerización de una mezcla formada por plasma humano y partículas magnéticas que poseen grupos  $\text{OH}^-$  en superficie. El estudio microscópico muestra que los hidrogeles magnéticos presentan unos clústeres que actúan como sitios de unión, conectando varias fibras de fibrina. Por el contrario, en los hidrogeles no magnéticos solo se observan uniones entre pares de fibras. El análisis de las propiedades reológicas demuestra que tanto el módulo de rigidez como los módulos viscoelásticos aumentan con el contenido de nanopartículas, siguiendo una función cuadrática. Además, el estudio de la cinética de gelificación demuestra que el tiempo necesario para que se forme el gel disminuye en presencia de nanopartículas magnéticas, puesto que estas actúan como puntos de unión para el entrecruzamiento de la fibrina.

Se ha desarrollado un modelo teórico semicuantitativo para explicar las propiedades mecánicas de los hidrogeles magnéticos. Este modelo se basa en la formación de uniones entre los grupos positivos presentes en los monómeros de fibrina y los grupos  $\text{OH}^-$  presentes en la superficie de las partículas. Dichas uniones dan lugar a clústeres densos que refuerzan el hidrogel desde el punto de vista mecánico.

Para completar la caracterización de los hidrogeles no magnéticos y magnéticos, y teniendo en cuenta que una de las posibles aplicaciones es en el campo de la ingeniería tisular, se estudia su biocompatibilidad *ex vivo* e *in vivo*. En ambos hidrogeles es viable la proliferación *ex vivo* de fibroblastos y, además su implantación *in vivo* no influye de forma negativa en el organismo de los animales empleados en el estudio.

### 3.1 Introducción

Los hidrogeles están formados por cadenas poliméricas entrecruzadas en el seno de una disolución acuosa. Su característica principal reside en la versatilidad de sus propiedades físico-químicas y en su biocompatibilidad. Basta modificar la composición química o el protocolo de preparación del gel para conseguir geles con características muy diferentes. Por ello, son materiales que potencialmente poseen aplicaciones en muy diversos campos de la ciencia y la tecnología y, en particular, en el campo de la biomedicina.<sup>1, 2</sup> De hecho, en ingeniería tisular, se emplean los hidrogeles para mimetizar la matriz extracelular de distintos tejidos nativos como los de córnea, mucosa oral, cartílago, nervio periférico o vejiga.<sup>3-7</sup> De igual modo, los hidrogeles porosos se vienen utilizando para liberación controlada o localizada de fármacos o bien, aprovechando su red de microcanales, para generar estructuras microlíticas en las que efectuar cultivos celulares en condiciones de flujo controlado de metabolitos.<sup>8-10</sup>

El estudio experimental de las propiedades reológicas de los hidrogeles es un campo de investigación muy activo,<sup>11-13</sup> en el que se presentan algunos retos importantes dado que, mientras se realizan las medidas, los geles pueden sufrir cambios en su estructura,<sup>14</sup> pérdida de disolvente<sup>15</sup> y efectos de deslizamiento en las superficies de medida.<sup>11, 15</sup>

La mayor parte de los trabajos publicados se centran principalmente en la medida del módulo de almacenamiento, en la cinética de gelificación y en el estudio de la transición sol-gel.<sup>13, 16-19</sup> De todos ellos, resultan especialmente interesantes los dedicados a determinar el tiempo de gelificación. Este se produce en el instante en que el entrecruzamiento progresivo de las cadenas de polímero provoca la transición de líquido viscoelástico a sólido viscoelástico.<sup>20</sup> Se han empleado numerosos métodos para detectar el punto de gelificación. Cabe destacar dos de ellos:

i) En el primero, el punto de gelificación se identifica con el tiempo necesario para que en las curvas de gelificación (en oscilometría, se miden el módulo de almacenamiento  $G'$  y el módulo de pérdidas  $G''$  en función del tiempo, a una frecuencia dada) se produzca el corte entre  $G'$  y  $G''$ . Aunque es uno de los métodos más usados, solo es correcto en el caso de que  $G'(\omega) = G''(\omega)$  para cualquier valor de la frecuencia de oscilación  $\omega$ .<sup>21</sup>

ii) El segundo, conocido como criterio de Winter y Chambon, es un método más general, en el que se estima el tiempo de gelificación como aquel en el que la tangente de pérdidas ( $\tan \delta = G''/G'$ ) es independiente de la frecuencia.<sup>22</sup> A su vez, para aplicar este criterio, se pueden seguir principalmente dos procedimientos experimentales. El primero consiste en realizar medidas de los módulos viscoelásticos en función del

tiempo, para distintos valores de frecuencia. Esto implica cambiar de muestra para cada frecuencia ensayada, con el consiguiente riesgo para la reproducibilidad de las medidas y, además, requiere consumir mucho tiempo. El segundo procedimiento es la Espectroscopia Mecánica con Transformada de Fourier (FTMS, *Fourier Transform Mechanical Spectroscopy*). En este, la muestra se somete simultáneamente a varias oscilaciones armónicas, en forma de onda compuesta, y se analiza posteriormente la respuesta por Transformada de Fourier.<sup>17, 23, 24</sup> Una alternativa a la FTMS es la Reometría de Fourier Óptima, donde la muestra se somete a una señal multifrecuencia con ondas moduladas en frecuencia.<sup>18, 25</sup>

Además de polímero y agua, los hidrogeles pueden contener otros materiales que modifiquen sus propiedades, como nano- o micropartículas sintéticas. A partir de ahora, nos vamos a referir a estos materiales como hidrogeles nanocompuestos, o incluso como hidrogeles bio-nano-compuestos si todos sus componentes son materiales biocompatibles. Un ejemplo de hidrogeles nanocompuestos son los llamados hidrogeles magnéticos o ferrogeles, que se caracterizan por contener partículas magnéticas dispersas en la matriz polimérica.<sup>26</sup> La presencia de material magnético permite su detección y control sin contacto directo con el ferrogel.<sup>27-30</sup> Esto representa una ventaja considerable frente a los hidrogeles no magnéticos, lo que explica el creciente interés que despiertan estos materiales.<sup>26-46</sup>

En trabajos recientes, se destacan las ventajas que pueden ofrecer los hidrogeles magnéticos frente a los no magnéticos, entre ellos cabe destacar las que se describen a continuación. La presencia de partículas magnéticas permite la visualización y seguimiento *in vivo* de los hidrogeles mediante resonancia magnética.<sup>45</sup> Además, los experimentos *ex vivo* sugieren que la presencia de material magnético dentro del hidrogel estimula la adhesión y la proliferación celular.<sup>31, 32, 47</sup> Por ejemplo, se ha demostrado recientemente que si se aplica a un ferrogel un campo magnético estático, se obtiene un efecto sinérgico en la diferenciación de osteoblastos primarios de cráneo de ratón.<sup>48</sup> Asimismo, para aplicaciones *in vivo* se ha sugerido que, en geles con nanopartículas magnéticas (NPM) funcionalizadas, las partículas se pueden guiar desde la zona en que se inyectan hasta otra zona diana mediante un campo magnético externo.<sup>32, 39, 45</sup> Desde el punto de vista de las aplicaciones en ingeniería tisular, esto representa una estrategia interesante para guiar y concentrar factores de crecimiento, fármacos y células, que se encuentren unidos a las NPM inyectadas. Por último, mencionar que recientemente se han preparado ferrogeles útiles como matrices extracelulares, para generar tejidos artificiales, cuyas propiedades mecánicas se pueden controlar mediante campos magnéticos externos.<sup>27, 29, 45</sup> De esta forma se podrían ajustar las propiedades mecánicas de los ferrogeles, para adaptarlas a las del

tejido nativo que se pretenda regenerar, lo que representa una ventaja única con respecto a los hidrogeles no magnéticos.

En trabajos previos de nuestro grupo, se ha demostrado que, incluso en ausencia de un campo magnético aplicado, se produce un incremento importante en los módulos mecánicos de los ferrogeles con respecto a los de los geles sin NPM.<sup>27, 29, 45</sup> Por ejemplo, el módulo de almacenamiento en hidrogeles de fibrina-agarosa (con fracción de volumen de NPM del 1 %) aumenta en un factor 2 - 3 respecto al que poseen los mismos hidrogeles sin partículas magnéticas.<sup>27, 29, 45</sup> Para descartar que este aumento tuviese relación con el carácter magnético de las partículas, se prepararon hidrogeles con la misma fracción de volumen de partículas no magnéticas y se obtuvo un incremento similar en  $G'$ .<sup>27</sup> Este aumento fue mucho mayor que el que predice la mecánica clásica de materiales compuestos para una matriz continua con inclusiones esféricas completamente rígidas.<sup>49</sup> En consecuencia, su origen debe estar en los cambios inducidos en la red polimérica interna de los hidrogeles cuando se embeben nanopartículas en su interior.

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este capítulo es determinar las propiedades mecánicas de los ferrogeles y relacionarlas con la estructura que poseen a escala microscópica. Para centrarnos exclusivamente en la interacción entre las nanopartículas y la fibrina, se investigó este sistema con la composición más simple posible. Por eso, para formular los geles, no se añadió agarosa, dado que este polisacárido (empleado en los hidrogeles descritos en el capítulo anterior) solo tenía en principio la función de proporcionar mayor consistencia a los hidrogeles. Se prepararon hidrogeles de fibrina con diferentes concentraciones de NPM y se analizaron: apariencia macroscópica, estructura microscópica, grado de hidratación, propiedades reológicas y tiempo de gelificación. Como se demostrará a continuación, se han hallado cambios considerables en las propiedades macroscópicas de los geles cuando se aumenta la concentración de partículas magnéticas. Dichos cambios se pueden atribuir a las modificaciones observadas en la estructura de los geles a escala microscópica.

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Materiales

Para preparar los hidrogeles se usó plasma humano, obtenido de donantes de sangre, proporcionado por el Biobanco de Granada (Sistema Sanitario Público de Andalucía, Junta de Andalucía). Las alícuotas de plasma se descongelaron en un baño termostático a 37 °C durante 10 minutos, inmediatamente antes de su uso.

Como fase sólida magnética, se usaron nanopartículas MagP-OH<sup>®</sup> suministradas por nanoMyP<sup>®</sup> (España), descritas en un trabajo anterior.<sup>27</sup> Estas partículas estaban

compuestas por un núcleo magnético multicristalino de óxido de hierro (90 % v/v) y una capa polimérica (10 % v/v) (ver Figura 3.1). El diámetro hidrodinámico medio de las nanopartículas MagP-OH<sup>®</sup> era de 110 nm. Este se midió mediante dispersión de luz dinámica usando un equipo Zetasizer (Malvern Instruments, EE.UU.). La capa polimérica estaba compuestas por un 54 % en peso de metacrilato de metilo, 15 % en peso de metacrilato de hidroxietilo y 31 % en peso de dimetacrilato de etilenglicol. Como consecuencia de este recubrimiento polimérico, las partículas MagP-OH<sup>®</sup> estaban funcionalizadas en superficie con grupos hidroxilo.

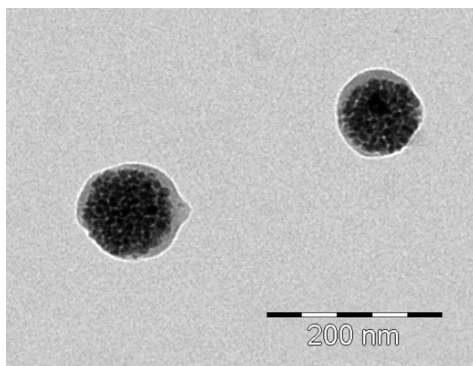


Figura 3.1. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas MagP-OH.

También se usó tampón PBS (fosfato salino suplementado con cloruro de magnesio y cloruro de calcio; nombre comercial *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich, España). Además, se usó una disolución de CaCl<sub>2</sub> de 0,02 g/mL para iniciar el entrecruzamiento del fibrinógeno presente en el plasma. Para preparar la disolución de CaCl<sub>2</sub>, se usó cloruro de calcio deshidratado (Sigma Ultra, 99 % de pureza) suministrado por Sigma-Aldrich y agua desionizada (Milli-Q, Millipore, Francia). También se utilizó una disolución de ácido tranexámico (Amchafibrina en comprimidos de 500 mg, Rottapharm) en agua Milli-Q a una concentración de 0,1 g/mL para evitar la fibrinólisis del hidrogel.

### 3.2.2 Preparación de los hidrogeles no magnéticos y magnéticos

Los hidrogeles no magnéticos se prepararon según el protocolo descrito por Alaminos y cols (2006).<sup>50</sup> Para preparar 5 mL de hidrogel, se mezclaron 3,8 mL de plasma con 875  $\mu$ L de tampón PBS, 75  $\mu$ L de ácido tranexámico y 250  $\mu$ L de disolución de CaCl<sub>2</sub> al 2 % (peso/volumen). Esta disolución de CaCl<sub>2</sub> se añade en último lugar porque el calcio activa el proceso de polimerización de la fibrina. Por último, la mezcla se vierte en una placa de cultivo de 35 mm de diámetro. Pasadas 2 horas desde el



inicio de la gelificación, se añadían 5 mL de PBS al hidrogel para evitar que se deshidratara. Los hidrogeles se mantuvieron bajo condiciones de cultivo celular (37 °C, atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>) durante 24 horas. Fue necesario someter los geles (sin células) a estas condiciones específicas para asegurar que son adecuados como medio de cultivo celular.

También se prepararon hidrogeles magnéticos modificando ligeramente el protocolo anterior. La modificación consistió en dispersar la cantidad correspondiente de nanopartículas MagP-OH<sup>®</sup> en la disolución de PBS inicial, obteniéndose una suspensión de nanopartículas con un volumen final de 875 µL. Las fracciones de volumen de nanopartículas MagP-OH<sup>®</sup> se encontraban entre el 0,1 % y el 1 %.

### **3.2.3 Estructura macroscópica de los hidrogeles**

Para analizar las características estructurales a escala macroscópica de los hidrogeles se usó un microscopio óptico (Nikon, SMZ800) con magnificación 5×. Se utilizó una cámara CCD (Pixelink, Canadá) conectada al microscopio para fotografiar los hidrogeles de fibrina y los ferrogel compuestos por partículas MagP-OH<sup>®</sup> y fibrina.

### **3.2.4 Hidratación de los hidrogeles**

Se realizaron medidas de hidratación y deshidratación para evaluar indirectamente la densidad de entrecruzamiento y la porosidad de los distintos hidrogeles. Para ello, se usaron hidrogeles que no se habían manipulado durante las 24 horas siguientes a su preparación. El procedimiento constaba de los siguientes pasos:

- i) Los hidrogeles, que estaban sumergidos en PBS, se separaron cuidadosamente de las paredes de la placa de cultivo usando una espátula de plástico.
- ii) Se eliminó todo el PBS sobrenadante con una pipeta.
- iii) Se midió la masa de la placa de cultivo conteniendo el hidrogel y la masa de la placa de cultivo vacía, para conocer la masa del hidrogel.
- iv) Por último, se obtuvo el residuo seco (masa después de deshidratación completa) de los hidrogeles manteniéndolos en un horno a 37 °C durante 24 horas.

Este estudio se realizó únicamente para los hidrogeles que presentaron una estructura macroscópica homogénea y que no se rompían por simple manipulación. Para cada hidrogel, con una concentración diferente de NPM, se hicieron estas medidas al menos 3 veces, usando cada vez un gel no manipulado previamente. Los resultados que se indican más adelante corresponden a la media y desviación estándar de cada serie de medidas. A partir de estos datos, se obtuvo el grado de hinchamiento

(Q) de los hidrogeles. En general, el grado de hinchamiento en un hidrogel se calcula mediante:<sup>51</sup>

$$Q = \frac{V_p + V_l}{V_p} \quad \text{Ec. (3.1)}$$

donde  $V_p$  es el volumen de polímero en el hidrogel,  $V_l$  es el volumen del líquido portador.

Para calcular Q, se procedió como se describe continuación. En primer lugar, se aproximó la masa de polímero de fibrina a la masa media de fibrinógeno en el plasma humano: 2 g/L.<sup>52</sup> Luego, se calculó el volumen de polímero teniendo en cuenta la densidad de las proteínas, que generalmente es igual a 1,35 g/mL, independientemente de la naturaleza de la proteína y de su peso molecular.<sup>53</sup> De esta manera, se puede estimar el volumen de polímero en el hidrogel:  $V_p = 5,6 \mu\text{L}$ . Entonces, sabiendo el volumen total de cada uno de los hidrogeles, se calculó Q como:

$$Q = \frac{V_T - V_{mp}}{V_p} \quad \text{Ec. (3.2)}$$

donde  $V_T$  es el volumen total de hidrogel y  $V_{mp}$  es el volumen de nanopartículas magnéticas que contiene el hidrogel.  $V_T$  se obtuvo a partir de la masa de los hidrogeles, suponiendo una densidad de 1 g/mL, puesto que el agua es su principal constituyente.

### 3.2.5 Estructura microscópica de los hidrogeles

Para analizar la estructura microscópica de las muestras, estas se prepararon con la técnica de Secado en Punto Crítico (CDP, Critical Point Drying) que permite conservar la estructura original de la muestra. Esta técnica consta de dos fases:

- i) Sustitución del agua de la muestra por dióxido de carbono para evitar la alteración de las muestras durante el proceso.
- ii) Eliminación del dióxido de carbono aumentando la temperatura y la presión para alcanzar el punto crítico.

Después de preparar las muestras con este protocolo, se analizó la estructura interna de los hidrogeles usando un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo Ambiental, Quanta 650 (FEI, *Field-Emission Environmental Scanning Electron Microscope*; Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada). Para determinar diferencias en la composición, se usó un detector de retrodisper-

sión circular. Este permite detectar diferencias en la composición del material observado en un mismo plano ya que, con esta técnica, los elementos más densos aparecen más brillantes.

### **3.2.6 Caracterización reológica de los hidrogeles**

Se determinaron las propiedades mecánicas de los hidrogeles con un reómetro Haake MARS III de esfuerzo controlado (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a una temperatura de 37 °C. Desde que se preparan los geles en las placas de cultivo, estos ya poseen forma de disco (diámetro 3,5 cm) que es la geometría de medida que se utilizará en el reómetro. La geometría de medida del reómetro es la denominada placa-placa o plato-plato, formada por una superficie plana fija y otra que es un disco rotor de 3,5 cm de diámetro. La superficie del disco rotor, en contacto con la muestra, es rugosa para evitar el deslizamiento en sus superficies. Las placas y la sujeción del eje del rotor al eje de rotación del reómetro son de titanio (sensor P35Ti L, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

Para realizar las medidas reológicas, se extrajeron los hidrogeles de las placas de cultivo e inmediatamente se depositaron en el plato inferior fijo del reómetro. Después, se ajustó el plato rotor del reómetro hasta que entrase en contacto con el hidrogel, sin llegar a comprimirlo. Para ello, se mantuvo una fuerza normal entre rotor y muestra de 0,5 N. El espesor correspondiente para la muestra fue aproximadamente de 200  $\mu\text{m}$  en todos los casos (con una desviación menor del 5 %). Se usó una muestra nueva para cada una de las medidas y se realizaron en atmósfera húmeda para evitar que se secaran durante el tiempo de medida. Se determinaron las propiedades reológicas de los hidrogeles bajo esfuerzo de cizalla constante y también bajo deformación de cizalla oscilatoria, como se describe a continuación.

#### **3.2.6.1 Comportamiento bajo esfuerzo de cizalla constante**

Las muestras se sometieron a un esfuerzo de cizalla constante y se registró la deformación de la muestra durante los primeros 600 segundos. Como se muestra en la Figura 3.2, para cada valor de esfuerzo de cizalla, la deformación aumenta bastante rápido durante los primeros 50-100 segundos, tendiendo a un valor constante para tiempos superiores. Por este motivo, se tomó el valor medio en los 100 últimos segundos en las curvas como las representadas en la Figura 3.2 como valor representativo de la deformación alcanzada para cada esfuerzo aplicado. Estas medidas se realizaron para esfuerzos de cizalla comprendidos entre 0,1 y 4 Pa. A partir de la pendiente inicial de las correspondientes curvas esfuerzo-deformación se estimó el módulo de rigidez de los hidrogeles.

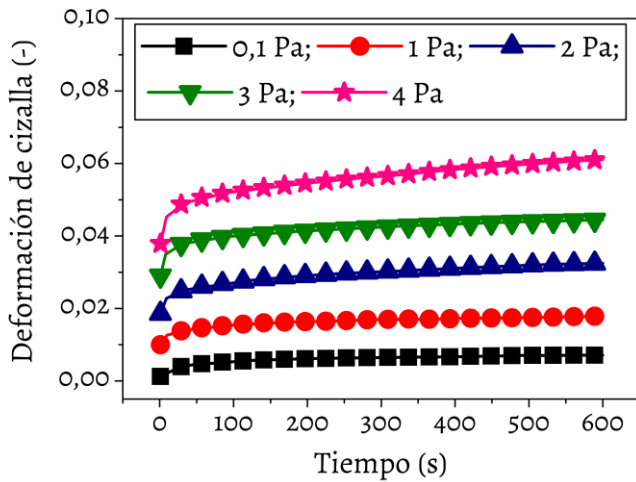


Figura 3.2. Deformación de un hidrogel de fibrina no magnético en función del tiempo, bajo la acción de un esfuerzo de cizalla constante. Los valores de esfuerzo aplicado se indican en la leyenda.

### 3.2.6.2 Comportamiento bajo deformación de cizalla oscilatoria

Las muestras se sometieron a una deformación de cizalla sinusoidal. Se realizaron dos tipos de ensayos, dependiendo de si se mantenía constante la amplitud o la frecuencia de la deformación, que son los siguientes. (i) Barrido de amplitud, en el que se mantuvo el valor de la frecuencia en 1 Hz y se varió la amplitud de la deformación, logarítmicamente espaciada, en el rango de 0,005 - 2,0. Con estas pruebas se obtuvo la zona viscoelástica lineal (ZVL), que es la zona en la que el esfuerzo medido también sigue una senoide de la misma frecuencia que la deformación, pero con un desfase angular. (ii) Barrido de frecuencia, en el que se fijó la amplitud de la deformación de cizalla en un valor que estuviera dentro de la ZVL y su frecuencia se varió linealmente espaciada en el rango de 0 a 10 Hz.

### 3.2.7 Cinética de gelificación mediante medidas reológicas

Para finalizar la caracterización reológica de los hidrogeles, se estudió la cinética de formación del gel, aplicando el criterio de Winter y Chambon, mediante la técnica FTMS. Para llevarlo a cabo, se usó un reómetro de esfuerzo controlado Haake MARS III, con geometría de medida de doble cono-plato de 60 mm de diámetro y un ángulo de 2°, fabricado en titanio (sensor DC60/2° Ti L, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La temperatura de las muestras se mantuvo a 37 °C durante toda la medida con ayuda de un baño termostático. En estos experimentos, los hidrogeles se prepararon dentro del portamuestras de doble cono-plato, ajustando el protocolo descrito en el apartado 3.2.2 para obtener un volumen final de gel de 8 mL. La mezcla

pre-gel se vertió en el portamuestras inmediatamente después de su preparación y se inició la medida lo más rápidamente posible. Durante todo el experimento, las muestras se sometieron a una señal oscilatoria, resultado de la combinación de una oscilación sinusoidal con algunos de sus armónicos. De esta manera, se obtuvieron los parámetros viscoelásticos dinámicos para cada frecuencia, por comparación de las formas de onda de entrada y salida mediante Transformada de Fourier. Para ello, se utilizó el Software Haake RheoWin 4.60.0001 de Thermo Fisher Scientific. Para no exceder la ZVL, se fijó la amplitud resultante (suma de las correspondientes a todos los armónicos) en un valor de 0,7 Pa. Se trabajó en un rango de frecuencias entre 1 y 10 Hz.

### 3.2.8 Ensayos de biocompatibilidad *ex vivo*

Con el fin de comprobar la biocompatibilidad *ex vivo*, tanto de los hidrogeles no magnéticos como de los ferrogeles, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Para ello, se aislaron fibroblastos humanos de donantes sanos. Se mantuvieron en cultivo y se expandieron hasta el quinto pase de cultivo celular. Una vez obtenido el número de células necesarias, se prepararon hidrogeles no magnéticos y magnéticos que contenían fibroblastos en su interior con una densidad celular de  $1,3 \times 10^5$  células·mL<sup>-1</sup>. Para la preparación se siguieron los protocolos ya descritos en bibliografía.<sup>54-57</sup> Los hidrogeles con células se mantuvieron en condiciones de cultivo (37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>) y en medio de cultivo DMEM, suplementado con una solución de antibióticos y antimicóticos, y con un 10 % de suero bovino fetal (todo ello suministrado por Sigma-Aldrich, Alemania). Después de 48 h, se evaluó la biocompatibilidad *ex vivo* mediante ensayos histológicos y de cuantificación de ADN descritos en las Refs. 56-58.

Para los análisis histológicos e histoquímicos, los hidrogeles se mantuvieron durante 24 h a temperatura ambiente con formaldehído neutro tamponado al 3 - 4 %. Después se deshidrataron las muestras, se lavaron e incluyeron en parafina, y se cortaron en láminas de 5 µm. En último lugar, se eliminó la parafina de las láminas y se realizaron dos tinciones histológicas: primero, con hematoxilina-eosina para identificar la fibrina; en segundo lugar, se utilizó el método Perls' para identificar los iones férricos presentes en las NPM dentro del hidrogel.<sup>56</sup>

Para determinar cuantitativamente el posible daño irreversible causado en la membrana celular, se cuantificó el ADN liberado al medio extracelular mediante espectrofotometría.<sup>56,58</sup> Para ello, después de 48 h de cultivo, se extrajo el sobrenadante (medio de cultivo) de cada una de las muestras, se guardó en tubos Eppendorf y se midió la concentración de ADN con un Espectrofotómetro UV-VIS NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Se midieron cuatro muestras de cada grupo experimental y se realizaron tres determinaciones de ADN por muestra. Como control negativo,

se incubaron constructos con Tritón x-100 al 2 %, para cada grupo experimental. Además, como control técnico positivo, se realizó un cultivo de células en 2D y también se cuantificó el ADN; en este caso, como control técnico negativo, se usó un cultivo de células en 2D incubado con Tritón x-100 al 2%. En último lugar, se determinó el ADN presente en el medio de cultivo y se restó este valor a los resultados obtenidos en los hidrogeles con células y el cultivo celular en 2D.

### **3.2.8.1 Análisis estadístico**

Para determinar el impacto causado por la incorporación de NPM en los hidrogeles de fibrina, se analizaron estadísticamente los valores de ADN obtenidos. Se sometieron las variables al test Shaphiro-Wilk para contrastar la normalidad del conjunto de datos, y se usó la prueba de la  $t$  de Student para comparaciones estadísticas entre los distintos grupos experimentales. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar. Además se usó el software SPSS v16.00 para comparaciones estadísticas, considerándose los valores  $p < 0,05$  como estadísticamente significativos.

### **3.2.8.2 Declaración ética**

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Granada. Cada uno de los donantes de tejido necesarios para la obtención de un cultivo de fibroblastos firmó un formulario de consentimiento para el estudio.

### **3.2.9 Análisis de biocompatibilidad *in vivo***

Una vez probada la biocompatibilidad *ex vivo* (ver apartado 3.3.6), se procedió a realizar ensayos de biocompatibilidad *in vivo*.

Para ello, se usaron 15 ratas *Wistar* macho, de tres semanas de edad y cuyo peso oscilaba entre 200-300 gramos. La Unidad Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves en Granada (España) fue la responsable de proporcionar los animales y cuidarlos durante las 5 semanas que duró el experimento. Se realizaron tres grupos experimentales que se describen a continuación:

- i) Cinco animales, a los que no se les realizó ninguna intervención, como control.
- ii) A otros 5 animales, se les practicó una intervención quirúrgica para insertar en el tejido conectivo subcutáneo de las patas delanteras unos discos de 5 mm de diámetro de hidrogel de fibrina.
- iii) Otros 5 animales fueron intervenidos quirúrgicamente para insertar unos discos de hidrogeles de fibrina con 0,5 % en volumen de NPM, en el mismo lugar que se hizo para el grupo (ii).

Los animales se mantuvieron, en jaulas estándar para ratas, a temperatura ambiente controlada de  $21 \pm 1$  °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, y se alimentaron con agua y comida *ad libitum*. Posteriormente, se les sacrificó mediante sobredosis de anestesia, seguido de perfusión intracardiaca fijativa.

Para estudiar el efecto de las nanopartículas en los animales, se realizaron análisis histológicos e histoquímicos de diferentes tejidos biológicos de hígado, bazo y riñón, así como de la zona de implante. Para ello, los tejidos se fijaron durante 24 h a temperatura ambiente con formaldehído neutro tamponado al 3 – 4 %, posteriormente se incluyeron en parafina, y se cortaron en láminas de 5  $\mu\text{m}$ . En último lugar, se eliminó la parafina y se realizaron los mismos ensayos histoquímicos descritos en el apartado 3.2.8 para los ensayos *ex vivo*, es decir, con tinciones de hematoxilina-eosina para identificar fibrina y ensayo Perls' para identificar las NPM en el hidrogel.

### **3.2.9.1 Declaración ética**

La caracterización *in vivo* se realizó siguiendo las directrices de la Unión Europea y del Gobierno de España, para el cuidado ético de animales (Directiva UE no. 63/2010, RD 53/2013). El Comité Ético de la Universidad de Granada aprobó los experimento *in vivo*, en el marco de referencia del proyecto de investigación FIS PI14-1343, financiado por el MINECO del gobierno de España y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

## **3.3 Resultados**

### **3.3.1 Estructura macroscópica de los hidrogeles**

A simple vista, se observó que los hidrogeles sin NPM presentaban un color amarillo semitransparente debido al plasma humano usado para su preparación –véase Figura 3.3 (a). También a simple vista, los hidrogeles magnéticos presentan un color marrón debido a las partículas magnéticas dispersas en el interior de la matriz polimérica (Figura 3.3 (b)) y, cuando se observan con un microscopio óptico, presentan un aspecto uniforme –véase que en Figura 3.3 (c) no se aprecia ninguna homogeneidad.

En particular, se observó que los hidrogeles con una concentración de NPM igual o superior al 0,5 % en volumen tenían grumos y eran muy frágiles, haciendo imposible su manipulación. Sin embargo, los hidrogeles cuya concentración de NPM era inferior al 0,5 % en volumen, presentaban un aspecto homogéneo y una buena consistencia, por lo que se podían manipular sin problema. Por ello, se estudiaron solamente los hidrogeles con una concentración de NPM inferior al 0,5 %.

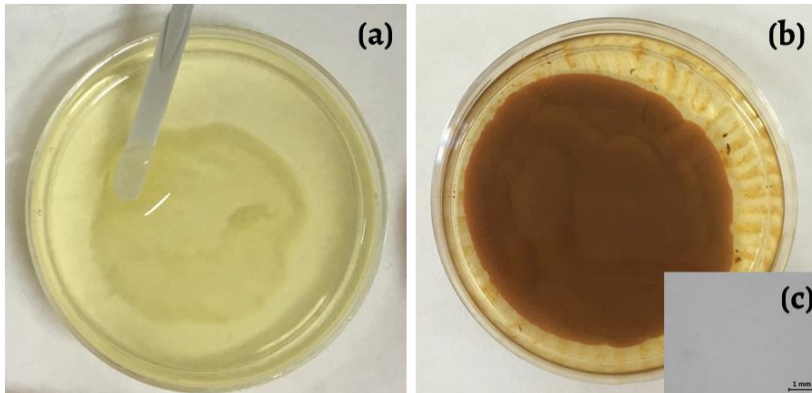


Figura 3.3. Imágenes de un hidrogel no magnético (a) y de un hidrogel magnético con fracción de volumen de NPM del 0,3 %. (c) Imagen de microscopía óptica de un hidrogel magnético al 0,2 % de NPM.

### 3.3.2 Hidratación de los hidrogeles

Una vez preparados los hidrogeles, se observó que los que contenían una concentración de NPM del 0,1 o del 0,2 % poseían una masa considerablemente mayor que los hidrogeles sin partículas magnéticas (ver columna  $W_i$  en Tabla 3.1). Además, a medida que aumentaba la concentración de NPM, por encima del 0,2 %, la masa de las muestras disminuía alcanzando valores similares a los de los hidrogeles no magnéticos. La masa de hidrogel más alta se obtuvo para una concentración del 0,1 % en NPM, aunque no había una diferencia significativa respecto a la masa del hidrogel al 0,2 %. Dado que el principal componente de estos hidrogeles era agua (véase en Tabla 3.1 que  $W_d$  es muy pequeño frente a  $W_i$ ), podemos decir que las diferencias en masa de los hidrogeles hidratados se debía al contenido en agua. El contenido de agua resultó mucho mayor en los hidrogeles con el 0,1 o con el 0,2 % de NPM (valores  $W_d/W_i$  más bajos en Tabla 3.1) que para los hidrogeles magnéticos con mayor concentración de sólidos (0,3 % y 0,4 %) y, también, mayor que en los hidrogeles no magnéticos. Además, la diferencia de masa de los distintos residuos secos (véase  $W_d$  en Tabla 3.1) era mínima, y estadísticamente no significativa, debido a la eliminación del agua.

Para el grado de hidratación, podemos llegar a las mismas conclusiones (valores de  $Q$  en la Tabla 3.1). Este parámetro nos da una idea de la capacidad que posee la red polimérica para hidratarse, además de indicar indirectamente la porosidad máxima alcanzada. Los valores tan altos de  $Q$  indican que existe un elevado grado de hinchamiento, tanto para los hidrogeles magnéticos como para los no magnéticos. Los valores de  $Q$  obtenidos (en torno a 500) son 5 veces mayores que los valores máximos calculados por Messing y colaboradores para ferrogel de poliacrilamida.<sup>51</sup> En cuanto a la dependencia no monotónica del grado de hidratación con respecto a la



concentración de NPM, se puede explicar suponiendo que las NPM actúan como nudos en la polimerización de la fibrina, abriendo la red polimérica y dando lugar a una estructura más porosa cuando la concentración de NPM era de 0,1 % y 0,2 %. Luego, a medida que vamos incrementando la concentración de NPM (0,3 % y 0,4 %), los nudos adicionales crean una estructura más densa y, por tanto, menos porosa, que hace que disminuya el grado de hidratación.

Tabla 3.1. Datos experimentales de los ensayos de hidratación de los hidrogeles. Se incluye la masa inicial ( $W_i$ ) y el grado de hidratación ( $Q$ ) de los hidrogeles después de 24 horas de incubación a 37 °C, así como la masa tras su deshidratación completa ( $W_d$ ). El valor máximo de  $Q$  se obtiene para el hidrogel de fibrina con 0,1 % vol. de NPM.

Concentración de NPM (% vol.)	$W_i$ (mg)	$Q$ (-)	$W_d$ (mg)	$W_d/W_i$ (%)
0	2630 ± 230	470 ± 40	86 ± 25	3,3 ± 1,2
0,1	3800 ± 300	680 ± 50	112 ± 17	2,9 ± 0,7
0,2	3560 ± 200	640 ± 40	94 ± 22	2,6 ± 0,8
0,3	2540 ± 210	450 ± 40	117 ± 14	4,6 ± 0,9
0,4	2600 ± 400	460 ± 70	123 ± 15	4,7 ± 1,3

### 3.3.3 Microestructura de los hidrogeles

Para comprobar la hipótesis planteada en el apartado 3.3.2, sobre que las NPM actúan como nudos de la red de fibrina, se observaron los hidrogeles no magnéticos y magnéticos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscopy*).

En los hidrogeles no magnéticos, se observaron fibras de fibrina formando una red bastante densa. En esta red las uniones entre distintas fibras se deben a interacciones entre pares de las mismas, provocando la formación de una red muy compacta como se muestra en la Figura 3.4 (a). Sin embargo, para los hidrogeles magnéticos (Figura 3.4 (b)), la estructura es mucho más abierta, con nudos formados por agregados de NPM y fibrina: en el plano de observación, se ven los elementos densos más brillantes, lo que nos permite detectar la presencia de NPM. Estos nudos, que provocan el entrecruzamiento entre cadenas de fibrina, favorecen la formación de una estructura más abierta, evitando que colapse la red polimérica. Además, esos nudos, dan lugar a una estructura muy homogénea, con una gran porosidad y una gran capacidad de hidratación en comparación con los hidrogeles no magnéticos.

Se observaron mediante SEM todos los hidrogeles magnéticos, con una concentración de NPM menor del 0,5 %, y se comprobó que en todos los casos existía una microestructura similar. Por otro lado, en hidrogeles con concentración de NPM

igual o mayor del 0,5 %, se observó que la estructura predominante estaba formada por una gran cantidad de agregados de NPM dispersos en la red polimérica. Esto es consistente con la observación macroscópica, ya que para elevadas concentraciones de NPM se obtuvieron geles mucho más frágiles y con grumos.

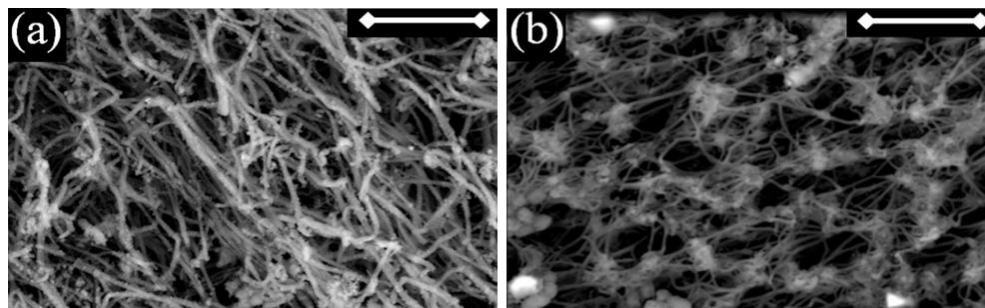


Figura 3.4. Imágenes obtenidas por SEM de: (a) hidrogeles no magnéticos, (b) hidrogeles magnéticos preparados con una fracción de volumen de NPM del 0,2 %. Longitud de la barra de escala 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.4 Caracterización reológica de los hidrogeles

#### 3.3.4.1 Comportamiento reológico bajo cizalla constante

Para caracterizar el comportamiento de los hidrogeles se midió la deformación para cada valor de esfuerzo de cizalla impuesto. En la Figura 3.5 podemos observar que, para baja deformación, la relación entre esfuerzo y deformación es prácticamente lineal: la pendiente es el módulo de rigidez. El módulo de rigidez  $G$  aumenta con la concentración de NPM como se muestra en la Figura 3.6.

El aumento en  $G$  es mucho mayor que el predicho por la fórmula de Einstein para partículas rígidas, o por la ecuación de Krieger-Dougherty para partículas ligeramente deformables. En ambos casos, se predice una relación lineal entre el módulo de rigidez y la fracción de volumen de partículas.<sup>59</sup> Hay que tener en cuenta que estas ecuaciones funcionan bien para dispersiones de partículas con movimiento browniano (no ligadas a un polímero), que es lo que ocurre, por ejemplo, en hidrogeles magnéticos compuestos por carragenanos y partículas de hierro.<sup>60</sup> En cambio, para los ferrohgeles utilizados en este trabajo, el incremento del módulo de rigidez con la concentración de NPM se ajusta a una función parabólica, como predice el modelo teórico que se presentará en el apartado 3.4.1.

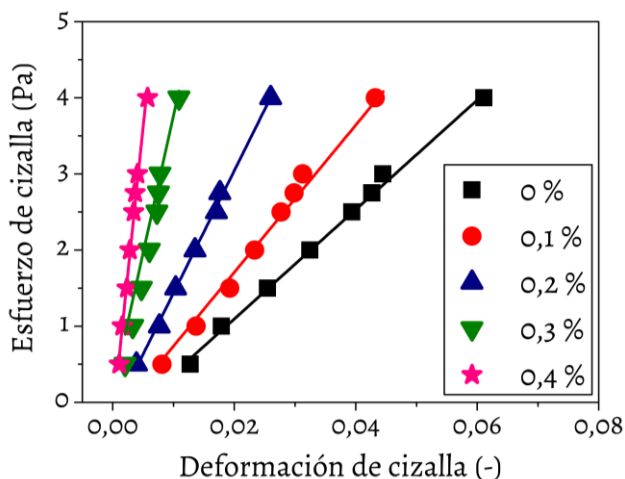


Figura 3.5. Curvas de esfuerzo de cizalla frente a deformación en hidrogeles preparados con las concentraciones de NPM que se indican. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas continuas corresponden con el ajuste lineal. Los datos experimentales se obtuvieron de curvas como las que se muestran en la Figura 3.2.

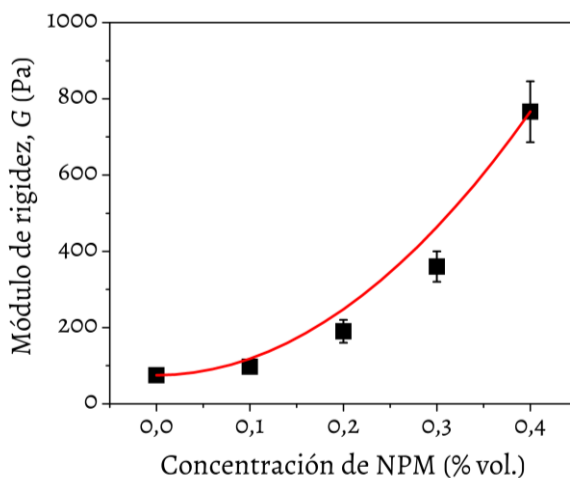


Figura 3.6. Módulo de rigidez de hidrogeles magnéticos para distintas concentraciones de NPM. Los símbolos cuadrados representan los datos experimentales. La línea continua representa la predicción teórica según la Ec. (3.12), tomando  $G_0 = 75$  Pa y  $A = 4,3 \times 10^7$  Pa.

### 3.3.4.2 Comportamiento reológico bajo esfuerzo de cizalla oscilatorio

Para caracterizar el comportamiento de los hidrogeles bajo deformación de cizalla oscilatoria, en primer lugar se realizaron ensayos en los que las muestras se sometieron a una deformación oscilatoria con frecuencia constante (1 Hz) y amplitud de

deformación creciente. De estos ensayos, se obtuvieron los valores de los módulos viscoelásticos  $G'$  y  $G''$  en función de la amplitud de la deformación ( $\gamma_0$ ). En la Figura 3.7, se muestra un ejemplo de las curvas de  $G'$  y  $G''$  en función de  $\gamma_0$ .

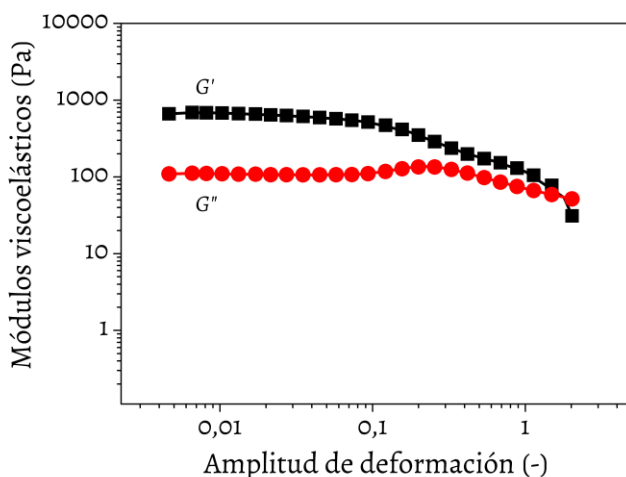


Figura 3.7. Módulo de almacenamiento  $G'$  y módulo de pérdidas  $G''$  en función de la amplitud de la deformación por cizalla, a una frecuencia de 1 Hz, para un hidrogel magnético con una fracción de volumen del 0,2 % vol. de NPM.

En general, la forma de estas curvas es similar para los hidrogeles no magnéticos y magnéticos. Principalmente, se observó que las curvas mostraban valores de  $G'$  y  $G''$  aproximadamente constantes para valores pequeños de amplitud de deformación ( $\gamma_0 < 0,03$ ) en donde se sitúa la zona viscoelástica lineal, ZVL. Para valores mayores de amplitud de deformación,  $G'$  y  $G''$  disminuyen de manera progresiva cuando se pasa a la zona viscoelástica no lineal (ZVNL). Dentro de la ZVL,  $G'$  tiene valores mucho mayores que  $G''$ , lo que indica que el material se comporta como un sólido viscoelástico, lo esperado para un material polimérico entrecruzado. Por otro lado, para valores muy altos de amplitud de deformación (deformación transversal mayor del 100 %), dentro de la ZVNL, se produce un cruce entre las curvas de  $G'$  y  $G''$  para un valor de  $\gamma_0$  por encima del que la energía disipada por rozamiento viscoso (proporcional a  $G''$ ) es mayor que la energía elástica almacenada (proporcional a  $G'$ ). Para comparar los módulos viscoelásticos de los hidrogeles magnéticos y no magnéticos se toman los valores de los módulos viscoelásticos, dentro de la ZVL, como los representativos de cada hidrogel. En esta zona, ambos módulos aumentaban con el contenido en partículas como se muestra en la Figura 3.8, igual que ocurriría con el módulo de rigidez (Figura 3.6). De hecho, el módulo de almacenamiento de los hidroge-

les magnéticos para la máxima concentración de NPM (0,4 % vol.) era aproximadamente 20 veces mayor que para los hidrogeles no magnéticos, aumento que también se observó para el módulo de pérdidas.

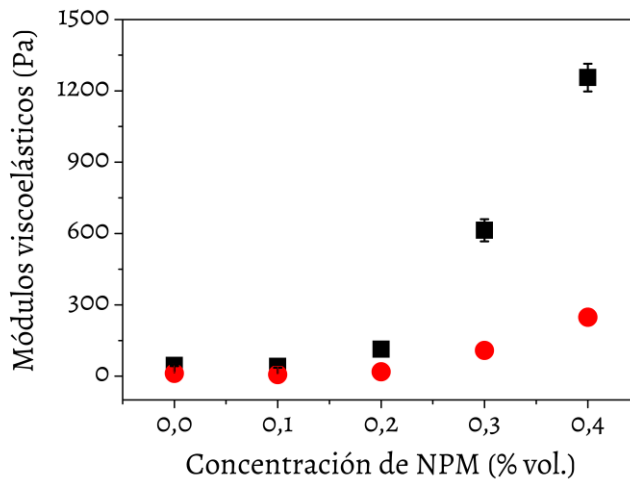


Figura 3.8. Módulo de almacenamiento (cuadrado negro) y módulo de pérdidas (círculo rojo) en función de la concentración de NPM en los hidrogeles. Los valores representados se han tomado dentro de la ZVL.

Además, hay otro parámetro importante que se puede obtener de las curvas como las de la Figura 3.7 que es la deformación crítica correspondiente al límite de la ZVL. Muchos autores identifican la deformación crítica con el punto donde el módulo de almacenamiento se desvía un 10 % del valor obtenido en el plateau de la ZVL.<sup>61, 62</sup> Siguiendo este criterio, tenemos que el valor de la deformación crítica para un hidrogel magnético con una concentración de NPM al 0,1 % vol. es mayor que el de un hidrogel no magnético (Tabla 3.2). Sin embargo, al aumentar la concentración de NPM por encima del 0,1 % vol., el valor de deformación crítica tiende a disminuir (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Valores de amplitud de deformación crítica que marcan el inicio de la zona viscoelástica no lineal.

Concentración de NPM (% vol.)	Deformación de cizalla crítica (-)
0	0,060 ± 0,011
0,1	0,087 ± 0,009
0,2	0,067 ± 0,007
0,3	0,045 ± 0,005
0,4	0,0216 ± 0,0022

Esta tendencia es similar a la que se obtuvo para los valores de  $Q$  (Tabla 3.1). Es importante señalar que recientemente se ha obtenido una tendencia no monótona similar, al estudiar el módulo de almacenamiento en función de la deformación de cizalla, para hidrogeles coloidales.<sup>63</sup> En ese trabajo previo, se muestra también una dependencia no monótona, con una correlación inversa respecto al espacio vacío en el gel. En nuestro trabajo, se puede considerar que el incremento de la deformación crítica para el 0,1 % de NPM se debe a cambios en la microestructura del hidrogel magnético (las NPM hacen de nudos de entrecruzamiento) con respecto a hidrogeles no magnéticos (solo se observan uniones entre fibras poliméricas). A medida que aumenta la concentración de NPM por encima del 0,1 % vol., la red polimérica se hace cada vez menos porosa y más rígida, como demuestra la disminución de la deformación crítica en función de la concentración de NPM. Igualmente, la hipótesis de que las partículas actúan como nudos de una red de fibras poliméricas, podría justificar la dependencia parabólica del módulo de almacenamiento respecto de la concentración de NPM, como se discutirá en el apartado 3.4.1.

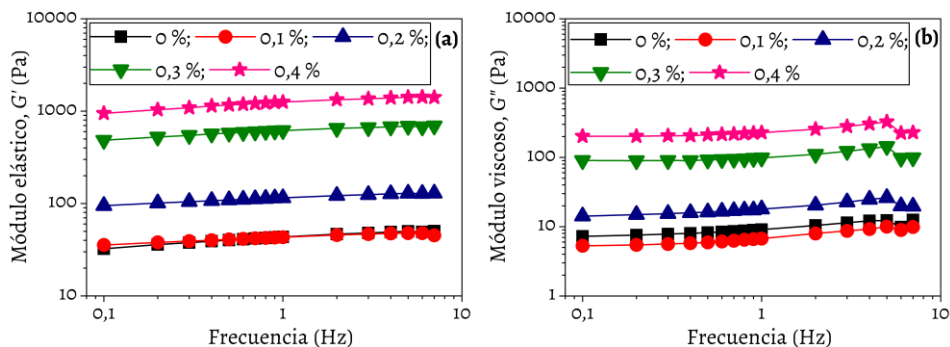


Figura 3.9 Módulo de almacenamiento (a) y módulo de pérdidas (b) en función de la frecuencia para hidrogeles de fibrina preparados a diferentes concentraciones de NPM (se indican en las gráficas).

Además de los ensayos oscilatorios a una frecuencia fija y deformación creciente, que son útiles para determinar la extensión de la ZVL, se realizaron ensayos oscilatorios con una amplitud de deformación constante (dentro de la ZVL) y una frecuencia creciente. De estos ensayos, se obtuvieron los módulos viscoelásticos en función de la frecuencia, conocidos como oscilogramas. En los oscilogramas,  $G'$  presenta una tendencia ligeramente ascendente al aumentar la frecuencia –Figura 3.9 (a). En cuanto a  $G''$ , se observó una tendencia creciente más acentuada hasta valores de frecuencia de 5 Hz, seguida de una disminución para frecuencias superiores –Figura 3.9 (b). Además, para todas las concentraciones de NPM,  $G'$  era mayor que  $G''$  en todo el rango de frecuencia estudiado, como cabe esperar en hidrogeles poliméricos entrecruzados.<sup>64</sup>

Cabe destacar el notable aumento en  $G'$  (casi dos órdenes de magnitud) que se consigue al embeber una cantidad relativamente baja (hasta 0,4 % vol.) de NPM en el gel de fibrina lo que, como hemos comentado, no se corresponde con una simple mezcla sin interacción mutua entre partículas y cadenas poliméricas.

### 3.3.5 Cinética de gelificación mediante medidas reológicas

Se estudió la cinética de gelificación empleando el criterio de Winter y Chambon basado en la técnica FTMS. Se obtuvieron los módulos viscoelásticos dentro de la ZVL en función del tiempo para distintas frecuencias (1-10 Hz) y se representó la tangente de pérdidas ( $\tan \delta = G''/G'$ ) en función del tiempo. El tiempo de gelificación es aquel en el que  $\tan \delta$  es independiente de la frecuencia (véase un ejemplo en la Figura 3.10). Los resultados demuestran que el tiempo de gelificación disminuye a medida que aumenta la concentración de NPM –Figura 3.11. Incluso para una concentración de NPM tan pequeña como el 0,1 % en volumen, se produce una bajada del tiempo de gelificación hasta la mitad del que tenía el hidrogel no magnético. Esto se puede explicar asumiendo que, al añadir NPM (en el rango 0,1 – 0,4 %) se produce un entrecruzamiento adicional entre las fibras de fibrina, dando lugar a una gelificación progresivamente más rápida.

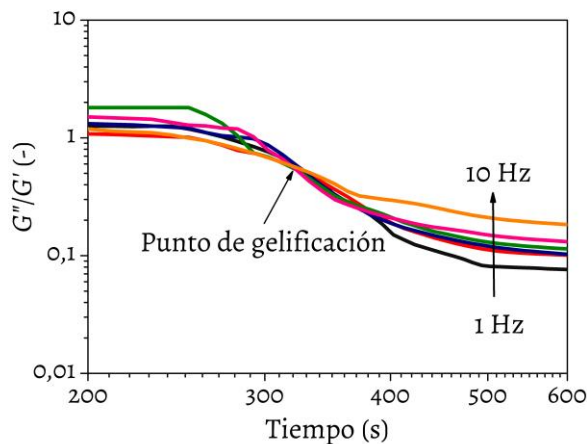


Figura 3.10. Tangente de pérdidas ( $\tan \delta = G''/G'$ ) medida simultáneamente a diferentes frecuencias mediante FTMS (*Fourier Transform Mechanical Spectroscopy*) para un hidrogel de fibrina no magnético. Para los hidrogeles magnéticos se obtuvieron gráficas similares.

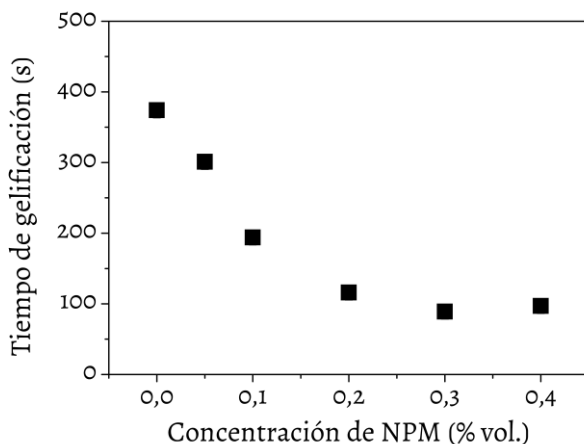


Figura 3.11. Tiempo de gelificación, de acuerdo al criterio de Winter Chambon, en función de la concentración de NPM para hidrogeles de fibrina.

### 3.3.6 Biocompatibilidad *ex vivo*

Se realizaron análisis histológicos en los que se comprobó que los fibroblastos se encapsularon correctamente tanto en los hidrogeles no magnéticos como en los magnéticos. Después de 48 h en condiciones de cultivo, las células mostraron su típica forma elongada. Se pudo identificar, en los cultivos celulares realizados en los hidrogeles de fibrina no magnéticos y magnéticos (cultivos celulares 3D), alguna filopodia, sugiriendo una interacción adecuada entre el material y las células (Figura 3.12). El método histológico Perls', que es positivo para las NPM (coloración azul), mostró que las nanopartículas estaban distribuidas de forma homogénea dentro de los hidrogeles de fibrina. Además, se observó una intensa reacción positiva de Perls' alrededor de la superficie de los fibroblastos, sugiriendo una posible interacción entre las nanopartículas y las células –Figura 3.12.

Respecto a la cuantificación de ADN liberado, el ensayo mostró que las células en cultivo 3D liberaron una cantidad significativamente mayor de ADN al medio extracelular ( $p < 0,005$ ) que las células bajo condiciones de cultivo 2D –Tabla 3.3. Sin embargo, los ensayos mostraron valores significativamente pequeños en comparación con los controles negativos ( $p < 0,05$ ), lo que confirma la biocompatibilidad de los hidrogeles no magnéticos y magnéticos. Por otra parte, cuando se comparan los valores de liberación de ADN entre los hidrogeles no magnéticos y magnéticos se encuentra un pequeño aumento, estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ), para estos últimos –Tabla 3.3.



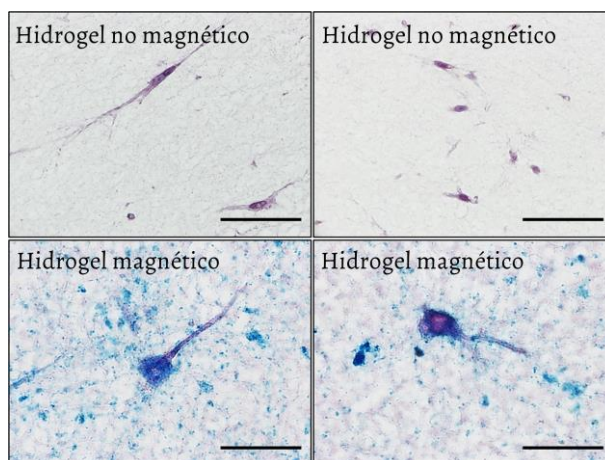


Figura 3.12. Análisis histológicos e histoquímicos *ex vivo* de fibroblastos cultivados en hidrogeles de fibrina no magnéticos y magnéticos. La tinción de H&E (las dos imágenes superiores) confirma la presencia de fibroblastos en los hidrogeles de fibrina no magnéticos, con sus característicos procesos citoplasmáticos. El método histológico Perl's' (las dos imágenes inferiores) muestra la distribución de las NPM en los hidrogeles de fibrina magnéticos: se puede observar como numerosas NPM interaccionan con la superficie de los fibroblastos. Longitud de la línea de escala 50  $\mu\text{m}$ .

Tabla 3.3. Resultados de los ensayos de liberación de ADN.

	Hidrogel no magnético	Hidrogel magnético	Cultivo celular 2D
<b>Liberación-ADN</b>	218 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	284 $\pm$ 14 <sup>a,b,c</sup>	25 $\pm$ 9 <sup>a,b</sup>
<b>Liberación-ADN (control negativo)</b>	592 $\pm$ 5	676 $\pm$ 4	2013 $\pm$ 18

Los valores de liberación de ADN son la media  $\pm$  la desviación estándar en unidades de  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ . Se realizó una comparación entre los diferentes grupos usando el test de *t* de Student.

<sup>a</sup> Diferencia estadísticamente significativa respecto a controles negativos.

<sup>b</sup> Diferencia significativa respecto a hidrogel no magnético.

<sup>c</sup> Diferencia significativa respecto al cultivo celular en 2D (control técnico).

### 3.3.7 Biocompatibilidad *in vivo*

Se realizaron análisis histológicos de distintos órganos como hígado, bazo, riñón y de la zona del implante, con los que se confirma la biocompatibilidad de estos hidrogeles nanocompuestos. En general, se observó que la respuesta a la implantación de los hidrogeles de fibrina magnéticos consistió en una reacción inflamatoria aguda localizada, que desapareció progresivamente después de la primera semana de implantación. Además, se estudió la posible migración de partículas a los distintos ór-

ganos mediante resonancia magnética de imagen *in vivo*, sin que se apreciara migración apreciable de las nanopartículas a ninguno de los órganos durante las 5 semanas de ensayo.

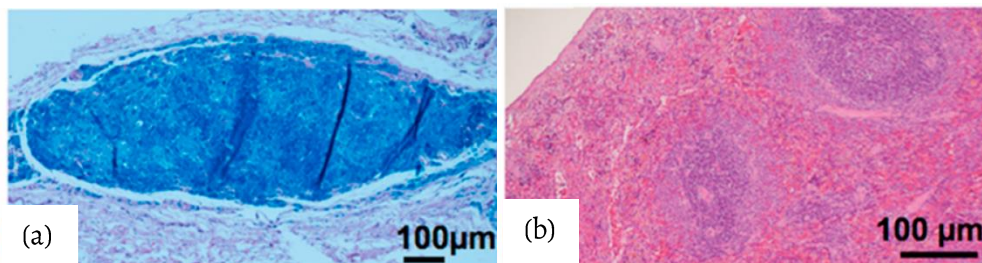


Figura 3.13. Análisis histológicos *in vivo* de distintas muestras, pertenecientes a un animal que había sido intervenido quirúrgicamente para insertar un hidrogel de fibrina al 0,5 % en volumen de NPM. (a) Esta imagen muestra la reacción histoquímica, en la zona del implante, con Azul de Prusia para nanopartículas con iones  $\text{Fe}^{3+}$  (método PerI's). (b) En esta otra imagen se observa una sección de bazo (tinción H&E) que muestra un aspecto normal.

Los análisis histológicos muestran que las células son capaces de invadir el constructo implantado –Figura 3.13. Además, se observó que las partículas están homogéneamente distribuidas dentro de los hidrogeles de fibrina varias semanas después de haber sido implantados –ver Figura 3.13 (a). Los análisis histológicos también confirman que los órganos presentan un aspecto normal, sin daño apreciable durante la duración de los experimentos –Figura 3.13 (b).

### 3.4 Discusión y teoría

En este trabajo se han determinado experimentalmente las propiedades físicas de hidrogeles magnéticos de fibrina, con diferentes concentraciones de nanopartículas magnéticas MagP-OH<sup>®</sup> (de 0 % a 0,4 % en volumen), dichas partículas estaban compuestas por un núcleo de magnetita y una capa polimérica con grupos OH<sup>-</sup> en superficie. El análisis microestructural demuestra que estos hidrogeles presentan una red porosa de fibras de fibrina y que la distribución del polímero era isotrópica –Figura 3.4 (a). De igual manera, al añadir NPM se obtuvo una red isotrópica de fibras de fibrina, pero en este caso la red se encontraba interrumpida por la presencia de clústeres –Figura 3.4 (b). Estos clústeres, formados por nanopartículas y fibrina, formaban nudos de unión adicionales para las cadenas que componían la red polimérica.

Se podría justificar el origen de la formación de los clústeres suponiendo que se produce una interacción electrostática entre los grupos con carga positiva del fibrinógeno (los mismos que permiten que se lleve a cabo la polimerización de la fibrina) y los grupos OH<sup>-</sup> presentes en la superficie de las partículas magnéticas. De hecho, la

fibrina se formó por polimerización de fibrinógeno (presente en el plasma sanguíneo) en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . El fibrinógeno es una glicoproteína formada por tres pares de cadenas polipeptídicas diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), unidas entre sí por enlaces puente disulfuro, que forman un dominio central E (cargado negativamente), dos dominios periféricos idénticos conocidos como dominios D (cargados negativamente) y dos dominios  $\alpha\text{C}$  (cargados positivamente).<sup>65-67</sup>

La polimerización de la fibrina tiene lugar en varios pasos. (i) Primero, se produce la activación del fibrinógeno, por acción de la trombina, que actúa produciendo la escisión de los fibrinopéptidos A y B que se encuentran en el extremo N-terminal de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del fibrinógeno (dominio E). De esta forma, se obtiene fibrinógeno activado, al que se denomina fibrina, y que es insoluble ya que el dominio D queda cargado positivamente,<sup>68</sup> además de producirse un cambio en la conformación de la glicoproteína. (ii) A continuación, los monómeros de fibrina se atraen entre sí por interacciones electrostáticas entre los dominios D (con carga negativa) y los dominios E (con carga positiva). Además, se producen otro tipo de interacciones, como los enlaces de hidrógeno, dando lugar a un polímero de fibrina blando. (iii) Finalmente, la enzima transglutaminasa cataliza el entrecruzamiento covalente del polímero de fibrina blando formado en el paso (ii); dicha enzima forma enlaces amida entre los grupos  $\epsilon$ -amino de lisinas residuales de un monómero de fibrina y los grupos  $\gamma$ -carboxiamida de las glutaminas residuales de otro monómero de fibrina adyacente.<sup>69</sup>

Como se ha mencionado anteriormente, las nanopartículas MagP-OH<sup>®</sup> tenían una carga superficial negativa por su funcionalización con grupos OH<sup>-</sup> de manera que, teniendo en cuenta el proceso de polimerización de la fibrina, las moléculas de fibrinógeno son muy probablemente adsorbidas en la superficie de las NPM MagP-OH<sup>®</sup>, antes de que se produzca la activación del fibrinógeno (paso (i)), debido a la atracción electrostática entre los grupos OH<sup>-</sup> de las NPM y las cargas positivas de los dominios  $\alpha\text{C}$  del fibrinógeno. En un trabajo anterior,<sup>70</sup> se ha propuesto una explicación parecida para justificar la adsorción del fibrinógeno sobre material inorgánico con carga superficial negativa. En consecuencia, se espera que las moléculas de fibrinógeno se anclen a las NPM MagP-OH<sup>®</sup>, actuando como sitios de unión en la polimerización de la fibrina, de acuerdo con lo observado en la Figura 3.4 (b). Además, la interacción atractiva entre el fibrinógeno y las NPM podrían justificar el rápido proceso de entrecruzamiento de los hidrogeles magnéticos con respecto a los no magnéticos. De hecho, cabe esperar que el hidrogel con la mayor concentración de NPM será el más rápido en alcanzar el punto de gelificación. En este sentido, Growney Kalaf y colaboradores<sup>71</sup> demostraron que el tiempo de gelificación en hidrogeles de alginato disminuía al aumentar la concentración de entrecruzador (iones calcio), de acuerdo con la hipótesis que se plantea en este trabajo.<sup>71</sup>

Las medidas reológicas han demostrado un aumento progresivo del módulo de rigidez (Figuras 3.5 y 3.6) y de los módulos viscoelásticos (Figuras 3.8 y 3.9) a medida que se aumentaba la concentración de NPM. Con los hidrogeles preparados al 0,4 % de NPM (la mayor concentración estudiada), se obtuvieron valores del módulo de rigidez y de los módulos viscoelásticos que eran casi dos órdenes de magnitud mayores que los de hidrogeles no magnéticos. Este incremento parece consistente con los cambios observados en la microestructura. Se puede decir que la presencia de NPM refuerza la estructura polimérica. De hecho la teoría clásica sobre elasticidad de geles demuestra que el módulo de almacenamiento de un gel es proporcional a la concentración de cadenas poliméricas que se enlazan en las uniones de la red polimérica.<sup>72</sup> Como mostraba la Figura 3.4 (b), los agregados actúan como nudos de entrecruzamiento de las cadenas de fibrina. Una característica importante de lo observado en esta figura es que dos agregados se pueden unir entre sí mediante varias fibras de fibrina. Esto podría justificar el incremento de los módulos mecánicos, obtenido conforme aumenta la concentración de NPM. En el siguiente apartado 3.4.1 se propone un modelo teórico que permite explicar la tendencia observada para el módulo de rigidez en función de la concentración de NPM.

En cuanto al comportamiento viscoelástico, se encontró en todos los casos (hidrogeles no magnéticos y magnéticos), que el módulo de almacenamiento dominaba sobre el módulo de pérdidas (Figuras 3.7 a 3.9), como era de esperar para sistemas poliméricos entrecruzados.<sup>64</sup> En términos generales, la tendencia en los oscilogramas dentro de la ZVL (Figura 3.9), es también típica de sistemas poliméricos entrecruzados. La tendencia del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) a crecer ligeramente con la frecuencia, se ha observado anteriormente para tejidos artificiales de estroma de mucosa oral humana preparados con hidrogeles de fibrina,<sup>73</sup> así como para un tejido nativo de mucosa de las cuerdas vocales humana,<sup>74</sup> que consiste principalmente en una red de colágeno tipo I y tipo II y fibras de elastina. En cuanto a la variación del módulo de pérdidas ( $G''$ ) con la frecuencia, en la que hay una disminución para frecuencias mayores que 5 Hz, hemos de mencionar que es similar a lo que se obtuvo anteriormente para tejidos artificiales de estroma de mucosa oral preparados con hidrogeles basados en fibrina.<sup>73</sup> También Chan and Titze observaron una tendencia semejante al estudiar el comportamiento de la mucosa de cuerda vocal humana nativa.<sup>74</sup>

### **3.4.1 Modelo teórico para el módulo de rigidez**

El principal objetivo de este apartado es explicar la dependencia no lineal del módulo de rigidez con la concentración de NPM en los hidrogeles magnéticos. La hipótesis

de partida es que la interacción entre las NPM y el fibrinógeno da lugar a la formación de clústeres muy densos, como los observados en la Figura 3.4 (b), que actúan como nudos de unión en la red formada por las fibras (o hilos) de fibrina.

Sea  $\nu$  el número de hilos de fibrina por unidad de volumen de material compuesto por NPM y fibrina. Según la teoría clásica de elasticidad para geles formados por una red de fibras, el módulo de rigidez  $G$  es proporcional a  $\nu$  (véase por ejemplo las refs. 19 y 72).

$$G \sim kT\nu \quad \text{Ec. (3.3)}$$

Esta ecuación es aplicable para geles en los que las subcadenas poliméricas están formadas por macromoleculares ideales (o gaussianas) enrolladas en forma helicoidal, como puede ser el caso los hidrogeles no magnéticos. La única energía característica de estas asociaciones helicoidales es la energía térmica  $kT$ . Sin embargo, este no es el caso de los hidrogeles magnéticos: los segmentos observados por SEM (ver Figura 3.4 (b)) no parecen asociaciones macromoleculares con forma helicoidal, sino más bien hilos flexibles. Por tanto, hemos de generalizar la Ec. (3.3) y reescribirla como:

$$G \sim w\nu \quad \text{Ec. (3.4)}$$

donde  $w$  representa ahora la energía asociada al cambio de conformación de las subcadenas poliméricas. Para determinar el valor de esta energía habría que realizar un análisis detallado de los cambios conformacionales a escala microscópica de las cadenas de fibrina, lo que representa un problema que queda fuera del alcance de este trabajo. Por consiguiente, tomaremos  $w$  como un parámetro de ajuste de la Ec. (3.4) a los resultados experimentales.

Parece lógico suponer que, en promedio,  $\nu$  es proporcional a superficie del clúster y que, por tanto:

$$\nu \sim n_d S_d \xi \quad \text{Ec. (3.5)}$$

donde  $n_d$  es la concentración de clústeres (en número por unidad de volumen),  $S_d$  es la superficie de un clúster y  $\xi$  es el número de contactos hilo-clúster por unidad de superficie. El parámetro  $\xi$  dependerá tanto de las interacciones fibrinógeno-partícula como de las interacciones entre las moléculas de fibrinógeno entre sí. De nuevo, consideraremos  $\xi$  como un parámetro empírico. Por otra parte, considerando que el número total de partículas presentes en la red clústeres-hilos es igual al de partículas añadidas, podemos escribir:

$$n_d V_d \varphi_d \sim \varphi_o \quad \text{Ec. (3.6)}$$

donde  $\varphi_o$  y  $\varphi_d$  representan, respectivamente, la fracción de volumen total de partículas en el material compuesto y la que hay en el interior de los clústeres y  $V_d$  es el volumen de un clúster. A partir de las ecuaciones (3.5) y (3.6), y considerando que  $S_d \sim V_d^{2/3}$ , se obtiene:

$$v \sim \xi \frac{\varphi_o S_d}{\varphi_d V_d} \sim \xi \frac{\varphi_o}{\varphi_d} V_d^{-1/3} \quad \text{Ec. (3.7)}$$

Hay que tener en cuenta que  $S_d$  y  $\xi$  representan valores promedio puesto que evidentemente no todos los clústeres son idénticos. El proceso de formación de la red hilos-clústeres se puede considerar como un proceso en el que, a partir de una mezcla sobresaturada de partículas y moléculas de fibrinógeno (la suspensión inicial), se forman gotas densas por condensación de nanopartículas y fibrinógeno. Según la teoría de cambios de fase por condensación, para que se forme una gota es necesario que el volumen de los núcleos de condensación supere un cierto volumen crítico  $V_c$ . Para núcleos esféricos, el volumen crítico se puede estimar como:<sup>75</sup>

$$V_c^{-1/3} \sim \frac{1}{\sigma} p_o \quad \text{Ec. (3.8)}$$

donde  $\sigma$  es la tensión superficial de la gota y  $p_o$  es la presión osmótica. Teniendo en cuenta que tanto la concentración de partículas como la de fibrinógeno en el hidrogel son bajas, se puede estimar la presión osmótica como la de una disolución diluida con dos componentes, dada por:

$$p_o = kT \left( \frac{\varphi_o}{v_p} + \frac{\varphi_f}{v_f} \right) \quad \text{Ec. (3.9)}$$

En esta ecuación  $v_p$  y  $v_f$  son, respectivamente, el volumen de una partícula y de una molécula de fibrinógeno, y  $\varphi_f$  es la fracción de volumen de fibrinógeno en el momento de la nucleación. Se puede suponer que inicialmente la sobresaturación del sistema partícula-fibrinógeno es suficientemente elevada como para que la nucleación sea instantánea. En estas condiciones, la velocidad de nucleación es muy elevada, la sobresaturación decrece rápidamente y, en consecuencia, la velocidad de crecimiento de las gotas disminuye muy rápidamente. Además, la polimerización de

la fibrina en el seno de la disolución contribuye a su vez a interrumpir la formación de las gotas. Por ello, en primera aproximación, se puede suponer una parada instantánea en el crecimiento de las gotas justo después de su formación. Esto implica que el volumen de las gotas viables es aproximadamente igual al volumen crítico  $V_c$ . Esta suposición parece razonable si tenemos en cuenta que los clústeres observados presentan muy poca variabilidad en tamaño (véase la Figura 3.4 (b)), lo que apoya la hipótesis de la nucleación instantánea del sistema. Combinando las ecuaciones (3.4), (3.8) y (3.9) y escribiendo en la Ec. (3.7)  $V_c$  en lugar de  $V_d$ , se puede estimar el módulo de rigidez como:

$$G \sim kT \left( \frac{w}{\sigma} \right)^\xi \frac{\varphi_o}{\varphi_d} \left( \frac{\varphi_o}{v_p} + \frac{\varphi_f}{v_f} \right) + G_o \quad \text{Ec. (3.10)}$$

donde  $G_o$  es el módulo de rigidez del hidrogel puro (sin NPM), teniendo en cuenta que incluso en ausencia de partículas las fibras de fibrina ya están entrecruzadas.

A partir de los datos experimentales, se puede estimar que: el volumen del fibrinógeno es  $v_f \sim 10^8 \text{ nm}^3$ , la fracción de volumen de fibrinógeno es  $\phi_f \sim 0,1 - 0,2 \%$  y el volumen medio de una partícula magnética MagP-OH<sup>®</sup> es  $v_p \sim 10^6 \text{ nm}^3$ . Así, para los hidrogeles estudiados con una fracción de volumen de partículas  $\varphi_o \geq 0,1 \%$ , se cumple la siguiente desigualdad:

$$\frac{\varphi_o}{v_p} \gg \frac{\varphi_f}{v_f} \quad \text{Ec. (3.11)}$$

En consecuencia, la Ec. (3.10) se puede escribir como:

$$G \sim A\varphi_o^2 + G_o \quad \text{Ec. (3.12)}$$

donde  $A = kT \left( \frac{w}{\sigma} \right)^\xi \frac{\xi}{\varphi_d v_p}$

Finalmente, a partir de los datos experimentales se puede estimar el parámetro  $A$ . Por ejemplo, para  $\varphi_o = 0,4 \%$ , tenemos que  $A \approx 4 \times 10^7 \text{ Pa}$ . De igual modo, podemos estimar los valores de los otros parámetros ajustables:  $w \sim 10^{-16} \text{ J}$ ,  $\xi \sim 10^{13} \text{ m}^{-2}$ , valores que son razonables desde el punto de vista físico. En la Figura 3.6 se muestra una

comparación de los resultados experimentales con lo que predice este modelo teórico. Como se puede ver, existe un buen acuerdo entre los resultados experimentales y lo que predice la Ec. (3.12).

Este modelo explica, al menos de forma semicuantitativa, los resultados experimentales y valida la hipótesis de partida, esto es: la existencia de clústeres densos formados por NPM y fibrinógeno que, como nudos en una red, determinan las propiedades mecánicas de los hidrogeles magnéticos, que no se corresponden con las de una simple mezcla de fibras y partículas esféricas sin interacción mutua.

### 3.5 Conclusiones

La incorporación de NPM, funcionalizadas con una capa polimérica que porta grupos OH<sup>-</sup>, a una mezcla de plasma humano y cloruro de calcio da lugar a un hidrogel magnético, al cabo de 24 h de gelificación a 37 °C.

Los geles con una fracción de volumen de NPM inferior al 0,5 %, son macroscópicamente homogéneos y las nanopartículas están embebidas en la red polimérica de fibrina.

Los ferrogeles poseen una porosidad muy elevada y tienen una gran capacidad de hidratación. Cuando el ferrogel contiene una fracción de volumen en el intervalo 0,1 - 0,2 % de NPM, se obtiene una red polimérica con una capacidad de hidratación mayor que la de un hidrogel no magnético y también mayor que en ferrogeles con mayor concentración de NPM. Las observaciones microscópicas sugieren que las nanopartículas forman clústeres que actúan como nudos para el entrecruzamiento de las fibras de fibrina.

Los hidrogeles magnéticos presentan una respuesta mecánica reforzada en comparación con la de los hidrogeles no magnéticos, lo que se refleja en mayores valores del módulo de rigidez y de los módulos viscoelásticos. De hecho, los valores de los módulos mecánicos obtenidos para un hidrogel preparado con un 0,4 % en volumen de NPM, son casi dos órdenes de magnitud mayores que los obtenidos en hidrogeles sin NPM. Se ha demostrado que el tiempo necesario para alcanzar el punto de gelificación, disminuye al aumentar la concentración de NPM.

El reforzamiento de las propiedades mecánicas de los geles magnéticos, respecto a los no magnéticos, está relacionado principalmente del modo en que las nanopartículas se integran dentro de la microestructura de la red polimérica. En esta, las NPM actúan como entrecruzadores por atracción entre los grupos negativos presentes en la superficie de las partículas y los grupos positivos de las moléculas de fibrinógeno.



Se ha desarrollado un modelo teórico basado en esta hipótesis (las NPM son nudos de una red de hilos de fibrina) que predice de forma semicuantitativa los valores experimentales del módulo de rigidez. Este modelo, que explica la dependencia cuadrática entre el módulo de rigidez y la concentración de NPM, se basa en la interacción entre las moléculas de fibrinógeno y las NPM. Dicha interacción da lugar a la formación de una fase más densa, en el medio que solo contiene fibras de fibrina, que contiene clústeres formados por agregados de partículas y fibrinógeno. La formación de estos clústeres se puede explicar como resultado de la condensación en un medio sobresaturado con dos componentes (NPM y fibrinógeno). Cuando la polimerización del fibrinógeno en disolución termina, los clústeres actúan como nudos entrelazados en una red de hilos de fibrina. Esto justifica que los valores del módulo de rigidez de los hidrogeles magnéticos sean mucho mayores que los esperables para una simple mezcla de partículas esféricas y fibras.

Se ha demostrado que los hidrogeles magnéticos presentan una adecuada biocompatibilidad *ex vivo* e *in vivo*. La presencia de NPM no altera la viabilidad celular, lo que confirma el potencial de este tipo de geles bio-nano-compuestos para aplicaciones *in vivo* como sustitutivos artificiales de tejidos biológicos.

En resumen, en este capítulo, se especifican los requisitos para la preparación de hidrogeles nanocompuestos y se ha propuesto una teoría que explica sus principales propiedades físicas: elevada porosidad, alto grado de hidratación y viscoelasticidad. Estas propiedades, junto con su biocompatibilidad, dotan a los hidrogeles con nanopartículas funcionalizadas de una amplia variedad de posibles aplicaciones biomédicas. Es de esperar que los resultados de este trabajo sean de ayuda para la generación de otros sistemas similares, así como para concebir nuevas aplicaciones.

### 3.6 Bibliografía

1. G. D. Nicodemus and S. J. Bryant, *Tissue Engineering Part B-Reviews*, 2008, **14**, 149-165.
2. S. Ladet, L. David and A. Domard, *Nature*, 2008, **452**, 76-79.
3. A. Atala, S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo and A. B. Retik, *Lancet*, 2006, **367**, 1241-1246.
4. N. Boucard, C. Viton, D. Agay, E. Mari, T. Roger, Y. Chancerelle and A. Domard, *Biomaterials*, 2007, **28**, 3478-3488.
5. I. A. Rodriguez, M. T. Lopez-Lopez, A. C. X. Oliveira, M. C. Sanchez-Quevedo, A. Campos, M. Alaminos and J. D. G. Duran, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2012, **6**, 636-644.
6. V. Carriel, J. Garrido-Gomez, P. Hernandez-Cortes, I. Garzon, S. Garcia-Garcia, J. Antonio Saez-Moreno, M. del Carmen Sanchez-Quevedo, A. Campos and M. Alaminos, *Journal of Neural Engineering*, 2013, **10**, 026022.

7. L. Garcia-Martinez, F. Campos, C. Godoy-Guzman, M. del Carmen Sanchez-Quevedo, I. Garzon, M. Alaminos, A. Campos and V. Carriel, *Histochemistry and Cell Biology*, 2017, **147**, 83-95.
8. R. Langer, *Science*, 1990, **249**, 1527-1533.
9. S. Mitragotri and J. Lahann, *Nature Materials*, 2009, **8**, 15-23.
10. N. W. Choi, M. Cabodi, B. Held, J. P. Gleghorn, L. J. Bonassar and A. D. Stroock, *Nature Materials*, 2007, **6**, 908-915.
11. S. Aktas, D. M. Kalyon, B. M. Marin-Santibanez and J. Perez-Gonzalez, *Journal of Rheology*, 2014, **58**, 513-535.
12. P. C. Nalam, N. N. Gosvami, M. A. Caporizzo, R. J. Composto and R. W. Carpick, *Soft Matter*, 2015, **11**, 8165-8178.
13. V. Adibnia and R. J. Hill, *Journal of Rheology*, 2016, **60**, 541-548.
14. D. Bonn and M. M. Denn, *Science*, 2009, **324**, 1401-1402.
15. J. M. Piau, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 2007, **144**, 1-29.
16. D. Calvet, J. Y. Wong and S. Giasson, *Macromolecules*, 2004, **37**, 7762-7771.
17. J. Cho, M.-C. Heuzey and M. Hamdine, *Macromolecular Materials and Engineering*, 2007, **292**, 571-581.
18. D. J. Curtis, A. Holder, N. Badieli, J. Claypole, M. Walters, B. Thomas, M. Barrow, D. Deganello, M. R. Brown, P. R. Williams and K. Hawkins, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 2015, **222**, 253-259.
19. M. Rubinstein and R. H. Colby, *Polymer Physics*, Oxford University, New York, NY, 2003.
20. H. H. Winter and F. Chambon, *Journal of Rheology*, 1986, **30**, 367-382.
21. H. H. Winter, *Polymer Engineering and Science*, 1987, **27**, 1698-1702.
22. F. Chambon and H. H. Winter, *Journal of Rheology*, 1987, **31**, 683-697.
23. E. E. Holly, S. K. Venkataraman, F. Chambon and H. H. Winter, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 1988, **27**, 17-26.
24. K. Hawkins, A. Lawrence, P. R. Williams and R. L. Williams, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 2008, **148**, 127-133.
25. E. Ghiringhelli, D. Roux, D. Bleses, H. Galliard and F. Caton, *Rheologica Acta*, 2012, **51**, 413-420.
26. Y. Li, G. Huang, X. Zhang, B. Li, Y. Chen, T. Lu, T. J. Lu and F. Xu, *Advanced Functional Materials*, 2013, **23**, 660-672.
27. M. T. Lopez-Lopez, G. Scionti, A. C. Oliveira, J. D. G. Duran, A. Campos, M. Alaminos and I. A. Rodriguez, *Plos One*, 2015, **10**, e0133878.

28. J. I. Kim, C. Chun, B. Kim, J. M. Hong, J.-K. Cho, S. H. Lee and S.-C. Song, *Biomaterials*, 2012, **33**, 218-224.
29. L. Rodriguez-Arco, I. A. Rodriguez, V. Carriel, A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, P. Kuzhir, J. D. G. Duran and M. T. Lopez-Lopez, *Nanoscale*, 2016, **8**, 8138-8150.
30. M. T. Lopez-Lopez, I. A. Rodriguez, L. Rodriguez-Arco, V. Carriel, A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, A. Zubarev and J. D. G. Duran, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2017, **431**, 110-114.
31. M. Banobre-Lopez, Y. Pineiro-Redondo, R. De Santis, A. Gloria, L. Ambrosio, A. Tampieri, V. Dediu and J. Rivas, *Journal of Applied Physics*, 2011, **109**, 07B313.
32. N. Bock, A. Riminucci, C. Dionigi, A. Russo, A. Tampieri, E. Landi, V. A. Goranov, M. Marcacci and V. Dediu, *Acta Biomaterialia*, 2010, **6**, 786-796.
33. B. Das, M. Mandal, A. Upadhyay, P. Chattopadhyay and N. Karak, *Biomedical Materials*, 2013, **8**, 035003.
34. R. De Santis, A. Gloria, T. Russo, U. D'Amora, S. Zeppetelli, C. Dionigi, A. Sytcheva, T. Herrmannsdoerfer, V. Dediu and L. Ambrosio, *Journal of Applied Polymer Science*, 2011, **122**, 3599-3605.
35. A. Gloria, T. Russo, U. D'Amora, S. Zeppetelli, T. D'Alessandro, M. Sandri, M. Banobre-Lopez, Y. Pineiro-Redondo, M. Uhlarz, A. Tampieri, J. Rivas, T. Herrmannsdoerfer, V. A. Dediu, L. Ambrosio and R. De Santis, *Journal of the Royal Society Interface*, 2013, **10**, 20120833.
36. S.-H. Hu, T.-Y. Liu, C.-H. Tsai and S.-Y. Chen, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007, **310**, 2871-2873.
37. H. Hu, W. Jiang, F. Lan, X. Zeng, S. Ma, Y. Wu and Z. Gu, *RSC Advances*, 2013, **3**, 879-886.
38. K. Lai, W. Jiang, J. Z. Tang, Y. Wu, B. He, G. Wang and Z. Gu, *RSC Advances*, 2012, **2**, 13007-13017.
39. S. Panseri, C. Cunha, T. D'Alessandro, M. Sandri, G. Giavaresi, M. Marcacci, C. T. Hung and A. Tampieri, *Journal of Nanobiotechnology*, 2012, **10**, 32.
40. H. Skaat, O. Ziv-Polat, A. Shahar, D. Last, Y. Mardor and S. Margel, *Advanced Healthcare Materials*, 2012, **1**, 168-171.
41. A. Tampieri, E. Landi, F. Valentini, M. Sandri, T. D'Alessandro, V. Dediu and M. Marcacci, *Nanotechnology*, 2011, **22**, 015104.
42. A. Tampieri, T. D'Alessandro, M. Sandri, S. Sprio, E. Landi, L. Bertinetti, S. Panseri, G. Pepponi, J. Goettlicher, M. Banobre-Lopez and J. Rivas, *Acta Biomaterialia*, 2012, **8**, 843-851.

43. X.-B. Zeng, H. Hu, L.-Q. Xie, F. Lan, Y. Wu and Z.-W. Gu, *Journal of Inorganic Materials*, 2013, **28**, 79-84.
44. Y. Zhu, F. Shang, B. Li, Y. Dong, Y. Liu, M. R. Lohe, N. Hanagata and S. Kaskel, *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, **1**, 1279-1288.
45. O. Ziv-Polat, H. Skaat, A. Shahar and S. Margel, *International Journal of Nanomedicine*, 2012, **7**, 1259-1274.
46. R. K. Singh, K. D. Patel, J. H. Lee, E.-J. Lee, J.-H. Kim, T.-H. Kim and H.-W. Kim, *Plos One*, 2014, **9**, e91584.
47. X. B. Zeng, H. Hu, L. Q. Xie, F. Lan, W. Jiang, Y. Wu and Z. W. Gu, *International Journal of Nanomedicine*, 2012, **7**, 3365-3378.
48. H.-M. Yun, S.-J. Ahn, K.-R. Park, M.-J. Kim, J.-J. Kim, G.-Z. Jin, H.-W. Kim and E.-C. Kim, *Biomaterials*, 2016, **85**, 88-98.
49. R. M. Christensen, *Mechanics of Composite Materials*, Malabar:Krieger Publishing Company, 1991.
50. M. Alaminos, M. D. Sanchez-Quevedo, J. I. Munoz-Avila, D. Serrano, S. Medialdea, I. Carreras and A. Campos, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, **47**, 3311-3317.
51. R. Messing, N. Frickel, L. Belkoura, R. Strey, H. Rahn, S. Odenbach and A. M. Schmidt, *Macromolecules*, 2011, **44**, 2990-2999.
52. T. Lang, K. Johanning, H. Metzler, S. Piepenbrock, C. Solomon, N. Rahe-Meyer and K. A. Tanaka, *Anesthesia and Analgesia*, 2009, **108**, 751-758.
53. H. Fischer, I. Polikarpov and A. F. Craievich, *Protein Science*, 2004, **13**, 2825-2828.
54. V. Carriel, G. Scionti, F. Campos, O. Roda, B. Castro, M. Cornelissen, I. Garzón and M. Alaminos, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2017, **11**, 1412-1426.
55. V. Carriel, I. Garzon, J.-M. Jimenez, A.-C.-X. Oliveira, S. Arias-Santiago, A. Campos, M.-C. Sanchez-Quevedo and M. Alaminos, *Cells Tissues Organs*, 2012, **196**, 1-12.
56. V. Carriel, I. Garzón, A. Campos, M. Cornelissen and M. Alaminos, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2017, **11**, 553-563.
57. F. Campos, A. B. Bonhome-Espinosa, L. Garcia-Martinez, J. D. G. Duran, M. T. Lopez-Lopez, M. Alaminos, M. C. Sanchez-Quevedo and V. Carriel, *Biomedical Materials*, 2016, **11**, 055004.
58. M. A. Martin-Piedra, I. Garzon, A. C. Oliveira, C. A. Alfonso-Rodriguez, V. Carriel, G. Scionti and M. Alaminos, *Cytotherapy*, 2014, **16**, 266-277.
59. R. G. Larson, *The Structure and Rheology of Complex Fluids*, Oxford University Press, New York, 1999.
60. T. Mitsumata, A. Honda, H. Kanazawa and M. Kawai, *Journal of Physical Chemistry B*, 2012, **116**, 12341-12348.

61. I. Agirre-Olabide, M. J. Elejabarrieta and M. M. Bou-Ali, *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, 2015, **26**, 1880-1886.
62. N. M. Wereley, A. Chaudhuri, J. H. Yoo, S. John, S. Kotha, A. Suggs, R. Radhakrishnan, B. J. Love and T. S. Sudarshan, *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, 2006, **17**, 393-401.
63. E. Moghimi, A. R. Jacob, N. Koumakis and G. Petekidis, *Soft Matter*, 2017, **13**, 2371-2383.
64. C. W. Macosko, *Rheology: Principles, Measurements and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 1994.
65. A. V. Bychkova, O. N. Sorokina, A. L. Kovarski, A. B. Shapiro, V. B. Leonova and M. A. Rosenfeld, *Biofizika*, 2010, **55**, 605-611.
66. H. C. F. Cote, S. T. Lord and K. P. Pratt, *Blood*, 1998, **92**, 2195-2212.
67. P. Zeliszewska, A. Bratek-Skicki, Z. Adamczyk and M. Ciesla, *Langmuir*, 2014, **30**, 11165-11174.
68. G. Hudryclergeon, G. Marguerie, L. Pouit and M. Suscillon, *Thrombosis Research*, 1975, **6**, 533-541.
69. M. W. Mosesson, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2005, **3**, 1894-1904.
70. N. Hassan, V. Verdinelli, J. M. Ruso and P. V. Messina, *Soft Matter*, 2012, **8**, 6582-6592.
71. E. A. G. Kalaf, R. Flores, J. G. Bledsoe and S. A. Sell, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2016, **63**, 198-210.
72. A. Grosberg and A. Khokhlov, *Statistical Physics of Macromolecules*, Springer, Berlin, 1994.
73. M. A. Rodriguez, M. T. Lopez-Lopez, J. D. G. Duran, M. Alaminos, A. Campos and I. A. Rodriguez, *Cryobiology*, 2013, **67**, 355-362.
74. R. W. Chan and I. R. Titze, *Journal of the Acoustical Society of America*, 1999, **106**, 2008-2021.
75. L. P. Pitaevskii and E. M. Lifshits, *Physical Kinetics*, Butterworth-Heinemann, 1999.



# Capítulo 4

Hidrogeles sustitutivos de cartílago.  
Reología y Biocompatibilidad *ex vivo*

### **RESUMEN**

En este capítulo se describe la preparación de tejidos substitutivos de cartílago mediante el cultivo de condrocitos en matrices poliméricas de fibrina-agarosa. Se han preparado biomateriales celulares y acelulares, que a su vez contienen o no nanopartículas magnéticas, con objeto de determinar el efecto de la presencia de células y de las nanopartículas magnéticas sobre las propiedades mecánicas de los biomateriales compuestos resultantes. A continuación, se ha evaluado la biocompatibilidad de los biomateriales mediante ensayos de citotoxicidad y de proliferación celular. En último lugar, se ha realizado un análisis histológico de los biomateriales utilizando técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas. Estas técnicas permiten observar la evolución morfológica de las células en las matrices poliméricas no magnéticas y magnéticas y, además, determinar la expresión de los compuestos presentes mayoritariamente en la matriz cartilaginosa, tales como colágeno tipo II y proteoglicanos. Los resultados obtenidos demuestran que la incorporación de nanopartículas magnéticas no tiene efectos negativos sobre la biocompatibilidad intrínseca de los biomateriales generados



## 4.1 Introducción

El cartílago hialino es un tejido conectivo avascular que se caracteriza por tener una abundante matriz extracelular compuesta principalmente por colágeno tipo II y proteoglicanos.<sup>1, 2, 3</sup> En el sistema músculo-esquelético, el cartílago hialino se encuentra formando dos estructuras especializadas asociadas a los huesos largos: el cartílago articular y el cartílago de crecimiento.<sup>2, 4</sup> Su acción en dicho sistema hace que el cartílago hialino esté habitualmente expuesto a cargas mecánicas que influyen tanto en la regulación fisiológica del comportamiento de los condrocitos como en el desarrollo de multitud de procesos patológicos. De ahí que se pueda decir que los condrocitos sienten y responden a cargas mecánicas.<sup>3, 5-7</sup>

La ausencia de vascularización hace que el cartílago presente muy poca capacidad de reparación espontánea. Además, es un tejido propenso a dañarse por traumas o por degeneración dando lugar a enfermedades tan importantes como la osteoartritis.<sup>1</sup> En la bibliografía se recoge que más del 60 % de los pacientes jóvenes sometidos a procedimientos artroscópicos presentan lesiones en el cartílago articular.<sup>8, 9</sup> De lo anterior, se deriva el impacto sanitario que pueden tener las técnicas que faciliten la reparación o la regeneración del cartílago articular.

Actualmente, existen dos alternativas para tratar daños en el cartílago. La primera de ellas consiste en estimular la (débil) capacidad regenerativa intrínseca del cartílago mediante la migración de células madre mesenquimales a la zona donde se ha producido el defecto, generando un fibrocartílago que sin embargo es menos resistente que el cartílago hialino.<sup>10</sup> La segunda alternativa es conseguir una reparación biológica a través de la implantación de un cartílago hialino generado mediante ingeniería tisular. En este capítulo, nos vamos a centrar en esta segunda alternativa, combinando los principios de la ingeniería y la biología para desarrollar un sustituto biológico capaz de reproducir las propiedades de la matriz extracelular del cartílago nativo. En general, la matriz artificial elegida deberá tener una serie de propiedades tales como: permitir una buena difusión de nutrientes y metabolitos (alto contenido en agua, estructura 3-D porosa), adherencia adecuada a la zona afectada, una tasa de degradación adecuada y propiedades biomecánicas semejantes a las del cartílago nativo.<sup>11, 12</sup>

Se han estudiado varios tipos de biomateriales, como por ejemplo quitosano y ácido hialurónico, para encapsular condrocitos y obtener cartílago artificial.<sup>13, 14</sup> En el trabajo que se presenta en este capítulo, siguiendo la línea de investigación desarrollada hasta el momento, se propone como alternativa el empleo de hidrogeles de fibrina-agarosa. Este biomaterial ha dado muy buenos resultados para generar otros

tipos de tejidos como córnea, mucosa oral y piel.<sup>15-17</sup> Además, en trabajos previos habíamos comprobado que, en los hidrogeles compuestos por fibrina-agarosa y nanopartículas magnéticas (NPM), se pueden regular las propiedades mecánicas del biomaterial por aplicación de campos magnéticos. Esto parece muy conveniente para generar tejidos como el cartílago, ya que se podría endurecer según las necesidades del cartílago nativo a sustituir. Por último, se ha demostrado en trabajos previos que la presencia de material magnético mejora la eficiencia del cultivo celular de algunos tipos de células como los fibroblastos,<sup>18</sup> lo que confiere una ventaja doble a estos materiales compuestos que incorporan NPM.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, este capítulo se centra en la encapsulación de condrocitos dentro de matrices poliméricas de fibrina-agarosa con NPM con un doble objetivo. Primero, estudiar cómo influye la presencia de condrocitos y NPM en las propiedades mecánicas de los hidrogeles de fibrina-agarosa. En segundo lugar, comprobar si la presencia de NPM influye de manera positiva o negativa en la proliferación y daño celular y, al mismo tiempo, determinar si los condrocitos son capaces de expresar las proteínas presentes en un cartílago nativo.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Diseño experimental

Se trabajó con 4 grupos experimentales de tejidos artificiales: (i) hidrogeles de fibrina-agarosa sin células o acelulares (HFA-A); (ii) hidrogeles de fibrina-agarosa con células o celulares (HFA-C); (iii) hidrogeles de fibrina-agarosa con partículas magnéticas y acelulares (HFA-PM-A); (iv) hidrogeles de fibrina-agarosa con partículas magnéticas y celulares (HFA-PM-C).

Se midió la evolución temporal de las propiedades reológicas de los 4 grupos experimentales a los 2, 16 y 30 días de su preparación.

El estudio de biocompatibilidad *ex vivo* se llevó a cabo para los grupos HFA-C y HFA-PM-C mediante ensayos de liberación de ADN, citotoxicidad celular WST-1 y análisis histológicos empleando técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas. Los ensayos se realizaron a los 2, 9, 16 y 30 días de la preparación de los biomateriales.

Dada la excelente biocompatibilidad, los hidrogeles HFA-A y HFA-C se emplearon como grupo control acelular y celular, respectivamente.<sup>17,19</sup>

### 4.2.2 Cultivo celular de condrocitos: aislamiento y expansión

En este estudio se emplearon condrocitos humanos derivados de cartílago hialino (CHDCH). Las células se aislaron de la biopsia de dos donantes sanos, sometidos a una cirugía nasal menor, siguiendo el procedimiento experimental descrito en trabajos anteriores.<sup>20, 21</sup>

Las muestras de tejido se fragmentaron mecánicamente y se sometieron a una digestión enzimática empleando colagenasa tipo II de *Clostridium histolyticum* con una concentración de 2 mg·mL<sup>-1</sup> (Gibco BRL Life Sciences Technologies) a 37 °C. A la mañana siguiente, se recuperaron las células mediante centrifugación y se cultivaron en un medio de expansión (ME) compuesto por DMEM/F-12 (GIBCO) suplementado con un 10 % en volumen de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich, EE. UU.), más 1 % en volumen de una solución de antibióticos y antimicóticos (penicilina 100 U·mL<sup>-1</sup>, estreptomycin 100 mg·mL<sup>-1</sup> y anfotericina B 0,25 mg·mL<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich, EE. UU.), y con L-glutamina hasta una concentración final 2 mM (Sigma-Aldrich, EE. UU.).

Los condrocitos se incubaron a 37 °C en una atmósfera con el 5 % de CO<sub>2</sub>. Se cambió el medio de expansión cada tres días. Además, los condrocitos se expandieron con tripsina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) hasta pase 6 para la generación de tejidos artificiales.

### 4.2.3 Preparación de tejidos artificiales de fibrina-agarosa

Como se ha mencionado en el apartado 4.2.1, se obtendrán 4 hidrogeles diferentes denominados HFA-A, HFA-C, HFA-PM-A e HFA-PM-C.

Para preparar los hidrogeles de HFA-C, se siguió el procedimiento que describimos a continuación.<sup>19</sup> Para obtener un volumen total de 20 mL de mezcla pre-gel, se mezclaron 15,2 mL de plasma humano (suministrado por el Biobanco de Granada, Junta de Andalucía); 2,5 mL de suspensión de CHDCH de pase 6 en medio condrogénico y 300 µL de ácido tranexámico (amchafibrin, Fides-Ecofarma, Valencia) para prevenir la fibrinólisis del hidrogel. Esta mezcla se agitó con cuidado para obtener una solución homogénea. A continuación se añadieron: 1 mL de CaCl<sub>2</sub> al 2 % peso/volumen y 1 mL de disolución acuosa de agarosa tipo VII (Sigma-Aldrich, EE. UU.) al 2 % en peso/volumen. De este modo, se obtuvieron hidrogeles celulares de fibrina-agarosa con el 0,1 % en peso/volumen de agarosa tipo VII. La densidad celular de los hidrogeles resultantes era de 5 × 10<sup>4</sup> CHDCH·mL<sup>-1</sup>.

Para preparar los HFA-PM-C, se usó el mismo protocolo con la siguiente modificación. En lugar de utilizar los 2,5 mL de suspensión de CHDCH, como se describe

en el párrafo anterior, se utilizó 1,5 mL de suspensión de CHDCH en medio condrogénico y con el volumen restante (1 mL) se preparó una suspensión de nanopartículas magnéticas MagP-OH<sup>®</sup> (NanoMyp<sup>®</sup>, España) en medio condrogénico. En este caso, se obtuvieron hidrogeles celulares de fibrina con el 0,1 % en peso/volumen de agarosa tipo VII y 0,1 % en volumen de nanopartículas magnéticas MagP-OH<sup>®</sup>. En el capítulo 3 de esta tesis se describen con detalle las características de las partículas MagP-OH<sup>®</sup>.

Para preparar los HFA-A y HFA-PM-A, se modificaron los procedimientos experimentales anteriores, suprimiendo la adición de CHDCH.

Todos los hidrogeles preparados, tanto celulares como acelulares, se mantuvieron bajo condiciones de cultivo (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) con medio condrogénico (MC) durante todo el tiempo que duraron los ensayos. El medio de cultivo se cambió tres veces por semana.

Dicho medio condrogénico estaba compuesto por DMEM/F-12, suplementado con el 0,1 % en volumen de solución de antibióticos; 2 mM de piruvato de sodio, GIBCO; 0,1 % en volumen de ITS (*insulin-transferrine-sodium selenite*); 4 μM de ácido ascórbico; 10 ng·mL<sup>-1</sup> de TGF-β1 (*transforming growth factor-β1 human*); 10 μM de dexametasona; y 0,35 mM de L-prolina. Todos estos reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich, EE.UU.

#### 4.2.4 Caracterización reológica de los hidrogeles

Se midieron las propiedades mecánicas de los hidrogeles de los 4 grupos experimentales en un reómetro de esfuerzo controlado Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a 37 °C. Los hidrogeles destinados a las medidas reológicas se prepararon en placas de 6 pocillos con un diámetro de 3,5 cm. La geometría de medida usada fue de platos paralelos de titanio con 3,5 cm de diámetro y de superficie rugosa para evitar el deslizamiento en las superficies de medida (sensor P35Ti L, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para transferir cada una de las muestras al plato inferior del reómetro se usó una espátula de plástico para despegar el biomaterial de la placa sin romperlo y depositarlo en el plato. Para asegurarnos que el plato superior realmente tocaba la muestra (y no sólo la capa de agua que se encontraba en la superficie superior del hidrogel), este se bajó lentamente hasta que la fuerza normal ejercida sobre el plato rotor tenía un valor comprendido entre 0,25 y 1,0 N, asegurándonos así que la compresión ejercida sobre la muestra era muy débil. El volumen de mezcla pre-gel empleado para la preparación de cada una de las muestras fue de 3 mL.

Para caracterizar las propiedades mecánicas de los 4 grupos experimentales, se estudió el comportamiento de los hidrogeles bajo cizalla oscilatoria. Se hicieron dos tipos de ensayos:

- (i) *Barridos de amplitud.* En este caso se fijó la frecuencia de la deformación de cizalla sinusoidal en 1 Hz. La amplitud de la deformación ( $\gamma_0$ ) se incrementó logarítmicamente espaciada en el intervalo que va desde  $\gamma_0 = 1 \times 10^{-4}$  hasta  $\gamma_0 = 2,0$ . Este ensayo nos permitió acotar la zona viscoelástica lineal (ZVL).
- (ii) *Barridos de frecuencia.* En este caso se fijó el valor de la amplitud de la deformación en  $\gamma_0 = 0,001$  (dentro de la ZVL) y la frecuencia se incrementó linealmente espaciada en el intervalo 0 - 10 Hz.

#### 4.2.5 Ensayos de citotoxicidad celular

Para evaluar la citotoxicidad *ex vivo* de los condrocitos, derivada de la inclusión de nanopartículas magnéticas MagP-OH en las matrices poliméricas de fibrina-agarosa, se realizaron dos ensayos fundamentales que se describen a continuación.

##### 4.2.5.1 Ensayo de proliferación celular WST-1

Para medir la viabilidad y proliferación celular en función del tiempo de cultivo (2, 9, 16 y 30 días) de los 4 grupos experimentales estudiados, se empleó el método colorimétrico de la sal de tetrazolio (*Cell Proliferation Reagent WST-1, water-soluble tetrazolium salt-1*, Roche Diagnostic). Este ensayo se basa en la reducción de la sal de tetrazolio a formazán (Figura 4.1), por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células con capacidad de división.

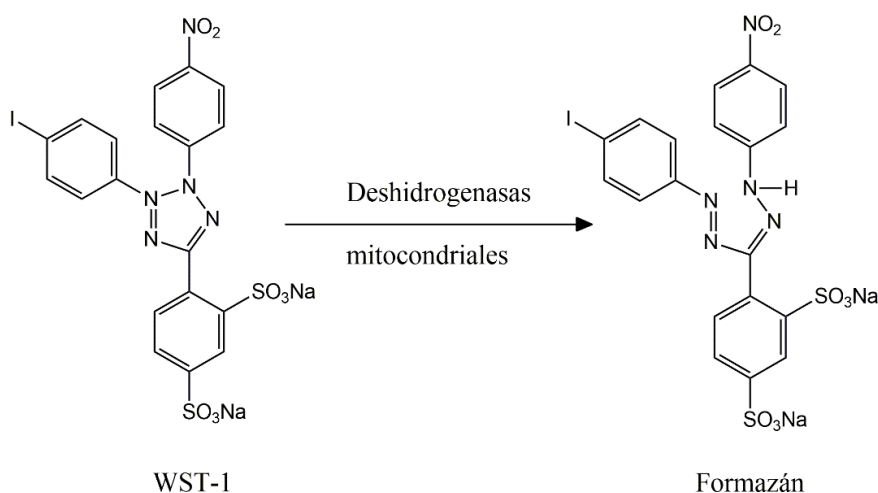


Figura 4.1. Estructura química de la sal de tetrazolio (WST-1) y de su forma reducida (formazán) producida por acción de las deshidrogenasas mitocondriales. La mayor actividad de estas enzimas indica una proliferación celular más intensa.

El formazán generado (de color amarillo oscuro) se detecta mediante espectrofotometría a una longitud de onda entre 420–480 nm. El grado de proliferación celular es proporcional a la absorbancia medida. En estos ensayos se emplearon 4 réplicas por grupo y tiempo. Una de las réplicas se incubó con tritón al 2 % en volumen y se usó como control negativo. De cada una de las réplicas se obtuvieron tres alícuotas en las que se midió la absorbancia.

#### **4.2.5.2 Ensayo de liberación de ADN**

Para evaluar el daño de la membrana nuclear se realizó una cuantificación del ADN liberado al medio extracelular mediante espectrofotometría (SmarttSpec™ Plus, Bio-Rad Hercules CA, EE. UU.) a una longitud de onda de 260 - 280 nm. Este ensayo se realizó cada vez que se cambiaba el medio condrogénico. Para cada grupo y tiempo se usaron 5 réplicas, además de un control negativo que se realizó igualmente incubando otras 3 réplicas con tritón al 2 % en volumen.

#### **4.2.6 Análisis histológico**

Las muestras correspondientes a tiempos de cultivo de 2, 9, 16 y 30 días, de los grupos HFA-C y HFA-PM-C, se fijaron durante 72 h en una disolución al 10 % de formalina tamponada, a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 5 µm de espesor. Con las secciones histológicas así obtenidas, una vez desparafinadas y deshidratadas, se realizaron los ensayos histoquímicos e inmunohistoquímicos que se describen a continuación.

##### **4.2.6.1 Ensayos histoquímicos**

Se utilizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) para realizar una evaluación morfológica y determinar la celularidad en cada uno de los grupos experimentales. Este método se basa en el carácter básico de la hematoxilina para teñir, en color azul y púrpura, estructuras ácidas como los núcleos celulares y, al mismo tiempo, en el carácter ácido de la eosina para teñir en tonos rosa los componentes básicos, como por ejemplo el citoplasma celular.

Además, se empleó el método Azul de Alcian, para la identificación de proteoglicanos en la matriz extracelular, ya que los condrocitos generan una compleja matriz extracelular en cuya composición se encuentran, entre otras moléculas, proteoglicanos y colágeno mayoritariamente. Este colorante es de carácter básico y está compuesto por una serie de isómeros de tetrametil tioisouronio que tiñen los carbohidratos en color azul debido al cobre que posee la molécula. Para realizar el contraste se

utilizó el colorante “*nuclear fast red*”, con sulfato de aluminio que actúa como mordiente, marcando selectivamente la cromatina nuclear en rojo y proporcionando una tinción inespecífica de tejidos de fondo en rosa.

Por último, para identificar las nanopartículas magnéticas (MagP-OH<sup>®</sup>) todas las muestras se tiñeron con el método Perl's. Esta técnica permite detectar iones de hierro presentes en compuestos insolubles, basándose en la reacción de iones férricos (liberados por la acción de una solución de ácido clorhídrico) con ferrocianuro de potasio formando un precipitado de color azul, conocido como Azul de Prusia (ferrocianuro férrico). Para contrastarla se usó H&E.

#### **4.2.6.2 Ensayos inmunohistoquímicos**

Se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico para detectar la proteína S-100 que está presente en los condrocitos y se usa como marcador de estos. Para ello, se trataron los cortes histológicos con tampón citrato (pH = 6) durante 25 min y a 95 °C. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario policlonal anti-S100 de conejo (*rabbit anti-S100 polyclonal*, Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca), a una dilución de 1:400, durante 1 hora.

Para detectar la presencia de colágeno tipo II, se realizó un pretratamiento de los cortes histológicos usando tampón EDTA (ácido etilendiaminotetraacético; pH = 8,) durante 25 min y a 95 °C. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario policlonal anti-colágeno tipo II (*Rabbit anti-collagen II polyclonal*, EDM Millipore, Billerica, Massachusetts, EE. UU.), a una dilución de 1:250, durante una noche a 4 °C.

Para revelar las reacciones inmunohistoquímicas, se empleó un anticuerpo conjugado covalentemente con una molécula de 3,3-diaminobencidina (DAB) que se unió de manera específica a los anticuerpos primarios empleados. Finalmente, al añadir una disolución de peróxido de hidrógeno, la enzima peroxidasa oxida la DAB produciendo un precipitado de color marrón oscuro.

#### **4.2.7 Declaración ética**

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Granada. Cada donante del tejido necesario para obtener un cultivo de condrocitos firmó el correspondiente consentimiento informado.

## 4.3 Resultados y discusión

### 4.3.1 Cultivo celular de condrocitos

Se empleó el medio de expansión (ME, descrito en el apartado 4.2.2) para realizar la expansión de los condrocitos desde un cultivo primario hasta pase 6. No se avanzó en la expansión a posteriores pases de cultivo para evitar que los condrocitos perdiesen su diferenciación. En la Figura 4.2 (a) se muestra una imagen de microscopía del cultivo primario de condrocitos. En general, se observan células con una morfología alargada debido a que estas se encuentran confluentes, no pudiéndose observar la morfología típica. Sin embargo, una vez que se realiza la primera tripsinización (pase 1) podemos ver células con la morfología piramidal típica de los condrocitos – Figura 4.2 (b).

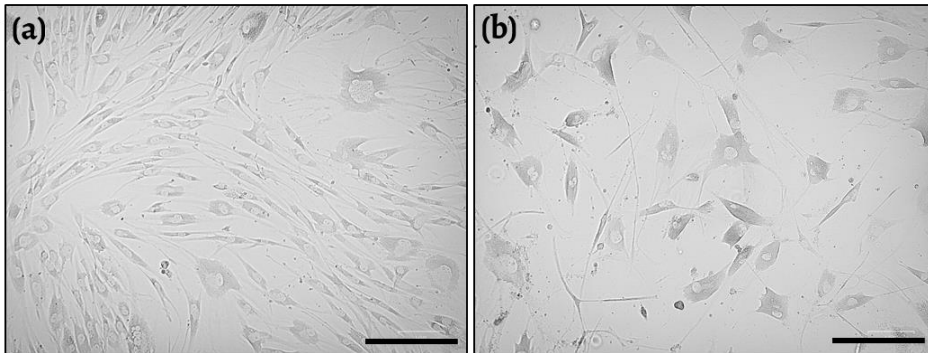


Figura 4.2. Imágenes de microscopía óptica de un cultivo primario de condrocitos (a) y un cultivo de condrocitos en pase 1 (b). Barra de escala 200  $\mu\text{m}$ .

### 4.3.2 Preparación de hidrogeles y tejidos en matriz de fibrina-agarosa

Como se mencionó en el apartado 4.2.3, se prepararon hidrogeles de fibrina-agarosa acelulares sin y con nanopartículas magnéticas MagP-OH<sup>®</sup>. Además, se incorporaron con éxito CHDCH a los hidrogeles de fibrina-agarosa tanto no magnéticos como magnéticos.

### 4.3.3 Caracterización reológica

El comportamiento reológico de los hidrogeles de fibrina-agarosa preparados (HFA-A, HFA-C, HFA-PM-A y HFA-PM-C) se caracterizó someténdolos a una deformación de cizalla oscilatoria. Para ello, se registró el esfuerzo que sufren los hidrogeles bajo una deformación de cizalla sinusoidal, con una frecuencia y amplitud determinadas.



i) *Barrido de amplitud.* El primer ensayo consistió en la deformación por cizalla oscilatoria con frecuencia constante (1 Hz) y una amplitud de deformación ( $\gamma_0$ ) creciente. Se obtuvieron los valores del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y del módulo de pérdidas ( $G''$ ) en función de  $\gamma_0$ . En la Figura 4.3 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos. En general, la forma de estas curvas es similar en los 4 grupos experimentales estudiados. Las curvas obtenidas mostraban valores de  $G'$  y  $G''$  aproximadamente constantes para valores pequeños de amplitud de deformación ( $\gamma_0 < 0,01$ ), observándose una leve tendencia decreciente para  $G'$  y creciente para  $G''$  al aumentar  $\gamma_0$ . Esta región de la curva es la zona viscoelástica lineal (ZVL). En la ZVL se obtienen valores de  $G'$  superiores a los valores de  $G''$  lo que indica que el material se comporta como un sólido viscoelástico para la frecuencia fijada de 1 Hz. A medida que aumenta  $\gamma_0$ , se observa como las curvas de  $G'$  y  $G''$  empiezan a converger, conforme se pasa a comportamiento viscoelástico no lineal, hasta que se cortan en un punto (deformación crítica) a partir del cual  $G'' > G'$ . Este hecho nos indica que la energía disipada por el sistema (proporcional a  $G''$ ) es mayor que la energía elástica almacenada (proporcional a  $G'$ ), lo que se puede atribuir a la ruptura de la estructura interna del hidrogel a escala microscópica.

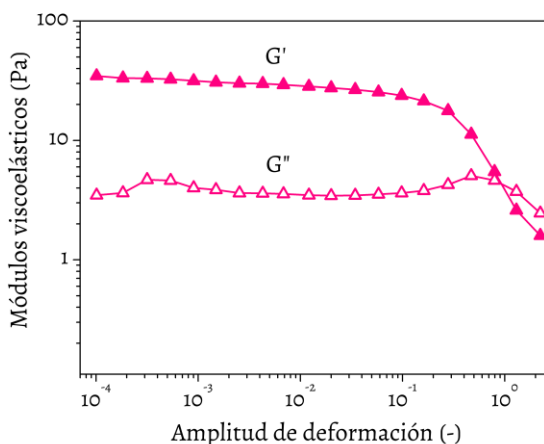


Figura 4.3. Módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y módulo de pérdidas ( $G''$ ) en función de la amplitud de deformación (a frecuencia constante de 1 Hz) para un hidrogel de fibrina-agarosa con condrocitos (HFA-C) a los 16 días de cultivo.

Para comparar la evolución temporal de los módulos viscoelásticos en los cuatro grupos experimentales (HFA-A, HFA-C, HFA-PM-A y HFA-PM-C), se tomó el promedio de los valores de  $G'$  y  $G''$  obtenidos en el intervalo de  $\gamma_0$  comprendido entre  $10^{-4}$  - 0,01, en el que todos los biomateriales presentaban comportamiento viscoelástico lineal con  $G'$  y  $G''$  prácticamente constantes.

En la Figura 4.4, se presentan los valores medios de  $G'$  y  $G''$  en función del tiempo para los cuatro grupos de hidrogeles estudiados. En el caso de los hidrogeles de fibrina-agarosa acelulares no magnéticos y magnéticos (Figura 4.4.a),  $G'$  y  $G''$  decrecen con el tiempo en ambos grupos, produciéndose la disminución más acentuada (sobre todo en  $G'$ ) entre 2 y 16 días. En contraste, para los hidrogeles de fibrina-agarosa celulares no magnéticos y magnéticos (Figura 4.4 (b)),  $G'$  y  $G''$  permanecen prácticamente constantes con el tiempo, observándose un progresivo y leve aumento en  $G'$  en el intervalo de tiempo medido (entre 2 y 30 días). Es importante destacar que:

(a) Aunque inicialmente (2 días) los hidrogeles acelulares presentan valores de los módulos viscoelásticos muy superiores a los de los hidrogeles celulares, en estos últimos se observa una estabilidad de las propiedades mecánicas que contrasta con la progresiva degradación mecánica de los hidrogeles que no contienen condrocitos.

(b) En los hidrogeles acelulares, la incorporación de partículas magnéticas (HFA-PM-A) da lugar a geles menos elásticos: se produce una disminución de los valores de  $G'$  al embeber las partículas en el gel. Sin embargo, en los hidrogeles celulares ocurre justamente lo contrario: los valores de  $G'$  en los hidrogeles con partículas magnéticas (HFA-PM-C) son un 35 % superiores que en los hidrogeles que no contienen partículas (HFA-C).

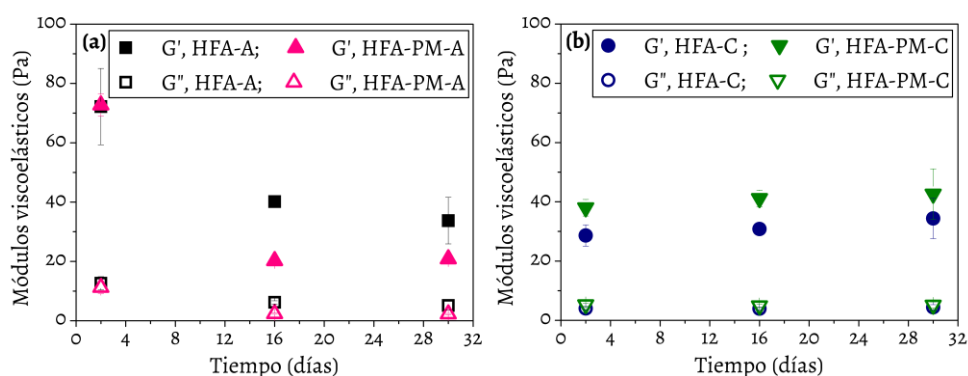


Figura 4.4. Módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y módulo de pérdidas ( $G''$ ), correspondientes a la zona viscoelástica lineal, en función del tiempo para: (a) hidrogeles de fibrina-agarosa acelulares no magnéticos (HFA-A) y magnéticos (HFA-PM-A); (b) hidrogeles de fibrina-agarosa celulares no magnéticos (HFA-C) y magnéticos (HFA-PM-C).

Para explicar a este hecho, que en principio parece contradictorio, se midieron los volúmenes de hidrogel contenido entre el plato rotor y el plato en reposo del reómetro para los 4 grupos experimentales. Recuérdese (apartado 4.2.4) que el hueco entre ambos platos se ajusta en cada caso para que la fuerza normal inicial ejercida

sobre los geles (entre 0,25 y 1,0 N) favorezca un buen contacto gel-platos y la (pequeña) compresión de la muestra sea similar en todas las muestras.

En la Figura 4.5 se representan las distancias entre platos (o gap, Figura 4.5 (a)) y los correspondientes volúmenes de los hidrogeles (Figura 4.5 (b)). En los hidrogeles acelulares se observa que los no magnéticos (HFA-A) presentan un volumen tres veces menor que los magnéticos (HFA-PM-C). Esto se debe, como se explicó en el capítulo 3, a que las partículas magnéticas forman nudos en la matriz polimérica dando lugar a una red más abierta con mayor capacidad de hinchamiento por absorción de agua. En cambio, para los hidrogeles celulares, se observa que los geles no magnéticos y los magnéticos (HFA-C y HFA-PM-C) presentan un volumen muy parecido. Esto quiere decir que la presencia de células impide el hinchamiento adicional que provoca la simple inclusión de partículas en el gel.

Hemos de recordar, como se explicó en el capítulo 1, que los hidrogeles son materiales que están compuestos casi en su totalidad por agua y que pequeñas diferencias en la proporción de agua pueden provocar cambios importantes en sus propiedades mecánicas. Se puede decir que los condrocitos determinan la estructura interna de estos biomateriales evitando su degradación en 30 días y, además, hacen que los hidrogeles no magnéticos y magnéticos posean una estructura con una capacidad de hinchamiento muy similar.

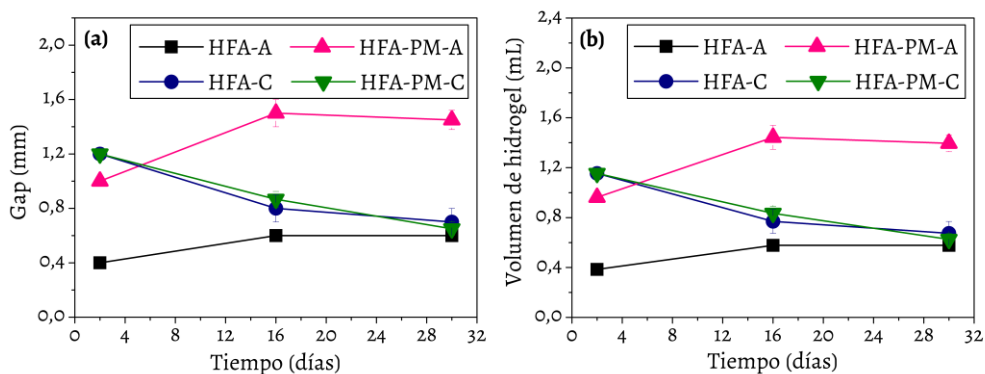


Figura 4.5. Distancia o gap plato-plato (a) y volumen contenido entre los dos platos del réómetro (b) en función del tiempo, para los hidrogeles que se indican.

ii) *Barrido de Frecuencia*. El segundo ensayo realizado consistió en aplicar una deformación oscilatoria con amplitud constante dentro de la ZVL ( $\gamma_0 = 0,001$ ), y frecuencia creciente en el rango entre 0 y 10 Hz. En la Figura 4.6 (a), se observa que  $G'$  va creciendo hasta que se alcanza una frecuencia de 2 Hz para los grupos experimentales HFA-A, HFA-C y HFA-PM-C. Sin embargo, para los hidrogeles HFA-PM-A esa

tendencia se mantiene solo hasta la frecuencia de 1 Hz. A partir de esos valores de frecuencia (2 Hz ó 1 Hz, según el caso), tiene lugar una ligera disminución en  $G'$  hasta los 4 Hz. Por encima de esta frecuencia, los resultados carecen de significado porque los efectos inerciales sobre la muestra ya no son despreciables como se supone implícitamente en la teoría de la viscoelasticidad lineal (véase una discusión sobre los efectos inerciales a altas frecuencias en Chan y Titze, 1999).<sup>22</sup>

La tendencia observada para  $G''$  (Figura 4.6. (b)) consiste, para todos los grupos, en un lento crecimiento hasta un valor de frecuencia de 1 Hz, seguido de una disminución hasta los 3 Hz y a partir de una frecuencia de 4 Hz se repite la situación comentada para  $G'$ . Por último, hay que destacar que, como ocurría en el barrido de amplitud a la frecuencia constante de 1 Hz, aquí también se tiene que los 4 tipos de materiales se comportan como sólidos viscoelásticos ( $G' > G''$ ) en todo el rango de frecuencia estudiado para el que los resultados son significativos (entre 0,1 y 4 Hz). También se confirma que en todo ese rango de frecuencia el hidrogel acelular con partículas (HFA-PM-A) es el menos elástico, mientras que los otros tres presentan propiedades mecánicas similares y propias de sólidos viscoelásticos blandos: su respuesta es predominantemente elástica con un módulo de almacenamiento (y módulo de rigidez complejo,  $G^*$ ) en torno a los 30 - 40 Pa.

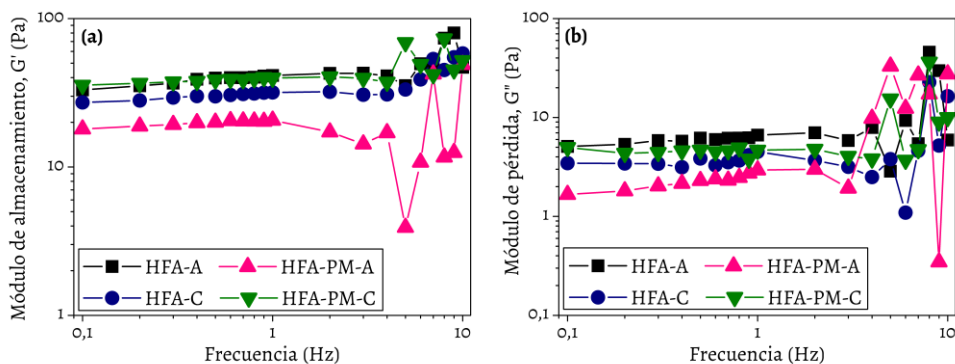


Figura 4.6. Módulo de almacenamiento (a) y módulo de pérdidas (b) en función de la frecuencia para los 4 grupos experimentales estudiados para un tiempo de 16 días.

Estos valores tan bajos del módulo rigidez complejo permitirían implantar fácilmente estos biomateriales, por ejemplo mediante inyección, pero son muy inferiores a los valores del módulo de rigidez ( $G$ ) correspondientes al cartílago articular humano; téngase en cuenta que  $G^*$  debe coincidir con  $G$  para una frecuencia de cizalla oscilatoria tendiente a cero. Stammen y cols. (2001) recogen un valor de  $G$  de 0,23 MPa.<sup>23</sup> Otros autores, como Magnussen y cols. (2005) dan valores de  $G$  entre 1 y 3 MPa dependiendo de las condiciones de cizalla, aunque con una gran desviación típica (p.

ej. para velocidad de deformación de  $0,01 \text{ s}^{-1}$ ,  $G = 1,05 \pm 0,84 \text{ MPa}$ ).<sup>24</sup> Por lo tanto, los tejidos preparados en este trabajo solo podrían alcanzar propiedades mecánicas similares a los del cartílago humano nativo si por acción de campos magnéticos externos se endureciera el biomaterial. Hasta qué punto esto se puede conseguir será objeto de trabajo futuro.

#### 4.3.4 Análisis de citotoxicidad celular

Para analizar el daño celular que los materiales estudiados pudieran causar a los CHDCH, se llevaron a cabo dos ensayos para cuantificar la citotoxicidad celular. En primer lugar, se llevó a cabo el test WST-1, con objeto de cuantificar la proliferación celular en cada uno de los grupos experimentales que contenían células (HFA-C y HFA-PM-C). Como control positivo se realizó un cultivo de CHDCH en 2-D; y como control negativo se realizó un cultivo de CHDCH en 2-D en presencia de tritón, que es un tensioactivo que causa daño irreversible en la pared celular. Se aplicó el test estadístico de Mann-Whitney para estimar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos biomateriales estudiados para los distintos tiempos de cultivo.

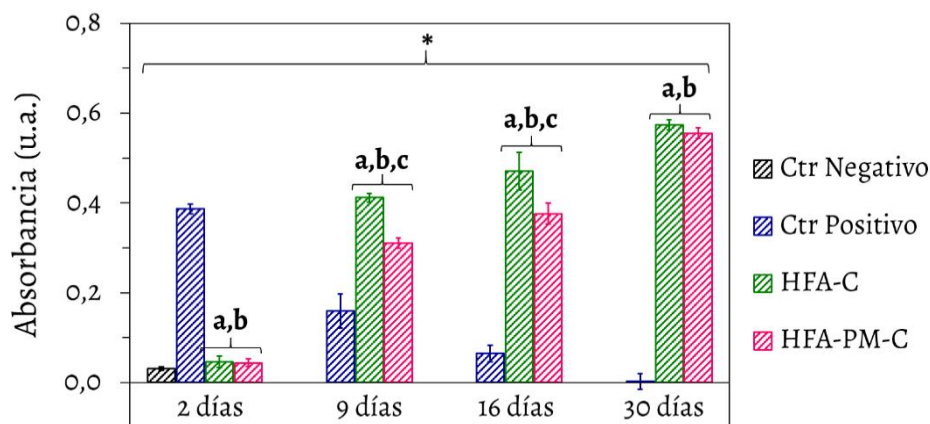


Figura 4.7. Valores de absorbancia para el ensayo WST-1 en los cultivos de CHDCH en 2D (control negativo y positivo) y en los grupos experimentales (cultivo de CHDCH en 3-D en HFA-C y HFA-PM-C). Las barras muestran los valores medios  $\pm$  desviación estándar. Las comparaciones realizadas se llevaron a cabo con el test no paramétrico Mann-Whitney con un nivel de significación  $p < 0,05$ .

- \* Diferencia estadísticamente significativa en cada uno de los grupos en función del tiempo.
- a Diferencia significativa entre los grupos (HFA-C y HFA-PM-C) frente al control positivo (Ctr Positivo).
- b Diferencia significativa entre los grupos (HFA-C y HFA-PM-C) frente al control negativo (Ctr Negativo).
- c Diferencia significativa entre el grupo HFA-C frente al grupo HFA-PM-C.

En la Figura 4.7 se representan los resultados obtenidos, que se pueden resumir como sigue:

i) Para un tiempo de 2 días. El control negativo no presenta proliferación celular (valor de la absorbancia próxima a cero), mientras que el control positivo muestra la máxima proliferación celular. Entre los hidrogeles no magnéticos (HFA-C) y magnéticos (HFA-PM-C) no hay una diferencia significativa en la proliferación celular, siendo esta significativamente mayor que en el control negativo.

ii) Para tiempos intermedios (9 y 16 días). Es importante resaltar que a los 9 días sí existen diferencias significativas en la proliferación celular del grupo HFA-C respecto al grupo HFA-PM-C, siendo la proliferación superior para el grupo sin partículas HFA-C (usado como grupo control). Aunque va decreciendo, esta diferencia se mantiene todavía a 16 días.

iii) Para un tiempo de 30 días. Conforme transcurre el tiempo de cultivo hasta los 30 días, la proliferación celular en el control positivo disminuye hasta alcanzar valores de absorbancia muy cercanos a cero. Esto se debe a que los CHDCH han crecido hasta que se quedan sin espacio y confluyen entre sí provocando el cese de la proliferación celular. Sin embargo, para los grupos HFA-C y HFA-PM-C se observa que la proliferación celular va aumentando hasta alcanzar valores de absorbancia cercanos a 0,6 u.a. en ambos grupos, no habiendo entre ellos diferencias significativas.

Estos resultados pueden explicarse asumiendo que los condrocitos (CHDCH) necesitan más tiempo para adaptarse (proliferación más lenta) al medio extracelular que contiene nanopartículas magnéticas magnéticos (HFA-PM-C) que para adaptarse al medio constituido por un hidrogel de fibrina-agarosa sin partículas (HFA-C).

En segundo lugar, para comprobar si la información obtenida en el test anterior es consistente, se determinó el daño producido en la membrana nuclear midiendo el ADN liberado por las células al medio extracelular. En la Tabla 4.1 se recoge el porcentaje de ADN liberado por cada uno de los biomateriales ensayados. Los valores se encuentran normalizados tomando la cantidad de ADN liberado por el control negativo como 100 %. En ninguno de los biomateriales de interés (HFA-C y HFA-PM-C) se libera ADN al medio extracelular. Se puede concluir que la inclusión de partículas magnéticas (MagP-OH®) en los hidrogeles de fibrina-agarosa no produce daño celular irreversible en la membrana nuclear –ver resultados para el grupo HFA-PM-C en la Tabla 4.1.

Hay que precisar que los resultados obtenidos en este test, para el control positivo, podrían parecer contradictorios con los obtenidos en el test WST-1 (proliferación celular). Como se recoge en la Tabla 4.1, no se observa liberación de ADN al medio en el control positivo 2-D en 30 días, mientras que la proliferación celular para ese mismo tiempo disminuye hasta valores próximos a cero (Tabla 4.1). Dicha contradicción aparente se puede explicar asumiendo que las células dejan de proliferar

por la confluencia entre las mismas (ya no hay más espacio disponible), pero que el tiempo de estudio no es suficiente como para que se produzca muerte celular.

Tabla 4.1. Cuantificación de ADN liberado al medio para un tiempo de cultivo de hasta 30 días y para los grupos experimentales que se indican. Control positivo: cultivo de CHDCH en 2-D. Control negativo: cultivo de CHDCH en 2-D en presencia de tritón. Los datos de la tabla están expresados en porcentaje tomando como 100 % el valor medio de ADN liberado por el control negativo.

Tiempo	Control Positivo	Control Negativo	HFA-C	HFA-PM-C
2 días	0,00 ± 0,19		0 ± 4	1,0 ± 2,2
5 días	0,00 ± 0,07		1,4 ± 1,1	0,0 ± 1,3
7 días	0,00 ± 0,18		0,0 ± 0,3	0,0 ± 0,8
9 días	0,02 ± 0,05		1,2 ± 1,5	1,8 ± 2,2
12 días	0,00 ± 0,13		0,0 ± 2,2	0,0 ± 2,2
14 días	0,00 ± 0,05		0,00 ± 0,24	0,0 ± 0,4
16 días	0,00 ± 0,06	100 ± 3	0,00 ± 0,23	0,0 ± 0,3
19 días	0,29 ± 0,08		0,0 ± 0,3	0,00 ± 0,23
21 días	0,21 ± 0,19		0,0 ± 0,3	0,00 ± 0,15
23 días	0,08 ± 0,08		0,00 ± 0,13	0,00 ± 0,25
26 días	0,10 ± 0,22		0,0 ± 0,3	0,00 ± 0,23
28 días	0,11 ± 0,07		0,00 ± 0,09	0,00 ± 0,19
30 días	0,08 ± 0,06		0,00 ± 0,21	0,00 ± 0,14

### 4.3.5 Análisis histológico

En el trabajo que se describe en este apartado, se llevaron a cabo ensayos histoquímicos e inmunohistoquímicos para observar posibles diferencias en el tejido resultante generado en las matrices de fibrina-agarosa (HFA-C y HFA-PM-C).

En general, la tinción de H&E –ver Figura 4.8– reveló que los CHDCH se encapsularon correctamente en la matriz polimérica de fibrina-agarosa no magnética (HFA-C, empleada como grupo control) y también en la magnética (HFA-PM-C), donde se evidencia una distribución aleatoria de las células dentro del material. Las células presentaban la morfología elongada característica de los fibroblastos. Por ello, para comprobar el linaje de las células observadas con la tinción de H&E, se realizó un análisis inmunohistoquímico que mostró una reacción positiva para la proteína S-100 (las cé-

lulas adquieren un color marrón), pudiendo concluir en tal caso que las células observadas son condrocitos. Además se observa que para ambos grupos experimentales, las células presentan una larga filopodia, evidencia de que existe interacción entre las células y ambos tipos de materiales (no magnéticos y magnéticos).

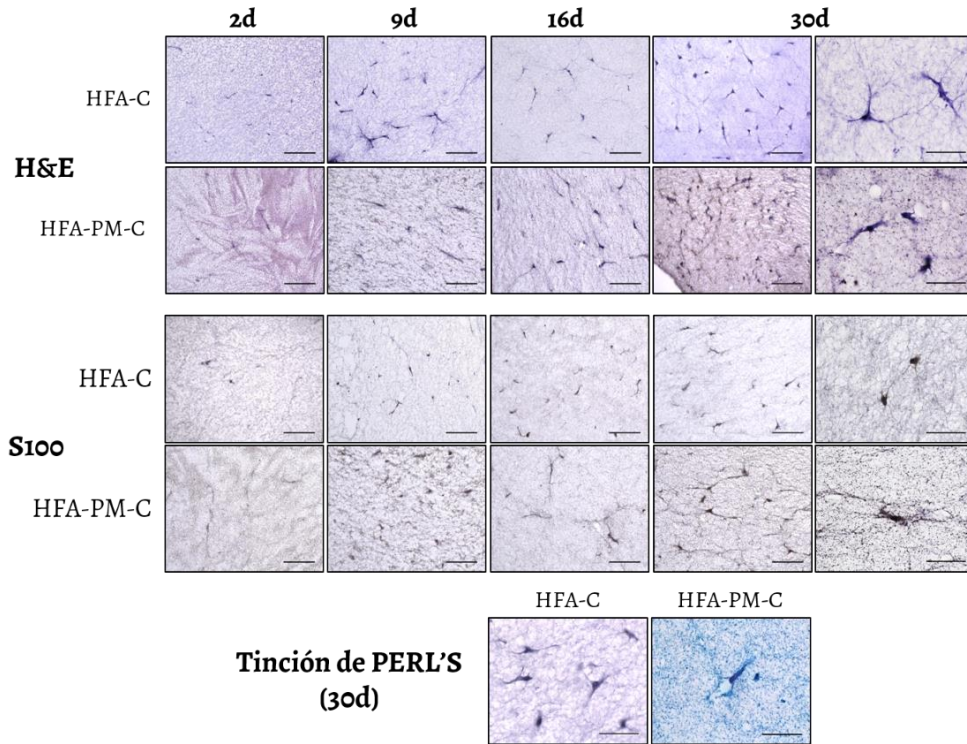


Figura 4.8. Tinción de H&E y expresión de S-100 de los CHDCH encapsulados en los hidrogeles de fibrina-agarosa para tiempos de cultivo entre 2 y 30 días; barra de escala 100 µm, excepto en la última columna de la derecha donde la barra de escala es de 50 µm. En las dos imágenes inferiores se muestran secciones de hidrogel (30 días de cultivo) teñidas por el método Perl's; la barra de escala es de 50 µm.

Por último, en la Figura 4.8 también se muestran dos secciones de hidrogel perteneciente a ambos grupos, que se tiñeron con el método de Perl's. Como era de esperar, en el grupo HFA-C la técnica da negativo, ya que estos materiales no poseen iones de hierro. Por contra, en la sección correspondiente al grupo HFA-PM-C se produce una reacción de color azul intenso, que marca los iones de hierro presentes en la muestra (pertenecientes a las partículas de magnetita MagP-OH). Esta tinción nos muestra la distribución homogénea de las partículas MagP-OH en el seno de la matriz polimérica.

Además, podemos observar en las imágenes correspondientes a la tinción de H&E que se produce un aumento del número de células al transcurrir el tiempo. Para



cuantificar este aumento en ambos grupos experimentales, se realizó un conteo celular. Se calculó el número medio de células que había en una sección observada a un aumento de  $10\times$  (el área de la sección analizada era  $1,24\text{ mm}^2$ ) contando las células presentes en 9 secciones diferentes para cada grupo y tiempo experimental. De esta manera se obtuvieron los resultados de la Figura 4.9, en la se representa la celularidad presente en cada grupo experimental en función del tiempo.

Haciendo un análisis de los resultados de celularidad obtenidos basándonos en los valores de la media  $\pm$  la desviación estándar (representados en la gráfica de barras de la Figura 4.9), podemos ver que en ambos grupos se observa un aumento del número de células en función del tiempo. En el caso del grupo control (HFA-C), se produce un aumento de la celularidad bastante rápido en torno a la primera semana (entre los 2 y 9 días), sin cambios significativos en la segunda semana (16 días), produciéndose después un nuevo crecimiento pronunciado (30 días). En contraste para el grupo HFA-PM-C se observó un aumento de la celularidad prácticamente lineal con el tiempo.

Puesto que usamos el grupo HFA-C como grupo control, por los excelentes resultados de biocompatibilidad *ex vivo* publicados anteriormente,<sup>17, 19</sup> es interesante detenernos a comparar ambos grupos en cada uno de los tiempos estudiados. A los 2 días de ensayo, el grupo control (HFA-C) presenta una celularidad significativamente superior al grupo HFA-PM-C, diferencia que se mantiene a los 9 días. Sin embargo a los 16 días, las barras de error de ambos grupos se solapan por lo que la celularidad observada en ambos grupos es semejante. En último lugar, a los 30 días se aprecia nuevamente una diferencia significativa entre ambos grupos, aunque bastante menor que la observada a los 2 días.

Los valores medios  $\pm$  la desviación estándar, empleados en los dos párrafos anteriores para la discusión de los resultados de la Figura 4.9, nos ofrecen una estimación de las diferencias de celularidad con un 68,3 % de grado de confianza. Sin embargo, en biomedicina es habitual efectuar estas evaluaciones estadísticas elevando el grado de confianza hasta el 95 %. Por esta razón, se aplicó nuevamente el test estadístico de Mann-Witney con  $p < 0,05$  (nivel de significación del 5 %) para ver si se llegaba a conclusiones diferentes –ver notas en la leyenda de la Figura 4.9. Efectivamente, al aplicar este test estadístico, no hay diferencias estadísticamente significativas entre sí para los grupos HFA-C y HFA-PM-C, para ninguno de los tiempos estudiados. En cuanto al análisis de cada uno de los grupos experimentales por separado y en función del tiempo, se confirman las estimaciones a las que llegábamos utilizando la desviación típica como estadígrafo: efectivamente, la celularidad crece significativamente con el tiempo en el grupo HFA-C y lo mismo ocurre en el grupo HFA-PM-C.

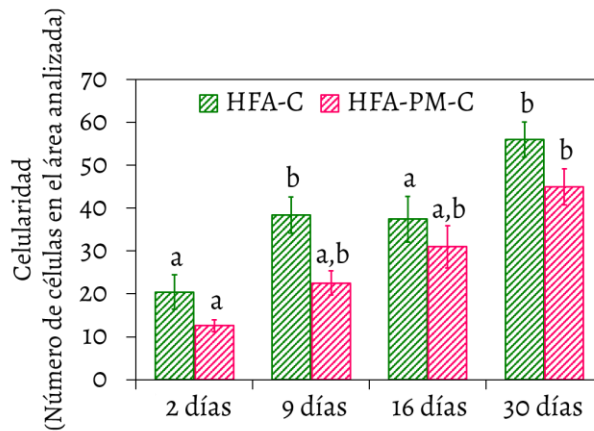


Figura 4.9. Celularidad (número de células en el área analizada, 1,24 mm<sup>2</sup>) para los grupos HFA-C y HFA-PM-C en función del tiempo, estimada a partir de las imágenes tomadas en las secciones teñidas con H&E. Las barras de error muestran los valores medios  $\pm$  la desviación estándar. Las comparaciones en función del tiempo para cada grupo y las comparaciones entre los dos grupos para cada tiempo se efectuaron mediante el test de Mann-Whitney, con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

a Diferencias estadísticamente significativas de un grupo, para un tiempo determinado, frente al mismo grupo para el tiempo mayor consecutivo.

b Diferencias estadísticamente significativas de un grupo, para un tiempo determinado, frente al mismo grupo para el tiempo menor consecutivo.

\* Por otra parte, al comparar entre sí los dos grupos (HFA-C y HFA-PM-C), para cualquiera de los tiempos, no se observaron diferencias significativas utilizando el test de Mann-Whitney.

Entre todos los compuestos que forman un cartílago nativo, en la matriz extracelular se encuentran mayoritariamente proteoglicanos y colágeno tipo II. Por ello, se realizó una tinción de Azul de Alcian con el fin de identificar los proteoglicanos y se realizó un ensayo inmunohistoquímico para ver la expresión de colágeno tipo II por parte de los CHDCH. Como podemos ver en la Figura 4.10, la tinción de azul de alcian dio negativo tanto para el grupo control (HFA-C) como para el grupo de hidrogeles magnéticos (HFA-PM-C) y para todos los tiempos experimentales ensayados. Sin embargo, la inmunohistoquímica para ver la expresión de colágeno tipo II por parte de las células dio positivo, puesto que los CHDCH se tiñen de color marrón, y a simple vista se observa, tanto en el grupo de HFA-C como en el grupo HFA-PM-C, que la expresión del COL II se produce en la misma magnitud.

En vista de las observaciones hechas a través de los ensayos histoquímicos e inmunohistoquímicos, no podemos concluir que se haya obtenido un cartílago artificial mediante inclusión de CHDCH en hidrogeles de fibrina-agarosa no magnéticos (HFA-C) y magnéticos (HFA-PM-C). Pero sí ha sido posible que los CHDCH puedan expresar algunas proteínas como S-100 y COL II, típicas de tejido cartilaginoso. Y, seguramente lo más importante, la inclusión de partículas magnéticas no produce

resultados adversos distintos de los obtenidos en el grupo control (HFA-C), en cuanto a la proliferación celular, la liberación de ADN y la celularidad estudiadas.

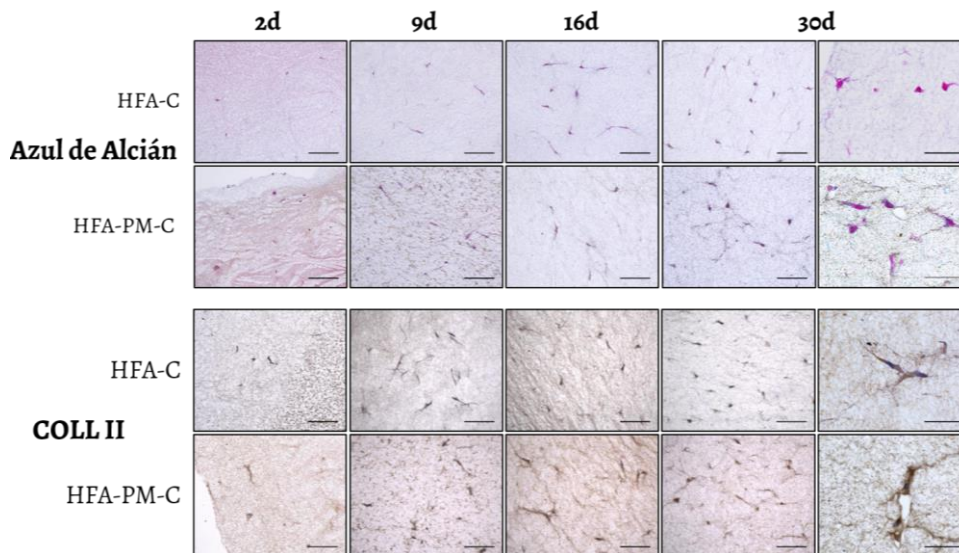


Figura 4.10. Tinción de Azul de Alcian y expresión de Colágeno Tipo II (COLL II) por los CHDCH encapsulados en los hidrogeles de fibrina-agarosa no magnéticos y magnéticos. Barra de escala 100  $\mu\text{m}$ , excepto en la última columna de la derecha donde la barra de escala es de 50  $\mu\text{m}$ .

## 4.4 Conclusiones

La incorporación de condrocitos (CHDCH) en una matriz polimérica de fibrina-agarosa magnética (conteniendo el 0,1 % en fracción de volumen de nanopartículas magnéticas MagP-OH<sup>®</sup>) y no magnética permitió la obtención de biomateriales con potencial aplicación en el campo de la ingeniería tisular.

Se estudiaron las propiedades mecánicas de hidrogeles de fibrina-agarosa acelulares (HFA-A), hidrogeles de fibrina-agarosa magnéticos acelulares (HFA-PM-A), hidrogeles de fibrina-agarosa celulares (HFA-C) e hidrogeles de fibrina-agarosa magnéticos celulares (HFA-PM-C). El estudio reológico reveló que la inclusión de condrocitos (CHDCH) en la matriz polimérica de fibrina-agarosa no magnética y magnética evita la degradación del biomaterial.

Los biomateriales obtenidos son sólidos viscoelásticos muy blandos (módulo de rigidez menor de 100 Pa) lo que podría permitir, en su caso, su implantación por inyección. Sin embargo, son materiales mucho menos elásticos/rígidos que el cartílago articular humano (módulo de rigidez del orden de 1 MPa) y, por tanto, su utilización

como tejidos substitutivos de dichos tejidos nativos requeriría de un reforzamiento posterior muy intenso.

Los ensayos de citotoxicidad (liberación de ADN) y proliferación celular (test WST-1) mostraron que la inclusión de nanopartículas magnéticas MagP-OH® no afecta negativamente al desarrollo de los condrocitos. Los resultados de ambas pruebas son similares para el grupo experimental usado como control positivo (HFA-C) y para el grupo experimental magnético (HFA-P-C).

Se realizó un análisis histológico mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas estándar. De estos ensayos, se obtuvo que los condrocitos interactuaban con los dos biomateriales ensayados (HFA-C y HFA-PM-C), ya que las células presentaban una filopodia alargada. Se identificó la expresión de la proteína s-100 por parte de las células encapsuladas en los biomateriales, comprobándose su linaje (condrocitos). Además, se observó la expresión de una de las proteínas mayoritarias (colágeno tipo II) presentes en la matriz extracelular del cartílago por parte de los condrocitos en ambos biomateriales. Sin embargo, no se observó la expresión de proteoglicanos (otro componente mayoritario en el tejido cartilaginoso) por parte de los condrocitos en ninguno de los dos grupos ensayados.

En conclusión, no fue posible la obtención de un cartílago artificial para el tiempo experimental ensayado, pero es importante destacar que, tanto el grupo experimental usado como control positivo (HFA-C) como el grupo experimental magnético (HFA-PM-C), mostraron resultados similares para todos los ensayos mecánicos y de biocompatibilidad realizados. Esto demuestra que es viable la incorporación de nanopartículas magnéticas en materiales para la obtención de tejidos artificiales biocompatibles que contengan CHDCH (condrocitos humanos derivados de cartílago hialino).

## 4.5 Bibliografía

1. C. Vinatier and J. Guicheux, *Annals of physical and rehabilitation medicine*, 2016, **59**, 139-144.
2. E. J. Mackie, L. Tatarczuch and M. Mirams, *Journal of Endocrinology*, 2011, **211**, 109-121.
3. N. S. Landínez Parra, D. A. Garzón-Alvarado and J. C. Vanegas Acosta, *Revista Cubana de Ortopedia y Traumatología*, 2009, **23**, 0-0.
4. J. Becerra, J. A. Andrades, E. Guerado, P. Zamora-Navas, J. M. Lopez-Puertas and A. H. Reddi, *Tissue Engineering Part B-Reviews*, 2010, **16**, 617-627.
5. R. J. Lories and F. P. Luyten, *Nature Reviews Rheumatology*, 2011, **7**, 43-49.
6. Z. Hochberg, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002, **16**, 399-419.

7. J. F. Stoltz, N. de Isla, C. Huselstein, D. Bensoussan, S. Muller and V. Decot, *Biorheology*, 2006, **43**, 171-180.
8. B. Johnstone, M. Alini, M. Cucchiaroni, G. R. Dodge, D. Eglin, F. Guilak, H. Madry, A. Mata, R. L. Mauck, C. E. Semino and M. J. Stoddart, *European Cells & Materials*, 2013, **25**, 248-267.
9. W. Widuchowski, J. Widuchowski and T. Trzaska, *Knee*, 2007, **14**, 177-182.
10. C. Ibarra, A. Izaguirre, E. Villalobos, M. Masri, G. Lombardero, V. Martinez, C. Velasquillo, A. Olivos Meza, V. Guevara and L. G. Ibarra, *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 2014, **30**, 715-723.
11. K. X. Ren, C. L. He, C. S. Xiao, G. Li and X. S. Chen, *Biomaterials*, 2015, **51**, 238-249.
12. F. Khan and S. R. Ahmad, *Macromolecular Bioscience*, 2013, **13**, 395-421.
13. A. La Gatta, G. Ricci, A. Stellavato, M. Cammarota, R. Filosa, A. Papa, A. D'Agostino, M. Portaccio, I. Delfino, M. De Rosa and C. Schiraldi, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, **103**, 978-989.
14. M. A. Shamekhi, A. Rabiee, H. Mirzadeh, H. Mandavi, D. Mohebbi-Kalhari and M. B. Eslaminejad, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2017, **80**, 532-542.
15. M. Alaminos, M. D. Sanchez-Quevedo, J. I. Munoz-Avila, D. Serrano, S. Medialdea, I. Carreras and A. Campos, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, **47**, 3311-3317.
16. J. M. Vinuela-Prieto, M. C. Sanchez-Quevedo, C. A. Alfonso-Rodriguez, A. C. Oliveira, G. Scionti, M. A. Martin-Piedra, G. Moreu, A. Campos, M. Alaminos and I. Garzon, *Journal of Periodontal Research*, 2015, **50**, 658-665.
17. V. Carriel, I. Garzon, J.-M. Jimenez, A.-C.-X. Oliveira, S. Arias-Santiago, A. Campos, M.-C. Sanchez-Quevedo and M. Alaminos, *Cells Tissues Organs*, 2012, **196**, 1-12.
18. K. Shimizu, A. Ito and H. Honda, *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 2006, **77B**, 265-272.
19. F. Campos, A. B. Bonhome-Espinosa, L. Garcia-Martinez, J. D. G. Duran, M. T. Lopez-Lopez, M. Alaminos, M. C. Sanchez-Quevedo and V. Carriel, *Biomedical Materials*, 2016, **11**, 055004.
20. I. Garzon, V. Carriel, A. Belen Marin-Fernandez, A. Celeste Oliveira, J. Garrido-Gomez, A. Campos, M. del Carmen Sanchez-Quevedo and M. Alaminos, *Plos One*, 2012, **7**, e51961.
21. L. Garcia-Martinez, F. Campos, C. Godoy-Guzman, M. del Carmen Sanchez-Quevedo, I. Garzon, M. Alaminos, A. Campos and V. Carriel, *Histochemistry and Cell Biology*, 2017, **147**, 83-95.
22. R. W. Chan and I. R. Titze, *Journal of the Acoustical Society of America*, 1999, **106**, 2008-2021.

23. J. A. Stammen, S. Williams, D. N. Ku and R. E. Guldberg, *Biomaterials*, 2001, **22**, 799-806.
24. R. A. Magnussen, F. Guilak and T. P. Vail, *Journal of Orthopaedic Research*, 2005, **23**, 576-583.

# Capítulo 5

Hidrogeles supramoleculares  
compuestos por péptidos y  
nanopartículas magnéticas. Reología

### RESUMEN

En este capítulo se estudian las propiedades reológicas de un nuevo biomaterial con potencial aplicación en ingeniería tisular. La novedad reside en que el hidrogel se forma a partir de la asociación mediante enlaces no covalentes de moléculas discretas. El compuesto que da lugar al hidrogel forma una red tridimensional mediante interacciones  $\pi$ - $\pi$  y enlaces de hidrógeno. Se trata de un derivado di-peptídico conocido con el nombre de fluorenilmetoxicarbonil-difenilalanina (fmoc-difenilalanina). Desde el punto de vista físico, el interés de estos hidrogeles reside en el hecho de que hay una gran controversia en la bibliografía en cuanto a sus propiedades mecánicas. Además de realizar una caracterización lo más exhaustiva posible, en este trabajo también se lleva a cabo una modificación del método de preparación para incluir en su interior nanopartículas magnéticas de hierro. De esta forma se puede dotar al material de nuevas propiedades y, al mismo tiempo, sería posible su seguimiento *in vivo* mediante resonancia magnética. Los ensayos mecánicos en régimen dinámico y estacionario permiten obtener los valores de los módulos viscoelásticos y del módulo de rigidez. Se consiguen grandes aumentos en los módulos mecánicos al aumentar la concentración de nanopartículas magnéticas. Para explicar el cambio observado en las propiedades mecánicas se lleva a cabo un estudio de la microestructura de los hidrogeles mediante microscopía de barrido ambiental.



## 5.1 Introducción

Los hidrogeles son materiales formados fundamentalmente por agua, que poseen propiedades de sólidos viscoelásticos. Este comportamiento mecánico se debe a la presencia de una red, generada mediante entrecruzamiento de cadenas poliméricas que inmovilizan la fase continua (normalmente constituida por agua).<sup>1</sup> Como hemos estudiado en los capítulos anteriores, la principal aplicación biomédica de este tipo de materiales es su uso en ingeniería de biomateriales, por lo tanto se requieren materiales con alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. Para ello, se usan principalmente biopolímeros de gran peso molecular (p. ej. proteínas como la fibrina) que se entrecruzan mediante enlaces covalentes. El principal inconveniente que presentan estos materiales es la degradación mecánica que sufren cuando se someten a una deformación estacionaria. Ello se debe a que las grandes biomoléculas están fuertemente unidas en los puntos de reticulación por enlaces covalentes y, si se someten a grandes deformaciones durante un tiempo prolongado, se supera el punto de rotura por la tensión que sufren las fibras unidas a los nudos de entrecruzamiento dando lugar a la destrucción irreversible del hidrogel.<sup>2</sup>

Por ese inconveniente de los hidrogeles poliméricos, recientemente ha aumentado el interés por una nueva clase de biomateriales, conocidos como hidrogeles supramoleculares. La ventaja de estos materiales reside en que están formados por moléculas individuales, que se ensamblan mediante interacciones no covalentes, y presentan características similares a las que poseen los geles producidos por agregación de partículas coloidales.<sup>3</sup> De manera que, aunque estos hidrogeles moleculares se rompan cuando se deforman, al cesar el esfuerzo mecánico se pueden reconstruir y recuperar su elasticidad inicial.<sup>2</sup>

Teniendo en cuenta las ventajas que presentan frente a los hidrogeles poliméricos, es lógico que exista un número creciente de trabajos centrados en el desarrollo de una nueva generación de biomateriales basados en el autoensamblaje de péptidos y derivados.<sup>4</sup> Concretamente, los hidrogeles que se van a estudiar en este capítulo están compuestos por el dipéptido difenilalanina, cuyo extremo N-terminal se encuentra funcionalizado con un grupo aromático de gran tamaño (fluorenilmetoxicarbonil, fmoc), normalmente empleado como grupo protector.<sup>5</sup> Este derivado dipéptidico, conocido como fmoc-difenilalanina (su estructura se muestra en la Figura 5.1), es el más usado como hidrogelador por su gran capacidad para formar estructuras supramoleculares.

Para producirse la formación del hidrogel, la parte aromática del grupo fmoc de estos dipéptidos tiene un papel fundamental en el proceso de autoensamblaje, ya que

los electrones  $\pi$  presentes en los anillos de fluorenilo son los responsables de las interacciones  $\pi$ - $\pi$  intermoleculares (véase Figura 5.1). Sin embargo, se ha comprobado que no todos los derivados dipeptídicos que poseen el grupo fmoc son capaces de formar un gel, ya que también es muy importante que la geometría molecular dé lugar a distancias regulares de apilamiento para que se produzcan las interacciones  $\pi$ - $\pi$  correctamente.<sup>2</sup> Por otra parte, se forman enlaces de hidrógeno entre los componentes peptídicos que ayudan a estabilizar la estructura formada.<sup>4</sup>

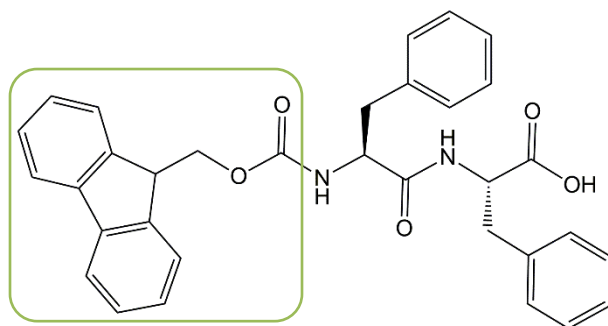


Figura 5.1. Estructura química del derivado dipeptídico fmoc-difenilalanina. El grupo fmoc (fluorenilmetoxicarbonilo) es el rodeado por la línea verde.

Para explicar la formación de la red tridimensional observada al preparar una disolución de fmoc-difenilalanina, se ha desarrollado un modelo estructural que implica la formación de una nueva arquitectura nanocilíndrica molecular basada en hojas  $\beta$  entrelazadas mediante interacciones  $\pi$ - $\pi$ . Se ha demostrado que, efectivamente, el derivado dipeptídico fmoc-difenilalanina en disolución forma hojas  $\beta$  antiparalelas, que interaccionan mediante el apilamiento  $\pi$ - $\pi$  de los grupos fluorenilo y los anillos fenilo presentes en el borde de las cadenas laterales de fenilalanina. Además, se ha observado que debido al giro natural de las hojas  $\beta$ , cuatro de estas se juntan para formar un fibrilla nanocilíndrica con un diámetro externo de aproximadamente 3,0 nm. Posteriormente, estas fibrillas se autoensamblan lateralmente para dar lugar a fibras largas.<sup>6</sup> Las fibras formadas son capaces de producir redes tridimensionales resistentes a cizalladura, dando lugar a un material con propiedades características de los sólidos blandos.<sup>7</sup> Otra de sus características es que se pueden preparar a pH fisiológico, siendo por tanto muy adecuados para diversas aplicaciones biomédicas, como por ejemplo ingeniería tisular,<sup>8</sup> cultivo celular 3D<sup>9-11</sup> y como moldes para generar materiales con unas características determinadas.<sup>12, 13</sup>

Los protocolos de preparación de hidrogeles supramoleculares se clasifican en dos categorías. En la primera, se encuentra el método de preparación por cambio de

pH, “*pH-switch*”, que consiste en la preparación de una disolución de fmoc-difenilalanina a un valor de pH alto (cerca de 10,5), seguido de una bajada de pH de manera controlada hasta dar lugar a un gel.<sup>5</sup> La preparación de la disolución de fmoc-difenilalanina es un paso crucial ya que a pH básico el grupo aromático se puede escindir del dipéptido con mucha facilidad.<sup>14</sup> Normalmente este cambio de pH se llevaba a cabo con un ácido mineral diluido,<sup>6, 15, 16</sup> observándose la formación de hidrogeles no homogéneos, con regiones más densas dispersas en un gel menos denso. Esto da lugar a que en la bibliografía haya una gran variabilidad en las propiedades mecánicas de los hidrogeles, registrándose unos valores del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) en un rango comprendido entre 1 Pa y 20 kPa.<sup>4, 10, 11</sup> Adams y colaboradores,<sup>17</sup> corroboraron que el cambio de pH es un parámetro crítico para formar estos hidrogeles y, por ello, desarrollaron la hidrólisis de la glucono- $\delta$ -lactona a ácido glucónico como una manera quiescente de formación de hidrogeles para esta clase de geladores, observándose mejoras significativas y propiedades mecánicas reproducibles en comparación con el uso de un ácido mineral.

En la segunda categoría, se encuentra el método de preparación por cambio de disolvente “*solvent-switch*”, que consiste en la preparación de una disolución de fmoc-difenilalanina en un disolvente orgánico, seguido de su dilución en agua. Los disolventes orgánicos más adecuados son el hexafluoroisopropanol (HFIP), acetona y dimetilsulfóxido (DMSO). La dilución en agua a una concentración final comprendida entre 2 y 5 mg·mL<sup>-1</sup> da lugar a la formación del hidrogel. Este segundo método no es el más adecuado para aplicaciones biomédicas porque los disolventes orgánicos empleados no son biocompatibles.

El objetivo de este trabajo es caracterizar mecánicamente hidrogeles de fmoc-difenilalanina (al 0,3 % en peso/volumen) preparados mediante el método de “*pH-switch*”, obteniendo los valores del módulo de almacenamiento ( $G'$ ), módulo de pérdidas ( $G''$ ) y módulo de rigidez ( $G$ ). Para ello, se van a emplear ensayos reológicos en estado dinámico y en estado estacionario. Una vez caracterizados estos biomateriales, se va a proceder a la incorporación de nanopartículas magnéticas de hierro recubiertas con polietilenglicol (NPFe@PEG) y se estudiarán los cambios que se produzcan en las propiedades mecánicas. El interés en caracterizar mecánicamente estos materiales, así como en obtener materiales con mejores propiedades mecánicas, se debe a que las propiedades mecánicas de la matriz extracelular afectan a la viabilidad y proliferación de las células cultivadas para generar un tejido artificial.<sup>18</sup> Por tanto, si la aplicación final que queremos para este material es su uso en ingeniería tisular, debemos asegurar la obtención de un biomaterial con unas propiedades mecánicas adecuadas a tal fin. En último lugar, otro objetivo del trabajo desarrollado en este

capítulo, consiste en efectuar un análisis micro-estructural básico, que permita comprender los cambios observados en las propiedades reológicas al variar la concentración de NPFe@PEG.

## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1 Materiales

Para preparar los hidrogeles se usó como gelador el péptido fmoc-difenilalanina (Fmoc-Phe-Phe-OH, BaChem, Alemania). Además, para producir la gelificación del mismo se empleó glucono- $\delta$ -lactona (*D-(+)-Gluconic acid  $\delta$ -lactone*, Sigma-Aldrich, EE. UU.). Como fase magnética, para preparar hidrogeles magnéticos, se emplearon nanopartículas de hierro (NPFe) con diámetro entre 60 y 80 nm (Fe nanopowder- nanoparticles, 99,7 %, SkySpring Nanomaterials, Inc., Houston, EE. UU.).

### 5.2.2 Recubrimiento de las nanopartículas de hierro con PEG

Para conferir biocompatibilidad a las nanopartículas de hierro, se decidió recubrirlas con polietilenglicol (PEG) siguiendo el procedimiento experimental descrito por Chatterjee y colaboradores.<sup>19</sup> Como las nanopartículas esféricas son de menor tamaño que las utilizadas en capítulos anteriores y, por tanto, la superficie a recubrir mayor para una misma cantidad de masa de partículas, fue necesario ajustar la cantidad de PEG.

Para preparar la fase acuosa se dispersaron 200 mg de NPFe y 2 g de PEG-400 (polietilenglicol, 400 g·mol<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, EE. UU.) en 15 mL de agua Mili-Q (Millipore, Francia). Se dispersaron con ultrasonidos durante 7 minutos. Para la fase oleosa se mezclaron 450 mL de hexano (n-hexano, min. 99 %, Scharlab S.L.), 150 mL de aceite mineral y 0,750 mL de sesquiolato de sorbitan (ambos suministrados por Sigma-Aldrich, EE. UU.). A continuación, se mezclaron ambas fases y se dejaron en ultrasonidos durante 5 minutos, hasta obtener una microemulsión. Transcurrido este tiempo, se sometió la mezcla a agitación mecánica y se añadieron 150 mL de glutaraldehído, que es el responsable de la iniciación de la polimerización del PEG. Se dejó reaccionar con agitación mecánica durante 2 h. Por último, el producto de reacción se recuperó por decantación magnética y se realizaron varios lavados con etanol y agua para eliminar los restos de reactivos.

### 5.2.3 Caracterización de las nanopartículas de hierro

Para comprobar la morfología y el tamaño de las nanopartículas de hierro proporcionadas por el fabricante, así como confirmar la correcta deposición de la capa polimérica de polietilenglicol (PEG) sobre la superficie de las mismas, se tomaron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y se realizaron medidas de movilidad electroforética.

Para la caracterización morfológica de las nanopartículas de hierro desnudas (NPFe) y la observación del recubrimiento polimérico de PEG de las nanopartículas de hierro (NPFe@PEG), se tomaron imágenes de TEM con un microscopio LIBRA 120 PLUS (Carl Zeiss GmbH, Alemania).

Para las medidas de la movilidad electroforética se usó un equipo Nano Zs, Zeta-sizer (Malvern Instruments, EE. UU.). Se prepararon suspensiones de NPFe y NPFe@PEG en una disolución 1 mM de  $\text{NaNO}_3$ . Para cada una de las muestras se prepararon suspensiones en un rango de pH comprendido entre 4 y 11. Para ajustar el pH de cada una de las suspensiones se emplearon disoluciones 0,1 M de NaOH y 0,1 M de  $\text{HNO}_3$ . Se inyectaron muestras diluidas en una cubeta desechable y las medidas se llevaron a cabo a una temperatura de 25 °C. Se realizaron tres repeticiones por medida, usando una muestra nueva cada vez.

### 5.2.4 Preparación de hidrogeles de péptidos

Para obtener un hidrogel con un volumen final de 8 mL, se preparó una disolución de fmoc-difenilalanina al 0,3 % en peso/volumen ( $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Para ello, se dispersaron 24 mg de fmoc-difenilalanina en 8 mL de agua destilada. A continuación, se fueron añadiendo pequeñas cantidades de una disolución 0,5 M de NaOH, a la vez que se agitaba con ultrasonidos, hasta alcanzar un valor de pH aproximadamente igual a 10,5 (medido con papel indicador). En este punto se obtuvo una disolución transparente, que indicaba que se había disuelto completamente el derivado dipeptídico fmoc-difenilalanina. En último lugar, se añadieron a la disolución anterior dos equivalentes de glucono- $\delta$ -lactona por cada equivalente de fmoc-difenilalanina presente en la misma, es decir, se añadieron 106  $\mu\text{L}$  de una disolución de  $150 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de glucono- $\delta$ -lactona.

Para la preparación de los hidrogeles magnéticos, se usaron NPFe@PEG con fmoc-difenilalanina adsorbido en superficie. Para ello, se dispersó la cantidad de NPFe@PEG necesaria (para preparar hidrogeles al 0,05; 0,1; 0,3; 0,6 y 0,9 % en volumen de NPFe@PEG) en una disolución al 0,3 % en peso/volumen de fmoc-difenilalanina, dejándola en contacto unos minutos, para posteriormente centrifugarlas y eliminar el sobrenadante. Una vez adsorbido el fmoc-difenilalanina en la superficie de

las NPFe@PEG, la cantidad necesaria de estas partículas se suspendió en 8 mL de disolución de fmoc-difenilalanina y se siguieron los pasos anteriormente descritos para preparar el hidrogel.

Es muy importante ser muy precisos en la preparación de los hidrogeles, pues como hemos mencionado, sus propiedades reológicas son muy sensibles a los cambios de pH y a la presencia de heterogeneidades en las muestras.

### 5.2.5 Medidas de magnetización

Se obtuvo el ciclo de histéresis de las partículas NPFE y NPFe@PEG en polvo y de los hidrogeles dipeptídicos que contenían distintas fracciones en volumen de NPFe@PEG (0,1; 0,3; 0,6 y 0,9 %). En todos los casos se hizo a temperatura ambiente utilizando un magnetómetro QUANTUM DESIGN NPMS X (Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada).

### 5.2.6 Reología de los hidrogeles supramoleculares

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles de péptidos no magnéticos y magnéticos se midieron con un reómetro Haake MARS III de esfuerzo controlado (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Debido a la dificultad de manipular estos hidrogeles sin modificar su estructura, se prepararon directamente en la célula de medida del reómetro. Para esto, la geometría elegida fue la de doble cono-plato, con 60 mm de diámetro y un ángulo de 2° entre la generatriz del cono y el plano del plato, fabricado en titanio (sensor DC 60/2° Ti L, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La mezcla que da lugar al hidrogel (8 mL) se vertió en dicha célula de medida justo después de su preparación y se bajó el doble cono, cerrando con el plato superior y dejando gelificar la muestra durante un tiempo suficiente como para obtener unos valores aproximadamente constantes de las magnitudes viscoelásticas. En el caso de los hidrogeles magnéticos se aplicó un campo magnético de 15 kA·m<sup>-1</sup> durante la primera hora de gelificación, para ello se usó una bovina situada coaxialmente con respecto al eje de la geometría de medida. Todas las medidas se realizaron a una temperatura de 25 °C, que se mantuvo constante para evitar el calentamiento de la muestra por rozamiento viscoso durante la realización de los ensayos. Para cada concentración estudiada se realizó la medida de al menos tres muestras diferentes, los resultados obtenidos para cada magnitud se presentan como los valores medios ± la desviación estándar.

### **5.2.6.1 Cinética de gelificación**

En primer lugar, con el fin de obtener unas medidas reproducibles, había que determinar el tiempo necesario para que la gelificación fuese completa. Por tanto, se midieron los módulos viscoelásticos durante la formación del gel. Para ello, la mezcla pre-gel, que se encontraba en la etapa inicial del proceso de gelificación, se sometió a una deformación por cizalla sinusoidal con amplitud 0,001 y frecuencia 1 Hz, ambos valores suficientemente pequeños para asegurar que la medida no afectaba al proceso de gelificación. Se monitorizaron con el tiempo los valores de los módulos viscoelásticos,  $G'$  y  $G''$  hasta alcanzar valores estacionarios.

### **5.2.6.2 Comportamiento reológico en régimen oscilatorio**

Finalizada la gelificación, los hidrogeles se sometieron a un esfuerzo de cizalla sinusoidal y se midió la deformación de cizalla resultante. Para este tipo de ensayos, el esfuerzo sinusoidal aplicado debe tener un valor que se encuentre dentro de la zona viscoelástica lineal (ZVL). A partir de las medidas, se obtuvieron los valores del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y módulo de pérdidas ( $G''$ ).

Se realizaron dos tipos de ensayos, dependiendo de si se fijaba la amplitud o la frecuencia de la cizalla oscilatoria:

i) *Barridos de amplitud*. En estos ensayos se mantuvo la frecuencia constante (1 Hz) y la amplitud de la deformación de cizalla se incrementó logarítmicamente espaciada hasta alcanzar el inicio de la zona viscoelástica no lineal (ZVNL). La ZVNL se identificó durante la medida con valores de amplitud de deformación ( $\gamma_0$ ) para los que  $G'$  y  $G''$  empezaban a disminuir y aumentar, respectivamente, a medida que iba aumentando el valor de la amplitud de la deformación. Se realizaron cinco ciclos oscilatorios para cada valor de amplitud de deformación de cizalla, usándose solo los tres últimos ciclos para calcular los valores medios de los módulos viscoelásticos.

ii) *Barridos de frecuencia*. En estos ensayos se mantuvo constante la amplitud de la deformación de cizalla con valor dentro del plateau de la ZVL (se tomó  $\gamma_0 = 0,002$ ) y la frecuencia se incrementó logarítmicamente espaciada entre 0 y 10 Hz. De estos ensayos se obtuvieron los oscilogramas con  $G'$  y  $G''$  en función de la frecuencia.

### **5.2.6.3 Comportamiento reológico en régimen estacionario**

En estos ensayos, las muestras se sometieron a un esfuerzo de cizalla constante, que se mantuvo durante 10 s para asegurar un valor estacionario, y se registró la correspondiente deformación de cizalla. El esfuerzo de cizalla se incrementó linealmente espaciado hasta alcanzar la región de dependencia no lineal entre el esfuerzo y la

deformación. En este tipo de ensayos, a partir de la pendiente inicial de las curvas obtenidas se calculó el módulo de rigidez.

## **5.2.7 Estructura de los hidrogeles**

### **5.2.7.1 Caracterización macroscópica**

Para observar las nanopartículas magnéticas (NPFe) en el seno del hidrogel de fmoc-difenilalanina se usó un microscopio óptico (Nikon, SMZ800) con magnificación de 6,3×. Se utilizó una cámara CCD (Pixelink, Canadá) conectada al microscopio para fotografiar los hidrogeles. Se obtuvieron imágenes tanto de la superficie superior del hidrogel como del lateral. Los hidrogeles magnéticos se prepararon aplicando un campo magnético de 15 kA·m<sup>-1</sup>.

### **5.2.7.2 Caracterización microscópica**

Para observar los cambios microscópicos existentes entre los hidrogeles no magnéticos y los magnéticos, se decidió preparar una muestra de cada uno de ellos sobre una rejilla de microscopía, y observarlos sin realizar ningún tratamiento. El objetivo era observar la estructura que estos hidrogeles presentan estando hidratados, en las mismas condiciones en las que se caracterizaron sus propiedades mecánicas. Para tal fin, se empleó un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo Ambiental (Quanta 650 FEI, *Field-Emission Environmental Scanning Electron Microscope*, Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada), que permite observar las muestras a bajo vacío, sin necesidad de eliminar el disolvente presente en las mismas.

## **5.3 Resultados y discusión**

### **5.3.1 Caracterización de las nanopartículas de hierro**

Como fase magnética para la preparación de los hidrogeles moleculares, se emplearon nanopartículas esféricas de hierro recubiertas con polietilenglicol (NPF@PEG) para conferirles biocompatibilidad. Según las indicaciones del fabricante las NPFe empleadas tenían un diámetro medio comprendido entre 60 y 80 nm. Para comprobar la morfología y distribución de tamaño se tomaron imágenes de TEM y se realizaron medidas de tamaño con ayuda del software "Image J". De estas medidas se obtuvo la distribución que se muestra en la Figura 5.2, de la que se puede concluir que el valor medio del diámetro era de 90 ± 30 nm.



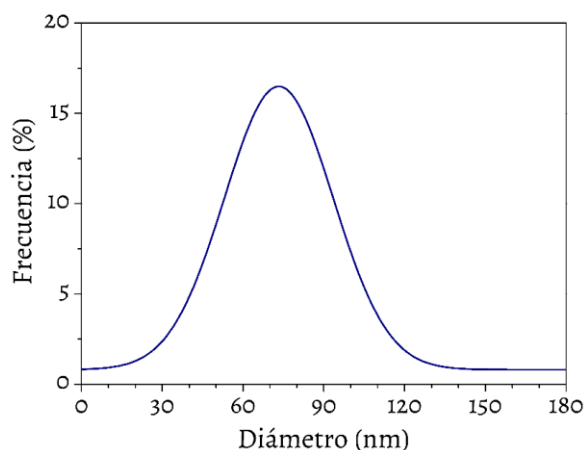


Figura 5.2. Distribución de tamaño de las nanopartículas de hierro, NPFes. El diámetro medio estimado es de  $90 \pm 30$  nm.

Además, como podemos ver en la Figura 5.3 (a), en las imágenes de TEM obtenidas se confirma que las NPFes poseen morfología esférica y una cierta polidispersión; se observan partículas tanto con un diámetro superior a 120 nm (flechas verdes) como partículas con un diámetro inferior a 50 nm (flechas rosas).

Con las imágenes de TEM, también se pudo identificar la presencia de la capa polimérica de polietilenglicol (PEG) sobre la superficie de las nanopartículas, que se identifica con la capa semitransparente –Figura 5.3 (b).

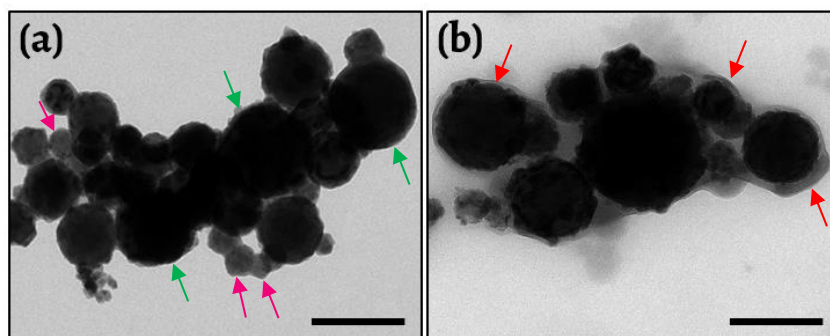


Figura 5.3. Imágenes de microscopía electrónica TEM de las nanopartículas de hierro desnudas (a) y recubiertas con una capa biocompatible de polietilenglicol (b). Barra de escala 200 nm.

Para corroborar que las partículas se encontraban completamente recubiertas por el PEG, se realizaron medidas de movilidad electroforética, tanto para las nanopartículas de hierro desnudas como para las recubiertas con PEG. Como podemos

observar en la Figura 5.4, las nanopartículas recubiertas por PEG presentan un menor valor de movilidad, en todo el rango de pH, en comparación con los valores de obtenidos para las NPFe. Las partículas de hierro tienen una capa superficial de óxido férrico, por lo que se espera que tengan un punto isoeléctrico cercano al de la hematites ( $\text{pH} = 7$ ) y la movilidad sea positiva (negativa) para valores de pH ácido (básico).<sup>20</sup> En efecto, eso es lo que se observa en la Figura 5.4.

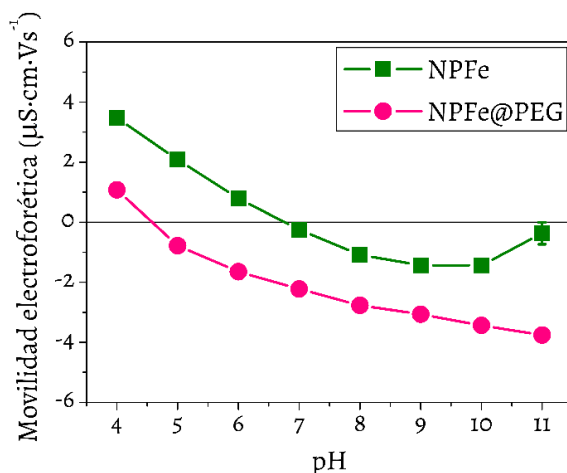


Figura 5.4. Movilidad electroforética, en función del pH, de la suspensión de nanopartículas de hierro desnudas (NPFe) y de la superficie de las nanopartículas de hierro recubiertas con polietilenglicol (NPFe@PEG). Fuerza iónica 1 mM  $\text{NaNO}_3$ .

Al depositar la capa de PEG, la superficie de las NPFe se funcionaliza con grupos hidroxilo, por lo que es de esperar que la movilidad tienda a ser negativa en casi todo el rango de pH, de acuerdo con lo que se muestra en la Figura 5.4; solo para  $\text{pH} = 4$  la movilidad electroforética presenta un valor positivo aunque bastante cercano a cero. A la vista de estos resultados y, teniendo en cuenta además las observaciones realizadas con TEM, podemos tener certeza de que las NPFe se han recubierto con una capa de PEG homogéneamente distribuida.

En último lugar, se obtuvieron los ciclos de histéresis magnética de las nanopartículas de hierro desnudas (NPFe) y las nanopartículas de hierro recubiertas de polietilenglicol (NPFe@PEG) —véase la Figura 5.5. A partir de estas curvas se obtuvo el valor de la susceptibilidad magnética ( $\chi_i$ ) y el valor de la magnetización de saturación ( $M_s$ ) para cada una de las muestras. Para ello, se siguió el mismo procedimiento que se explicó en el capítulo 2, utilizando las ecuaciones (2.1) y (2.2) para calcular  $\chi_i$  y  $M_s$ , respectivamente. Para las NPFe se obtuvo  $\chi_i = 3,996 \pm 0,017$  y  $M_s = 1521 \pm 15 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ . Para las NPFe@PEG,  $\chi_i = 5,25 \pm 0,04$  y  $M_s = 1530 \pm 12 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ .

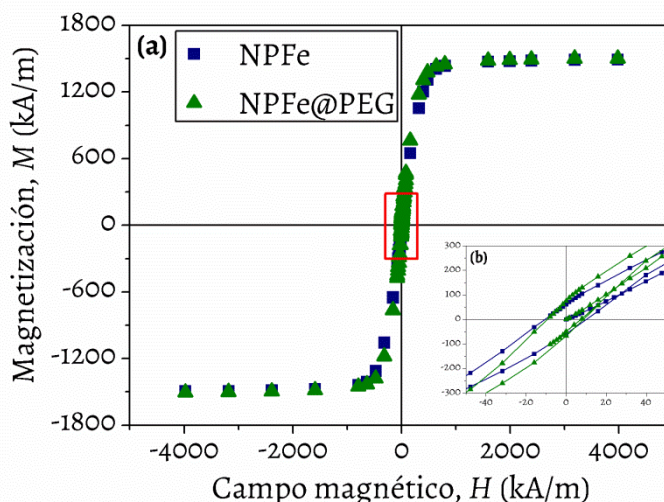


Figura 5.5. (a) Ciclos de histéresis de las muestras NPFes y NPFes@PEG (cuadrado azul y triángulo verde, respectivamente). (b) Detalle para campos de hasta  $\pm 50$  kA/m.

Además, como se observa en la Figura 5.5 (b), las NPFes y las NPFes@PEG tienen una magnetización remanente de  $62,3 \pm 2,4 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  y  $75 \pm 3 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ , respectivamente. Esto implica que, en su caso, cuando se aplique un campo magnético y luego se retire, las partículas siguen magnetizadas y se atraerán entre sí. Como consecuencia del proceso de imanación-desimanación el hidrogel resultante quedaría más rígido.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores de movilidad electroforética e imágenes de TEM, junto con los parámetros magnéticos obtenidos, podemos concluir que la capa de PEG no era muy gruesa.

### 5.3.2 Medidas de magnetización de hidrogeles magnéticos

Para caracterizar las propiedades magnéticas de los hidrogeles preparados con distintas concentraciones de NPFes@PEG, también se obtuvieron las curvas de histéresis para cada una de las muestras.

Como era de esperar (véase Figura 5.6), la magnetización de saturación y la susceptibilidad magnética aumentan de forma proporcional a la fracción de volumen de partículas de NPFes@PEG.

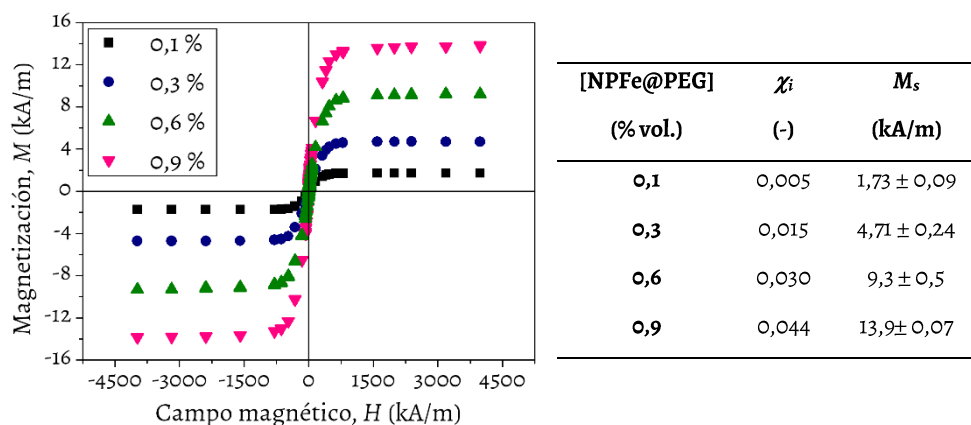


Figura 5.6. Curvas de histéresis de los hidrogeles de péptidos con las fracciones de volumen de NPF@PEG que se indican. La tabla adjunta incluye los valores de susceptibilidad magnética ( $\chi_i$ ) y de magnetización de saturación ( $M_s$ ) de cada muestra.

### 5.3.3 Reología de los hidrogeles de péptidos

#### 5.3.3.1 Cinética de gelificación

Para asegurar que todos los hidrogeles estudiados habían completado su proceso de gelificación, se llevaron a cabo unos ensayos reológicos en régimen dinámico donde se registraron los valores de los módulos viscoelásticos,  $G'$  y  $G''$ , en función del tiempo, obteniéndose tendencias similares para las distintas concentraciones de NPF –véase la Figura 5.7.

Como se observa en la Figura 5.7 (b), la mezcla pre-gel ya poseía propiedades de gel desde el inicio del proceso de gelificación, ya que  $G'$  era mayor que  $G''$ . Este hecho se puede explicar teniendo en cuenta que desde el momento en el que se añade glucono- $\delta$ -lactona, ya existen en la mezcla estructuras nanocilíndricas que interaccionan débilmente confiriendo al sistema propiedades de gel.<sup>6</sup> Conforme pasaba el tiempo, los valores de los módulos viscoelásticos iban aumentando notablemente hasta alcanzar un pseudoplateau que acababa aproximadamente a los 13000 segundos. A partir de ahí, se produjo nuevamente un aumento de los módulos viscoelásticos hasta transcurrido un tiempo de 30000 segundos. Después, ambos módulos aumentaron lentamente hasta alcanzar un plateau en el que ya se mantuvieron prácticamente constantes. Por tanto, como podemos ver en la Figura 5.7 (a) a partir de los 35000 segundos, los valores de  $G'$  y  $G''$  son aproximadamente independientes del tiempo de gelificación.

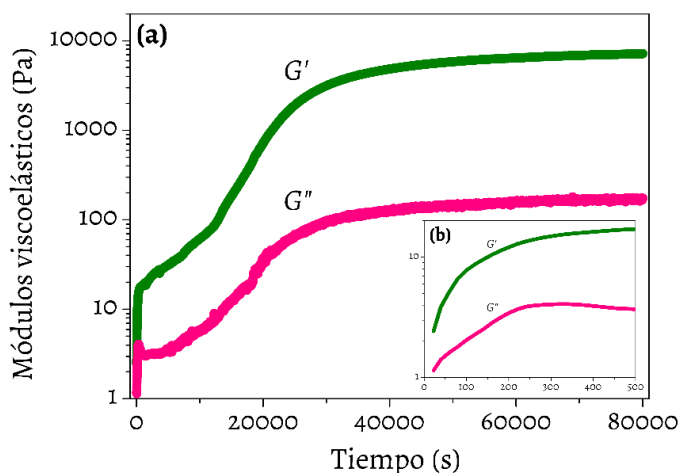


Figura 5.7. Módulos viscoelásticos en función del tiempo de gelificación para una mezcla pre-gel inicial ( $t=0$  s) que contiene una fracción de volumen del 0,05 % de NPFe. La gráfica insertada (b) muestra  $G'$  y  $G''$  durante los primeros 500 s de gelificación.

En general, en todas las muestras no magnéticas y magnéticas estudiadas se observaron tendencias similares durante el proceso de gelificación. Sin embargo, el tiempo necesario para alcanzar valores constantes de  $G'$  y  $G''$  no fue el mismo para las distintas muestras preparadas con la misma concentración de NPFe, reduciéndose en algunos casos a la mitad el tiempo necesario para alcanzar el plateau final. Por tanto, para evitar problemas derivados del tiempo necesario para alcanzar valores de  $G'$  y  $G''$  constantes, se decidió prolongar el proceso de gelificación hasta los 8000 s en todas las muestras, antes de proceder a la caracterización reológica de los hidrogeles resultantes que se describe en el siguiente párrafo.

### 5.3.3.2 Comportamiento en régimen oscilatorio

Para caracterizar reológicamente los hidrogeles bajo deformación de cizalla sinusoidal, se realizaron dos tipos de ensayos: barrido de amplitud de deformación (frecuencia constante de 1 Hz) y barrido de frecuencia. Del primero, se obtuvieron los valores de los módulos viscoelásticos,  $G'$  y  $G''$ , en función de la amplitud de la deformación,  $\gamma_0$ , como se puede ver en el ejemplo de la Figura 5.8. Tanto para los hidrogeles no magnéticos como magnéticos se observaron curvas con tendencias similares. Estas curvas presentaban valores de  $G'$  y  $G''$  aproximadamente constantes para valores de amplitud de deformación pequeños ( $\gamma_0 < 0,003$ ), correspondientes a la zona viscoelástica lineal (ZVL). Para mayores valores de amplitud de deformación, se producía un leve aumento de los módulos viscoelásticos, seguido de una disminución bastante acentuada, indicio de que ya se alcanzaba la zona viscoelástica no lineal

(ZVNL). El leve aumento observado se puede atribuir a la interacción de fibras próximas por acción del esfuerzo de cizalla aplicado, dando lugar a un aumento de la resistencia del material. Por otra parte, como hemos comentado en capítulos anteriores, los hidrogeles son sólidos viscoelásticos ( $G' \gg G''$ ). Por último, destacar que para valores de  $\gamma_0$  del orden de 1 (deformación transversal del 100 %), dentro de la ZVNL, se produce un cruce entre  $G'$  y  $G''$  que corresponde a la rotura de la estructura interna del hidrogel, provocando su flujo.

Para comparar los valores de los módulos viscoelásticos de los hidrogeles no magnéticos y los magnéticos, preparados a distintas concentraciones de NPFe (% en volumen), se tomó el valor medio de cada uno de los módulos viscoelásticos, dentro de la ZVL ( $\gamma_0$  entre  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$ ), como valor representativo para cada una de las muestras ensayadas y se representaron en función de la concentración de NPFe@PEG.

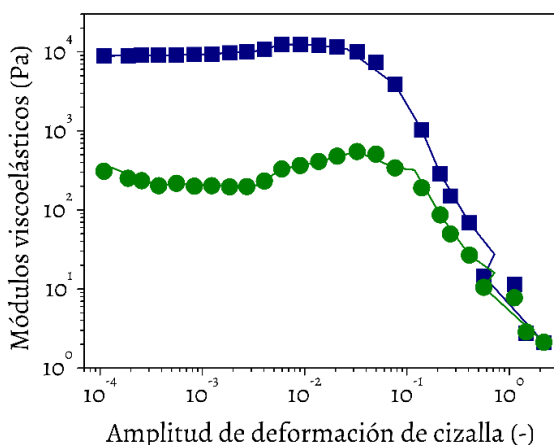


Figura 5.8. Módulo de almacenamiento ( $G'$ , cuadrado azul) y módulo de pérdidas ( $G''$ , círculo verde), en función de la amplitud de la deformación de cizalla, para un hidrogel magnético al 0,05 % vol. de NPFe@PEG. La frecuencia se mantiene constante en 1 Hz.

En la Figura 5.9, se muestran los valores obtenidos de  $G'$  y  $G''$  en la ZVL para cada uno de los hidrogeles ensayados. En los hidrogeles preparados con las menores concentraciones de partículas, se observó un aumento muy acusado de los módulos viscoelásticos. Por ejemplo, en los hidrogeles con 0,05 % de NPFe@PEG el valor de  $G'$  es el triple que el del hidrogel no magnético. A su vez, en el hidrogel que contiene 0,1 % de NPFe@PEG se alcanza un valor de  $G'$  casi doble del que contiene 0,05 %. Sin embargo, por encima de esa concentración del 0,1 % en volumen, las propiedades mecánicas aumentan levemente con un máximo en el 0,6 %, aunque los valores de  $G'$  y  $G''$  solapan (véanse barras de error) para las concentraciones entre 0,1 y 0,9 % y no son

significativamente diferentes; asumimos que para estas concentraciones  $G'$  y  $G''$  permanecen prácticamente constantes.

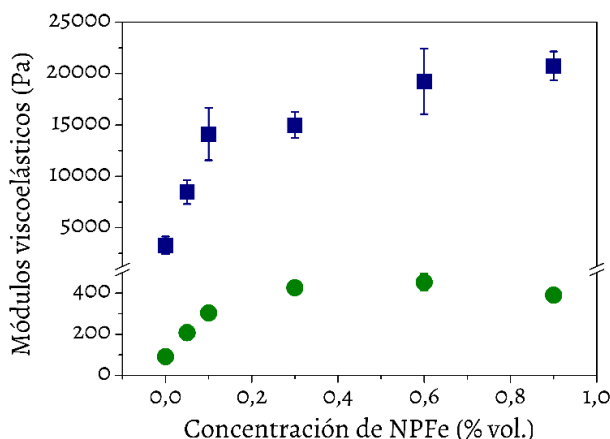


Figura 5.9. Módulo de almacenamiento,  $G'$  (cuadrado azul) y módulo de pérdidas,  $G''$  (círculo verde) en función de la fracción de volumen de NPFe en los hidrogeles. Los valores representados corresponden con el valor medio de la ZVL (amplitud de deformación entre 0,0001 y 0,001).

Es interesante comparar esta tendencia de crecimiento de  $G'$  y  $G''$  en los hidrogeles magnéticos de fmoc-difenilalanina, con la tendencia obtenida para los hidrogeles de fibrina con nanopartículas MagP-OH® (capítulo 3). En estos últimos,  $G'$  y  $G''$  crecía de forma cuadrática con la concentración de NPM hasta un 0,5 %, mientras que en los hidrogeles de péptidos  $G'$  y  $G''$  crecen linealmente con la concentración de NPFe hasta el 0,1 % y después se observa un pseudoplateau. En los hidrogeles de fibrina ese crecimiento se asociaba con la generación de nuevos puntos de entrecruzamiento al aumentar la concentración de NPFe@PEG. En el caso de los hidrogeles de péptidos, este reforzamiento se puede asociar a la formación de cadenas de NPFe@PEG cuando se aplica el campo magnético. Para explicar que para concentraciones superiores al 0,1 %,  $G'$  y  $G''$  prácticamente no aumenten, podemos suponer que inicialmente las NPFe@PEG (que tienen derivados dipeptídicos adsorbidos), se incorporan a las unidades estructurales (dipeptidos) que conforman las fibras. Posteriormente, para concentraciones superiores a 0,1 %, ha de producirse una saturación de NPFe@PEG en las fibras. Sobre esta cuestión se volverá a hablar en el apartado 5.3.4 con más detalle.

En el segundo ensayo se obtuvo el oscilograma para frecuencias entre 0 y 10 Hz, manteniendo una amplitud constante dentro de la ZVL. En la Figura 5.10 (a), se observa que  $G'$  presenta un valor constante e independiente de la frecuencia para todos los hidrogeles (magnéticos y no magnéticos). En esta gráfica, también se aprecia

como para los valores de concentración de partículas más altos (0,3; 0,6 y 0,9 % vol.) los valores de  $G'$  prácticamente se superponen. Por otra parte, en la Figura 5.10 (b), se observa que los valores del módulo de pérdidas, tanto para los hidrogeles no magnéticos como magnéticos, siguen una tendencia ligeramente creciente hasta alcanzar un máximo en 5 Hz. Después, hay un descenso brusco y, finalmente, un valor constante de  $G''$  para las frecuencias más elevadas.

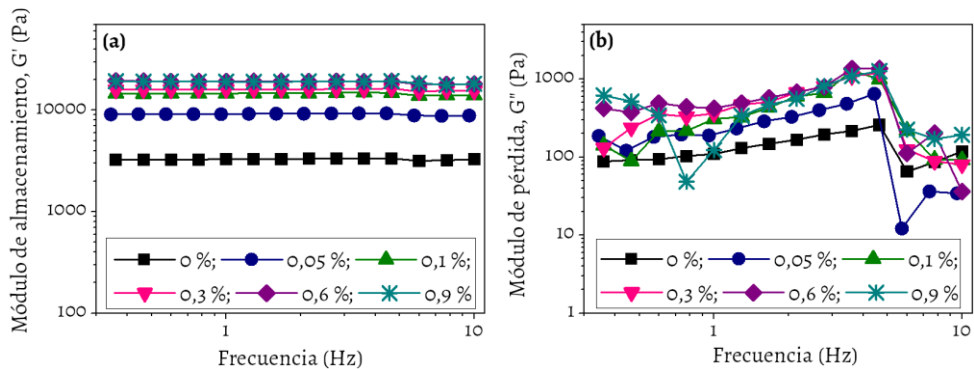


Figura 5.10. Módulo de almacenamiento (a) y módulo de pérdidas (b) en función de la frecuencia para hidrogeles peptídicos que contienen NPF en las concentraciones (% v/v) que se indican.

### 5.3.3.3 Comportamiento reológico en régimen estacionario

Para determinar el módulo de rigidez ( $G$ ) de los hidrogeles, se midió la deformación para cada valor de esfuerzo de cizalla impuesto. Para cada muestra se obtuvieron gráficas como la de la Figura 5.11, dónde se observa que el esfuerzo de cizalla varía linealmente con la deformación para valores bajos de esta. A partir de estos datos, se realizó un ajuste lineal para calcular el módulo de rigidez de los hidrogeles. Para cada concentración de partículas se midieron al menos 4 muestras diferentes para obtener el módulo de rigidez (promedio) en función de la concentración de NPF@PEG. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.12.

Se observó que el módulo de rigidez presenta una tendencia muy similar a la observada anteriormente para los módulos viscoelásticos (Figura 5.9). Hay dos zonas, en la primera de ellas, comprendida entre 0 y 0,1 % vol. de NPF@PEG, se observa un aumento lineal del módulo de rigidez con la concentración de material magnético. En esta primera zona, se obtiene para el gel al 0,05 % de NPF@PEG un valor de  $G$  doble al gel sin partículas. A su vez, en el gel al 0,1 %,  $G$  casi se duplica respecto al gel que contiene 0,05 % de partículas. En la segunda zona, para concentraciones mayores de 0,1 %, se observa un aumento muy débil con un máximo en 0,6 % aunque, al solaparse las barras de error, los valores de  $G$  son prácticamente constantes.



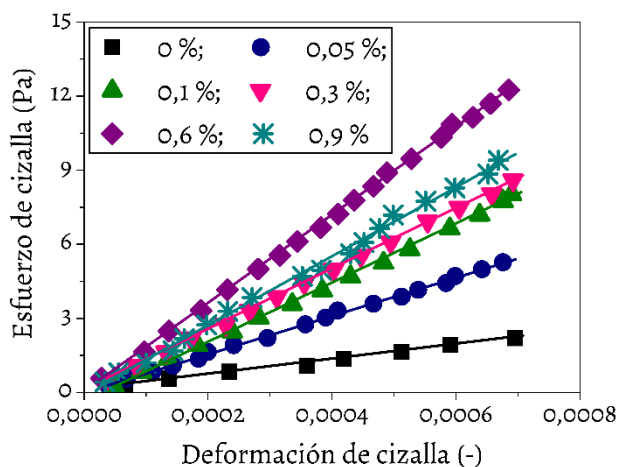


Figura 5.11. Esfuerzo de cizalla frente a deformación para los hidrogeles supramoleculares con distintas fracciones de volumen de NPF@PEG. Los datos experimentales se representan con símbolos y las líneas corresponden con el ajuste lineal realizado para calcular el módulo de rigidez.

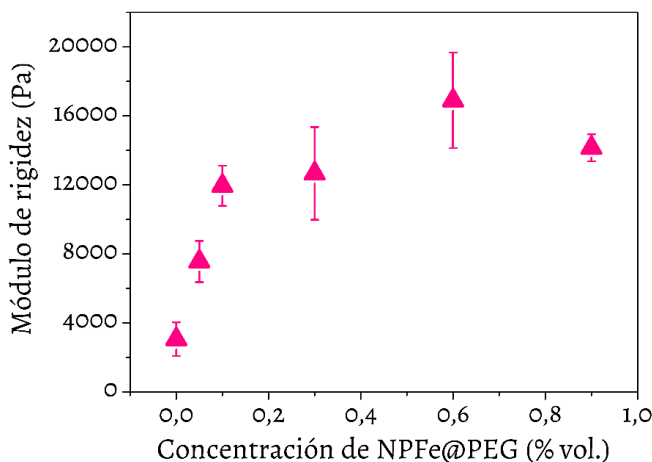


Figura 5.12. Módulo de rigidez de hidrogeles de fmoc-difenilalanina no magnéticos y magnéticos en función de la concentración de NPF@PEG.

### 5.3.4 Estructura de los hidrogeles

El estudio macroscópico (microscopio óptico) desveló que la aplicación de un campo magnético de  $15 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$  durante la primera hora de gelificación produce la formación de columnas compuestas por agregados de NPF@PEG, como era de esperar.

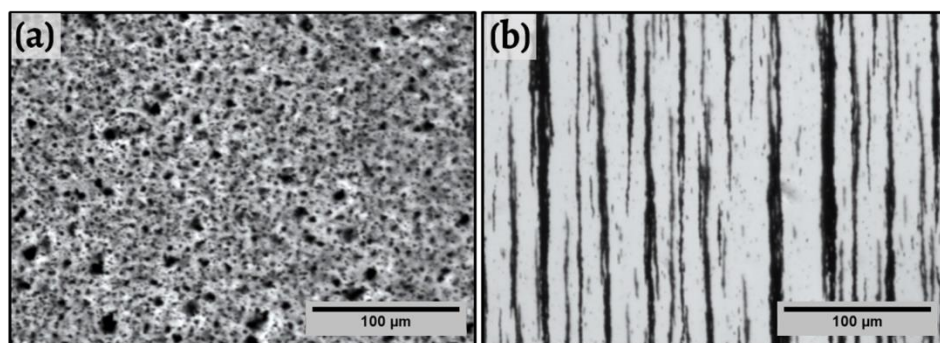


Figura 5.13. Imágenes de microscopía óptica de hidrogeles magnéticos de fmoc-difenilalanina. (a) Imagen tomada desde la superficie superior de un hidrogel preparado al 0,3 % de NPFe. (b) Imagen tomada del lateral de un hidrogel preparado con 0,1 % de NPFe; las columnas de partículas tienen la misma dirección del campo magnético aplicado.

En la Figura 5.13 (a) podemos ver una imagen de microscopía óptica de la superficie superior de un hidrogel, donde se observan agregados de partículas homogéneamente distribuidos en el seno del mismo. Estos agregados corresponden con las columnas de nanopartículas formadas vistas desde arriba (la foto está tomada en la superficie del hidrogel perpendicular a la dirección de aplicación del campo magnético). En la Figura 5.13 (b), podemos ver una fotografía tomada de un lateral del hidrogel en la que se observan claramente las columnas de agregados de partículas orientadas en la misma dirección del campo magnético aplicado.

Por otro lado, cuando los hidrogeles se observan con el microscopio electrónico (SEM), se aprecia que tanto los no magnéticos como los magnéticos mantienen la misma estructura supramolecular –véase la Figura 5.14. Con la particularidad de que en los hidrogeles magnéticos (véase la Figura 5.14 (b)), se observa que en la estructura microporosa formada por el gelador (fmoc-difenilalanina) están adheridas las nanopartículas magnéticas NPFe@PEG. Teniendo en cuenta que sobre la superficie de las NPFe@PEG se adsorbió gelador, es evidente que las nanopartículas forman parte de la estructura fibrilar sin producir alteraciones en la estructura del hidrogel.

Estas observaciones (macroscópicas y microscópicas) permiten suponer que al recubrir las NPFe@PEG con fmoc-difenilalanina, y aplicar inicialmente un campo magnético, las nanopartículas magnéticas forman cadenas que refuerzan el material. Además, como las partículas están recubiertas con fmoc-difenilalanina, se incorporan a la red de fibras. Todo ello favorece que, al retirar el campo magnético, las columnas de partículas se mantengan y siguen reforzando el material.

Por otro lado, para explicar los valores prácticamente constantes obtenidos para  $G'$ ,  $G''$  y  $G$  en hidrogeles con una concentración de NPFe@PEG superior al 0,1 % en

volumen, hemos de tener en cuenta que el gel contiene solamente un 0,3 % en peso/volumen de fmoc-difenilalanina. En consecuencia, para concentraciones de partículas superiores al 0,1 %, no queda suficiente hidrogelador libre para que las nanopartículas sigan incorporándose a la estructura interna del gel. Es decir, la red ya no puede incorporar más nanopartículas de manera activa y esta saturación hace que los valores de  $G'$ ,  $G''$  y  $G$  permanezcan prácticamente constantes.

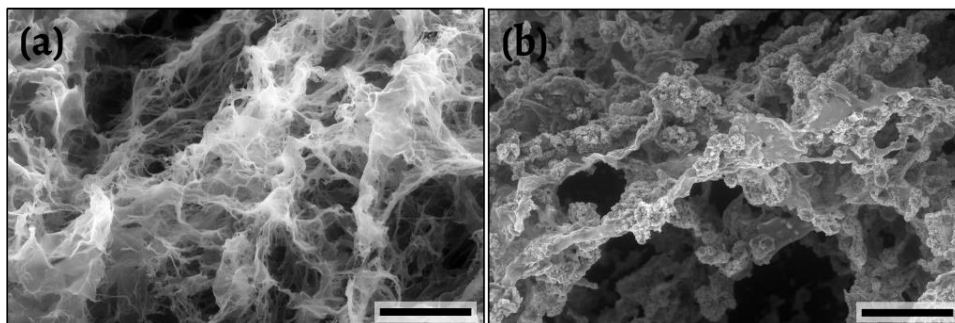


Figura 5.14. Imágenes de microscopía TEM de los hidrogeles no magnéticos (a) y de los magnéticos con 0,6 % en volumen de NPFe@PEG (b). Barra de escala 20  $\mu$ m.

## 5.4 Conclusiones

Se han preparado hidrogeles supramoleculares con el derivado dipeptídico fmoc-difenilalanina a una concentración del 0,3 % en peso/volumen. Se ha llevado a cabo con éxito la incorporación de nanopartículas de hierro biocompatibles (NPFe@PEG) en los hidrogeles, con fracciones de volumen de nanopartículas magnéticas entre 0,05 % y 0,9 % en volumen. El método de preparación empleado para obtener los hidrogeles ha sido el llamado “*pH switch*”. Para incorporar al biomaterial la fase magnética, se realizó un recubrimiento de las NPFe con polietilenglicol y, posteriormente, se adsorbieron moléculas de fmoc-difenilalanina en la superficie de las mismas para favorecer la interacción partícula-hidrogel.

Las nanopartículas de hierro (NPFe), empleadas como fase magnética en la preparación de los hidrogeles presentaban heterogeneidad en el tamaño y un diámetro medio de  $90 \pm 30$  nm. En cuanto a las NPFe@PEG fue posible identificar la cubierta biocompatible de PEG mediante imágenes de TEM y medidas de movilidad electroforética.

Se obtuvieron hidrogeles no magnéticos y magnéticos con valores de  $G'$  y  $G''$  prácticamente constantes después de algo menos de 24 h desde el inicio de la gelificación, manteniendo una temperatura de 25 °C durante todo el proceso. Se fijó este tiempo (exactamente 80000 s) como el necesario para asegurar la completa gelificación de los hidrogeles antes de realizar la caracterización reológica.

Se determinaron las propiedades magnéticas de las nanopartículas de hierro NPF<sub>e</sub> y NPF<sub>e</sub>@PEG. De igual manera, se determinaron las propiedades magnéticas de los hidrogeles de péptidos preparados con distinta fracción de volumen de NPF<sub>e</sub>@PEG, observándose que a medida que aumentaba la concentración de NPF<sub>e</sub>@PEG, también aumentaban los valores de la susceptibilidad magnética y magnetización de saturación como era de esperar según la ley de mezclas.

Se estudiaron las propiedades mecánicas de los hidrogeles no magnéticos y magnéticos en régimen oscilatorio. Se observó un aumento muy pronunciado en  $G'$  y  $G''$  para los hidrogeles preparados a una concentración del 0,05 y 0,1 % en volumen de FeNP@PEG con respecto al hidrogel no magnético, obteniéndose para concentraciones mayores unos valores solo ligeramente superiores a los del 0,1 %. Los barridos de frecuencia mostraron que  $G'$  era independiente de la frecuencia en el rango de frecuencia comprendido entre 0 y 10 Hz. Los valores del módulo de rigidez o del módulo de almacenamiento de los hidrogeles, que contienen solamente un 0,1 % vol. de NPM, alcanzan valores del orden de  $10^4$  Pa.

En último lugar, el estudio estructural a escala macroscópica y microscópica permiten explicar, al menos cualitativamente, que los módulos (visco)elásticos se mantengan constantes para concentraciones de NPF<sub>e</sub>@PEG superiores al 0,1 %. Se propone que las nanopartículas de hierro NPF<sub>e</sub>@PEG, en presencia de campo, forman columnas y que, debido a la adsorción de hidrogelador en la superficie de las mismas, las NPF<sub>e</sub>@PEG forman parte de la estructura interna del gel. Esto hace que el gel quede reforzado incluso después de la retirada del campo magnético, lo que explicaría los grandes aumentos de los valores de  $G'$ ,  $G''$  y  $G$  para pequeñas concentraciones de nanopartículas.

Sin embargo, dada la poca concentración de hidrogelador en la disolución inicial pre-gel, al preparar hidrogeles a concentraciones superiores al 0,1 % de NPF<sub>e</sub>@PEG, estas no pueden integrarse activamente en la estructura interna del material. Por ello, se tiene un efecto de saturación en sus propiedades mecánicas.

La continuación de este trabajo implicaría el estudio reológico asociado a la capacidad de recuperación de este tipo de hidrogeles después de su rotura, así como el estudio de su capacidad de inyección.

## 5.5 Bibliografía

1. D. J. Adams, *Macromolecular Bioscience*, 2011, **11**, 160-173.
2. N. A. Dudukovic and C. F. Zukoski, *Langmuir*, 2014, **30**, 4493-4500.
3. E. Zaccarelli, *Journal of Physics-Condensed Matter*, 2007, **19**, 323101.

4. C. Tang, A. M. Smith, R. F. Collins, R. V. Ulijn and A. Saiani, *Langmuir*, 2009, **25**, 9447-9453.
5. J. Raeburn, G. Pont, L. Chen, Y. Cesbron, R. Levy and D. J. Adams, *Soft Matter*, 2012, **8**, 1168-1174.
6. A. M. Smith, R. J. Williams, C. Tang, P. Coppo, R. F. Collins, M. L. Turner, A. Saiani and R. V. Ulijn, *Advanced Materials*, 2008, **20**, 37-41.
7. N. A. Dudukovic and C. F. Zukoski, *Soft Matter*, 2015, **11**, 7663-7673.
8. L. Haines-Butterick, K. Rajagopal, M. Branco, D. Salick, R. Rughani, M. Pilarz, M. S. Lamm, D. J. Pochan and J. P. Schneider, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, **104**, 7791-7796.
9. E. Beniash, J. D. Hartgerink, H. Storrie, J. C. Stendahl and S. I. Stupp, *Acta Biomaterialia*, 2005, **1**, 387-397.
10. V. Jayawarna, S. M. Richardson, A. R. Hirst, N. W. Hodson, A. Saiani, J. E. Gough and R. V. Ulijn, *Acta Biomaterialia*, 2009, **5**, 934-943.
11. M. Zhou, A. M. Smith, A. K. Das, N. W. Hodson, R. F. Collins, R. V. Ulijn and J. E. Gough, *Biomaterials*, 2009, **30**, 2523-2530.
12. M. Reches and E. Gazit, *Science*, 2003, **300**, 625-627.
13. J. D. Hartgerink, E. Beniash and S. I. Stupp, *Science*, 2001, **294**, 1684-1688.
14. L. A. Carpino and G. Y. Han, *The Journal of Organic Chemistry*, 1972, **37**, 3404-3409.
15. Y. Zhang, H. W. Gu, Z. M. Yang and B. Xu, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, **125**, 13680-13681.
16. V. Jayawarna, M. Ali, T. A. Jowitt, A. E. Miller, A. Saiani, J. E. Gough and R. V. Ulijn, *Advanced Materials*, 2006, **18**, 611-614.
17. D. J. Adams, M. F. Butler, W. J. Frith, M. Kirkland, L. Mullen and P. Sanderson, *Soft Matter*, 2009, **5**, 1856-1862.
18. D. E. Discher, P. Janmey and Y. L. Wang, *Science*, 2005, **310**, 1139-1143.
19. J. Chatterjee, M. Bettge, Y. Haik and C. J. Chen, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, **293**, 303-309.
20. M. M. Ramos-Tejada, A. Ontiveros, J. L. Viota and J. D. G. Duran, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, **268**, 85-95.



# Capítulo 6

Hidrogeles de alginato reforzados con partículas magnéticas. Reología bajo tracción

### RESUMEN

En este capítulo se estudian las propiedades mecánicas bajo esfuerzos de tracción de un tipo de hidrogel ampliamente utilizado en el campo de la ingeniería tisular, con el objetivo aplicarlo en un futuro para la regeneración de cartílago y hueso. El polímero que se utiliza en este capítulo es alginato de sodio, que es capaz de generar un hidrogel que posee elevadas biocompatibilidad y biodegradabilidad y, además, se puede funcionalizar con mucha facilidad. Todas estas propiedades hacen que sea un material idóneo para este tipo de aplicaciones biomédicas.

El alginato es un polisacárido que se extrae de algunos tipos de algas y, cuando se encuentra en disolución, en presencia de iones calcio gelifica dando lugar a una gel viscoelástico de forma casi instantánea. En este trabajo, con el objetivo de mejorar sus propiedades mecánicas, se han incorporado micro partículas magnéticas de hierro a la matriz de alginato. Se han preparado hidrogeles de alginato de calcio no magnéticos y magnéticos con 9; 15,3; 21,1 y 23,8 % en fracción de volumen de partículas de hierro. Se han realizado medidas de densidad y de magnetización y se han estudiado sus propiedades mecánicas bajo esfuerzos de tracción oscilatoria con amplitud de variable. En último lugar, se han realizado ensayos mecánicos en presencia de campos magnéticos externos moderados para evaluar la variación de las propiedades mecánicas en presencia de campo.



## 6.1 Introducción

El alginato es un polisacárido que se obtiene de algunas "algas marrones" de gran tamaño, entre las que se encuentran fundamentalmente la *Laminaria hyperborea* que prolifera en las costas de Noruega, la *Laminaria digitata* que se puede encontrar en el mar cantábrico, la *Laminaria japónica* que se cultiva en China y Japón, la *Macrocystis pyrifera* de aguas del Pacífico, y algunas especies de los géneros *Lessonia*, *Ecklonia*, *Durvillaea* y *Ascophyllum*. Todas estas algas contienen entre el 20 % y el 40 % de alginato sobre su peso seco.<sup>1-5</sup> Aunque el porcentaje de alginato presente en este tipo de algas depende de la especie, también influyen el hábitat y la estación del año en que se recogen las algas, observándose que poseen un mayor porcentaje de alginato en verano.<sup>6</sup>

En cuanto a su estructura química, el alginato es una sal del ácido algínico, un polisacárido lineal constituido por dos unidades monoméricas, el ácido-D-manurónico (M) y el ácido-L-gulurónico (G).<sup>7</sup> En la Figura 6.1 se muestran las estructuras químicas de ambos monómeros.

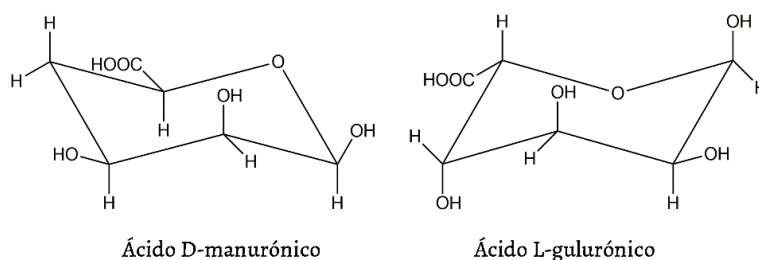


Figura 6.1. Fórmulas en forma de silla de los ácidos D-manurónico y L-gulurónico.

La cadena polimérica que constituye el ácido algínico y sus sales (p. ej. alginato de sodio) se compone de tres regiones o bloques. Los bloques G solo contienen unidades derivadas del ácido L-gulurónico, los M se basan completamente en ácido D-manurónico y las regiones MG, que consisten en unidades alternadas de ambos ácidos. Los bloques M y G se forman mediante enlaces  $\alpha$ -glucosídicos entre los carbonos C-1 y C-4 de las dos unidades monoméricas. Las regiones de bloques M corresponden con cadenas lineales, mientras que los bloques G presentan una estructura en forma de bucle.<sup>8,9</sup> Los bloques G en disolución se alinean formando unos huecos en forma de diamante capaces de albergar un ión metálico, siendo el  $\text{Ca}^{2+}$  el ion que por su tamaño se ajusta mejor a esos huecos, dando lugar a una estructura dimérica —véase la Figura 6.2.

Para explicar este fenómeno existe un modelo conocido como “*egg-box model*”, propuesto por Grant en 1973, para explicar las propiedades de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas.<sup>10</sup>

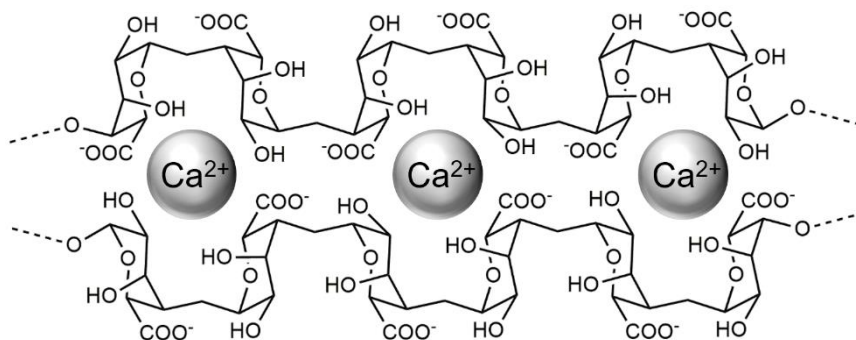


Figura 6.2. Esquema del modelo de caja de huevos (“*egg-box model*”). Se representan dos bloques G alineados, cuyos huecos en forma de diamante están ocupados por iones calcio. El calcio forma compuestos de coordinación con los grupos OH y COO<sup>-</sup> que los rodea.

La gran afinidad de los iones calcio por ocupar estos huecos provoca que, en una disolución de alginato, tenga lugar una transición de fase de líquido a sólido de manera casi instantánea en presencia de Ca<sup>2+</sup>, dando lugar a un hidrogel de alginato de calcio heterogéneo que presenta generalmente un color blanco.<sup>11</sup> Con objeto de obtener hidrogel homogéneos, se ha desarrollado un método basado en la liberación controlada de Ca<sup>2+</sup> formando una suspensión de carbonato de calcio en una disolución de alginato de sodio en presencia de glucono- $\delta$ -lactona.<sup>12</sup> El papel de la glucono- $\delta$ -lactona es acidificar el medio lentamente por hidrólisis produciendo ácido glucónico, que hace que se disuelva el carbonato de calcio poco a poco, liberando iones Ca<sup>2+</sup> al medio de manera controlada.<sup>11</sup>

La facilidad de preparación, junto con su biocompatibilidad y biodegradabilidad, hace que el hidrogel de alginato de calcio (formado mediante entrecruzamiento iónico), sea el material más comúnmente utilizado en la industria biomédica para el tratamiento de heridas,<sup>13, 14</sup> encapsulación celular<sup>15, 16</sup> y como matrices biocompatibles en ingeniería tisular.<sup>12, 17</sup> Por ejemplo, dentro del campo de la ingeniería tisular, se ha investigado la encapsulación y diferenciación de células madre de pulpa dental en tejidos adipogénicos y osteogénicos para la obtención de un tejido de hueso artificial.<sup>18</sup> Su versatilidad para las aplicaciones se debe a la facilidad con la que se puede funcionalizar, conjugando moléculas bioactivas al alginato no modificado para dotarlo de sitios de adhesión celular. Por ejemplo, un método muy popular para facilitar la adhesión celular en alginato es mediante la incorporación de péptidos que son re-

conocidos por la integrina (glicoproteínas presentes en la superficie celular que favorecen la interacción de las células con la matriz extracelular), como RGD (tripéptido formada por la secuencia aminoacídica arginina-glicina-ácido aspárticos) y YIGSR (pentapéptido formado por la secuencia aminoacídica tirosina-isoleucina-glicina-serina-arginina).<sup>19</sup>

En este capítulo se describen las propiedades mecánicas de hidrogeles de alginato y se va a desarrollar un nuevo material basado en la incorporación de micropartículas magnéticas de hierro a la matriz polimérica. El objetivo es obtener materiales, con potencial aplicación en biomedicina, cuyas propiedades mecánicas se puedan modular a distancia por aplicación de un campo magnético externo. Para ello, se han caracterizado los nuevos materiales magnéticos obtenidos. También se han determinado sus propiedades mecánicas bajo tracción ya que, si su posible aplicación es emplearlos en regeneración de hueso o cartílago, debemos estudiar sus propiedades mecánicas bajo esfuerzos similares a los que se encuentran sometidos habitualmente esos tejidos biológicos.

## 6.2 Materiales y métodos

### 6.2.1 Materiales

Para la síntesis de los hidrogeles de alginato se usó alginato de sodio, glucono- $\delta$ -lactona y carbonato de calcio (Sigma-Aldrich, EE. UU.). También se usó cloruro de calcio dihidratado (Merck, EE. UU.). Como fase magnética se emplearon partículas esféricas de hierro HQ (*carbonyl iron HQ powder*, Basf, Alemania), que según el fabricante contenían un mínimo del 97,8 % de hierro, entre el 0,6-0,9 % de carbono, 0,6-0,9 % de nitrógeno y 0,3-0,6 % de oxígeno y un diámetro medio de 2,0  $\mu\text{m}$ .

### 6.2.2 Preparación de hidrogeles de alginato

Para preparar los hidrogeles de alginato se siguió el procedimiento experimental descrito por Kalaf y colaboradores<sup>11</sup> con algunas modificaciones, ya que en este trabajo buscamos la incorporación de una fase magnética para mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles no magnéticos.

En primer lugar, se prepararon 50 mL de una disolución de alginato de sodio al 1 % en peso/volumen en agua desionizada de calidad Milli-Q. La disolución se puede almacenar a 4 °C durante un tiempo máximo de una semana. El proceso de disolución del alginato de sodio en agua era muy lento y se llevó a cabo con ultrasonidos.

Una vez preparada la disolución de alginato, se vertieron 15 mL de la misma en un recipiente y se añadieron 22,5 mg de  $\text{CaCO}_3$ . Se agitó la mezcla hasta que adquirió un color blanco, indicativo de que el  $\text{CaCO}_3$  se encontraba distribuido homogéneamente en la disolución de alginato. En último lugar, se añadieron 80,1 mg de glucono- $\delta$ -lactona a la mezcla anterior y se agitó hasta que se disolvieron los cristales de este reactivo. El papel de la glucono- $\delta$ -lactona es acidificar lentamente el medio para que se produzca una liberación controlada de los iones calcio que forman parte del  $\text{CaCO}_3$ , cuya solubilidad en agua es muy baja.

Se dejó gelificar la muestra durante 1 h 30 min obteniéndose un hidrogel blando y transparente ya que, al producirse la gelificación de manera controlada, los bloques M tienen tiempo de alinearse para formar un hidrogel homogéneo. Posteriormente, se rompió el hidrogel mediante agitación manual y después con ultrasonidos durante 10 minutos hasta obtener una masa viscosa con textura homogénea.

En el caso de los hidrogeles magnéticos, antes de la agitación del hidrogel con ultrasonidos, se añadieron distintas cantidades de partículas Fe-HQ para preparar muestras con cuatro fracciones de volumen diferentes. Las cantidades añadidas de hierro fueron 5,91 g; 11,82 g; 17,73 g y 23,64 g.

Posteriormente, se vertió la masa viscosa obtenida (conteniendo o no partículas Fe-HQ) en una placa Petri de 50 mm de diámetro y se dejó reposar durante 3 h 30 min. En este momento, se añadieron 7,5 mL de una disolución 60 mM de  $\text{CaCl}_2$ , cuyo objetivo es reforzar el hidrogel mediante la transferencia de iones calcio desde la disolución hacia el interior del hidrogel. Esto tiene lugar puesto que la concentración de iones calcio dentro del hidrogel (15 mM) es inferior a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la disolución añadida (60 mM). Después de 24 h, se alcanza el equilibrio en cuanto a concentración de calcio, obteniéndose un hidrogel con una concentración 30 mM de iones calcio.

### 6.2.3 Medidas de densidad

Para caracterizar los materiales preparados se realizaron medidas de densidad de los hidrogeles de alginato (HA) no magnéticos y de los hidrogeles magnéticos preparados usando distintas concentraciones de partículas Fe-HQ. También se determinó la densidad de las partículas Fe-HQ empleadas. Para ello se usó un picnómetro de volumen conocido ( $V = 5,261 \text{ cm}^3$ ) y se empleó aceite cuya densidad fue determinada ( $\rho_{\text{aceite}} = 0,907 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) con el picnómetro a una temperatura de 22 °C. Teniendo en cuenta que los hidrogeles están formados mayoritariamente por agua, se utilizó aceite para la determinación de la densidad con el objetivo de que no se produjera ningún tipo de interacción entre la muestra (de densidad desconocida) y el líquido (de densidad conocida). El procedimiento seguido fue el siguiente:

- i) Se determinó con el picnómetro la densidad del aceite empleado.
- ii) Se midió la masa del picnómetro vacío.
- iii) Se midió la masa del picnómetro más la muestra de hidrogel, para saber la masa del hidrogel de alginato introducido en el picnómetro.
- iv) Se midió la masa del picnómetro más la muestra de hidrogel más el aceite.

El volumen contenido en el picnómetro es:

$$V_{\text{picnómetro}} = V_{HA} + V_{\text{aceite}} \quad \text{Ec. (6.1)}$$

donde  $V_{HA}$  es el volumen de hidrogel de alginato. Conocidas la densidad del aceite y su masa, podemos calcular el volumen de aceite de manera que:

$$V_{HA} = V_{\text{picnómetro}} - \frac{m_{\text{aceite}}}{\rho_{\text{aceite}}} \quad \text{Ec. (6.2)}$$

Una vez calculado el volumen del hidrogel y usando la masa del mismo (que se midió experimentalmente) se calculó su densidad. De igual, manera se calculó la densidad de las partículas Fe-HQ.

#### 6.2.4 Medidas de magnetización

Se midió a temperatura ambiente el ciclo de histéresis de las partículas Fe-HQ en polvo y de los hidrogeles de alginato magnéticos preparados con distintas concentraciones de partículas de hierro. Para ello, se usó un magnetómetro de muestra vibrante VSM 4500 (EG&G Princeton Applied Research, EEUU).

#### 6.2.5 Caracterización mecánica de los hidrogeles de alginato bajo esfuerzo de tracción

Las propiedades mecánicas bajo esfuerzo de tracción, de los hidrogeles de alginato no magnéticos y magnéticos, se determinaron con un viscoanalizador DMA 450<sup>+</sup> (Metravib, Limonest, Francia). Para obtener el módulo de almacenamiento ( $E'$ ) y el módulo de pérdidas ( $E''$ ), componentes real e imaginaria respectivamente del módulo de Young complejo ( $E^*$ ), se llevó a cabo un ensayo en régimen oscilatorio. Dicho ensayo consistió en la realización de un barrido de amplitud de deformación, donde se sometieron las muestras a una deformación oscilatoria longitudinal,  $\varepsilon$ , con frecuencia constante (10 Hz) y amplitud de deformación,  $\varepsilon_0$ , creciente. Para aplicar una

amplitud de deformación creciente, en el equipo se definió una rampa de desplazamiento oscilatorio longitudinal de las mordazas con respecto a la muestra en reposo (sin aplicar esfuerzo de tracción previo al inicio de la medida). Dicha rampa estaba comprendida entre 0,05 y 0,3 mm.

El ensayo se dividió en dos partes, la primera de ellas consistió en registrar  $E'$  y  $E''$  mientras que se producía un aumento del desplazamiento linealmente espaciado desde 0,05 hasta 0,3 mm (estas curvas se denominaron de “ida”). Una vez alcanzado el desplazamiento máximo comenzó la segunda parte del ensayo, donde se registraron nuevamente los valores de  $E'$  y  $E''$  a medida que el desplazamiento decrecía de 0,3 a 0,05 mm (“vuelta”). Este tipo de ensayo se llevó a cabo para los hidrogeles no magnéticos y magnéticos preparados.

El valor de la amplitud de la deformación oscilatoria,  $\varepsilon_0$ , se calculó teniendo en cuenta la longitud inicial de la muestra ( $h_0$ ) y el incremento de longitud máximo ( $h$ ) respecto de  $h_0$ , mediante la expresión:

$$\varepsilon_0 = \frac{h}{h_0} \quad \text{Ec. (6.3)}$$

En el caso de los hidrogeles magnéticos también se realizaron estos ensayos aplicando un campo magnético en la misma dirección del desplazamiento (deformación) —véase la Figura 6.3 (a). Se aplicaron dos intensidades de campo magnético de 15 y 25  $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$  mediante la bobina mostrada en la Figura 6.3 (c).

Tanto para los hidrogeles no magnéticos como para cada uno de los hidrogeles magnéticos, preparados con distintas concentraciones de partículas Fe-HQ, se midieron nueve muestras diferentes. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  desviación típica de los resultados obtenidos en cada una de las series de nueve muestras de un mismo hidrogel o ferrogel.

## 6.3 Resultados y discusión

### 6.3.1 Preparación de hidrogeles de alginato

Se prepararon hidrogeles de alginato no magnéticos y magnéticos con distintas fracciones de volumen de partículas Fe-HQ. En el procedimiento experimental seguido para la obtención de estos hidrogeles, durante la primera hora y media de gelificación se formó una fina capa de hidrogel de alginato más densa y más opaca en el fondo del recipiente que contiene la mezcla. Esto se debía a que la sedimentación del  $\text{CaCO}_3$ , contenido en la solución de alginato, daba lugar a una mayor concentración

de  $\text{Ca}^{2+}$  en esa zona, dando lugar a la formación inicial de un gel heterogéneo. Cuando, después de la hora y media de gelificación inicial (véase apartado 6.2.2), se rompió el gel por agitación manual, se obtuvo una mezcla que contenía grumos y algunas burbujas de aire.

Después de las siguientes etapas de la gelificación (reposo durante tres horas y media, adición de disolución de  $\text{Ca}^{2+}$  y 24 h de gelificación final), los hidrogeles finalmente obtenidos eran bastante homogéneos, aunque todavía se advierten a simple vista algunas heterogeneidades —véase la Figura 6.4 (a). En definitiva, la acidificación controlada por adición de glucono- $\delta$ -lactona permitió disminuir en gran medida la heterogeneidad de los hidrogeles, pero no eliminarla por completo.

En los hidrogeles con partículas Fe-HQ, se observó la formación de un material que a simple vista parecía homogéneo (Figura 6.4(b)), ya que la presencia de las partículas de hierro da lugar a un gel negro opaco que impedía apreciar cualquier heterogeneidad en su interior.

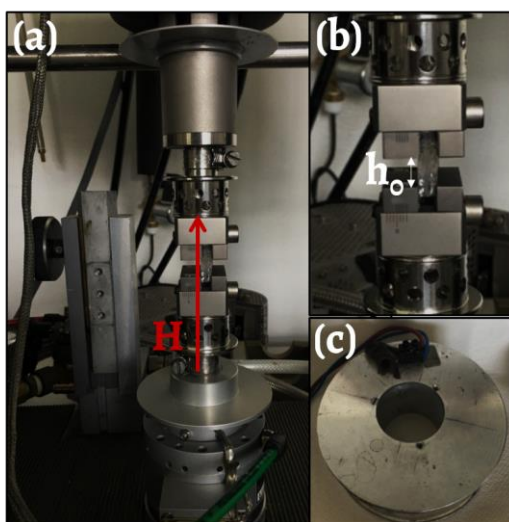


Figura 6.3. (a) Disposición de las mordazas superior e inferior del viscoanalizador; se indica el vector campo magnético ( $H$ ). (b) Se muestra una ampliación de las mordazas, entre las que se encuentra una muestra de hidrogel no magnético. (c) Se muestra la bobina empleada para aplicar el campo magnético en la misma dirección de la deformación; la bobina presentaba un hueco central suficientemente grande como para situar las mordazas con la muestra en su interior.

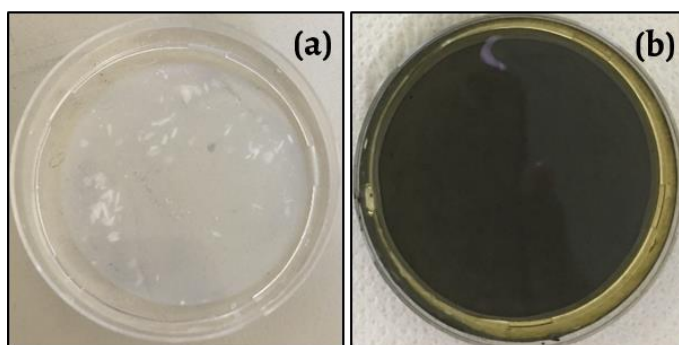
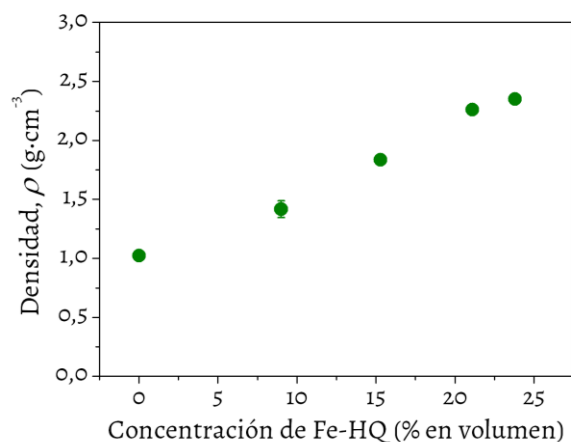


Figura 6.4. Fotografía de un hidrogel de alginato no magnético (a) y de otro magnético que contenía el 15,3 % en volumen de partículas Fe-HQ (b).

### 6.3.2 Medidas de densidad

Se midió la densidad de las partículas de hierro (Fe-HQ), siendo esta de  $7,89 \pm 0,16 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Además, se midió la densidad de los hidrogeles de alginato no magnéticos y magnéticos preparados, obteniéndose los valores que se presentan en la tabla adjunta en la Figura 6.5. Como era de esperar, la densidad de los hidrogeles crece de forma prácticamente lineal con la fracción de volumen de partículas de hierro (véase la gráfica en la Figura 6.5).



[Fe-HQ] (% vol)	Densidad ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )
9	$1,42 \pm 0,07$
15,3	$1,84 \pm 0,04$
21,1	$2,26 \pm 0,022$
23,8	$2,35 \pm 0,03$

Figura 6.5. Densidad de los hidrogeles de alginato no magnéticos y magnéticos en función de la concentración de partículas Fe-HQ.

Como veremos en el apartado siguiente, era necesario determinar la densidad de los hidrogeles para poder expresar las curvas de magnetización en unidades del sistema internacional. De hecho, los valores de concentración en fracción de volumen



de partículas de hierro en los hidrogeles, que se incluyen en la Figura 6.5, se estimaron a partir de las curvas de primera imanación.

### 6.3.3 Medidas de magnetización

Las propiedades magnéticas de los ferrogel de alginato, se determinaron midiendo la magnetización en función de la intensidad de campo en el intervalo aproximado entre 400 y -400  $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ . En la Figura 6.6 se presentan los ciclos de histéresis de los hidrogeles preparados con distintas fracciones de volumen de partículas magnéticas. Se aprecia el aumento de la susceptibilidad magnética (pendiente inicial de las curvas) así como de la intensidad de campo a partir de la cual no se espera un aumento significativo de la magnetización (magnetización de saturación).

De manera análoga a como se hizo en el capítulo 3, la susceptibilidad magnética ( $\chi$ ) de los ferrogel se calculó ajustando los datos de la curva de primera imanación (Figura 6.6) a la ley de Fröhlich-Kennelly (ver Ec. 3.1). Para campos elevados el ajuste a la ley de Fröhlich-Kennelly no era lo suficientemente bueno, se obtenían valores de magnetización de saturación ( $M_s$ ) inusualmente altos. Por lo tanto, para calcular la  $M_s$  se empleó la ley empírica que se propuso en el capítulo 3, (Ec. 3.2). Los valores obtenidos se incluyen en la Tabla 6.1. Por otra parte, a partir de las curvas de primera imanación contenidas en las gráficas de la Figura 6.6, y utilizando la ley de mezclas, se estimaron las concentraciones reales de hierro existentes en los hidrogeles magnéticos que se incluyen en la Tabla 6.1 (y también anteriormente en la Figura 6.5).

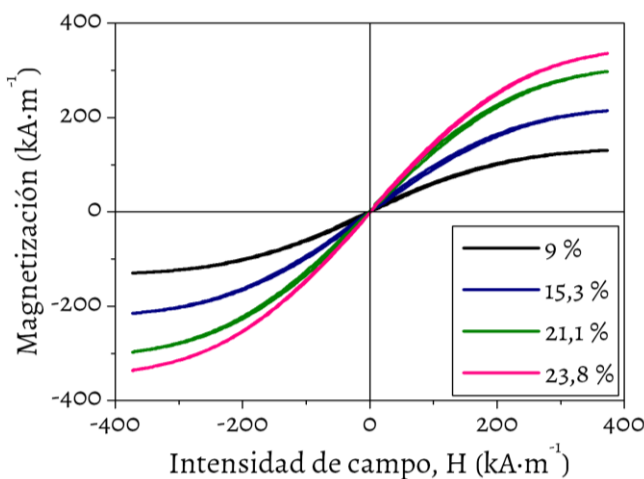


Figura 6.6. Ciclos de histéresis magnética de los hidrogeles de alginato preparados con las concentraciones de partículas Fe-HQ que se indican.

Tabla 6.1. Valores de densidad, magnetización de saturación ( $M_s$ ) y susceptibilidad magnética ( $\chi_i$ ) de las partículas de hierro y de los ferroeles. En la primera columna, se incluyen las masas de hierro añadidas para preparar las distintas muestras de ferroeles (véase apartado 6.2.2). En la última columna figuran los valores estimados de la fracción de volumen de partículas de hierro en cada muestra.

Masa de partículas Fe-HQ añadidas (g)	Densidad ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )	$M_s$ ( $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ )	$\chi_i$ (-)	Concentración de Fe-HQ (% vol)
5,91	$1,42 \pm 0,07$	165,5	0,86	9
11,82	$1,84 \pm 0,04$	279,2	1,30	15,3
17,73	$2,26 \pm 0,022$	385,7	1,77	21,1
23,64	$2,35 \pm 0,03$	434,8	1,96	23,8
Fe-HQ puras	$7,89 \pm 0,16$	1830	8,63	

### 6.3.4 Caracterización reológica

Se determinaron las propiedades mecánicas de los hidrogeles no magnéticos y magnéticos preparados con partículas Fe-HQ.

Al realizar el barrido de amplitud primero en sentido creciente (ida) y después decreciente (vuelta) en la deformación, para los hidrogeles no magnéticos se observa histéresis mecánica en la muestra. Como podemos ver en la Figura 6.7 (a), en la curva de ida  $E'$  tiene un valor medio de unos 2000 Pa (en torno al 10 % del valor de  $E'$ ) por encima del valor correspondiente a la curva de vuelta. Sin embargo, al realizar un segundo y tercer ciclo de histéresis, la diferencia entre ambas curvas es cada vez menor, lo que indica que la historia mecánica del hidrogel determina su respuesta reológica, esto es, que tenemos un claro comportamiento tixotrópico.

Para los hidrogeles magnéticos se observa una histéresis mecánica aún más pronunciada. Como podemos ver en la Figura 6.7 (b), para un gel con el 15,3 % de hierro, el valor medio de  $E'$  en la curva de ida es en promedio unos 5000 Pa superior al de la curva de vuelta. Además, el ciclo es muy abierto y después de la deformación-recuperación  $E'$  se reduce en aproximadamente un 33 % (cae desde  $3 \times 10^4$  Pa hasta  $2 \times 10^4$  Pa). Luego, al repetir un segundo y tercer ciclo de histéresis, aunque también el ciclo de histéresis es más estrecho, se sigue observando una diferencia considerable entre ambas curvas. Esto nos indica que en los hidrogeles magnéticos existe un comportamiento tixotrópico aún más pronunciado, lo que parece lógico porque, al ser hidrogeles compuestos por cadenas poliméricas y partículas, los cambios en la microestructura interna pueden ser más intensos y con un mayor grado de irreversibilidad que en los hidrogeles que no contienen partículas sólidas.

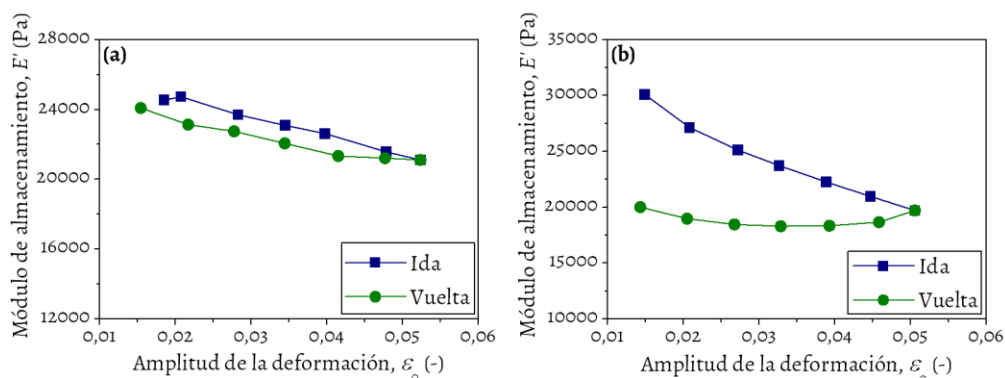


Figura 6.7. Módulo de almacenamiento en función de la amplitud de deformación. (a) Con hidrogel de alginato no magnético. (b) Hidrogel de alginato con un 15,3 % en volumen de hierro. Se muestran las curvas obtenidas para un barrido con amplitud de deformación creciente (ida) y después decreciente (vuelta).

Teniendo en cuenta este elevado grado de tixotropía, se procedió como se describe a continuación. Para cada muestra se realizó un primer ciclo de histéresis en ausencia de campo magnético. Después, y sin cambiar de muestra, se aplicó un campo magnético de  $15 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  y se obtuvo un segundo ciclo de histéresis mecánico. A continuación, también sin cambiar de muestra, se realizó un tercer ciclo de histéresis aplicando un campo de  $25 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ . Este procedimiento se repitió con nueve muestras de cada uno de los hidrogeles con fracciones de volumen de hierro comprendidas entre 0 % y 23,8 %.

En la Figura 6.8 se muestran, como un ejemplo, las curvas del hidrogel que contiene un 15,3 % en volumen de hierro. Debido a la histéresis que presentan los hidrogeles magnéticos, no hay una tendencia clara en el efecto para las curvas de ida. Como podemos ver en la Figura 6.8 (a), la curva obtenida en ausencia de campo aplicado está por encima (mayor  $E'$ ) de la curva obtenida en presencia de un campo de  $15 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ . Luego, al incrementar el campo de 15 a  $25 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  se produce un aumento de  $E'$ , aunque sin alcanzar los valores obtenidos en ausencia de campo. De todas formas, la dispersión de los datos (véanse barras de error) no permite extraer una conclusión significativa sobre los resultados obtenidos en las curvas de ida para esta concentración de hierro (15,3 % vol.).

Por contra, al estudiar el efecto del campo magnético sobre las curvas de vuelta, sí parece existir un aumento progresivo de  $E'$  al aumentar la intensidad del campo magnético (véase Figura 6.8 (b)) aunque, de nuevo, para esta concentración de hierro (15,3 %), las barras de error indican una variabilidad que resta fiabilidad a los resultados. Volveremos sobre esta cuestión más adelante. A partir de ahora, para estudiar

como varían los módulos viscoelásticos en función de la concentración de hierro, tomaremos los valores medios  $E'$  y  $E''$  de las curvas de vuelta para una deformación de 0,015, que se encuentra con seguridad dentro de la ZVL.

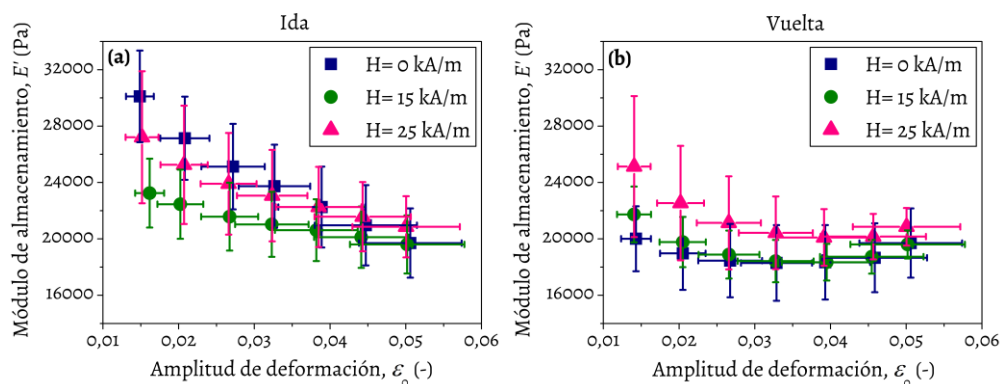


Figura 6.8. Módulo de almacenamiento ( $E'$ ) y módulo de pérdidas ( $E''$ ) de un hidrogel de alginato preparado con un 15,3 % en volumen de hierro. (a) Registrado a medida que se aumentaba  $\epsilon_0$  partiendo del reposo (ida) y (b) registrado a medida que disminuía  $\epsilon_0$  partiendo del valor máximo anteriormente alcanzado (vuelta). En las gráficas se representan los valores medios, con sus desviaciones típicas, de las nueve muestras estudiadas para esta concentración de hierro.

En la Figura 6.9 se representan los valores de los módulos elástico y viscoso ( $E'$ ,  $E''$ ) y del módulo de Young complejo ( $E^*$ ) en función de la fracción de volumen de partículas de hierro. Se observa que los valores de  $E'$  son entre 5 y 7 veces mayores que los valores de  $E''$  para los hidrogeles no magnéticos y magnéticos, lo que indica que son sólidos viscoelásticos.

En ausencia de campo aplicado, los valores de  $E'$  (Figura 6.9 (a)) del hidrogel no magnético (0 % Fe-HQ) son mayores que los de los hidrogeles magnéticos, salvo para la concentración más alta de hierro en que se igualan. En el caso de  $E''$  (Figura 6.9 (b)), parece haber un ligero aumento, respecto al hidrogel no magnético, solo cuando la concentración de hierro es la máxima empleada (23,8 %). En consecuencia, el módulo de Young complejo ( $E^*$ ) de los hidrogeles (en ausencia de campo externo aplicado) no experimenta un aumento significativo, de manera que la adición de partículas no refuerza la red polimérica de alginato, más bien parece debilitarla.

Cuando se aplican campos magnéticos moderados (entendiendo por moderados entre 10 y 100  $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ), se esperaría que la interacción entre partículas ferromagnéticas reforzara los gels. Se ensayó el efecto de campos de 15  $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$  y 25  $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ , que es el máximo aplicable en el dispositivo de la Figura 6.3. Como se muestra en la Figura 6.9 (c), ese reforzamiento (incremento en  $E^*$  respecto a hidrogeles en ausencia de campo) solo se da para las concentraciones más altas de hierro (21,2 % y 23,8 %) y para

el campo más intenso empleado. En los demás casos, no hay diferencias significativas entre los módulos viscoelásticos en ausencia y en presencia de campo magnético aplicado.

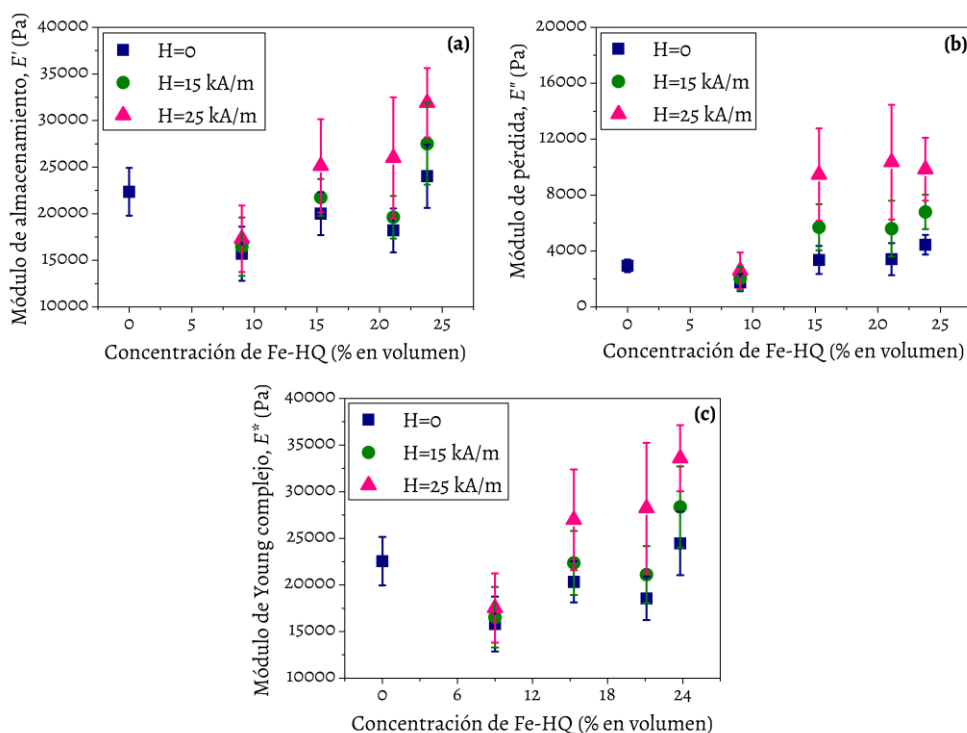


Figura 6.9. Módulo de almacenamiento (a), módulo de pérdidas (b) y módulo de Young complejo (c) en función de la fracción de volumen de hierro en los hidrogeles. Datos obtenidos en ausencia de campo magnético o aplicando el campo magnético cuya intensidad que se indica.

A la vista de estos resultados, hemos de comentar dos hechos. Primero, la variabilidad en los resultados obtenidos y, segundo, el efecto sobre las propiedades mecánicas que produce la inclusión de partículas micrométricas en la red polimérica de alginato.

En cuanto a la variabilidad en las medidas de los módulos viscoelásticos, hemos de ser conscientes de que estamos trabajando con hidrogeles viscoelásticos blandos y con un muy elevado contenido en agua. Estos hidrogeles se han formado por interacciones electrostáticas entre cadenas poliméricas e iones calcio, que hacen de puente de unión entre distintas cadenas. Se trata, por tanto, de lo que suele llamarse geles físicos, es decir, geles en los que las uniones entre cadenas no se producen por enlaces covalentes. Esto tiene la ventaja de que podemos tener un material blando

con mucha agua absorbida, pero tiene la desventaja de que la debilidad de las uniones cadena-cadena puede dar lugar a estructuras mesoscópicas no idénticas en cada síntesis. El control preciso de las condiciones de polimerización (p. ej. acidificación controlada) permite obtener hidrogeles más homogéneos, pero no evita por completo que el orden interno en la red polimérica pueda variar entre una y otra síntesis. A esto hay que añadir que durante la polimerización, y también en la manipulación posterior de la muestra para situarla en el dispositivo de medida, el gel pierde pequeñas cantidades de agua.

Todos estos factores se pueden minimizar, pero no evitar por completo, y son la principal fuente de errores experimentales aleatorios en los resultados. Si nos fijamos en la Figura 6.9, en los hidrogeles sin partículas esto da lugar a un error relativo del orden del 10 % en los valores de los módulos viscoelásticos. En los hidrogeles magnéticos, y en ausencia de campo, la cota de error también se encuentra en torno al 10 %, pero cuando se miden las mismas propiedades en presencia de campo se alcanzan errores relativos que varían entre el 10 % y el 25 %. Esto último nos indica que la estructura interna de los hidrogeles con partículas, y en presencia de campo, no debe ser una estructura muy ordenada. Para distintas muestras –aún con igual composición e igual protocolo de preparación– la ordenación de las partículas inducida por el campo en el interior de una red polimérica, que ya de por sí estará muy distorsionada por las micropartículas, puede ser muy variable dando lugar a respuestas mecánicas con reproducibilidad bastante deficiente.

Estas cotas de error experimental aleatorio (entre 10 y 25 %) pueden parecer exageradas, pero depende de con qué otro material se compare. Si comparamos con polímeros con uniones covalentes entre cadenas (elastómeros) o incluso con geles con uniones covalentes entre cadenas, evidentemente es mucho, pero si lo comparamos con tejidos biológicos nativos, o substitutivos de estos, con un elevado contenido de agua, es muy poco. Para un mismo tejido nativo puede haber una variabilidad del más del 100 % dependiendo de factores como edad, sexo o historial clínico de una persona, como ya demostraron Chan y Titze (1999) en un estudio pionero sobre las propiedades reológicas de la mucosa oral.<sup>20</sup> Incluso cuando se generan tejidos artificiales mediante ingeniería tisular, por ejemplo a partir de fibrina o fibrina-agarosa (sin partículas), tener errores relativos del orden del 10 % en los correspondientes módulos viscoelásticos entra dentro de lo habitual (véase p. ej. en Rodríguez y cols., 2012).<sup>21</sup>

En cuanto a los cambios en la estructura interna de los hidrogeles provocada por la inclusión de partículas de hierro, hemos de tener en cuenta que la alineación de los bloques M de la cadena del alginato genera huecos con carga negativa con un volumen adecuado para que sean ocupados por iones calcio. Las partículas de hierro en

suspensión a pH ácido también portan carga positiva, y podríamos pensar que en principio competirán con los iones  $\text{Ca}^{2+}$  para situarse en los mismos huecos. Sin embargo, el tamaño de las partículas de hierro (2 micras) es varios órdenes de magnitud mayor que el de los iones calcio por lo que, en presencia de partículas, la red resultante será mucho más abierta e irregular que cuando las partículas de hierro no están presentes durante el proceso de gelificación. Esta desorganización de la red de alginato es la razón por la que la inclusión de partículas, en lugar de reforzar, parece debilitar el hidrogel resultante. Sólo cuando la concentración de partículas de hierro se acerca al 25 % en volumen (lo que ya es un sistema muy concentrado), se refuerza ligeramente el gel resultante.

De igual manera, la acción del campo, que hará migrar a las partículas para encadenarse en un medio muy viscoso ( $E''$  en torno a  $5 \times 10^3$  Pa antes de aplicar el campo), solo es capaz de reforzar el gel cuando hay muchas partículas de hierro (más del 20 % en volumen) y para campos magnéticos entre 15 y 25  $\text{kA} \cdot \text{m}^{-1}$ . De todas formas, hemos de hacer notar que campos de esta intensidad son fácilmente accesibles (son campos muy moderados) y que aun así se pueden conseguir incrementos en el módulo de Young del orden de 10000 Pa, es decir, un incremento en torno al 30 % respecto a la situación en ausencia de campo.

## 6.4 Conclusiones

Se han preparado hidrogeles de alginato no magnéticos y se han podido incorporar con éxito partículas de hierro con un diámetro medio de 2  $\mu\text{m}$ , pudiéndose preparar hidrogeles de alginato magnéticos.

Se ha determinado la densidad de las partículas de Fe-HQ, de los hidrogeles de alginato no magnéticos y de los hidrogeles magnéticos. Además, se obtuvieron las curvas de imanación de los distintos hidrogeles magnéticos preparados. Se empleó la ley de mezclas para calcular la fracción de volumen de hierro de cada muestra, siendo estas de 9; 15,3; 21,1 y 23,8 %.

Se ha estudiado el comportamiento reológico de los hidrogeles en experimentos de tracción oscilatoria. Se han determinado los módulos de almacenamiento ( $E'$ ) y de pérdidas ( $E''$ ) y el módulo de Young complejo ( $E^*$ ) de los hidrogeles magnéticos y no magnéticos, demostrándose que se comportan como sólidos viscoelásticos blandos.

La caracterización mecánica muestra un comportamiento fuertemente tixotrópico y una elevada variabilidad en los resultados obtenidos. Esto refleja que la gelificación provocada por interacciones físicas (uniones no covalentes) entre las cadenas

de polímero da lugar a estructuras internas que pueden ser considerablemente variables, a pesar del estricto control en las condiciones físico-químicas del proceso de gelificación. No obstante, los errores relativos en los valores de los módulos viscoelásticos son del mismo orden que los obtenidos en tejidos biológicos blandos generados por ingeniería tisular y mucho menores que los correspondientes a tejidos nativos.

La acción combinada de la inclusión de partículas magnéticas en los hidrogeles y de la aplicación de campos magnéticos externos permite cierto grado de modulación en las propiedades mecánicas de los hidrogeles como se resume a continuación. Los hidrogeles resultan reforzados (incrementos de módulo de Young de hasta un 30 %) solo cuando el contenido de partículas de hierro es bastante elevado (del orden del 20 % en volumen) y se aplican campos magnéticos moderados (en torno a 20 kA/m). En caso contrario (poca concentración de hierro, campos débiles), la presencia de partículas sólidas embebidas en la red polimérica debilita el gel hasta un punto en el que ni siquiera aplicando campos magnéticos moderados se consigue recuperar la elasticidad de los hidrogeles puros.

## 6.5 Bibliografía

1. S. J. Horn, E. Moen and K. Ostgaard, *Journal of Applied Phycology*, 1999, **11**, 9-13.
2. L. O'Sullivan, B. Murphy, P. McLoughlin, P. Duggan, P. G. Lawlor, H. Hughes and G. E. Gardiner, *Marine Drugs*, 2010, **8**, 2038-2064.
3. A. J. Lorbeer, S. Charoensiddhi, J. Lahnstein, C. Lars, C. M. M. Franco, V. Bulone and W. Zhang, *Journal of Applied Phycology*, 2017, **29**, 1515-1526.
4. N. P. Chandia, B. Matsuhira and A. E. Vasquez, *Carbohydrate Polymers*, 2001, **46**, 81-87.
5. N. P. Chandia, B. Matsuhira, E. Mejias and A. Moenne, *Journal of Applied Phycology*, 2004, **16**, 127-133.
6. P. Schiener, K. D. Black, M. S. Stanley and D. H. Green, *Journal of Applied Phycology*, 2015, **27**, 363-373.
7. A. Haug, B. Larsen and O. Smidsrod, *Acta Chemica Scandinavica*, 1966, **20**, 183-190.
8. A. Haug and B. Larsen, *Acta Chemica Scandinavica*, 1962, **16**, 1908-1918.
9. A. Haug, B. Larsen and O. Smidsrod, *Acta Chemica Scandinavica*, 1967, **21**, 2859-2870.
10. G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith and D. Thom, *Febs Letters*, 1973, **32**, 195-198.
11. E. A. G. Kalaf, R. Flores, J. G. Bledsoe and S. A. Sell, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2016, **63**, 198-210.
12. C. K. Kuo and P. X. Ma, *Biomaterials*, 2001, **22**, 511-521.



13. J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. E. Stevens and G. M. Eccleston, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, **97**, 2892-2923.
14. K. Y. Lee and D. J. Mooney, *Progress in Polymer Science*, 2012, **37**, 106-126.
15. D. R. Griffin and A. M. Kasko, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 13103-13107.
16. W. H. Tan and S. Takeuchi, *Advanced Materials*, 2007, **19**, 2696-2701.
17. L. Shapiro and S. Cohen, *Biomaterials*, 1997, **18**, 583-590.
18. A. Moshaverinia, C. Chen, K. Akiyama, S. Ansari, X. T. Xu, W. W. Chee, S. R. Schrickler and S. T. Shi, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2012, **23**, 3041-3051.
19. A. D. Augst, H. J. Kong and D. J. Mooney, *Macromolecular Bioscience*, 2006, **6**, 623-633.
20. R. W. Chan and I. R. Titze, *Journal of the Acoustical Society of America*, 1999, **106**, 2008-2021.
21. I. A. Rodriguez, M. T. Lopez-Lopez, A. C. X. Oliveira, M. C. Sanchez-Quevedo, A. Campos, M. Alaminos and J. D. G. Duran, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2012, **6**, 636-644.



# Capítulo 7

Conclusiones



El objetivo principal de este trabajo ha sido la preparación de hidrogeles magnéticos, cuyas propiedades se puedan modular mediante la aplicación de un campo magnético externo, de intensidad baja a moderada, para emplearlos como sustitutos de tejidos biológicos en el campo de la ingeniería tisular. Para ello, se han analizado las propiedades mecánicas y magnéticas de distintos tipos de biomateriales y se han realizado ensayos de biocompatibilidad *ex vivo* e *in vivo* de los mismos. Este trabajo se ha dividido en dos partes:

La **primera** parte de la tesis consistió en lo siguiente. (i) Desarrollo de un método de síntesis para obtener nanopartículas magnéticas núcleo-capa de morfología esférica y fibrilar, recubiertas con un polímero biocompatible, que posean baja densidad y alta respuesta magnética, para ser incluidas en matrices de fibrina-agarosa. (ii) Comprobación de la biocompatibilidad *ex vivo* e *in vivo* de las matrices poliméricas de fibrina-agarosa y de fibrina-agarosa magnéticas que incluyen nanopartículas núcleo-capa sintetizadas y fibroblastos de mucosa oral. (iii) Estudio del efecto de la concentración de material magnético (partículas magnéticas comerciales, MagP-OH<sup>®</sup>, que poseen una cubierta biocompatible) sobre las propiedades mecánicas y la microestructura (porosidad) de hidrogeles de fibrina que contienen fibroblastos de mucosa oral humana. (iv) Por último, se llevó a cabo un cultivo celular de condrocitos en los hidrogeles de fibrina-agarosas no magnéticos y magnéticos (nanopartículas MagP-OH<sup>®</sup>), con el fin de obtener un tejido sustitutivo que mimetice a un tejido de cartílago nativo humano, y se han determinado las propiedades mecánicas así como la viabilidad y proliferación celular del tejido artificial generado.

Las principales conclusiones de esta primera parte de la tesis son las siguientes:

1. Se han sintetizado partículas de sílice de morfología elipsoidal con una relación de aspecto (longitud/diámetro) de 2,9 y se han empleado como núcleos para la deposición sobre los mismos de una capa de nanopartículas de magnetita, obteniéndose micropartículas magnéticas elipsoidales núcleo-capa. También se han obtenido nanopartículas esféricas magnéticas núcleo (polímero)-capa (magnetita).
2. Se ha comprobado que la incorporación de una capa externa de polietilenglicol (PEG) confiere a las nanopartículas magnéticas núcleo-capa una excelente biocompatibilidad *ex vivo* e *in vivo*.
3. La inclusión de partículas magnéticas núcleo-capa recubiertas de PEG en la matriz polimérica de fibrina-agarosa permite obtener hidrogeles magnéticos biocompatibles. La presencia de material magnético dentro de las matrices de fibrina-agarosa no afecta a la biocompatibilidad *ex vivo* e *in vivo* intrínseca que poseen los hidrogeles de fibrina-agarosa. Los ensayos *in vivo* muestran una

buena interacción de los hidrogeles magnéticos con el tejido huésped. La implantación tanto de nanopartículas magnéticas como de los hidrogeles magnéticos que los contienen solo provoca una reacción inflamatoria transitoria aguda y localizada.

4. La incorporación de una pequeña cantidad de nanopartículas magnéticas debidamente funcionalizadas dentro de matrices de fibrina provoca la apertura de la red polimérica, actuando como nudos de entrecruzamiento que hacen posible la formación de una estructura más porosa y con una gran capacidad de hidratación.
5. Los hidrogeles de fibrina magnéticos presentan una respuesta mecánica reforzada en comparación con la de los hidrogeles no magnéticos, obteniéndose mayores valores del módulo de rigidez y de los módulos viscoelásticos. El tiempo necesario para alcanzar el punto de gelificación, disminuye al aumentar la concentración de nanopartículas magnéticas.
6. Se ha desarrollado un modelo teórico que predice de forma semicuantitativa la dependencia cuadrática observada experimentalmente entre el módulo de rigidez y la concentración de partículas magnéticas en hidrogeles de fibrina. Dicho modelo se basa en la formación de clústeres, formados por interacciones entre moléculas de fibrinógeno y partículas magnéticas, que actúan como nudos de entrecruzamiento en la red polimérica.
7. La incorporación de condrocitos en una matriz polimérica de fibrina-agarosa magnética o no magnética permitió la obtención de biomateriales que no sufren degradación mecánica con el tiempo (tiempo máximo estudiado 30 días) y, por tanto, con potencial aplicación en el campo de la ingeniería tisular.
8. Los hidrogeles de fibrina-agarosa, tanto no magnéticos como magnéticos, presentan una buena biocompatibilidad *ex vivo*. Los condrocitos implantados interactúan con ambos tipos de matrices sin que se afecte negativamente la proliferación celular.
9. No fue posible obtener un tejido sustituto de cartílago hialino. Aunque los condrocitos incluidos en las matrices poliméricas de fibrina-agarosa no magnéticas y magnéticas expresaron proteínas típicas de cartílago (S-100 y colágeno tipo II), no se observó la producción de proteoglicanos. Además, dichas matrices no magnéticas y magnéticas poseen módulos (visco)elásticos mucho menores que los correspondientes al cartílago humano nativo.
10. La incorporación de nanopartículas magnéticas, en hidrogeles de fibrina-agarosa celulares, es viable para la obtención de tejidos artificiales biocompatibles

cuyas propiedades mecánicas se puedan modular a distancia por acción de campos magnéticos externos.

En la **segunda** parte de la tesis, se han estudiado las propiedades reológicas de nuevos hidrogeles, y la inclusión de partículas magnéticas en el seno de los mismos, con el fin de encontrar biomateriales alternativos a los hidrogeles de fibrina-agarosa (estudiados en la primera parte), que posean propiedades mecánicas adecuadas para su potencial aplicación en ingeniería tisular. En concreto, se estudiaron dos tipos de materiales: hidrogeles supramoleculares, formados por interacciones de tipo físico entre péptidos de cadena muy corta, e hidrogeles formados por interacción electrostática entre cadenas poliméricas de alginato e iones calcio.

Las principales conclusiones derivadas de esta segunda parte de la tesis son las siguientes:

11. Se prepararon hidrogeles mediante el uso del derivado peptídico fmoc-difenilalanina. La fmoc-difenilalanina es una molécula pequeña formada por dos aminoácidos (fenilalanina) y un grupo aromático (fmoc). Esta nueva generación de hidrogeles se forman mediante asociación física de moléculas de fmoc-difenilalanina a través de interacciones  $\pi$ - $\pi$ , formando fibras que se entrecruzan dando lugar a una red de cadenas capaces de ocluir más del 99 % de su peso en agua.
12. Se generaron hidrogeles magnéticos supramoleculares de fmoc-difenilalanina mediante la incorporación de nanopartículas de hierro recubiertas de PEG, que a su vez se habían funcionalizado por adsorción de fmoc-difenilalanina en superficie.
13. La susceptibilidad magnética y la magnetización de saturación de los hidrogeles supramoleculares magnéticos aumentan con la concentración de nanopartículas magnéticas.
14. Se estudiaron las propiedades mecánicas, bajo esfuerzos de cizalla, de los hidrogeles supramoleculares de fmoc-difenilalanina no magnéticos y magnéticos preparados con distintas concentraciones de nanopartículas magnéticas (hasta 0,9 % en volumen). Los valores de los módulos viscoelásticos y del módulo de rigidez de los hidrogeles magnéticos, preparados con muy baja concentración de nanopartículas magnéticas (0,05 % y 0,1 % en volumen), aumentan considerablemente con respecto a los hidrogeles no magnéticos. Sin embargo, concentraciones superiores al 0,1 % de nanopartículas magnéticas no permiten lograr aumentos significativos de los módulos viscoelásticos y del módulo de rigidez.

15. El estudio a escala microscópica de los hidrogeles de fmoc-difenilalanina no magnéticos y magnéticos permitió explicar, al menos cualitativamente, que los módulos mecánicos se mantuvieran constantes para concentraciones de partículas superiores al 0,1 %. Se propone que las nanopartículas de hierro producen la asociación de fibrillas muy finas en fibras más gruesas, produciendo aumento de los parámetros reológicos (reforzamiento del material) de manera que, para concentraciones superiores al 0,1 %, ya se ha alcanzado la asociación máxima de fibrillas posible y los módulos mecánicos no aumentan de forma significativa.
16. Se han incorporado con éxito micropartículas de hierro dentro de matrices poliméricas de alginato de calcio (que son de fácil preparación y bajo coste) para dotarlas de propiedades magnéticas.
17. Del estudio de las propiedades mecánicas de los hidrogeles de alginato de calcio no magnéticos y magnéticos, bajo esfuerzos de tracción, se deriva que la acción combinada de (i) la inclusión de partículas magnéticas y (ii) la aplicación de campos magnéticos externos, permite cierto grado de modulación en las propiedades mecánicas de los hidrogeles.
18. Los hidrogeles preparados con baja concentración de partículas de hierro sufren aparentemente un debilitamiento de la red polimérica. No es posible recuperar la elasticidad de los hidrogeles de alginato de calcio puros ni siquiera aplicando campos magnéticos moderados.
19. Los hidrogeles resultan reforzados (incrementos del módulo de Young de hasta un 30 %), bajo la acción de campos magnéticos de intensidad moderada (en torno a  $20 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ), solo cuando el contenido de partículas de hierro es bastante elevado (del orden del 20 % en volumen).



# Capítulo 8

Summary and Conclusions



## 8.1 Introduction

### 8.1.1 Hydrogels

Hydrogels are three-dimensional networks of flexible chains dispersed in water. The network is formed by the cross-linking, through chemical or physical bonds, of a wide variety of polymers, such as polysaccharides or proteins. In addition, in recent years a new generation of supramolecular hydrogels has been developed. Chains in these gels consisted of peptides containing between 2 and 12 aminoacids.<sup>1,2</sup> Peptides self-associate through physical interactions, forming a three-dimensional network of nanofibers.

There is a wide variety of hydrogels. They can be classified in different ways as it follows: (i) Depending on the source, polymers are classified as natural (polymers extracted from natural sources), synthetic (composed by molecules obtained by polymerization in the laboratory), and hybrids (composed by different types of molecules of mixing origin, natural and synthetic). (ii) According to the nature of the cross-linking process, hydrogels are classified as chemical hydrogels (flexible network formed by covalent bonds between the different chains) or physical (the flexible network is formed by physical interactions). (iii) Depending on the composition and chemical structure, they can be classified into hydrogels made of homopolymers (polymer networks derived from a single type of hydrophilic monomer); hydrogels made of copolymers (polymer chains, composed by a combination of two types of monomers, which crosslink to form a single polymer network); semi-blended network hydrogels (penetration of a linear polymer within a cross-linked polymeric network); and, finally, hydrogels made of two polymers networks (both covalently cross-linked and interpenetrated). (iv) According to their sensitivity to a stimulus, they can be classified into those that respond to a physical stimulus (e.g. temperature, electric field, mechanical stress) or a chemical/biochemical stimulus (as pH change or specific molecular recognition).

### 8.1.2 Properties of hydrogels

Hydrogels are characterized by their properties, such as the degree of swelling or the rheological properties. In this sense, hydrogels are very versatile. For example, by modification of the preparation protocol, hydrogels with a wide range of physical properties can be obtained.

Hydrogels are capable of retaining a large amount of water without being dissolved. The swelling capacity of hydrogels depends on several factors. One of these

is the hydrophilic/hydrophobic balance of the chemical compounds that form them. The hydration is favored by the presence of hydrophilic chemical groups, which can be altered by changes in the pH of the medium or the presence of ions. Another relevant factor is the degree of crosslinking and porosity of the hydrogel. A hydrogel excessively cross-linked will have a low porosity since the compact packing of the fibers that form the network leaves less space for the retention of water. Therefore, in order to achieve an adequate swelling capacity for a given application, it is very important to control the cross-linking degree of the chains of the polymer network.

Let's point out that, since hydrogels are constituted mainly by water, small changes in the degree of hydration (swelling) usually suppose considerable alterations in their mechanical properties. This represents a problem for the manipulation of the samples, since a slight pressure applied on the surface of the hydrogel implies an immediate loss of water. This is a common problem for the so-called soft and wet materials. Finally, note that hydrogels behave as viscoelastic materials, i. e., the relationship between mechanical stress and deformation does not satisfy the classical constitutive equations of Newtonian fluids or elastic solids.

### **8.1.3 Applications**

The diversity of preparation methods, chemical composition and mechanical properties of hydrogels makes them very versatile materials and, therefore, they have a wide range of technological applications. Applications of hydrogels in the biomedical field are of particular interest, including applications in controlled release of drugs and in tissue engineering. In the former case, the high swelling and high porosity of the hydrogels make them especially suitable for retaining drugs. The advantage of using hydrogels for this purpose is that they allow a controlled release of the drug, at the desired target, for a long period of time.<sup>3</sup> This release can be driven by different mechanisms such as controlled diffusion, controlled swelling, chemical reaction or by changes in the biological environment. In tissue engineering the need of artificial tissues capable of mimicking the behavior of native tissues is evident. Hydrogels seem especially suitable for this purpose because of their mechanical properties, high porosity and their biocompatibility. Artificial tissues (e. g. skin, cornea) based on polymer, capable of mimicking the behavior and structure of biological tissues have already been successfully prepared.<sup>4,5</sup> Generally, for this kind of applications, natural polymers such as agarose, fibrin or hyaluronic acid are used, since they intrinsically possess the desired biocompatibility. Despite of these research advances, there is still room for improvements in this field. The biological tissues and organs to be treated by regenerative medicine are very diverse and, especially, they have diverse mechanical properties—see Figure 8.1. In recent years, a very active field

of research focuses on the development of hydrogels containing synthetic micro- or nanoparticles to strengthen the polymer network and also to confer some advantages associated with the properties of the particles. Specifically, in this thesis the effect of inclusion of magnetic particles into polymer matrices is studied. This kind of hydrogels are commonly known as magnetic hydrogels or ferrogels, and they have the advantage that the mechanical properties of the resulting materials can be tuned by the action of external magnetic fields.<sup>6</sup>

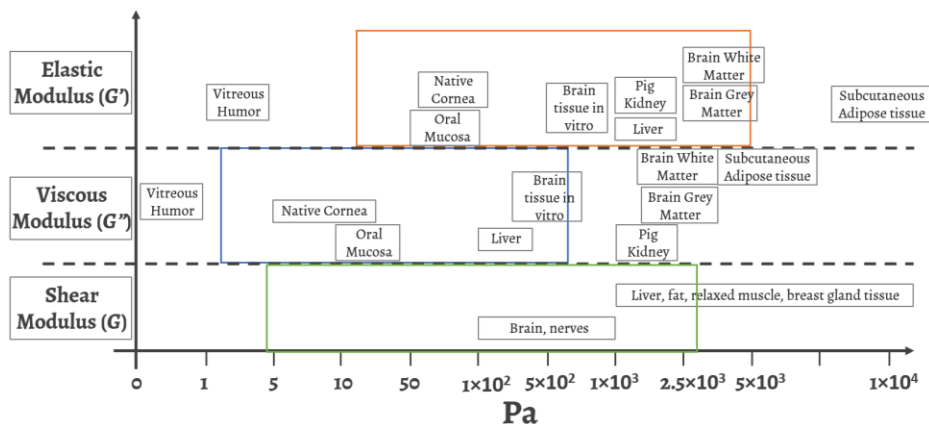


Figure 8.1. Viscoelastic ( $G'$  and  $G''$ ) and shear moduli ( $G$ ) of different biological tissues.<sup>7</sup> In the case of human articular cartilage  $G = 0.23$  MPa, according to Stammen et al. (2001);<sup>8</sup> other authors give values between 1 and 2 MPa, with a large standard deviation, for example for a low deformation speed (0.01 s<sup>-1</sup>),  $G = (1.05 \pm 0.84)$  MPa.<sup>9</sup>

### 8.1.4 Magnetic hydrogels

Magnetic hydrogels are dispersions of nano- or microparticles of ferromagnetic materials (some metals such as iron, cobalt, nickel and their alloys) or ferrimagnetic materials (magnetite, maghemite, ferrites) in a polymeric gel. Since they contain embedded magnetic particles, the physical properties of these materials, including their mechanical properties, can be modified by magnetic fields of low (up to 10 kA·m<sup>-1</sup>) or moderate (10-100 kA·m<sup>-1</sup>) intensity.

Magnetic hydrogels belong to a group of colloidal materials called magnetic colloids. Depending on the continuous phase or carrier medium containing the particles, magnetic colloids can be classified into two groups: magnetic suspensions, and magneto-polymers (see Figure 8.2).

In this work we study the inclusion of magnetic nano- and microparticles of spherical or fibrillar morphology in different polymer matrices to obtain magnetic hydrogels. The incorporation of magnetic particles gives to these materials new

characteristics. For example, the magnetic phase makes possible the detection and control of the hydrogel by non-invasive methods.<sup>10-16</sup> In what follows, we summarize the main advantages that present magnetic hydrogels in the field of biomedicine.

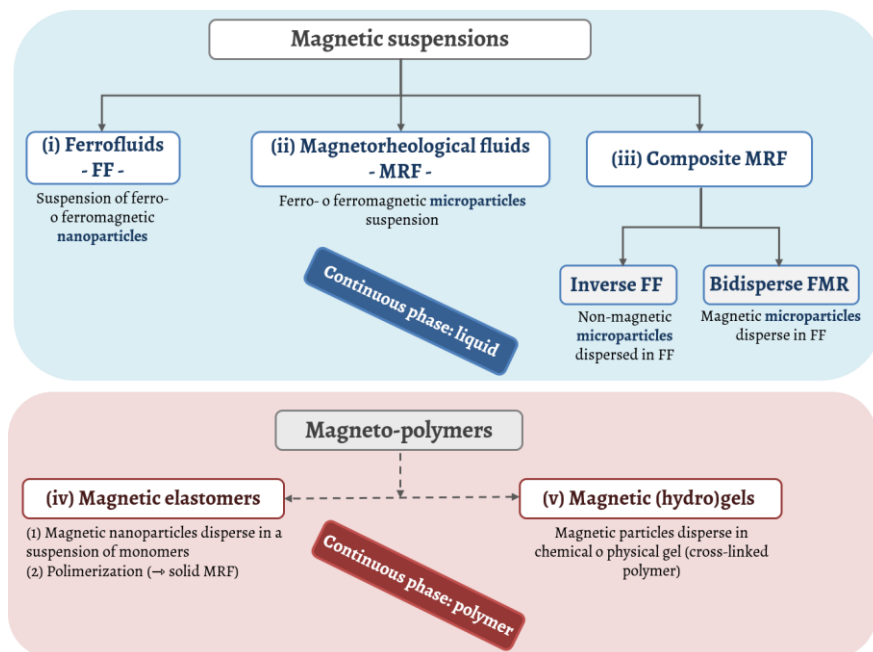


Figure 8.2. Classification of magnetic colloids.

First, the presence of magnetic particles allows visualization and monitoring of magnetic hydrogels in *in vivo* applications by magnetic resonance.<sup>17</sup> Second, *in vitro* studies suggest that the presence of magnetic material in hydrogels stimulates adhesion, proliferation and cell differentiation.<sup>18-20</sup> Third, artificial tissues based on magnetic hydrogels can act as magnets in *in vivo* applications attracting functionalized magnetic particles, injected close to them.<sup>17, 19, 21</sup> In biomedicine this represents an interesting strategy to guide and accumulate growth factors, drugs and cells attached to the injected magnetic particles. In addition, in pharmacological treatments against cancer would allow to avoid the systemic distribution of drugs. Finally, we have shown in recent works of our research group in collaboration with the Tissue Engineering Group of the Faculty of Medicine of the UGR, that artificial biological tissues based on magnetic hydrogels present mechanical properties modulated by applied magnetic fields.<sup>10</sup> This is a unique advantage with respect to other biomaterials: we would have intelligent materials suitable for mimicking natural tissues and, therefore, with a high potential in this field.

Keeping in mind the above-mentioned advantages, it can be concluded that the use of magnetic hydrogels in biomedicine offer considerable benefits over nonmagnetic ones. The most remarkable is, until now, the tenability of the mechanical properties by application of moderate magnetic fields.<sup>10</sup> This is one of the main motivations of this work, together with analysis of the biocompatibility, and the effect of magnetic particles on cell proliferation, when magnetic hydrogels are used as extracellular matrices to generate artificial biological tissues, both *ex vivo* and *in vivo*.

The aim of this thesis is the preparation of novel magnetic hydrogels for biomedical applications and their characterization. For this purpose, magnetic hydrogels having an adequate magnetic phase have been prepared. For this, part of the work focuses on the preparation of magnetic particles with intense magnetic response (high magnetic susceptibility and high saturation magnetization) and properly functionalized to achieve biocompatible. Another desired property for the magnetic particles is that they have low enough density to avoid their settling in the pre-gel mixture.

## 8.2 Magnetic hydrogels based on magnetic core-shell particles. *Ex vivo* and *in vivo* biocompatibility

In this paragraph, we describe the synthesis of new ellipsoidal core-shell nanoparticles. The physical and chemical properties of the synthesized particles (morphology, composition, magnetic properties) are studied. The *ex vivo* and *in vivo* biocompatibility of the core-shell nanocomposites, conferred by the incorporation of an outer layer of polyethylene glycol, is studied. Finally, we described the generation of magnetic tissues and demonstrate that they show active cell proliferation and good *in vivo* biocompatibility.

### 8.2.1 Experimental

#### 8.2.1.1 Synthesis of ellipsoidal core-shell particles

For the synthesis of ellipsoidal magnetic particles consisting of cores and shells, we followed a three-steps synthetic route.

**First step: Synthesis of silica particles (NPSi) with mesopores.** We dissolved 0.31 g of CTAB and 0.05 grams of PEG-200 in 50 ml of Milli-Q water, under mechanical stirring and at a temperature of 40 °C. Once the solution was prepared, 2.6 ml of 28-30 % NH<sub>4</sub>OH was added. To determine the amount of NH<sub>4</sub>OH necessary to obtain ellipsoidal NPSi cores, a morphological study was performed as a function of the pH of the reaction mixture (volume of NH<sub>4</sub>OH added). Finally, 1.5 ml of TEOS was added dropwise. The reaction mixture was kept, under mechanical agitation and at 40 °C.

After the reaction time was finished, the particles were recovered by centrifugation at 10000 rpm for 10 minutes. Then, we washed with water and ethanol, (we performed 4 cycles of dispersion/centrifugation with each one of the liquids) to eliminate the reactants that were not reacted. Lastly, the silica nanoparticles were calcined in a cylindrical tube furnace using a heating ramp of 5 °C/min starting at room temperature and up to 600 ° C. This temperature was maintained for 1 h, then the sample was left to cool down to room temperature.

**Second step: Synthesis of NPSi@Mag nanocomposites.** First, 50 mg of NPSi cores were dispersed in 15 mL of TREG in a 500 mL round bottom three-neck flask. In one of them a refrigeration column was placed; another was used to place mechanical agitation; and the third opening was used to create an inert atmosphere, by bubbling nitrogen. Once an inert atmosphere was created, we added 100 mg of  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ . The system remained under reflux conditions for 30 min. Finally, Poli@Mag nanocomposites were separated from the supernatant by centrifugation at 12,000 rpm for 10 minutes. Several cycles of centrifugation/redispersion with ethanol were carried out until all the remaining TREG was eliminated.

**Third step: Synthesis of NPSi@Mag@PEG nanocomposites.** To prepare NPSi@Mag@PEG composites we employed the following method based on the formation of a water-in-oil microemulsion.<sup>22</sup> In the water phase (15 mL) we dispersed 1 g of PEG-400 and 0.3 g of NPSi@Mag composites and ultrasonicated the sample for 7 min. The oil phase consisted of 450 mL of n-hexane, 150 mL of mineral oil and 750  $\mu\text{L}$  of sorbitan sesquioleate. Both phases were then mixed by ultrasonication for 5 min. Subsequently, 150 mL of glutaraldehyde were added and the sample was stirred for 2 h. The product was finally separated and washed with water and ethanol.

### 8.2.1.2 Synthesis of spherical core-shell nanocomposites

We used a two-steps synthesis route to obtain spherical nanocomposites with core-shell structure.

**First step: Synthesis of core-shell nanocomposites (Poly@Mag).** We dispersed 50 mg of polymeryc PolymP-H particles (supplied by NanoMyP® (Spain)) in 3 mL of aqueous solution of 0.1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ , for deprotonating the carboxylic groups on the surface of the particles, which were negatively charged. (ii) A solution of  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  with a molar ratio  $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}] = 0.5$  was added and the mixture was stirred mechanically. (iii) To allow the precipitation of the iron hydroxides, a solution of  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28-30 %) was added to the mixture until the solution reaches a pH = 12 (a black precipitate appeared). (iv) The mixture was kept under stirring for 1 hour, and then heated in a water bath until reaching a temperature of 95 ° C, to promote the formation of magnetite. (v) The reaction product (black precipitate) was allowed to



cool down to room temperature. Finally, the precipitate was separated magnetically and washed several times with water until reaching neutral pH.

**Second step: Synthesis of the outer polymeric layer (Poly@Mag@PEG).** We used the same method described in section 8.2.1.1 with slightly modifications.

### **8.2.1.3 Physicochemical characterization of the nanocomposites.**

**Electron microscopy.** We analyzed the morphology and composition of the synthesized nanocomposites by scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy. During SEM microscope, Energy-Dispersive X-ray (EDX) spectroscopy with high surface detector X-Max 50 nm was also conducted.

**Magnetization measurements.** The magnetization of the obtained powders and of the engineered magnetic tissues, was measured at room temperature as a function of the magnetic field strength using a vibrating sample magnetometer VSM 4500.

**Electrophoretic mobility measurements.** We measured the surface charge of the elongated nanocomposites, in each of the following steps of then shynthesis process: (i) the NPSi cores before calcination, (ii) the NPSi cores after calcination, (iii) NPSi@Mag composites, and (iv) NPSi@Mag@PEG composites.

### **8.2.1.4 Cytotoxicity assays.**

We evaluated the *ex vivo* cell cytotoxicity of Poly@Mag and Poly@Mag@PEG composites using a primary culture of human gingival fibroblasts. Cells were exposed to 1 vol. % of either Poly@Mag or Poly@Mag@PEG composites for 24 h. In addition, cultures of fibroblasts without the presence of magnetic composites were used as positive controls, and cells treated with 2 % Triton X-100 as negative control.<sup>30,45,53</sup> Cell morphology was classified into normal (elongated and spindle-shape) or affected morphology (irregular, rounded or apoptotic bodies) in each experimental conditions. Nuclear membrane permeability was evaluated by the quantification of DNA release and cell proliferation and viability were measured by using the water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) colorimetric assay.

### **8.2.1.5 Preparation of engineered magnetic tissues.**

We used 3.8 mL of human plasma (obtained from blood donors of the Health System Biobank of Granada, Spain) and added 1 million of oral mucosa fibroblasts resuspended in 0.625 mL of DMEM together with 75  $\mu$ L of a solution of tranexamic acid at a concentration of 0.1 g/mL. Tranexamic acid is an anti-fibrinolytic agent that prevents from scaffold degradation. Afterwards, we added concentrated suspensions of Poly@Mag or Poly@Mag@PEG particles (previously sterilized by dispersion in 70 % ethanol for 12 h) in DMEM (approximately 1.1 g/mL). Subsequently, we added 0.25

mL of a mixture of type VII agarose in PBS obtaining a 0.1 % of final agarose concentration. Finally, we added 0.25 mL of 2 %  $\text{CaCl}_2$  to the mixture to promote polymerization of fibrin. The final solution was kept at 37 °C until complete gelation. We applied a vertical magnetic field ( $36 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ) during the first 5 minutes of gelation with a coil. After 2 hours we added expansion medium (EM) to the constructs, and they were kept in standard culture conditions for 24 h.

### **8.2.1.6 *In vivo* evaluation of Poly@Mag@PEG composites and engineered magnetic tissues.**

**Laboratory animals and experimental groups.** For the *in vivo* assays of this work, 9-week-old male mice (*Mus Musculus*) were provided by and maintained in the Experimental Unit of the University Hospital “Virgen de las Nieves” (Granada, Spain). The animals were deeply anaesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of acepromizine (Calmo-Neosan®, 0.001 mg per g of weight of the animal) and ketamine (Imalgene 1000®, 0.15 mg per g of weight of the animal) after subcutaneous administration of atropine. The 27 provided animals were randomly assigned to the following three experimental groups ( $n = 9$  in each): (i) *in vivo* kinetic evaluation of Poly@Mag@PEG nanocomposites, by subcutaneously injecting 500  $\mu\text{L}$  of a sterile physiological suspension of the composites ( $11 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in the interscapulum of each mouse. (ii) *In vivo* kinetic evaluation of engineered magnetic tissue (FA-PMPC), by a subcutaneous implantation of a 500  $\mu\text{L}$  construct (concentration of composites of  $11 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in the interscapulum. (iii) Control group (CTR) of healthy animals without any surgical intervention. After injection or subcutaneous implantation of the constructs, all the animals were housed in a temperature controlled room ( $21 \pm 1$  °C), provided with a 12 h light/dark cycle and *ad libitum* access to tap water and standard mice chow. The *in vivo* histological biocompatibility was studied after 7, 14 and 21 days (3 mice of each group were analyzed each week,  $n = 3$ ). Animals of each experimental group were euthanized by cervical dislocation and the interscapulum, liver, kidneys, spleen and lungs were harvested for tissue processing and histological analyses.

**Histological analyses.** All samples were fixed in 10 % buffered formalin for 24 h, dehydrated and embedded in paraffin and divided into sections of 5  $\mu\text{m}$  of thickness. Histological sections were dewaxed, hydrated and stained with hematoxylin–eosin (H&E) for morphological evaluation and/or pathological evaluations. All the samples were stained using the picosirius method which is highly specific for the evaluation of the collagen extracellular matrix. In addition, we used the periodic acid-Schiff (PAS) histochemical method to evaluate the glycogen content of the liver (indicator of the normal function of this organ), the basal membrane of the kidneys (indicator of the normal structure of these organs) and the basal membrane and reticular fibers

of the other tissues and organs. For the identification of Poly@Mag@PEG nanocomposites, all the tissues and organs were stained with Perls' method (described above).

**Evaluation of the magnetic response of organ samples.** We took samples from the area of injection/implantation, spleen, liver, lungs and kidneys and evaluated their magnetic response to identify the presence of Poly@Mag@PEG composites. For this purpose, we placed the samples near a neodymium magnet providing a magnetic field gradient of  $10 \text{ mT}\cdot\text{mm}^{-1}$  and a maximum field of 470 mT, and observed the magnetic field-induced migration of the composites towards the areas of stronger field.

## 8.2.2 Results and discussion

### 8.2.2.1 Synthesis and characterization of ellipsoidal core-shell particles

Biocompatible magnetic ellipsoidal nanocomposites were prepared following a three stages synthesis route, as described in Figure 8.3.

Step (i) of the synthesis gave silica cores of ellipsoidal morphology as seen in Figure 8.4 (c), (d) and (e). To obtain these nuclei, several tests were carried out varying the pH of the reaction mixture (pH measured before adding the TEOS). Six different tests were carried out, adding different volumes (from 1.8 to 3.2 mL) of ammonium hydroxide at 28-30 %.

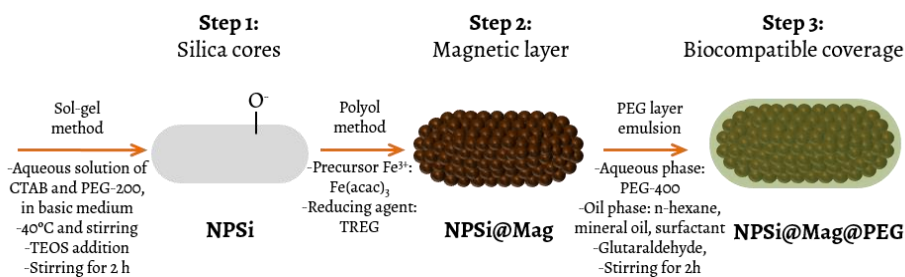


Figure 8.3. Scheme of the synthesis route for magnetic ellipsoidal core-shell nanostructures. First stage: ellipsoidal silica nanoparticles are obtained with OH groups on the surface. Second stage: on OH groups, partially deprotonated ( $-\text{O}^-$ ),  $\text{Fe}^{3+}$  adsorption occurs; magnetite nanocrystals are produced by the action of TREG at high temperature. Last stage: coating of magnetic nanocomposites with PEG through the formation of an emulsion.

This synthesis is very sensitive to small variations in pH as we can see in the Figure 8.4. In the pH range between 11.58 (P3) and 11.64 (P4), the length/diameter aspect ratio of the silica nanoparticles reaches its maximum value (between 2.3 and 2.7). However, at lower or higher pH values, particles with a significantly lower aspect ratio are obtained –see Figure 8.4, Figure 8.5 and Table 8.1.

Taking into account that for  $\text{NH}_4\text{OH}$  volumes between 2.2 and 2.8 mL, silica nanoparticles with a similar aspect ratio were obtained, the optimum volume of  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28-30 %) was fixed at 2.6 mL. Under these conditions, nanoparticles with dimensions  $(160 \pm 30 \text{ nm}) \times (470 \pm 40 \text{ nm})$  in diameter  $\times$  length (aspect ratio 2.9) were obtained.

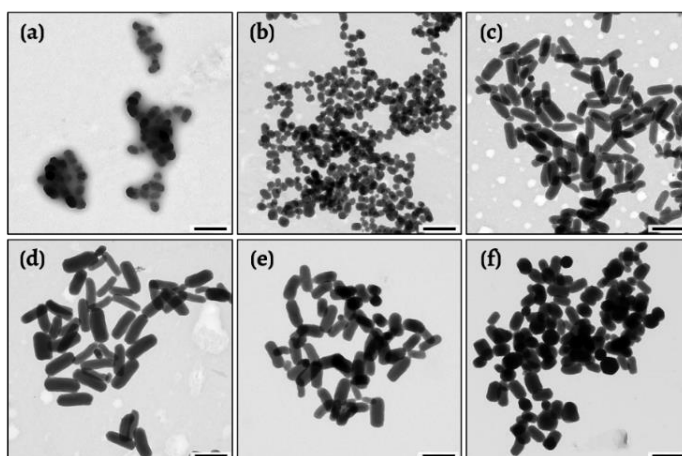


Figure 8.4. Morphology, observed by electron microscopy, of the NPSi cores for different volumes (V) of  $\text{NH}_4\text{OH}$  at 28-30% added. (a) Test P1, V = 1.8 mL. (b) Test P2, V = 2.0 mL. (c) Test P3, V = 2.2 mL. (d) Test P4, V = 2.4 mL. (e) Test P5, V = 2.8 mL. (f) Test P6, V = 3.2 mL. Scale bar length 500 nm.

Table 8.1. Morphology of the NPSi nuclei according to the pH of the reaction before adding TEOS. The average diameter and length of the particles obtained in each of the tests are included. The corresponding length/diameter aspect ratios appear in the last column.

Test	$\text{NH}_4\text{OH}$ V (mL)	pH	Diameter D (nm)	Length L (nm)	Ratio L/D
<b>P1</b>	1,8	11,52	$106 \pm 15$	$180 \pm 40$	1,7
<b>P2</b>	2,0	11,55	$116 \pm 17$	$160 \pm 30$	1,4
<b>P3</b>	2,2	11,58	$145 \pm 25$	$360 \pm 50$	2,5
<b>P4</b>	2,4	11,60	$163 \pm 22$	$390 \pm 50$	2,7
<b>P5</b>	2,8	11,64	$144 \pm 23$	$334 \pm 40$	2,3
<b>P6</b>	3,2	11,70	$210 \pm 40$	$354 \pm 60$	1,7

Once the dimensions of the NPSi cores were determined, the electrical properties of the solid/solution interface were studied. For this, the electrophoretic mobility of silica nanoparticles before and after calcination was measured. The calcination was carried out in order to obtain pure silica nanoparticles, eliminating any remaining

organic substance from the reaction mixture, in particular the CTAB surfactant that could remain adsorbed.

As seen in Figure 8.6, the silica nanoparticles before being calcined (black square symbols) had a positive surface charge over the entire pH range under study. However, for the calcined silica nanoparticles (blue triangles) the value of the electrophoretic mobility was negative throughout the pH range, more is observed a decreasing tendency of mobility as the pH increases. This tendency is expected for the NPSi cores, since these particles have Si-OH groups on the surface that, above the isoelectric point of the silica (located at  $\text{pH} \leq 2$ ), dissociate. Then, there are more surface groups with negative charge (Si-O<sup>-</sup>) as the pH value increases. We can deduce that the silica nanoparticles, before being calcined, had CTAB (cationic surfactant) adsorbed causing the silica cores to have positive mobility. With the calcination, the remaining CTAB in the pores of the particles was eliminated, leaving the surface with net negative charge. These groups favor, the adsorption of Fe<sup>3+</sup> cations on the NPSi cores which is essential for the formation of a magnetite shell.

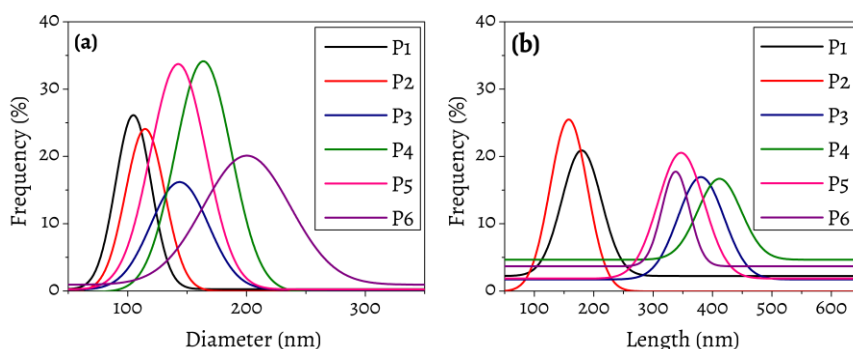


Figure 8.5. Size distribution of the NPSi cores for different pH values of the solution used in the P1 to P6 tests (see Table 3.1). Diameter (a) and length (b) of the particles.

In addition, electrophoretic mobility measurements were also carried out in suspensions of NPSi@Mag (Figure 8.6) for which is observed that these nanocomposites showed for the whole pH range under study, smaller absolute values of the (negative) electrophoretic mobility than that of the calcined NPSi cores. As an example for  $\text{pH} = 7$ , the electrophoretic mobility for the calcined cores was  $-2.52 \pm 0.07 \mu\text{S}\cdot\text{cm}\cdot\text{Vs}^{-1}$  while for the nanocomposites NPSi@Mag it was  $-1.54 \pm 0.05 \mu\text{S}\cdot\text{cm}\cdot\text{Vs}^{-1}$ . This reduction in the absolute value of the mobility indicates that the deposited magnetic layer had a surface charge that counteracts, at least partially, the negative charge of the NPSi cores. This seems logical, considering that magnetite has an isoelectric point around  $\text{pH} = 6.5$  (positive mobility for  $\text{pH} < 6.5$ , negative mobility for  $\text{pH} > 6.5$ )<sup>23</sup>. If

we take into account that the surface charge of the silica nuclei was high and that, as we will see below, the layer of magnetite deposited on their surface was not very thick, it seems logical that the electrophoretic mobility curve for the NPSi@Mag compounds remained negative throughout the range of pH studied. Finally, the mobility of the NPSi@Mag particles is very similar to that of the NPSi@Mag@PEG particles, from which it can be concluded that the PEG adsorption (polymer without ionizable groups) barely shielded the negative charge present in the NPSi@Mag composites.

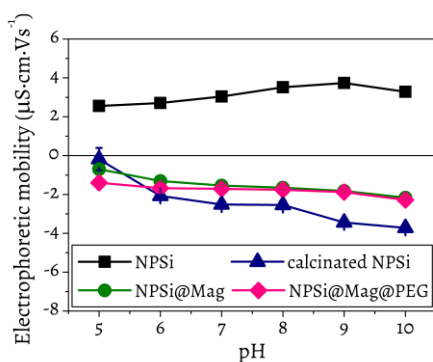


Figure 8.6. Electrophoretic mobility of suspensions of ellipsoidal particles as a function of the pH. Ionic strength 1 mM NaNO<sub>3</sub>. Black squares: NPSi cores before calcination (with CTAB adsorbed on the surface). Blue triangles: NPSi cores after calcination. Green circles: NPSi@Mag nanocomposites. Pink diamonds: NPSi@Mag@PEG nanocomposites.

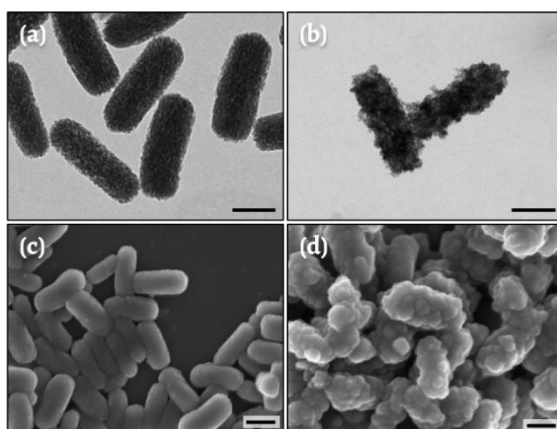


Figure 8.7. Transmission (a, b) and scanning (c, d) electron microscopy images of the silica nanoparticle cores NPSi (a, c), and of the NPSi@Mag nanocomposites (c, d). Scale bar length 200 nm.

In the second stage of the synthesis, the deposition of magnetite nanoparticles was performed, in order to obtain the NPSi@Mag nanocomposites. The NPSi cores were completely covered by magnetic nanoparticles with a diameter of 30 - 60 nm,

as can be seen by comparison of TEM - SEM images of the silica particles in Figure 8.7 (a)-(c) with those of NPSi@Mag nanocomposites in Figure 8.7 (b)-(d).

The magnetic properties of the samples were determined by measuring the magnetization as a function of the field strength in the approximate range between 400 and  $-400 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ —Figure 8.8.

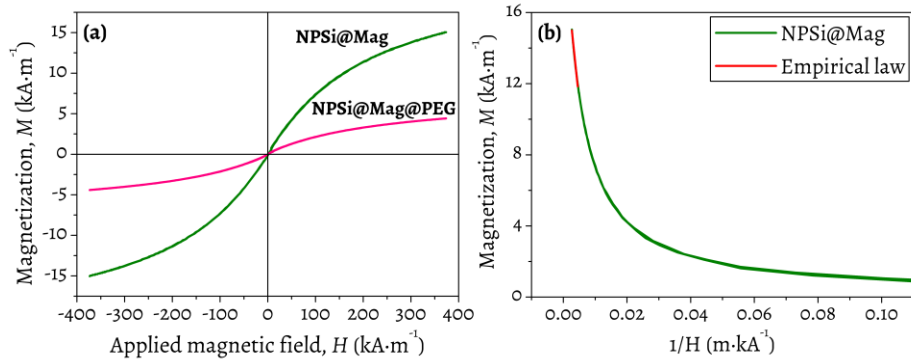


Figure 8.8. (a) Magnetization of the NPSi@Mag and NPSi@Mag@PEG samples (green and pink lines, respectively) versus the magnetic field intensity,  $H$ . The nanocomposites without the PEG coverage (NPSi@Mag) reached a higher saturation magnetization value than the NPSi@Mag@PEG nanocomposites. (b) Magnetization versus the inverse of the magnetic field; the red line represents the best fit of equation (8.2) to the data in the linear part at high  $H$ .

In order to calculate the magnetic susceptibility and the saturation magnetization of the NPSi@Mag nanocomposites from the data represented in Figure 8.8 (a), the data of the first magnetization curve were adjusted to the Fröhlich-Kennelly law:<sup>24</sup>

$$M = \frac{\chi_i H M_s}{M_s + \chi_i |H|} \quad \text{Eq. (8.1)}$$

This equation fitted the data quite well at low magnetic field values, giving a fitting magnetic susceptibility value of  $\chi_i = 0.105$ . On the contrary at high fields, the fitting gave an unusually high magnetization value ( $M_s = 24.5 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Therefore, to determine this last parameter, the following empirical law was chosen:

$$M = M_s - a \left( \frac{1}{H} \right) \quad \text{Eq. (8.2)}$$

The magnetization is plotted as a function of the inverse of the magnetic field in Figure 8.8 (b) and a linear fitting was made in the area of the curve corresponding to a high magnetic field (red line). A value of the saturation magnetization  $M_s = 19.6 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  was obtained. Taking into account that the saturation magnetization of bulk

magnetite is  $M_s = 447 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ,<sup>25</sup> we estimated as 4,4 % the magnetite volume fraction by the mixing law.

In the third stage of the synthesis, the NPSi@Mag nanocomposites were coated with a polyethylene glycol polymer layer, in order to confer the desired biocompatibility. The polyethylene glycol layer was visible by transmission electron microscopy. A semitransparent layer covering NPSi@Mag particles was observed.

In addition, the presence of the polyethylene glycol layer was reflected in the magnetic properties of the NPSi@Mag@PEG composites. As we can see in Figure 8.8 (a) (pink curve), the magnetic susceptibility (initial slope of the curve) and the saturation magnetization are lower for these nanocomposites ( $\chi_i = 0.03$  and  $M_s = 5.8 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ) than for the NPSi@Mag particles ( $\chi_i = 0.105$  and  $M_s = 19.6 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ). This fact is explained taking into account that, when the polymer layer is attached to the NPSi@Mag surface, the total volume and mass of the particles increased. Furthermore, some conversion of magnetite to nonmagnetic oxide took place during the PEG coating.

### **8.2.2.2 *Ex vivo biocompatibility of Poly@Mag and Poly@Mag@PEG composites***

Human gingival fibroblasts cultured in the presence of Poly@Mag composites showed a substantial morphological alteration (some cells maintained the typical elongated shape, others seemed to have a more irregular and rounded morphology). However, in the case of the Poly@Mag@PEG composites, the cells retained the elongated morphology. In addition, we performance WST-1 and DNA release. The obtained results confirmed the conclusion explained above.

These results support the high *ex vivo* biocompatibility associated with the PEG coating and demonstrate that Poly@Mag@PEG nanocomposites are excellent candidates for their incorporation in tissues generated by tissue engineering.

### **8.2.2.3 *Time-dependent in vivo biocompatibility of Poly@Mag@PEG composites and magnetic substitutes***

The composites were suspended in physiological solution and were carefully injected into mice. The magnetic constructs were surgically implanted in mice. None of the animals died after 21 days in any of the experimental groups. After 21 days the animals showed no signs of side effects and the changes of body weight were similar to those of the control group. The subcutaneously injected Poly@Mag@PEG nanocomposites remained in the interscapulum during the length experiment (i.e., 21 days), without migration to distal organs of the body. The injected nanocomposites formed an irregular and dense mass consisting of nanocomposite aggregates—Figure 8.9 (b)-



(g). The host response around this mass was a moderate acute inflammatory reaction mainly composed of neutrophils, some mononuclear cells and predominantly macrophages –Figure 8.9 (b)-(g). The inflammatory reaction was more evident after the first week, but it progressively decreased from the second to the third week. The mass was not fully reabsorbed after 21 days.

The histological and histochemical analyses of the liver, kidney, spleen and lungs did not show any inflammatory reaction and all organs were histologically normal during the 21 day follow-up period –Figure 8.9 (n)-(q). Tissue samples taken from these organs did not exhibit any magnetic response, in contrast to the samples obtained from the interscapular region, which were magnetic because of the presence of the nanocomposite. The histological analysis of the magnetic tissue-like constructs evidenced their successful subcutaneous implantation. The constructs showed a regular and compacted morphology –Figure 8.9 (h)–(m). The nanocomposites appeared homogeneously distributed over the thin FA hydrogel network, either individually or forming small aggregates, in contrast to the bigger aggregates found when the nanocomposites were injected in suspension –insets in Figure 8.9 (c) and (i) respectively. Therefore, the FA hydrogel prevented from the aggregation of the nanocomposites and favored their consistent and homogeneous individual distribution. The use of the FA hydrogel also eased the interaction with the host tissue: host cells were able to invade the implanted constructs from the first week (Figure 8.9 (i) and inset), in contrast to the few cells observed in the case of the injected nanocomposite suspension (Figure 8.9 (c) and inset). The constructs were not fully reabsorbed after 21 days. The host response to the constructs was a mild to moderate acute inflammatory reaction which progressively decreased over time –Figure 8.9 (h)-(m). As in the case of the suspension of Poly@Mag@PEG composites, a thin connective tissue capsule composed of collagen fibers and a vascular network was formed around the implants –Figure 8.9 (k) and (m). The moderate local acute inflammatory reaction did not affect the surrounding connective tissues and distal organs –Figure 8.9 (h)-(m) and (r)-(u). Similarly to what happened in the case of the nanocomposites in suspension, only the samples from the interscapulum showed a magnetic response, which indicated no migration of the Poly@Mag@PEG composites to other organs during the length of the experiment.

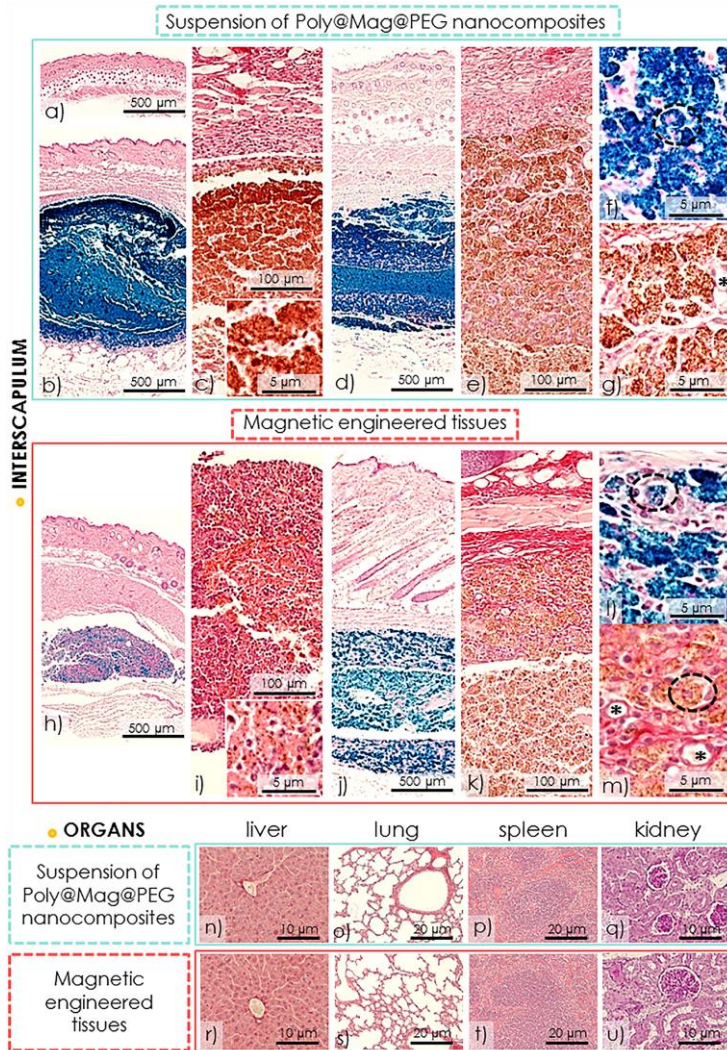


Figure 8.9. *In vivo* histological analyses. (a) Native skin control with normal epidermis, dermis and hypodermis. (b–g) Tissue from the interscapulum where Poly@Mag@PEG nanocomposites were injected after 1 week (b and c) and 3 weeks (d–g) post injection. (h–m) Tissue from the interscapulum where the magnetic tissue-like constructs were implanted, after 1 week (h and i) and 3 weeks (j–m) post-surgical implantation. (b), (d), (f), (h), (j) and (l) images show the Prussian blue histochemical reaction for the Poly@Mag@PEG nanocomposites (Perl’s method). (c), (e), (g), (i), (k) and (m) show picrosirius staining. (e) and (k) show the zone of external degradation and capsule (stained in red with picrosirius). Note the high number of cells in the engineered magnetic tissue after the first week (i and inset) in contrast with the injected nanocomposites (c and the inset). Circles indicate macrophages with nanocomposites, and (\*) show small blood vessels in the newly-formed inflammatory capsule after 3 weeks post *in vivo* implantation. (n–u) Tissues from distal organs (liver, lung, spleen and kidney) of the experimental groups of injected Poly@Mag@PEG nanocomposites (n–q) and the implanted magnetic constructs (r–u) after 3 weeks. All organs were histologically normal during the 21 day follow-up period.

## 8.3 Hydrogels with magnetic particles. Rheology and *ex vivo* and *in vivo* biocompatibility

### 8.3.1 Introduction

Hydrogels are systems consisting of flexible polymer chains cross-linked within a continuous aqueous medium. Due to the versatility of the properties (mechanical, chemical, biocompatibility degree) of hydrogels, depending on their composition and preparation protocols, different applications have been reported for these materials in several fields, including biomedical engineering.<sup>26, 27</sup>

The fundamental investigation of the rheological properties of gels is an active field of research,<sup>28-30</sup> that presents special challenges due to possible changes in structure,<sup>31</sup> solvent loss<sup>32</sup> and wall slip effects.<sup>28, 32</sup> Many rheological studies have focused on the steady-state storage modulus, gelation kinetics and sol-gel transition of hydrogels.<sup>30, 33-36</sup> Of particular interest is the study of the gel point that can be defined as the point at which crosslinking polymers undergo phase transition from liquid to solid.<sup>37</sup> A general method to detect the gel point is the Winter and Chambon criterion that identifies this with the point at which  $\tan\delta = G''/G'$  is frequency independent.<sup>38</sup>

In addition to polymer and water, hydrogels may contain other materials that modify their properties, such as synthetic nano- or microparticles. An example of that are the so-called magnetic hydrogels, which are characterized by the magnetic particles that are embedded within the polymer matrix.<sup>6</sup> The presence of magnetic material within this kind of hydrogels allows their detection and control by noncontact methods.<sup>10, 39-41</sup>

Several advantages have been reported for magnetic hydrogels in the field of biomedicine.<sup>17</sup> For example, it was recently demonstrated that when the presence of magnetic materials within the scaffolds was combined with application of a static magnetic field, a synergic effect in the osteoblastic differentiation of primary mouse calvarium osteoblasts was obtained.<sup>42</sup> In addition, very recently the preparation of artificial tissue-like hydrogels with magnetic field-depending mechanical properties has been reported.<sup>10, 40, 41</sup> This characteristics would allow the adjustment by noncontact magnetic forces of the mechanical properties of artificial magnetic hydrogels to native tissues at the site of implantation.

Interestingly, a substantial enhancement of the mechanical properties of magnetic hydrogels with respect to nonmagnetic ones was also reported in the absence of applied magnetic fields in these previous works.<sup>10, 40, 41</sup> For example, a twofold to threefold increase of the storage modulus was found for fibrin-agarose hydrogels

containing around 1 vol. % of magnetic particles with respect to the storage modulus of hydrogels without magnetic particles.<sup>10, 40, 41</sup> Note that this increase was not connected to the magnetic character of the particles, as demonstrated by using nonmagnetic particles, for which a similar enhancement was obtained.<sup>10</sup> Such an increase was much higher than the one predicted by the classical theory of mechanics of composite materials for a continuous matrix with spherical, completely rigid inclusions<sup>43</sup> and, thus, its origin must be in changes in the internal structure of the hydrogels when nanoparticles were included in the formulation.

In this context, the aim of the present section is to characterize such an enhancement of the mechanical properties and to investigate its microscopic origin. In order to focus on the interaction between the nanoparticles and the fibrin polymer we investigated for this work fibrin hydrogels as simple as possible, without addition of agarose (a polysaccharide), which was used in previous chapter to give consistence to the resulting fibrin-agarose hydrogels. We prepared hydrogels at different concentrations of magnetic nanoparticles (MNP) and analyzed their macroscopic appearance, microscopic structure, swelling behavior, rheological properties and gelling time. As it will be shown below, we found dramatic changes in the macroscopic properties of the hydrogels when particle concentration was increased, which correlated well with changes in the microscopic structure.

### **8.3.2 Materials and Methods**

#### **8.3.2.1 Materials**

For the preparation of the hydrogels, we used frozen human plasma obtained from blood donors (provided by the Granada Biobank of the Andalusian Regional Government). As magnetic phase for the preparation of the magnetic hydrogels, we used MagP-OH<sup>®</sup> nanoparticles supplied by nanoMyP<sup>®</sup> (Spain) as previously described.<sup>27</sup> These particles consisted of a multicrystalline magnetite (iron oxide) core (90 % v/v) and a polymeric layer (10 % v/v) functionalized with OH<sup>-</sup> groups. The mean hydrodynamic diameter of MagP-OH<sup>®</sup> particles was 110 nm.

#### **8.3.2.2 Preparation of the hydrogels and magnetic hydrogels**

For an initial volume of the mixture of 5 mL, we placed 3.8 mL of human plasma in culture dishes of 10 mL of volume and 35 mm of diameter. Then, we added 875  $\mu$ L of PBS, 75  $\mu$ L of tranexamic acid and 250  $\mu$ L of 2 % calcium chloride aqueous solution to promote the fibrin polymerization. Approximately 120 min after placing the hydrogels in the incubator, we added 5 mL of PBS (0.1 M and pH 7.2-7.4) to the obtained hydrogels to prevent their dehydration. Hydrogels were kept under cell culture conditions (37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>) for about 24 hours.

We also prepared magnetic hydrogels by modifying slightly the previous protocol. Namely, adding the corresponding amount of MagP-OH<sup>®</sup> nanoparticles dispersed into the PBS solution with a final volume of 875  $\mu\text{L}$ . We tested different volume concentrations of MagP-OH<sup>®</sup> particles in the initial mixtures (0.1 to 1 vol. %).

### 8.3.2.3 Swelling of hydrogels

In order to have an indirect evaluation of cross-linking density and information about the hydrogel porous structure, we measured the mass of the pristine hydrogels after 24 hours of gelling. For this aim, we proceeded as it follows. (i) Hydrogels, contained in the culture dishes and submerged in PBS according to the preparation protocol (see subsection 8.3.2.2), were carefully detached from the walls of the dishes with the help of a spatula. (ii) We removed all the supernatant PBS solution contained in the dish with a pipette. (iii) Afterwards, we measured the mass of the dish containing the hydrogel ( $M_{d-h}$ ) by means of a digital microbalance. (iv) We finally obtained the mass of the hydrogel, by subtracting the mass of the dish from  $M_{d-h}$ . (v) We obtained the mass of the hydrogels after dehydration.

From these data, we obtained the volume-based swelling degrees  $Q$  of the hydrogels, which can be defined as:<sup>44</sup>

$$Q = \frac{V_p + V_{lc}}{V_p} \quad \text{Eq. (8.3)}$$

where  $V_p$  is the volume of polymer in the hydrogel and  $V_{lc}$  the volume of the liquid carrier medium. We approximated the mass of fibrin polymer to the mean mass of fibrinogen within human plasma: 2 g/L.<sup>52</sup> Then, we calculated the volume of polymer by taking into account the density of proteins (1.35 g/mL).<sup>45</sup> Thus, the estimated value of the volume of polymer in our hydrogels was  $V_p = 5.6 \mu\text{L}$ . Then, we measured the volume of the hydrogels, and we calculated  $Q$  by the following formula:

$$Q = \frac{V_T - V_{mp}}{V_p} \quad \text{Eq. (8.4)}$$

where  $V_T$  is the total volume of the hydrogels and  $V_{mp}$  is the volume of magnetic particles in the hydrogel, which is known from the preparation protocol. Note finally that we obtained  $V_T$  from the mass of the hydrogels by assuming a density of 1 g/mL, since water was their main constituent.

### 8.3.2.4 Microstructure of the hydrogels

For the analysis of the microscopic structure of the samples, we prepared samples by the technique of Critical Point Drying (CPD), which allows conservation of the original structure of the sample. After, we analyzed the internal microstructure of the hydrogels by means of a Quanta 650 Field-Emission Environmental Scanning Electron Microscope (FEI, USA). In order to detect differences in composition, we used a circular back scatter detector, which allows to determine differences in the composition of the observed matter within a single plane. With this technique, within a single observation plane denser elements appear brighter.

### 8.3.2.5 Rheological characterization of the hydrogels

We characterized the mechanical properties of the hydrogels with a Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) controlled stress rheometer at 37 °C. We selected a measuring system geometry consisting of a parallel plate set of 3.5 cm of diameter with rough surfaces (to avoid wall slip) made of titanium (sensor P35Ti L, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). To perform the measurements, we placed the hydrogels on the bottom plate of the rheometer. Afterwards, we descended the upper plate of the rheometer until perfect contact with the hydrogel was reached, without appreciable compression of the hydrogel. We investigated the rheological properties of the hydrogels as follow.

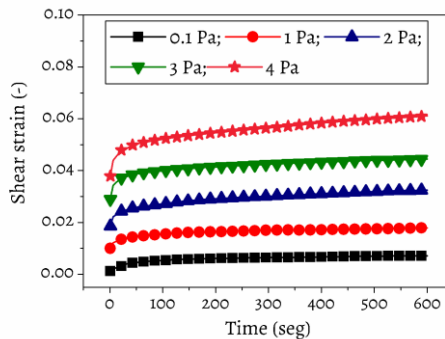


Figure 8.10. Time evolution of the shear strain for different values of the applied shear stress (indicated in the graph), for a nonmagnetic fibrin hydrogel.

**Behavior under constant shear stress.** We subjected the samples to a constant shear stress and we the corresponding shear strain was monitored as a function of time for 600 s (Figure 8.10). As observed, for each value of the imposed shear stress, the strain increased fast with time during the first 50-100 s, tending to a stationary value at longer times. Thus, in this work we took the average of the strain corresponding

to the last 100 s of curves like these shown in Figure 8.10, as representative value of the shear strain for each imposed value of the shear stress. Measurements were repeated at increasing shear stress values, to obtain the curves of the stationary shear strain as a function of the imposed shear stress. The initial slope of these curves is the rigidity modulus of the hydrogels.

**Behavior under oscillatory shear strain.** In these tests the samples were subjected to sinusoidal shear strains of given amplitude and frequency, and the corresponding shear stress was measured. We performed two types of tests for this regime: (i) Amplitude sweeps, for which the frequency of the oscillatory shear strain was fixed at 1 Hz and its amplitude increased logarithmically spaced in the range 0.005 - 2.0. This test allowed to obtain the linear viscoelastic region (LVR). (ii) Frequency sweeps, for which we fixed the amplitude of the oscillatory shear stress at a value corresponding to the LVR, and the frequency was increased linearly spaced in the range of 0-10 Hz.

### 8.3.3 Results

#### 8.3.3.1 Swelling behavior of hydrogels

For fresh samples after 24 hours of preparation, magnetic hydrogels corresponding to concentrations of MNP of 0.1 % or 0.2 % presented a considerable higher weight than hydrogels without MNP (see Table 8.2). As the concentration of MNP was further increased above 0.2 %, the weight of the samples diminished, becoming non-significantly different with respect to nonmagnetic hydrogels. The maximum weight was thus obtained for a MNP concentration of 0.1 %, although no significant difference was obtained for the weight of this sample with respect to the sample containing 0.2 %. Since the main contribution to the weight of the hydrogels was water (remark the almost negligible weight of the dried hydrogels with respect to their initial weight in Table 8.2), differences were mainly due to the water content, which was thus higher for magnetic hydrogels containing 0.1 % or 0.2 % of MNP, than for magnetic hydrogels containing a further concentration of MNP or nonmagnetic hydrogels. Furthermore, for dried samples differences in weight were minimal and statistically non-significant (note that average values are overlapped when standard deviations are taken into account), as a consequence of the removal of water.

The same conclusions can be drawn in terms of the volume-based swelling degrees ( $Q$ )—see data in Table 8.2. Nevertheless, this index gives us a better idea of the capacity of the polymer network to swell and, thus, of their maximum porosity achieved. Note the very high values of the swelling degree of both magnetic and non-magnetic hydrogels. A  $Q$  value of 500 is more than 5 times higher than the maximum value reported by Messing and coworkers for poly(acrylamide) ferrohydrogels.<sup>44</sup>

Concerning the non-monotonic dependence of the swelling degree on the concentration of MNP, it can be explained by supposing that the MNP may serve as nucleation sites for the fibrin polymerization. At the lowest concentration of MNP, their presence as knots of the fibrin net can open the network, resulting in a more porous structure. Then, as the concentration of MNP was increased, the additional cross-linking they imparted would progressively close the network, diminishing the porosity of the structure, and thus the swelling degree. Note that this hypothesis is consistent with the results of the next subsection.

Table 8.2. Experimental data corresponding to swelling experiments of hydrogels. We provide data of weight ( $W_i$ ) and volume-based swelling degrees ( $Q$ ) of hydrogels after 24 hours of incubation at 37 °C, as well as weight ( $W_d$ ) of hydrogels after dehydration. We can observe that the maximum  $Q$  value was obtained for fibrin hydrogels of 0.1 % concentration of magnetic particles.

Concentration of magnetic particles (% vol.)	$W_i$ (mg)	$Q$ (-)	$W_d$ (mg)	$W_d/W_i$ (%)
0	$2630 \pm 230$	$470 \pm 40$	$86 \pm 25$	$3.3 \pm 1.2$
0.1	$3800 \pm 300$	$680 \pm 50$	$112 \pm 17$	$2.9 \pm 0.7$
0.2	$3560 \pm 200$	$640 \pm 40$	$94 \pm 22$	$2.6 \pm 0.8$
0.3	$2540 \pm 210$	$450 \pm 40$	$117 \pm 14$	$4.6 \pm 0.9$
0.4	$2600 \pm 400$	$460 \pm 70$	$123 \pm 15$	$4.7 \pm 1.3$

### 8.3.3.2 Microstructure of the hydrogels

To verify this assumption of the particles opening the polymeric network, we carried out scanning electron microscopy (SEM) observations of nonmagnetic hydrogels and magnetic hydrogels containing 0.2 vol. % of MagP-OH<sup>®</sup> nanoparticles.

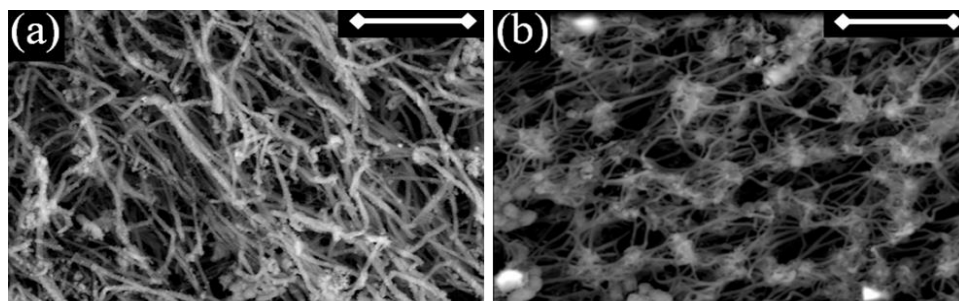


Figure 8.11. Environmental scanning electron microscopy of hydrogels. (a) Nonmagnetic hydrogel; (b) magnetic hydrogel prepared at a concentration of magnetic nanoparticles of 0.2 vol. %.



In such a way, we could observe that the nonmagnetic hydrogel –see Figure 8.11 (a)– had fibrin fibers distributed forming a relatively dense porous structure. Furthermore, we can see that the structure had not any junction, except for the homogeneously distributed links between couples of fibers. On the other hand, for magnetic hydrogels with 0.2 vol.% MagP-OH<sup>®</sup> –see Figure 8.11 (b)–, we observe a much opener structure, with knots formed presumably by clusters of MNP and polymer material (fibrinogen) –note that within a single plane of observation, denser elements appear brighter, which allows to detect the presence of magnetic particles. These knots very likely performed as cross-linkers between long polymer fibers, making possible to maintain an opener structure, avoiding the collapse of the fibers. Also, we can see that the structure was very homogeneous, with a high porosity that justifies the higher swelling capability of magnetic hydrogels compared with the swelling capability of the nonmagnetic hydrogels.

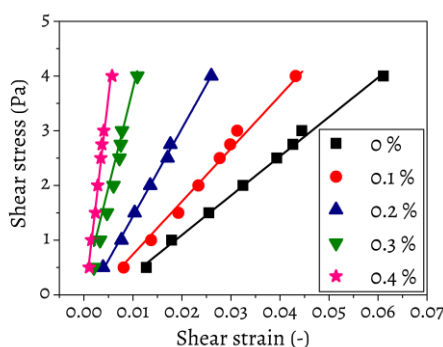


Figure 8.12. Shear stress vs. shear strain curves for fibrin hydrogels prepared at different volume concentrations of magnetic nanoparticles (indicated in the figure). Symbols represent experimental data and the continuous lines the best fits to straight lines. Experimental data were obtained from curves like those shown in Figure 8.10, by averaging of the shear strain values corresponding to the last 100 s of measurement.

### 8.3.3.3 Rheological characterization of the hydrogels

**Behavior under constant shear stress.** The behavior of the hydrogels was first characterized by measuring the shear strain resulting from imposed values of shear stress increased stepwise. At low shear strain the curves of shear stress vs. shear strain could be approximated to straight lines, with a characteristic slope (Figure 8.12). This slope is the rigidity modulus, which is one of the quantities that are used to measure the stiffness of a material. For magnetic hydrogels, rigidity modulus increased with the concentration of MNP (Figure 8.13). This increase is much stronger than this predicted by Einstein's formula or any other formula, such as

Krieger-Dougherty equation, based on the assumption of hard, or slightly deformable spheres.<sup>46</sup> Note that such equations work well for random dispersion of the particles, without attachment to the polymers, as illustrated for example for magnetic hydrogels consisting of carrageenan and carbonyl iron particles in Ref.<sup>47</sup>. For the system under study, the enhancement of the rigidity modulus with the concentration of MNP is well fitted by a parabolic-like function.

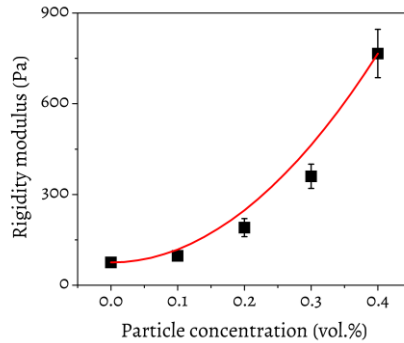


Figure 8.13. Rigidity modulus of magnetic hydrogels for increasing concentration of magnetic nanoparticles. Squares represent the experimental data. The continuous line (-) represents the theoretical prediction according to equation(8.14), for  $G_0 = 75 \text{ Pa}$ ;  $A = 4.3 \cdot 10^7 \text{ Pa}$ .

**Behavior under oscillatory shear strain.** For the characterization of the behavior under oscillatory shear strain, first we carried out oscillatory shear tests of fixed frequency (1 Hz) and increasing strain amplitude. From these measurements we obtained the values of  $G'$  and  $G''$  as a function of the strain amplitude ( $\gamma$ ). An example of the obtained curves of  $G'$  and  $G''$  vs.  $\gamma$  is shown in Figure 8.14— similar trends were obtained for other magnetic and nonmagnetic hydrogels. Let us analyze the trends obtained for curves of  $G'$  and  $G''$  vs.  $\gamma$ . First, as observed, the curves demonstrate roughly constant values of  $G'$  and  $G''$  at low values of the strain amplitude ( $\gamma < 0.03$ ). This pseudo-plateau region is identified with the LVR. At larger values of the strain amplitude, both  $G'$  and  $G''$  progressively diminished, in what is known as the nonlinear viscoelastic regime. Within the complete LVR, the values of  $G'$  are much larger than the values of  $G''$ , which is an indication of the material being more solid-like than liquid-like, in coherence with what is expected for a cross-linked material. On the other hand, at very large values of the strain amplitude within the nonlinear viscoelastic regime, there is a crossover of  $G'$  and  $G''$  at a given threshold value of  $\gamma$ , above which the viscous dissipation of energy (proportional to  $G''$ ) dominates over the elastic storage of energy (proportional to  $G'$ ).

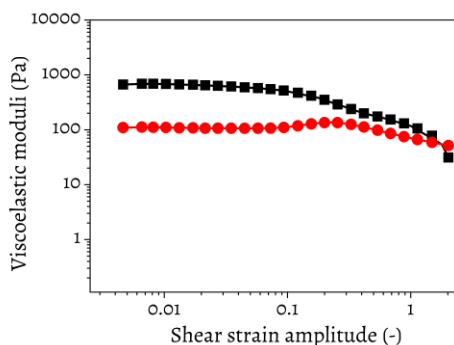


Figure 8.14. Storage (black square) and loss (red circle) moduli as a function of shear strain amplitude for oscillatory measurements at a frequency of 1 Hz for a magnetic hydrogel prepared at a concentration of magnetic nanoparticles of 0.2 vol.%.

In order to compare the viscoelastic moduli of the different hydrogels (magnetic and nonmagnetic) it is appropriate to take the value of the viscoelastic moduli within the LVR as the representative value for each hydrogel. As observed, both quantities increased strongly with the content of MNP, similarly to the case of the rigidity modulus (Figure 8.13). In fact, the storage modulus was approximately 20 times higher for the magnetic hydrogel with the highest content of nanoparticles (0.4 vol. %) than for the nonmagnetic hydrogels—a similar relative increase was obtained for the loss modulus.

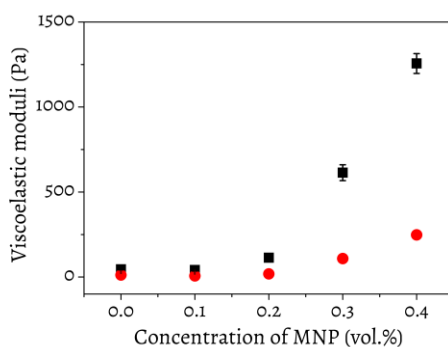


Figure 8.15. Storage modulus (black square) and loss modulus (red circle) corresponding to the viscoelastic linear region, as functions of the concentration of magnetic nanoparticles (MNP), for fibrin hydrogels.

Another important rheological parameter that can be obtained from curves like these shown in Figure 8.14 is the critical strain that delimits the limit of the LVR. Several authors have identified this critical strain as the point where the storage modulus deviates 10% from the plateau value.<sup>48, 49</sup> We used the same criterion in this work and obtained that the value of the critical strain increased for concentration of

MNP of 0.1 vol.% with respect to the nonmagnetic hydrogel (Table 8.3). Then, as the concentration of MNP was further increased above 0.1 vol. %, a tendency of the critical strain to decrease with MNP concentration was obtained (Table 8.3). Remark that the overall trend correlates with this obtained for  $Q$  values (see Table 8.2). Note at this point that for colloidal gels, a similar non-monotonic dependence was recently found for the trend of the storage modulus as a function of the preshear strain.<sup>50</sup> In this previous work, this non-monotonic dependence showed an inverse correlation with the volume of the empty space in the gel. In the case of the present work, we may consider that the increase of the critical strain for 0.1 vol.% is connected to changes in the microstructure of this magnetic hydrogel (where particle knots took the roll of cross-linkers), with respect to nonmagnetic hydrogel (where only intersections between pairs of polymer fibers were observed). Then, as the concentration of MNP was increased, the polymer network became less porous, as demonstrated by swelling experiments, and at the same time more rigid with respect to deformation, as inferred from the decrement of the critical strain. In addition, this hypothesis of particle knots as cross-linkers would also justify the monotonic dependence of the storage modulus with the MNP content.

Table 8.3. Experimental data corresponding to the critical shear strain value that marks the onset of the nonlinear viscoelastic regime.

Concentration of magnetic particles (% vol.)	Critical shear strain (-)
0	$0.060 \pm 0.011$
0.1	$0.087 \pm 0.009$
0.2	$0.067 \pm 0.007$
0.3	$0.045 \pm 0.005$
0.4	$0.0216 \pm 0.0022$

In addition to oscillatory tests of fixed frequency and increasing amplitude, that are useful for the determination of the extension of the LVR, we performed oscillatory tests of fixed strain amplitude (within the LVR) and increasing frequency. From these measurements we obtained the viscoelastic moduli as a function of the frequency. The typical trend for  $G'$  consisted of a very slight tendency to increase with frequency –Figure 8.16 (a). The overall trend for  $G''$  consisted of a stronger (with respect to  $G'$ ) tendency to increase up to a frequency of 5 Hz, followed by a decrease at higher frequencies –Figure 8.16 (b). In addition, in all cases  $G'$  was

larger than  $G''$  for the whole range of frequencies—compare Figure 8.16 (a) and Figure 8.16 (b). Again, these tendencies obtained for our hydrogels are typical of cross-linked polymer systems.<sup>51</sup>

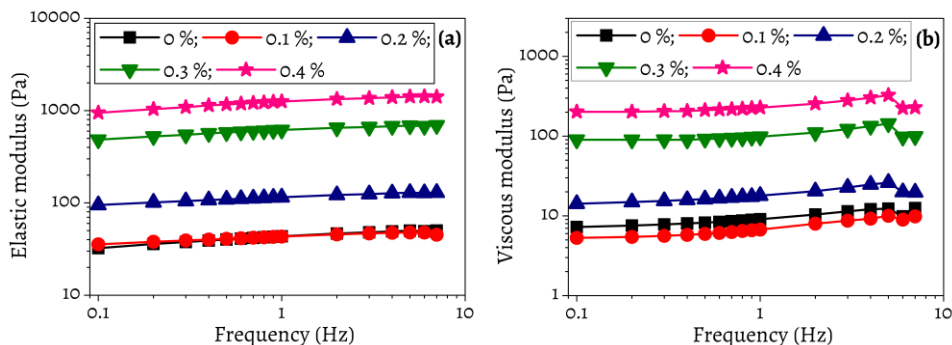


Figure 8.16. Storage modulus (a) and loss modulus (b) as a function of frequency for fibrin hydrogels prepared at different volume concentrations of magnetic nanoparticles (indicated in the graphs).

### 8.3.4 Discussion and theory

We characterized experimentally the physical properties of fibrin-based magnetic hydrogels for different concentrations of magnetic particles (from 0 up to 0.4 vol.%), consisting of a magnetite core and a layer of polymers with  $\text{OH}^-$  functionalization. Analysis of the microstructure demonstrated that in the absence of MNP the hydrogel presented a porous network of fibrin fibers with an isotropic distribution of the polymers—Figure 8.11 (a). The addition of MNP resulted also in an isotropic network of fibrin fibers that, however, was disrupted by the presence of large clusters—Figure 8.11 (b). These clusters consisting of nanoparticles and fibrin polymers constituted the knots of attachment of the network's filaments. Attraction between the positive groups of the fibrinogen, from which fibrin was polymerized, and the negative  $\text{OH}^-$  groups of the magnetic particle surface may justify the formation of these clusters. In fact, fibrin fibers were formed by polymerization of fibrinogen (from blood plasma) in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions. Fibrinogen is a glycoprotein consisting of three different chains ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ), linked to each other by disulfide bonds and forming a central E domain (negatively charged), two identical peripheral D domains (negatively charged), and two  $\alpha\text{C}$  domains (positively charged).<sup>52-54</sup> The conversion of fibrinogen to fibrin takes place in several steps: (i) thrombin cleaves fibrinopeptides A and B located on the N-terminus of the fibrinogen  $\alpha$  and  $\beta$  chains respectively of the E domain. As a result, soluble fibrinogen turns into a monomer of fibrin, with a positively charged E domain.<sup>55</sup> (ii) Fibrin monomers interact via electrostatic interactions (of the positively charged E domains with the D domains of negative charge) followed by hydrogen bonding to form a non-covalently linked fibrin polymer. (iii)

Crosslinking of this polymer to form a covalently linked fibrin polymer (clot) is catalyzed by the transglutaminase enzyme (Factor XIIIa), which forms amide bonds between the  $\epsilon$ -amino group of a lysine residue and the  $\gamma$ -carboxamide group of a glutamine residue of adjacent D domains.<sup>56</sup> MagP-OH<sup>®</sup> nanoparticles had negative surface charge as a consequence of the OH<sup>-</sup> functionalization. Then, according to the previous explanation of the formation of fibrin from fibrinogen, fibrinogen molecules very likely adsorbed on MagP-OH<sup>®</sup> MNP prior to thrombin cleavage (step (i)) because of the electrostatic attraction between the negative OH<sup>-</sup> groups of MagP-OH<sup>®</sup> MNP and the positively charged  $\alpha$ C domains of fibrinogen molecules. Note that a similar explanation for the adsorption of fibrinogen on negatively charged inorganic materials was previously reported in the literature.<sup>57</sup> As a consequence, fibrinogen molecules were expected to anchor on the MagP-OH<sup>®</sup> MNP and to act as condensation sites for the subsequent polymerization of fibrin fibers, in agreement with observations in Figure 8.11 (b). Furthermore, this positive interaction between fibrinogen and MNP would justify the faster cross-linking process of magnetic hydrogels with respect to nonmagnetic hydrogels results (not shown here for brevity). In fact, it is reasonable to conclude that the higher the concentration of cross-linker, the faster the time for reaching the gel point. In this regard, note that Growney Kalaf and co-workers found that the gel time of alginate hydrogel decreased as the concentration of cross-linker (calcium ions) was increased, in agreement with our hypothesis.<sup>58</sup>

The rheological analysis demonstrated a progressive enhancement of the rigidity modulus (Figure 8.12 and Figure 8.13) and the viscoelastic moduli (Figure 8.14, Figure 8.15 and Figure 8.16) as the content of MNP was increased. For the largest concentration of MNP (0.4 vol. %) we obtained rigidity and viscoelastic moduli more than one order of magnitude larger than for nonmagnetic hydrogels. This enhancement seems consistent with the observed changes in the microstructure and we could conclude that the presence of MNP reinforced the polymer structures. In fact, the classical theory of gel elasticity demonstrates that the storage modulus of a gel is proportional to the concentration of polymer subchains that link the junctions of the gel network.<sup>59</sup> As we can see for example in the Figure 8.11 (b) clusters cross-link the fibrin threads. An important feature observed in this figure is that two clusters can be bounded by several fibrin threads. This would justify the observed growth of the hydrogel mechanical properties with the concentration of the MNP. In subsection 8.3.4.1 below, we provide a theoretical model based on the previous experimental observations, which allows to explain the observed trend of the rigidity modulus on the concentration of magnetic particles.

Concerning the viscoelastic behavior of our hydrogels, we found that in all cases (magnetic and nonmagnetic hydrogels) the storage modulus dominates over the loss

modulus (Figure 8.14, Figure 8.15 and Figure 8.16), as expected for cross-linked polymer systems.<sup>51</sup> In general terms, the trends obtained for the viscoelastic moduli as a function of the frequency of the oscillatory shear strains within the LVR (Figure 8.16) are also typical of cross-linked polymer systems. The tendency of the storage modulus ( $G'$ ) to increase very smoothly with frequency was previously observed for artificial tissues of human oral mucosa stroma prepared from fibrin-based hydrogels,<sup>60</sup> as well as in the case of native tissue of human vocal fold mucosa<sup>61</sup> that consists mainly of a network of type I and III collagen and elastin fibers. Regarding the tendency of the loss modulus ( $G''$ ) to increase with frequency, with some rather strong decrease at frequencies larger than approx. 5 Hz in most of the cases, something similar was obtained previously for artificial tissues of human oral mucosa stroma prepared from fibrin-based hydrogels.<sup>60</sup> Furthermore, Chan and Titze reported a similar trend for the damping factor of native human vocal fold mucosa.<sup>61</sup>

### 8.3.4.1 Theoretical model for the rigidity modulus

The main goal of this section is to explain the principal physical cause of the non-linear dependence of the rigidity modulus of the magnetic hydrogels on the volume concentration of the MNP. We suppose that due to interaction of the MagP-OH<sup>®</sup> nanoparticles with the fibrinogen, the particles and the fibrinogens condense into dense clusters, alike to these of Figure 8.11 (b). These clusters play the role of attachment knots in the systems of the fibrin threads. Let us denote the number of the thread segments (sub-chains) in the unit volume of the composite as  $\nu$ . The classical theory of gel net elasticity gives –see, for example Ref.<sup>36, 59</sup>

$$G \sim kT\nu \quad \text{Eq. (8.5)}$$

This formula can be applied to gels, where the sub-chains present Gaussian (ideal) macromolecular coils, as it is presumably the case for nonmagnetic hydrogels. The only characteristic energy of these coils is the thermal energy  $kT$ . However, this is not the case for the magnetic hydrogel under consideration. The macromolecular segments observed by SEM (e.g., Figure 8.11 (b)) seem to be flexible linear threads, but not bulk coils. Taking this into account we can generalize Eq. (8.5) as:

$$G \sim w\nu \quad \text{Eq. (8.6)}$$

Here  $w$  is some typical energy of change of the sub-chain conformation. The microscopic determination of this energy requires detailed analysis of these transformations of the fibrin chain, which is a complex problem, beyond the scope of the present work. Here we will estimate  $w$  by fitting Eq. (8.6) to the experimental results.

It is natural to suppose that the mean number of the sub-chains, linking with a single cluster, is proportional to the drop (cluster) surface. Consequently, we can write:

$$v \sim n_d S_d \xi \quad \text{Eq. (8.7)}$$

Here  $n_d$  is the numerical concentration (number per unit volume) of the clusters,  $S_d$  is the drop surface,  $\xi$  is number of contacts of the fibrin threads with the cluster per unit of the drop surface. This parameter is determined by the details of interaction between the fibrinogens as well as of the fibrinogens with the particles. Since these details are unknown, we will consider  $\xi$  as an empirical parameter. Further, the following relation of conservation of the total number of particles can be used:

$$n_d V_d \varphi_d \sim \varphi_0 \quad \text{Eq. (8.8)}$$

Here  $\varphi_0$  and  $\varphi_d$  are total volume concentration of the particles in the composite and their concentration inside the drops respectively, and  $V_d$  is the drop volume. By combination of Eqs. (8.7) and (8.8) we get:

$$v \sim \xi \frac{\varphi_0}{\varphi_d} \frac{S_d}{V_d} \sim \xi \frac{\varphi_0}{\varphi_d} V_d^{-1/3} \quad \text{Eq. (8.9)}$$

Where the relation  $S_d \sim V_d^{2/3}$  has been taken into account. Note, of course, that the experimental clusters were not identical, presenting some slight variation in their size and state of surface. Because of this,  $S_d$  and  $\xi$  must be considered as some typical, mean magnitudes. After mixture of the MagP-OH<sup>®</sup> nanoparticles with the polymer, this mixture (suspension) of particles and fibrinogens is supersaturated. Then, the condensation of the particles, adsorbed on the fibrinogens, into the dense drops takes place. As well-known from the general theory of the condensation phase transition, volume of the viable nuclei of new phase must be more than some critical volume  $V_c$ . For the spherical-like nuclei, the critical volume, roughly, can be estimated as:<sup>62</sup>

$$V_c^{-1/3} \sim \frac{1}{\sigma} p_o \quad \text{Eq. (8.10)}$$

Here  $\sigma$  is the surface tension of the drop, and  $p_o$  is the osmotic pressure in the main part of the solution. Taking into account that the volume concentrations of both the particles and the fibrinogens in the hydrogel are low, we can use the following estimate of the osmotic pressure of dilute two-component solution:

$$p_o = kT \left( \frac{\varphi_o}{v_p} + \frac{\varphi_f}{v_f} \right) \quad \text{Eq. (8.11)}$$

Here  $v_p$  and  $v_f$  are respectively the volumes of the particles and fibrinogen, and  $\varphi_f$  is the volume concentration of the fibrinogens at the moment of the nucleation. We can suppose that initially the supersaturation of the particle-fibrinogen system was



high and, consequently, this system experienced a sudden (instantaneous) nucleation. Due to the fast rate of the nucleation, the supersaturation decreased quickly, and the rate of drop growth diminished very fast. Furthermore, polymerization of fibrins out of the drops should also contribute to the interruption of the drops evolution. Thus, in a first approximation, we can suppose the instantaneous stop of the growth of the drops right after their appearance. This means that volume of the viable drops is approximately equal to the critical volume  $V_c$ . Note, that clusters observed experimentally were similar, presenting only a slight variation in their size (see Figure 8.11 (b) as an example). This supports the hypothesis on the instant nucleation of the system.

By combination of Eqs. (8.6), (8.10) and (8.11), by using  $V_c$  instead of  $V_d$  in (8.9), we come to the following estimate:

$$G \sim kT \left( \frac{w}{\sigma} \right) \xi \frac{\varphi_0}{\varphi_d} \left( \frac{\varphi_0}{v_p} + \frac{\varphi_f}{v_f} \right) + G_0 \quad \text{Eq. (8.12)}$$

Here  $G_0$  is the shear modulus of the pure gel, without the MNP, which accounts for the fact that even in the absence of MNP, the fibrin fibers are cross-linked into a gel. From the experimental observations we estimated the volume and volume concentration of the fibrinogens as:  $v_f \sim 10^8 \text{ nm}^3$ ,  $\varphi_f \sim 0.1 - 0.2 \%$ . The average volume of a single MagP-OH<sup>®</sup> magnetic nanoparticle is  $v_p \sim 10^6 \text{ nm}^3$ . Thus, for the studied hydrogels with the particle volume concentration  $\varphi_0 \geq 0.1 \%$  the following strong inequality is fulfilled:

$$\frac{\varphi_0}{v_p} \gg \frac{\varphi_f}{v_f} \quad \text{Eq. (8.13)}$$

Under this consideration, Eq. (8.12) can be written as:

$$G \sim A \varphi_0^2 + G_0 \quad \text{Eq. (8.14)}$$

with  $A = kT \left( \frac{w}{\sigma} \right) \frac{\xi}{\varphi_d v_p}$ .

We can estimate parameter  $A$  by using the experimental results. For example, for  $\varphi_0 = 0.4\%$  we get  $A \approx 4 \cdot 10^7 \text{ Pa}$ . From the experimental observations we can also estimate other parameters. In particular, we obtained  $w \sim 10^{-16} \text{ J}$  and  $\xi \sim 10^{13} \text{ m}^{-2}$ , which are reasonable values from the physical point of view. Comparison of the experimental results with the theoretical ones is shown in Figure 8.13. The agreement with the experimental results and the formula given by Eq. (8.14) is quite reasonable. Thus, at

least from the semiquantitative point of view, our model explains the experimental trend, which can be taken as a justification of our hypotheses.

## **8.4 Generation of cartilage-substitute tissues. Rheology and *ex vivo* biocompatibility**

This chapter focuses on the encapsulation of chondrocytes within polymeric matrices of fibrin-agarose containing MNP with a double objective. First, to study how the presence of chondrocytes and MNP influences the mechanical properties of fibrin-agarose hydrogels (biomaterials). Second, to verify if the presence of MNP influences in a positive or negative way the proliferation and cellular damage and, at the same time, to determine if the chondrocytes are able to express the proteins present in a native cartilage.

### **8.4.1 Materials and methods**

#### **8.4.1.1 Experimental design**

We worked with 4 experimental groups of biomaterials: 1) fibrin-agarose hydrogels without cells or acellular (HFA-A); 2) fibrin-agarose hydrogels with cells or cellular (HFA-C); 3) fibrin-agarose hydrogels containing magnetic particles without cells or acellular (HFA-PM-A); 4) fibrin-agarose hydrogels containing magnetic particles with cells or cellular (HFA-PM-C). The time evolution of the rheological properties of the 4 experimental groups was measured at 2, 16 and 30 days of their preparation. The *ex vivo* biocompatibility study was carried out for the HFA-C and HFA-PM-C groups by DNA release assays, WST-1 cellular cytotoxicity and histological analyzes using histochemical and immunohistochemical techniques. The tests were carried out at 2, 9, 16 and 30 days after the preparation of the biomaterials. Biomaterials HFA-A and HFA-C were used as acellular and cellular control group, respectively.<sup>5, 63</sup>

#### **8.4.1.2 Cell culture of chondrocytes: isolation and expansion**

In this study, human chondrocytes derived from hyaline cartilage (CHDCH) were used. The cells were isolated from the biopsy of two healthy donors, undergoing minor nasal surgery, following the experimental procedure described in previous studies.<sup>64, 65</sup> The chondrocytes were incubated at 37 ° C in an atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub>. The medium of expansion was changed every three days.

#### **8.4.1.3 Preparation of artificial fibrin-agarose tissues**

To prepare HFA-C biomaterials, the following procedure was followed.<sup>63</sup> First, 15.2 mL of human plasma (supplied by the Biobank of Granada, Junta de Andalucía) were

mixed with 2.5 mL of chondrocyte suspension derived from hyaline cartilage (CHDCH, passage 6) in chondrogenic medium and 300  $\mu\text{L}$  of tranexamic acid (amchafibrin, Fides-Ecofarma, Valencia) to prevent fibrinolysis of the biomaterial. This mixture was stirred carefully to obtain a homogeneous suspension. Then, 1 mL of aqueous solution of  $\text{CaCl}_2$  at 2 % weight/volume and 1 mL of aqueous solution of type VII agarose (Sigma-Aldrich, USA) at 2 % w/v were added. In this way, fibrin-agarose cellular biomaterials were obtained with 0.1 % weight/volume of type VII agarose. The cell density of the resulting biomaterials was  $5 \times 10^4$  CHDCH $\cdot\text{mL}^{-1}$ . To prepare the HFA-PM-C, the same protocol was used with the following modification. Magnetic nanoparticles (MagP-OH<sup>®</sup>, NanoMyp, Spain) were added to the suspension of cells in chondrogenic medium. Cellular biomaterials were obtained with 0.1 % w / v of type VII agarose and 0.1 % by volume of MagP-OH<sup>®</sup> magnetic nanoparticles. To prepare the acellular HFA-A and HFA-PM-A, the previous experimental procedures were modified, suppressing the addition of CHDCH.

All biomaterials, both cellular and acellular, were kept under culture conditions (37 ° C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) with chondrogenic medium (CM) during the entire experimental time

#### **8.4.1.4 Rheological characterization of biomaterials**

The mechanical properties of the biomaterials of the 4 experimental groups were measured in a Haake MARS III controlled stress rheometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 37 ° C. The measuring geometry was a parallel plates set made of titanium with 3.5 cm diameter and rough surface to avoid sliding on the measuring surfaces (sensor P35Ti L, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). In order to ensure that the upper plate was in perfect contact with the sample, it was lowered slowly until the normal force exerted on the measuring plate reached a value between 0.25 and 1.0 N, thus ensuring that the compression exerted on the sample was weak enough. The volume of pre-gel mixture used for the preparation of each of the samples was 3 mL.

To study the behavior of the gels under oscillatory shear stress, amplitude sweeps were carried out. For this, the frequency of the sinusoidal shear deformation was set at 1 Hz. The amplitude of the deformation ( $\gamma_0$ ) was increased logarithmically spaced in the range from  $\gamma_0 = 1 \times 10^{-4}$  to  $\gamma_0 = 2.0$ . This test allowed us to delimit the linear viscoelastic region (LVR).

#### **8.4.1.5 Cellular cytotoxicity assays**

To evaluate the ex vivo cytotoxicity of the biomaterials, derived from the inclusion of MagP-OH<sup>®</sup> magnetic nanoparticles in the polymer matrices of fibrin-agarose, two

fundamental tests were carried out. (i) WST-1 cell proliferation assay. This test was used to measure cell viability and proliferation as a function of culture time in the 4 experimental groups under study. It is based on the reduction of the salt of tetrazolium to formazan by the action of mitochondrial dehydrogenases by proliferating cells. (ii) DNA release assay. To assess under membrane damage by determining the amount of DNA released to the extracellular medium by spectrophotometry.

#### **8.4.1.6 Histological analysis**

Samples corresponding to culture times of 2, 9, 16 and 30 days, of the groups HFA-C and HFA-PM-C, were processed and cut into sections of 5  $\mu\text{m}$  thickness to carry out the following tests. (i) Histochemical tests, for which we used three different methods. First, hematoxylin-eosin (H&E) staining was used to perform a morphological evaluation and determine cellularity in each of the experimental groups. Second, the alcian blue method was used for the identification of proteoglycans in the extracellular matrix. Finally, to identify the magnetic nanoparticles (MagP-OH<sup>®</sup>) all the samples were stained with the Perl's method. (ii) Immunohistochemical assays. First, we detected the S-100 protein that is present in the chondrocytes and is used as a marker of their lineage. In addition, the detection of collagen type II, a protein present in the extracellular matrix of the chondrocytes, was carried out. The immunohistochemical reactions were revealed with 3,3-diaminobenzidine (DAB).

#### **8.4.1.7 Ethics statement**

This study was approved by the Ethics Committee of the University of Granada, Granada, Spain. Each tissue donor for the culture of chondrocytes signed an informed consent form for the study.

### **8.4.2 Results and discussion**

#### **8.4.2.1 Rheological characterization**

The rheological behavior of the fibrin-agarose biomaterials (HFA-A, HFA-C, HFA-PM-A and HFA-PM-C) was characterized by subjecting them to oscillatory shear strain. With this aim, the shear stress experienced by the biomaterials under a sinusoidal shear strain, with a certain frequency and amplitude, was recorded. In order to compare the time evolution of the viscoelastic moduli in the four experimental groups (HFA-A, HFA-C, HFA-PM-A and HFA-PM-C), we obtained the average of the values of  $G'$  and  $G''$  belonging to the linear viscoelastic region, which was defined by the analysis of the amplitude sweep tests. In Figure 8.17, the average values of  $G'$  and  $G''$  are plotted as a function of time for the four groups of biomaterials. In the case of nonmagnetic and magnetic acellular fibrin-agarose biomaterials (Figure 8.17 (a)),  $G'$

and  $G''$  decreased with time in both groups, with the most pronounced decrease (especially in  $G'$ ) observed between 2 and 16 days. In contrast, for nonmagnetic and magnetic cellular fibrin-agarose biomaterials (Figure 8.17 (b)),  $G'$  and  $G''$  remained practically constant over time, with a progressive and slight increase in  $G'$  in the time interval under study (between 2 and 30 days). It is important to note that: (a) although initially (2 days) the acellular biomaterials had values of the viscoelastic moduli much higher than those of the cellular biomaterials, a stability of the mechanical properties of the latter is observed, in contrast to the progressive mechanical degradation of biomaterials that do not contain chondrocytes; (b) in acellular biomaterials, the incorporation of magnetic particles (HFA-PM-A) resulted in a decrease of strength: there was a decrease in  $G'$  values then the particles were embedded in the gel. However, in the case of cellular biomaterials, exactly the opposite took place: the  $G'$  values in the magnetic biomaterials (HFA-PM-C) were 35 % higher than in the biomaterials that did not contain particles (HFA-C).

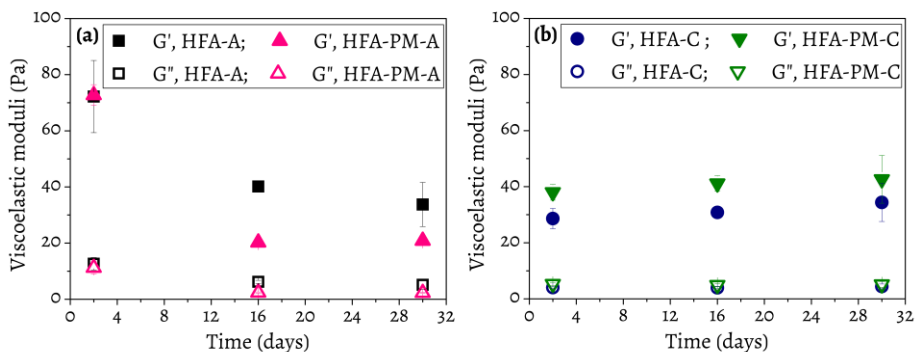


Figure 8.17. Storage ( $G'$ ) and loss moduli ( $G''$ ), corresponding to the linear viscoelastic region, as a function of time: (a) Nonmagnetic (HFA-A) and magnetic (HFA-PM-A) acellular fibrin-agarose biomaterials; (b) Nonmagnetic (HFA-C) and magnetic (HFA-PM-C) cellular fibrin-agarose biomaterials.

In order to give an explanation to this observation, which in principle seems contradictory, the volumes of biomaterial contained between the rotor plate and the plate at rest of the rheometer for the 4 experimental groups were measured. Figure 8.18 shows the distances between plates (or gap, Figure 8.18 (a)) and the corresponding volumes of the biomaterials (Figure 8.18 (b)). In the acellular biomaterials it is observed that the nonmagnetic ones (HFA-A) have a volume three times smaller than the magnetic ones (HFA-PM-C). This is because the magnetic particles form knots in the polymeric matrix giving rise to a more open network with greater capacity for swelling by absorption of aqueous solution. In contrast, for cellular biomaterials, it is observed that nonmagnetic and magnetic biomaterials (HFA-C and HFA-PM-C)

had a very similar volume. Thus in this case (cellular biomaterials) the role of cells on the volume is more determinant than this of particles.

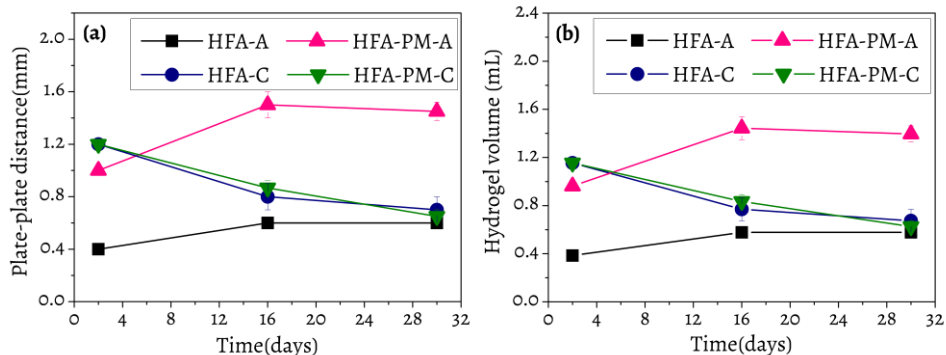


Figure 8.18. Plate-plate distance (a) and contained volumen between the two plates of reometer (b) as functions of the time for the indicated hydrogels (biomaterials).

#### 8.4.2.2 Cellular cytotoxicity assays

First, the results obtained for the WST-1 test are shown in Figure 8.19, which can be summarized as it follows:

i) Time of 2 days. The negative control did not present significant cellular proliferation, while the positive control showed the maximum cellular proliferation. Among the nonmagnetic (HFA-C) and magnetic (HFA-PM-C) biomaterials there was no significant difference in cell proliferation.

ii) Intermediate times (9 and 16 days). It is important to note that at 9 days there were significant differences in cell proliferation between the HFA-C group and the HFA-PM-C group, with higher proliferation for the group without particles HFA-C (used as a control group). Although at a smaller degree, this difference was still maintained at 16 days.

Time of 30 days. Cell proliferation in the positive control decreased until reaching absorbance values very close to zero. This was because the CHDCH had already grown until they run out of space and converge to each other causing the cessation of cell proliferation. However, for the HFA-C and HFA-PM-C groups, it is observed that cell proliferation increased until reaching absorbance values close to 0.6 a.u. in both groups, without significant differences between them.

These results can be explained by assuming that chondrocytes (CHDCH) needed more time to adapt (slower proliferation) to the extracellular medium containing magnetic nanoparticles (HFA-PM-C) than to adapt to the medium constituted by a fibrin-agarose biomaterial without particles (HFA-C).

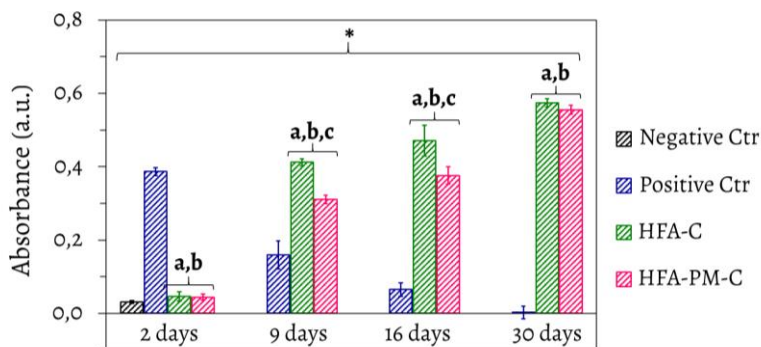


Figure 8.19. WST-1 quantitative and statistical results. Graphic and numeric representation of absorbance values for WST-1 assay in 2D chondrocytes cultures (positive and negative control) and experimental groups (3D chondrocytes culture in HFA-C and HFA-PM-C). Values are shown as mean  $\pm$  SD;  $p < 0.05$  was considered statistically significant for Mann-Whitney non-parametric test. Comparisons over the time and between groups are indicated as it follows:

\*= Statistically significant differences in for each group over the time.

a= Statistically significant differences of experimental groups vs. negative Ctr.

b= Statistically significant differences of experimental groups vs. positive Ctr.

c= Statistically significant differences between HFA-C and HFA-PM-C groups.

Secondly, and in order to check if the information obtained in the previous test is consistent, the damage produced in the nuclear membrane was determined by measuring the DNA released by the cells to the extracellular medium. In general, it was observed that in all the biomaterials of interest (HFA-C and HFA-PM-C) DNA was released into the extracellular medium at a similar rate. Therefore, it can be concluded that the inclusion of magnetic particles (MagP-OH<sup>®</sup>) in the fibrin-agarose biomaterials did not produce irreversible cellular damage in the nuclear membrane.

#### 8.4.2.3 Histological analysis

H&E staining -see Figure 8.20- revealed that CHDCH were correctly encapsulated in the nonmagnetic fibrin-agarose matrix (HFA-C, used as a control group) and also in the magnetic (HFA-PM-C). In both cases a random distribution of cells within the material is evidenced; in addition, the cells had a long filopodia, which evidences that there was interaction between the cells and both types of materials (magnetic one and nonmagnetic one). The lineage was checked in the cells by an immunohistochemical analysis that showed a positive reaction for the S-100 protein (the cells acquired a brown color), so that the cells observed were chondrocytes.

Finally, Figure 8.20 also shows two sections of biomaterials stained by the Perl's method. The analysis gave negative for the nonmagnetic HFA-C group. In contrast, in the group HFA-PM-C an intense blue color reaction occurred, which marked the

iron ions. This staining demonstrated the homogeneous distribution of the MagP-OH<sup>®</sup> particles within the polymer matrix.

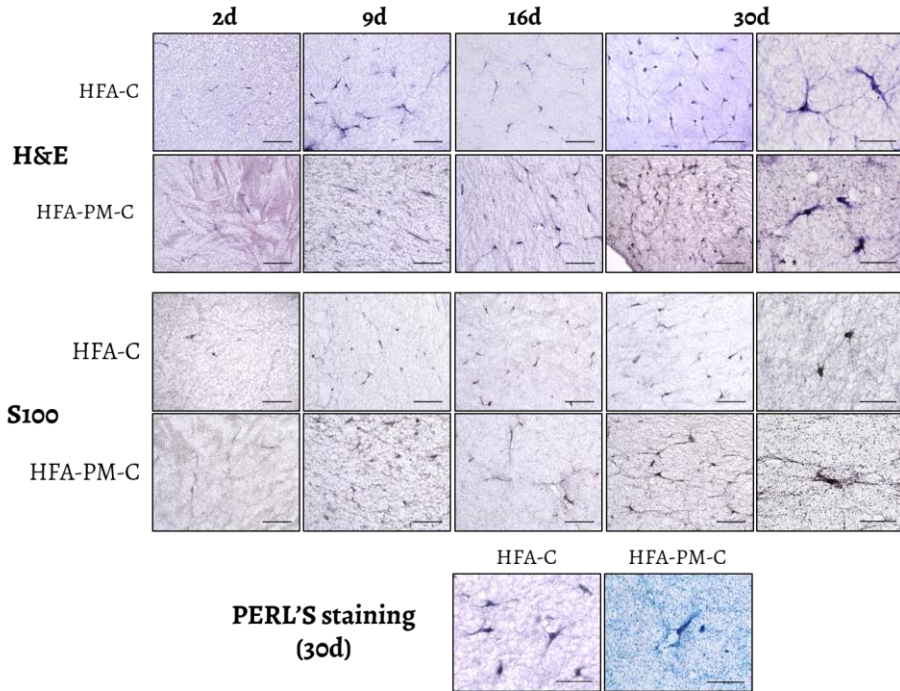


Figure 8.20. H&E staining (2 upper files) and S-100 expression (2 middle files) of the CHDCH encapsulated in the fibrin-agarose biomaterials for culture times between 2 and 30 days; scale bar length 100 μm, except for the last column on the right where the scale bar length is 50 μm. Staining by Perl's method (last file) of biomaterials sections (30 days of culture). The scale bar length is 50 μm.

In addition, we can see in the images corresponding to H&E staining that an increase in the number of cells took place over time. To quantify this increase in both experimental groups, a cell count was performed, obtaining the results of Figure 8.21.

From the analysis of the cellularity results, we can conclude that, there are no statistically significant differences between results for HFA-C and HFA-PM-C. Regarding the analysis of each of the experimental groups separately and as a function of time, it is observed that cellularity grew significantly with time in the HFA-C group and the same occurred in the HFA-PM-C group.

The extracellular matrix of the compounds that form a native cartilage are composed predominantly by proteoglycans and type II collagen. Therefore, an alcian blue staining was performed in order to check the presence of proteoglycans. An immunohistochemical assay was also performed to check for the expression of type II



collagen by the CHDCH. As we can see in Figure 8.22, alcian blue staining was negative for both the control group (HFA-C) and the magnetic group (HFA-PM-C), for all the experimental times tested. However, the immunohistochemistry carried out to check the expression of type II collagen by the cells was positive, since the CHDCH were stained brown. Furthermore, it is observed that in both groups (HFA-C and HFA-PM-C) the expression of type II collagen happened at the same level.

In view of the results histochemical and immunohistochemical assays, we cannot conclude that an artificial cartilage was obtained by inclusion of CHDCH in non-magnetic fibrin-agarose biomaterials (HFA-C) neither in magnetic fibrin-agarose biomaterials (HFA-PM-C). But the CHDCH expressed some proteins such as S-100 and type II collagen, typical of cartilage tissue. And, most importantly, the inclusion of magnetic particles did not produce adverse results other than those obtained also in the control group (HFA-C), in terms of cell proliferation, DNA release and cellularity.

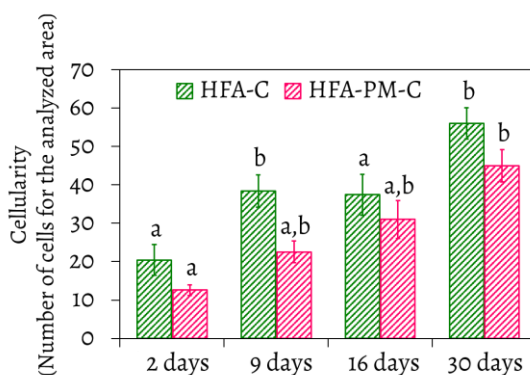


Figure 8.21. Cellularity (number of cells for analyzed area, 1.24 mm<sup>2</sup>) for the groups HFA-C and HFA-PM-C as a function of time, estimated from the images taken in the sections stained by H&E. The error bars show the mean value  $\pm$  standard deviation. Comparisons based on time for each group and comparisons between the two groups for each time were made using the Mann-Whitney test, with a level of significance of  $p < 0.05$ .

a Statistically significant difference of a group, for a given time, against the same group for the greater consecutive time.

b Statistically significant difference of a group, for a given time, against the same group for the shorter consecutive time.

\* Comparison of the two groups (HFA-C and HFA-PM-C), for any of the times, gave no significant differences using the Mann-Whitney test.

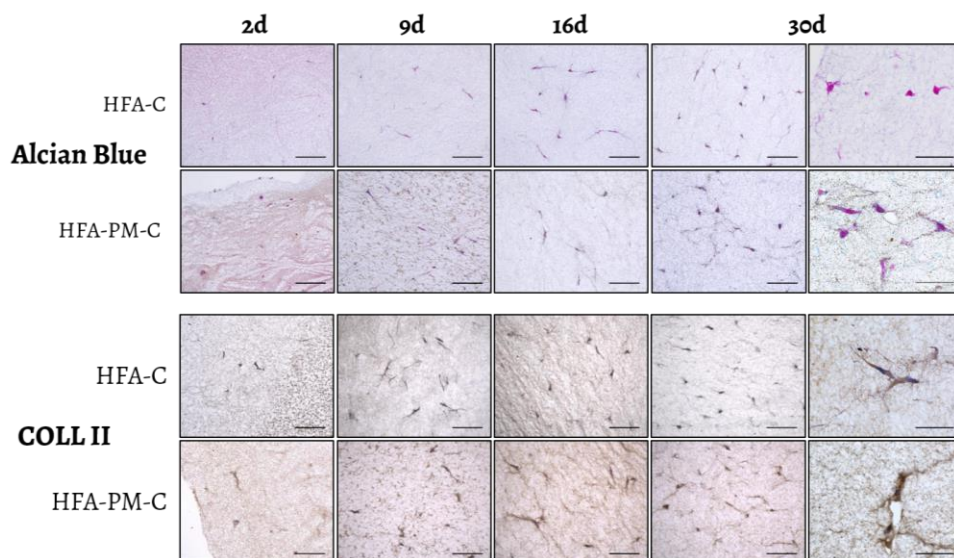


Figure 8.22. Alcian blue staining and expression of type II collagen (COLL II) by the CHDCH encapsulated in nonmagnetic and magnetic fibrin-agarose hydrogels (biomaterials). Scale bar length 100  $\mu\text{m}$ , except for the rightmost column, where the scale bar is 50  $\mu\text{m}$ .

## 8.5 Supramolecular hydrogels consisting of peptides and magnetic nanoparticles. Rheology

Recently a new class of biomaterials, known as molecular hydrogels, has been developed. The advantage of these materials is that they are built by individual molecules, which are assembled by non-covalent interactions, resulting in materials with characteristics similar to those of gels produced by the aggregation of colloidal particles.<sup>66</sup> Thus, although these molecular hydrogels are broken under shear, when the mechanical stress ceases they are usually reconstructed and their initial elasticity recovered.<sup>67</sup>

In the work of this thesis corresponding to this paragraph we used the dipeptide fmoc-fluorenylmethoxycarbonyl for the formation of peptide hydrogels. In this peptide, the aromatic part (fmoc group) of the molecule has a fundamental role in the self-assembly process, forming intermolecular  $\pi$ - $\pi$  interactions between dipeptides (see Figure 8.23).

The objective of this paragraph is to mechanically characterize fmoc-diphenylalanine hydrogels (at 0.3 % weight/volume), obtaining the values of the storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ) and rigidity modulus ( $G$ ). Then, we evaluated the changes in the mechanical properties of hydrogels, when magnetic iron nanoparticles coated with polyethylene glycol (NPFe@PEG) are incorporated. Our main interest in these

materials is based on their potential use as extracellular matrixes in tissue engineering applications. Note that the characterization of the mechanical properties is of special interest, since they affect the proliferation of cultured cells.<sup>68</sup> Finally, we present a basic structural analysis, which help to understand the changes observed in the rheological properties by varying the concentration of NPFe@PEG.

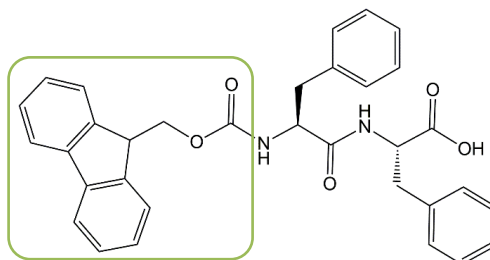


Figure 8.23. Chemical structure of the dipeptide derivative fmoc-diphenylalanine. The fmoc group (fluorenylmethoxycarbonyl) is the one surrounded by the green line.

## 8.5.1 Methods

### 8.5.1.1 Preparation of peptide hydrogels

In order to obtain a hydrogel with a final volume of 8 mL, a 0.3 w/v % (3 mg·mL<sup>-1</sup>) solution of fmoc-diphenylalanine was prepared. Then, small amounts of a 0.5 M solution of NaOH were added under sonication, until reaching a pH value approximately equal to 10.5 (measured with indicator paper) was reached. Finally, 106  $\mu$ L of a solution of 150 mg · mL<sup>-1</sup> of glucono- $\delta$ -lactone was added to the previous solution.

For the preparation of magnetic hydrogels, NPFe@PEG with fmoc-diphenylalanine adsorbed on the surface were used. For achieving the peptide coating, NPFe@PEG nanoparticles were dispersed in a 0.3 % w/v solution of fmoc-diphenylalanine, the suspension left at rest afterwards for a few minutes, and the peptides recuperated finally by centrifugation.

### 8.5.1.2 Characterization of the magnetic properties of hydrogels.

We obtained the hysteresis loop of the magnetic hydrogels by means of a QUANTUM DESIGN NPMS X magnetometer. For this aim, we applied different values of the magnetic field and measured the resulting magnetization of the samples.

### 8.5.1.3 Rheological characterization.

We characterized the rheological properties of the hydrogels (both magnetic and non-magnetic) by using a Haake MARS III controlled-stress rheometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). In order to avoid changes in the samples due to the manipulation of the hydrogels, we used a double cone-plate geometry (60 mm in diameter

and angle of  $2^\circ$ ; sensor DC60/2° Ti L, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for the characterization of the rheological properties, and we generated each of the hydrogels directly inside this geometry prior to measurement. The mixture was left to jellify for 24 hours at  $25^\circ\text{C}$ . We applied a magnetic field of  $15\text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  during the first hour of gelling. After the 24 h period, we carried out the rheological characterization at  $25^\circ\text{C}$ . For each formulation we measured at least 3 different samples.

**Rheological behavior under steady shear stress.** We subjected the samples to ramps of step-wise increasing shear stress and the corresponding values of the shear strain were obtained. We maintained each value of the shear stress for 10 s. The initial slope of the shear stress vs. shear strain curve is the rigidity modulus of the hydrogels.

**Rheological behavior under oscillatory shear strain.** We subjected the samples to oscillatory shear strain in order to characterize their viscoelastic response. We carried out ramps of oscillatory strains of fixed frequency (1 Hz) and increasing amplitude. Such kind of measurements allows the identification of the linear viscoelastic region (LVR) as the low range of values of the strain amplitude for which the viscoelastic moduli (both  $G'$  and  $G''$ ) are approximately independent of the magnitude of the strain amplitude. Above the LVR,  $G'$  decreases abruptly with the strain amplitude, whereas  $G''$  usually increases first and then decreases

#### **8.5.1.4 Microscopic characterization of hydrogels**

In order to analyze the differences between the microstructure of nonmagnetic hydrogels and magnetic hydrogels under the same conditions that their mechanical properties were characterized, we prepared samples of each of them on microscopy grids, and observed them without performing any sample treatment. For this purpose, we used an Electronic Field Emission Scanning Microscope (Quanta 650 FEI, Field-Emission Environmental Scanning Electron Microscope, Center for Scientific Instrumentation of the University of Granada).

### **8.5.2 Results**

#### **8.5.2.1 Characterization of the magnetic properties of hydrogels.**

First, we obtained the values of the saturation magnetization of both NPFe and NPFe@PEG ( $1521 \pm 15\text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  for NPFe and  $1530 \pm 12\text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  for NPFe@PEG) from their magnetization curves (not shown here for brevity). From these data, we may conclude that coating by PEG had an almost negligible effect on the magnetic properties of the iron powder. Furthermore, in both cases a rather soft ferromagnetic behavior (low remanence) was evidenced.

Second, we obtained the magnetization curves of magnetic hydrogels. As observed, they presented a typical shape of ferromagnetic materials, although with a much smaller saturation magnetization (Figure 8.24) than NPFe and NPFe@PEG. From these curves we obtained the volume concentration of magnetic particles ( $\phi$ ) within the hydrogels using the mixing law of magnetism:<sup>69</sup>  $M_{sh} = \phi M_s$ , with  $M_{sh}$  and  $M_s$  being the saturation magnetizations of the hydrogels and the MNP@PEG, respectively. As observed, there is a good correspondence between concentrations according to preparation protocol and those obtained from magnetization measurements (attached table in Figure 8.24).

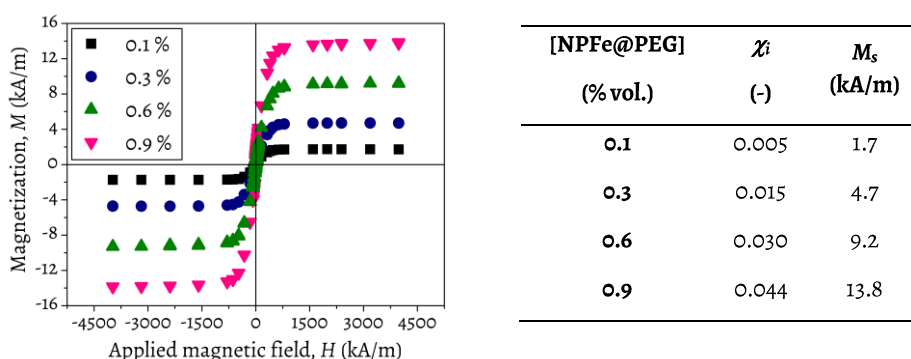


Figure 8.24. Magnetization curves of the peptide hydrogels prepared at different NPF@PEG volume fractions (indicated in the figura). The attached table includes the values of magnetic susceptibility and saturation magnetization of each sample.

### 8.5.2.2 Rheological characterization.

**Rheological behavior under steady shear stress.** The effect of magnetic nanoparticles on the steady state rheological behaviour of hydrogels within the linear regime is described by the slope of shear stress vs. shear strain curves. This slope is the shear (or rigidity) modulus, which is usually used as a measure of the strength of a material. The rigidity modulus of our hydrogels increased strongly with nanoparticle concentration up to 0.1 vol. % (Figure 8.25). Note that this tiny concentration of nanoparticles provoked a 4-fold increase in the value of the shear modulus with respect to the hydrogel without nanoparticles. Above this concentration and up to 0.6 vol. % the shear modulus still increased, although at a lower rate. However, a further increase in nanoparticle concentration did not provoke any additional enhancement of the shear modulus, but rather a tendency to decrease. Such a global trend, with an initial enhancement of mechanical strength of gels when nanoparticles are added at a low concentration, followed by a leveling off (or even decrease) of the mechanical

strength at larger concentrations, has been previously reported in the case of polymeric gels.<sup>70</sup>

**Rheological behavior under oscillatory shear strain.** The trend of  $G'$  and  $G''$  as a function of shear strain amplitude for oscillatory experiments at fixed frequency (1 Hz) demonstrated a typical behavior of cross-linked systems. Such kind of measurements allows the identification of the linear viscoelastic region (LVR) as the low range of values of the strain amplitude for which the viscoelastic moduli (both  $G'$  and  $G''$ ) are approximately independent of the magnitude of the strain amplitude. Above the LVR,  $G'$  decreases abruptly with the strain amplitude, whereas  $G''$  usually increases first and then decreases (see Figure 8.26). In addition we could observed that hydrogels are viscoelastic solids since the storage modulus,  $G'$ , are much larger than the loss modulus,  $G''$ .

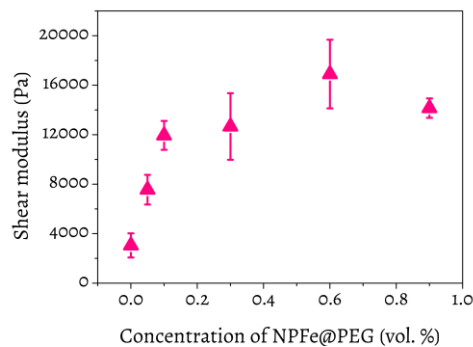


Figure 8.25. Shear modulus of nonmagnetic and magnetic fmoc-diphenylalanine molecular hydrogels as a function of the concentration of NPFe@PEG.

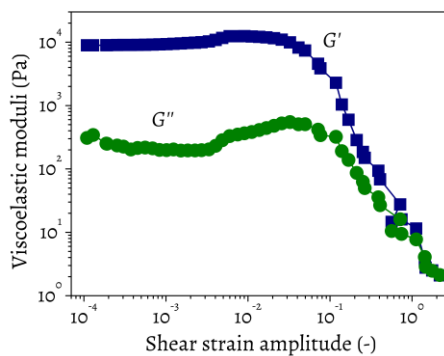


Figure 8.26. Viscoelastic moduli,  $G'$  (blue square) and  $G''$  (green circle), depending on the amplitude of the shear deformation, at a frequency of 1 Hz, for a magnetic hydrogel containing 0.05 vol. % of NPFe@PEG.

In what concerns the trend obtained for  $G'$  and  $G''$  as functions of the nanoparticle concentration, they were similar to this discussed above for the shear modulus. Therefore, we can conclude that there is an enhancement of the mechanical strength of peptide hydrogels when small amounts of magnetic properly functionalized nanoparticles are added.

### 8.5.2.3 Microscopic characterization of hydrogels

As can be seen in Figure 8.27 (a), nonmagnetic hydrogels present a fibrillar network of spongy appearance with thicker fibers and many thin fibrils, which make areas of higher and lower fibrillar density. However, in magnetic hydrogels (see Figure 8.27 (b)) only gaps and dense fibers with adhered nanoparticles are observed. This fact, together with the tendency of  $G'$ ,  $G''$  and  $G$  observed as a function of the concentration of the NPF<sub>e</sub>@PEG leads us to infer that the nanoparticles are incorporated into the three-dimensional network, making it possible for the thin fibrils to aggregate giving rise to thicker fibers.

This would explain the great increase experienced by the mechanical properties when a small volume fraction of NPF<sub>e</sub> is included in the formulation of peptide hydrogels containing 0.6 vol. % of NPF<sub>e</sub>@PEG (Figure 8.27 (b)). We could hypothesize that for concentrations of NPF<sub>e</sub>@PEG greater than 0.1 vol. % a maximum clustering of fibrils in coarse fibers is already reached, giving rise to approximately constants values for  $G'$ ,  $G''$  and  $G$ .

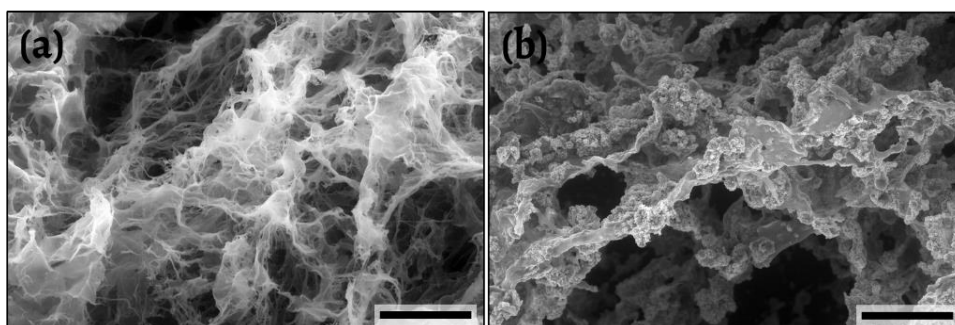


Figure 8.27. TEM images of (a) nonmagnetic hydrogels and (b) magnetic hydrogels containing 0.6 vol. % of NPF<sub>e</sub>@PEG. Scale bar length 20  $\mu\text{m}$ .

## 8.6 Alginate hydrogels reinforced with magnetic particles. Rheology under tensile forces

The objective is obtaining materials, with potential application in biomedicine, that present mechanical properties that can be modulated by the application at a distance of an external magnetic field. In this paragraph we describe the mechanical properties of alginate hydrogels and magnetic alginate hydrogels under traction because for applications in bone or cartilage regeneration, the mechanical properties under tensile stress similar to which are usually subjected these biological tissues are of great relevance.

### 8.6.1 Experimental

#### 8.6.1.1 Preparation of alginate hydrogels

First, 50 mL of a 1 % w/v sodium alginate solution in Milli-Q water was prepared. Then 15 mL of this solution were poured into a vessel and 22.5 mg of  $\text{CaCO}_3$  were added. The mixture was stirred until it became white. Lastly, 80.1 mg of glucono- $\delta$ -lactone were added to the above mixture and then it was stirred until the crystals of this reagent were dissolved. The sample was allowed to gel for 1 h 30 min, obtaining a soft and transparent hydrogel. Subsequently, the hydrogel was broken by manual agitation and then by sonication for 10 minutes. In the case of magnetic hydrogels, before sonication, proper amounts of spherical Fe-HQ particles (2.0  $\mu\text{m}$  of diameter) were added to prepare samples with four different volume fractions. Finally, the obtained viscous mass (containing or not Fe-HQ particles) was poured into a 50 mm diameter Petri dish and left at rest for 3 h 30 min. After this time, 7.5 mL of a 60 mM  $\text{CaCl}_2$  solution were added to reinforce the hydrogel by transferring calcium ions from the solution into the hydrogel. The mixture was left at rest for 24 hours.

#### 8.6.1.2 Magnetization measurements

The magnetization curves of powders of Fe-HQ particles and the prepared magnetic alginate hydrogels (using different concentrations of magnetic particles) were measured at room temperature. These measurements were used to calculate the magnetic particle concentration in each hydrogel.

#### 8.6.1.3 Mechanical characterization of alginate hydrogels under tensile stress

The mechanical properties under tensile stress of the nonmagnetic and magnetic alginate hydrogels were determined with a DMA 450<sup>+</sup> viscoanalyzer (Metravib, Limestone, France). We performed a shear strain amplitude sweep test. The samples were subjected to a longitudinal oscillatory deformation,  $\epsilon$ , with constant frequency (10



Hz) and increasing shear strain amplitude,  $\varepsilon_0$ , (ramp between 0.05 and 0.3 mm). We obtained the storage ( $E'$ ) and the loss modulus ( $E''$ ).

The test was divided into two parts, the first of which consisted in recording  $E'$  and  $E''$  while there was an increase in the linearly spaced displacement from 0.05 to 0.3 mm (these curves were called "going"). Once the maximum displacement was reached, the second part of the test started, where the values of  $E'$  and  $E''$  were again recorded as the displacement decreased from 0.3 to 0.05 mm ("back"). This type of test was carried out for nonmagnetic and magnetic hydrogels.

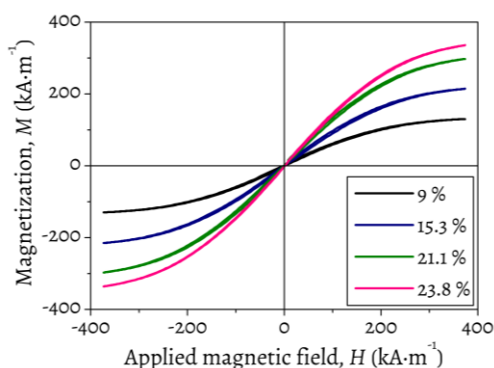
In the case of magnetic hydrogels, these tests were also carried out under the application of a magnetic field in the same direction of displacement (deformation). Two magnetic field strengths of 15 and 25  $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$  were applied with a coil.

## 8.6.2 Results and discussion

### 8.6.2.1 Magnetization measurements

The magnetization curves of the hydrogels prepared with different volume fractions of magnetic particles are presented in Figure 8.28. Similarly to previous paragraphs, we calculated the magnetic susceptibility by adjusting the curve to Fröhlich-Kennelly law. In addition we used an empiric law to obtain the saturation magnetization of each sample—see table in Figure 8.28.

Finally, we calculated the iron particles concentration of each magnetic hydrogel by using the mixing law.



Weight of Fe-HQ added (g)	$M_s$ ( $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ )	$\chi_i$ (-)	Calculated [Fe-HQ] (vol. %)
<b>5.91</b>	165.5	0.86	9
<b>11.82</b>	279.2	1.30	15.3
<b>17.73</b>	385.7	1.77	21.1
<b>23.64</b>	434.8	1.96	23.8
<b>Fe-HQ</b>	1830	8.63	-

Figure 8.28. Left graph: Magnetization curves of alginate hydrogels containing different value concentrations of Fe-HQ particles (indicated). Right table: Values of saturation magnetization and magnetic susceptibility of iron particles and the prepared magnetic hydrogels. In the first column, the iron masses added to prepare the different samples of ferrogels are included and, in the last column, the estimated values of iron particle concentration in each sample according to mixing law.

### 8.6.2.2 Rheological characterization

The mechanical properties of the nonmagnetic and magnetic hydrogels were characterized.

When the amplitude sweep is carried out first in an increasing (going) direction and then in a decreasing (back) direction, for the nonmagnetic hydrogels, mechanical hysteresis was obtained. We can see in Figure 8.29 (a), that the going curve had an average value of about 2000 Pa above that for the back curve. However, the hysteresis decreased for the second and third hysteresis cycles. So, we have a clear thixotropic behavior. For the magnetic hydrogels, it was obtained an even more pronounced mechanical hysteresis. As we can see in Figure 8.29 (b), for a gel with 15.3 vol. % of iron, the average value of  $E'$  in the going curve is about 5000 Pa higher than that of the back curve. For the second and third hysteresis cycles, the hysteresis cycle was narrower, although a considerable difference between both curves was still observed. This indicates that in magnetic hydrogels there was an even more pronounced thixotropic behavior, which seems logical because, the hydrogels being composed of polymer chains and particles, changes in the internal microstructure can be more intense and with a greater degree of irreversibility than in hydrogels that do not contain solid particles.

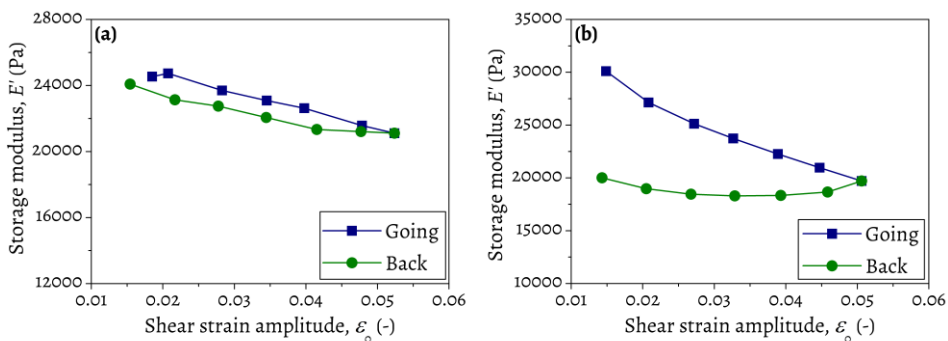


Figure 8.29. Storage modulus as a function of the deformation amplitude in (a) a nonmagnetic alginate hydrogel and (b) an alginate hydrogel containing 15.3 vol. % of iron. The curves obtained for an amplitude sweep of increasing deformation (going) and then decreasing (back) are shown.

Taking into account this high degree of thixotropy, we proceeded as described in what follows. For each sample, a first cycle of hysteresis was performed in the absence of a magnetic field. Afterwards, and without changing the sample, a magnetic field of  $15 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$  was applied and a second cycle of mechanical hysteresis was obtained. Then, also without changing the sample, a third hysteresis cycle was carried

out under a field of  $25 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ . This procedure was repeated with nine different samples of each of the magnetic hydrogels (for volume fractions between 0 % and 23.8 %).

Figure 8.30 shows the values of the elastic and viscous moduli ( $E'$ ,  $E''$ ) and the complex Young's modulus ( $E^*$ ) as a function of the volume fraction of iron particles. It is observed that the values of  $E'$  are about 5 and 7 times greater than the values of  $E''$  for the nonmagnetic and magnetic hydrogels, which is an indication of their viscoelastic solid-like nature.

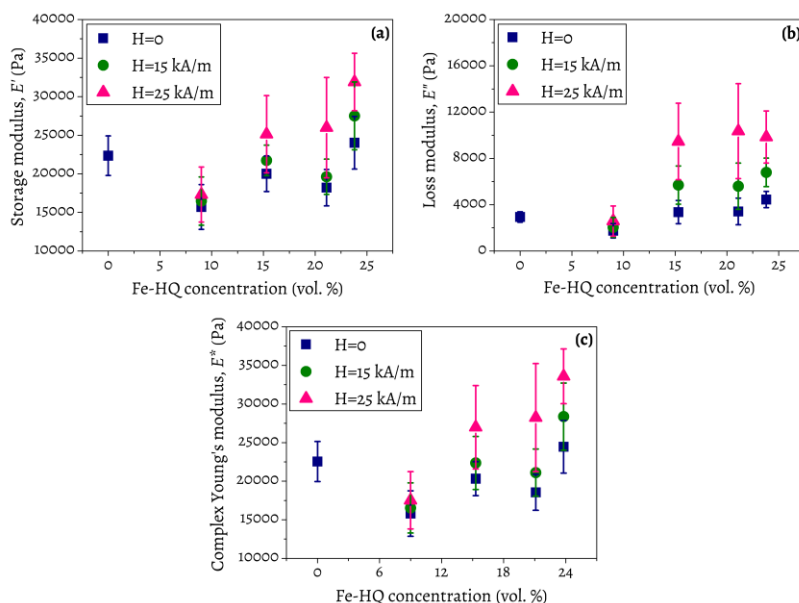


Figure 8.30. Storage modulus (a), loss modulus (b) and complex Young's modulus (c) as a function of the volume fraction of iron in the hydrogels. Data obtained for the indicated values of the magnetic field.

In the absence of applied field, the values of  $E'$  (Figure 8.30 (a)) of the nonmagnetic hydrogel are greater than those of the magnetic hydrogels, except for the highest concentration of iron for which they are similar. In the case of  $E''$  (Figure 8.30 (b)), there seems to be a slight increase, with respect to the nonmagnetic hydrogel, only when the iron concentration is the maximum under study (23.8 vol. %). Consequently, the Young's modulus ( $E^*$ ) of the hydrogels (in the absence of applied field) did not experience a significant increase, so that the addition of particles did not reinforce the alginate polymer network, but rather seemed to weaken it.

Under the application of magnetic fields, the interaction between ferromagnetic particles is expected to reinforce the gels. The effect of fields of  $15 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  and  $25 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  of intensity was tested. Comparison of data obtained in the absence of magnetic

field and in the presence of magnetic field indicated that reinforcement (increase in  $E^*$  with respect to hydrogels in the absence of field) only happened for the two highest concentrations of iron particles (21.2 and 23.8 vol. %) and for the most intense applied field.

In view of these results, it is worthy to discuss on two experimental facts. First, the variability in the results obtained and, second, the effect on the mechanical properties produced by the inclusion of micrometric particles in the alginate network.

i) Regarding the variability in the measurements of the viscoelastic moduli, we must be aware that we are working with soft viscoelastic hydrogels with a high water content. These hydrogels are built by electrostatic interactions between polymer chains and calcium ions. This allows to obtain soft material with high swelling capacity. However they have the disadvantage that the weakness of the chain-chain linkages can give rise to non-identical mesoscopic structures in different syntheses. The precise control of polymerization makes it possible to obtain more homogeneous hydrogels, but it does not completely wide dispersion in the internal order of the polymer network. According to Figure 8.30, in the hydrogels without particles the relative error in the values of the viscoelastic modules is of the order of 10 %. In magnetic hydrogels, and in the absence of field, the error level is also around 10 %, but when the same properties are measured in the presence of field, relative errors ranging between 10 % and 25 % are reached. The latter indicates that the internal structure of hydrogels with particles, and in the presence of field, present a large variability. For different samples—even with the same composition and the same preparation protocol—the ordering of the particles induced by the field inside a polymer network, which in itself will be very distorted by the microparticles, can be very variable, resulting in mechanical responses with quite poor reproducibility.

ii) Regarding the changes in the internal structure of the hydrogels caused by the inclusion of iron particles, we must take into account that the alignment of alginate polymers chains generates negatively charged holes with an adequate volume to be occupied by calcium ions. The iron particles in suspension at acidic pH also carry a positive charge, and we could hypothesize that in principle they will compete with  $\text{Ca}^{2+}$  ions to place themselves in the same holes. However, the size of the iron particles (2 microns) is several orders of magnitude higher than that of the calcium ions, so in the presence of particles the resulting network will be much more open and irregular than when the iron particles are not included in the formulation. This disorganization of the alginate network is the reason why the inclusion of particles, instead of reinforcing, weakens the resulting hydrogel. Only when the concentration of iron particles approaches 25 vol. %, does the resulting gel slightly strengthen.

Similarly, the action of the field, which provokes a tendency of the particles to migrate and to chain, is only able to reinforce the gel at high iron particles concentration (> 20 vol. %) and for magnetic fields stronger than  $15 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ . In any cases, we should note that fields of this intensity are easily accessible and that already for these fields we have increases in the Young's modulus of the order of 10000 Pa, an increase of around 30 % with respect to the absence of field.

## 8.7 Conclusions

The main goal of this work has been the preparation of magnetic hydrogels, with physical properties that can be modulated by the application of an external magnetic field of low to moderate intensity, to be used as substitutes for biological tissues in the field of tissue engineering. For this purpose, the mechanical and magnetic properties of different types of biomaterials have been analyzed. Furthermore, the *ex vivo* and *in vivo* biocompatibility of the biomaterials was evaluated. This work has been divided into two parts:

The **first** part of the thesis was focused on fibrin-agarose hydrogels. (i) Development of a synthesis method to obtain magnetic core-shell nanoparticles of spherical and ellipsoidal morphology, coated with a biocompatible polymer, to be included in fibrin-agarose hydrogels. (ii) The preparation and study of the *ex vivo* and *in vivo* biocompatibility of the magnetic fibrin-agarose polymer hydrogels, containing the synthesized core-shell nanoparticles. (iii) The analysis of the effect of the concentration of magnetic material (commercial magnetic particles, MagP-OH<sup>®</sup>), on the mechanical properties and microstructure (porosity) of fibrin hydrogels. (iv) Finally, the study of cell culture of chondrocytes in nonmagnetic and magnetic (containing MagP-OH<sup>®</sup> nanoparticles) fibrin-agarose hydrogels, in order to obtain artificial tissues that mimic a human native cartilage tissue; finally, we analysed the mechanical properties, and the cell proliferation and histological properties of the resulting artificial tissues.

The main conclusions of the first part of the thesis are as it follows:

1. Silica particles of ellipsoidal morphology with an aspect ratio (length / diameter) of 2.9 have been synthesized and have been used as cores for the deposition on them of a layer of magnetite nanoparticles, obtaining core-shell ellipsoidal magnetic microparticles. We have also obtained spherical magnetic core (polymer)-shell (magnetite) nanoparticles.
2. We have found that the incorporation of an outer layer of polyethylene glycol (PEG) gives the core-shell magnetic nanoparticles an excellent *ex vivo* and *in vivo* biocompatibility.

3. The inclusion of magnetic core-shell nanoparticles coated with PEG in a fibrin-agarose matrix allows us to obtain biocompatible magnetic hydrogels. The presence of magnetic material within the fibrin-agarose matrices does not affect the intrinsic *ex vivo* and *in vivo* biocompatibility of the fibrin-agarose hydrogels. The *in vivo* assays have shown a good interaction of the magnetic hydrogels with the host tissue; the implantation in experimental animal models of both, magnetic nanoparticles and magnetic hydrogels, only causes a localized acute inflammatory reaction.
4. The incorporation of a small amount of properly functionalized magnetic nanoparticles within fibrin scaffolds indicates a more open polymer network. Clusters of magnetic nanoparticles act as cross-linking knots, which makes possible the formation of a more porous structure, with a great capacity of swelling.
5. Magnetic fibrin hydrogels have a reinforced mechanical response compared to nonmagnetic hydrogels, characterized by higher values at the rigidity modulus and viscoelastic moduli.
6. We have developed a theoretical model that semiquantitatively predicts the quadratic dependence between the rigidity modulus and the concentration of magnetic nanoparticles within the fibrin hydrogels observed experimentally. This model is based on the formation of clusters, created by interactions between fibrinogen molecules and magnetic nanoparticles, which act as cross-linking nodes in the polymer network.
7. The incorporation of chondrocytes in a magnetic or a nonmagnetic fibrin-agarose polymeric matrix allowed to obtain biomaterials that did not undergo mechanical degradation with time (maximum time studied of 30 days) and, therefore, with potential application in the field of tissue engineering.
8. Fibrin-agarose hydrogels, both nonmagnetic and magnetic, have excellent *ex vivo* biocompatibility. The implanted chondrocytes interact with both types of scaffolds without affecting cell proliferation.
9. It was not possible to obtain a substitute tissue of hyaline cartilage. However, the chondrocytes included in the nonmagnetic and magnetic fibrin-agarose scaffolds expressed typical cartilage proteins (S-100 and type II collagen), although the production of proteoglycans was not observed. In addition, both nonmagnetic and magnetic scaffolds have much smaller (visco)elastic moduli than those corresponding to native human cartilage.

10. The incorporation of magnetic nanoparticles, in cellular fibrin-agarose hydrogels, is viable for obtaining biocompatible artificial tissues with mechanical properties remotely tunable by the action of external magnetic fields.

In the **second** part of the thesis, we had studied the rheological properties of new magnetic hydrogels as alternative biomaterials to the fibrin-agarose hydrogels (studied in the first part). Specifically, we have studied two types of materials: supramolecular hydrogels, formed by physical interactions between very short chain peptides; alginate hydrogels formed by electrostatic interaction between polymer chains of alginate and calcium ions.

The main conclusions derived from this second part of the thesis are as it follows:

11. We have successfully prepared hydrogels by the use of the peptide derivative fmoc-diphenylalanine. Fmoc-diphenylalanine is a small molecule formed by two aminoacids (phenylalanine) and an aromatic group (fmoc). This new generation of hydrogels are formed by physical association of fmoc-diphenylalanine molecules through  $\pi$ - $\pi$  interactions, forming cross-linking fibers resulting in a network of chains capable of absorbing more than 99% of their weight in water.
12. We have generated fmoc-diphenylalanine supramolecular magnetic hydrogels by embedding iron nanoparticles coated with PEG, which were previously functionalized by adsorption of fmoc-diphenylalanine.
13. The magnetic susceptibility and the saturation magnetization of magnetic supramolecular hydrogels increased with the concentration of magnetic nanoparticles.
14. We have studied the mechanical properties, under shear stress, of the nonmagnetic and magnetic fmoc-diphenylalanine hydrogels prepared with different concentrations of magnetic nanoparticles (up to 0.9 vol. %). The values of the viscoelastic moduli and the rigidity modulus of the prepared magnetic hydrogels increased considerably at very low concentration of magnetic nanoparticles (0.05 % and 0.1 % in volume) with respect to the nonmagnetic hydrogels. However, for concentrations of magnetic nanoparticles greater than 0.1 vol. %, a tendency to saturation of the increase of the viscoelastic moduli and the rigidity modulus was obtained.
15. The study at a microscopic scale of nonmagnetic and magnetic fmoc-diphenylalanine hydrogels allowed to explain, at least qualitatively, that the enhancement of the mechanical moduli saturates for particle concentrations

higher than 0.1 %. We proposed that iron nanoparticles produced the association of very fine fibrils into thicker fibers, producing an increase in the rheological parameters (reinforcement of the material) so that, for concentrations greater than 0.1%, the maximum possible association of fibrils had already been reached and the mechanical moduli did not increase further.

16. We have successfully incorporated iron microparticles into polymer calcium alginate matrices (which are low cost and easy to prepare), resulting in magnetic hydrogels.
17. From the study of the mechanical properties of the nonmagnetic and magnetic alginate hydrogels, under tensile stress, it follows that the combined action of (i) the inclusion of magnetic particles and (ii) the application of external magnetic fields, allowed a certain degree of modulation of the mechanical properties of hydrogels.
18. Alginate hydrogels prepared with low concentration of iron particles suffered a weakening of the polymer network. It was not possible to recover the elasticity of pure calcium alginate hydrogels even under the application of moderate magnetic fields.
19. Alginate hydrogels were reinforced (increase in Young's modulus of up to 30 %), under the action of moderate magnetic fields (around  $20 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ), only when the content of iron particles was quite high (of the order of 20 % in volume).

## 8.8 References

1. E. Beniash, J. D. Hartgerink, H. Storrie, J. C. Stendahl and S. I. Stupp, *Acta Biomaterialia*, 2005, **1**, 387-397.
2. D. J. Adams, *Macromolecular Bioscience*, 2011, **11**, 160-173.
3. T. R. Hoare and D. S. Kohane, *Polymer*, 2008, **49**, 1993-2007.
4. M. Alaminos, M. D. Sanchez-Quevedo, J. I. Munoz-Avila, D. Serrano, S. Medialdea, I. Carreras and A. Campos, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, **47**, 3311-3317.
5. V. Carriel, I. Garzon, J.-M. Jimenez, A.-C.-X. Oliveira, S. Arias-Santiago, A. Campos, M.-C. Sanchez-Quevedo and M. Alaminos, *Cells Tissues Organs*, 2012, **196**, 1-12.
6. Y. Li, G. Huang, X. Zhang, B. Li, Y. Chen, T. Lu, T. J. Lu and F. Xu, *Advanced Functional Materials*, 2013, **23**, 660-672.
7. G. Scionti, M. Moral, M. Toledano, R. Osorio, J. D. G. Duran, M. Alaminos, A. Campos and M. T. Lopez-Lopez, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2014, **102**, 2573-2582.



8. J. A. Stammen, S. Williams, D. N. Ku and R. E. Guldborg, *Biomaterials*, 2001, **22**, 799-806.
9. R. A. Magnussen, F. Guilak and T. P. Vail, *Journal of Orthopaedic Research*, 2005, **23**, 576-583.
10. M. T. Lopez-Lopez, G. Scionti, A. C. Oliveira, J. D. G. Duran, A. Campos, M. Alaminos and I. A. Rodriguez, *Plos One*, 2015, **10**, e0133878.
11. C. R. Mayer, V. Cabuil, T. Lalot and R. Thouvenot, *Advanced Materials*, 2000, **12**, 417-420.
12. S. Brule, M. Levy, C. Wilhelm, D. Letourneur, F. Gazeau, C. Menager and C. Le Visage, *Advanced Materials*, 2011, **23**, 787-790.
13. J. I. Kim, B. Kim, C. Chun, S. H. Lee and S.-C. Song, *Biomaterials*, 2012, **33**, 4836-4842.
14. R. Barbucci, D. Pasqui, G. Giani, M. De Cagna, M. Fini, R. Giardino and A. Atrei, *Soft Matter*, 2011, **7**, 5558-5565.
15. C. S. Brazel, *Pharmaceutical Research*, 2009, **26**, 644-656.
16. R. Fuhrer, E. K. Athanassiou, N. A. Luechinger and W. J. Stark, *Small*, 2009, **5**, 383-388.
17. O. Ziv-Polat, H. Skaat, A. Shahar and S. Margel, *International Journal of Nanomedicine*, 2012, **7**, 1259-1274.
18. M. Bañobre-Lopez, Y. Piñeiro-Redondo, R. De Santis, A. Gloria, L. Ambrosio, A. Tampieri, V. Dediu and J. Rivas, *Journal of Applied Physics*, 2011, **109**, 07B313.
19. N. Bock, A. Riminucci, C. Dionigi, A. Russo, A. Tampieri, E. Landi, V. A. Goranov, M. Marcacci and V. Dediu, *Acta Biomaterialia*, 2010, **6**, 786-796.
20. X.-B. Zeng, H. Hu, L.-Q. Xie, F. Lan, Y. Wu and Z.-W. Gu, *Journal of Inorganic Materials*, 2013, **28**, 79-84.
21. S. Panseri, C. Cunha, T. D'Alessandro, M. Sandri, G. Giavaresi, M. Marcacci, C. T. Hung and A. Tampieri, *Journal of Nanobiotechnology*, 2012, **10**, 32.
22. J. Chatterjee, M. Bettge, Y. Haik and C. J. Chen, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, **293**, 303-309.
23. C. Galindo-Gonzalez, J. de Vicente, M. M. Ramos-Tejada, M. T. Lopez-Lopez, F. Gonzalez-Caballero and J. D. G. Duran, *Langmuir*, 2005, **21**, 4410-4419.
24. D. C. Jiles, *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials*, Chapman & Hall, London, 1991.
25. S. J. Kemp, R. M. Ferguson, A. P. Khandhar and K. M. Krishnan, *Rsc Advances*, 2016, **6**, 77452-77464.
26. G. D. Nicodemus and S. J. Bryant, *Tissue Engineering Part B-Reviews*, 2008, **14**, 149-165.
27. S. Ladet, L. David and A. Domard, *Nature*, 2008, **452**, 76-79.

28. S. Aktas, D. M. Kalyon, B. M. Marin-Santibanez and J. Perez-Gonzalez, *Journal of Rheology*, 2014, **58**, 513-535.
29. P. C. Nalam, N. N. Gosvami, M. A. Caporizzo, R. J. Composto and R. W. Carpick, *Soft Matter*, 2015, **11**, 8165-8178.
30. V. Adibnia and R. J. Hill, *Journal of Rheology*, 2016, **60**, 541-548.
31. D. Bonn and M. M. Denn, *Science*, 2009, **324**, 1401-1402.
32. J. M. Piau, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 2007, **144**, 1-29.
33. D. Calvet, J. Y. Wong and S. Giasson, *Macromolecules*, 2004, **37**, 7762-7771.
34. J. Cho, M.-C. Heuzey and M. Hamdine, *Macromolecular Materials and Engineering*, 2007, **292**, 571-581.
35. D. J. Curtis, A. Holder, N. Badiie, J. Claypole, M. Walters, B. Thomas, M. Barrow, D. Deganello, M. R. Brown, P. R. Williams and K. Hawkins, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 2015, **222**, 253-259.
36. M. Rubinstein and R. H. Colby, *Polymer Physics*, Oxford University, New York, NY, 2003.
37. H. H. Winter and F. Chambon, *Journal of Rheology*, 1986, **30**, 367-382.
38. F. Chambon and H. H. Winter, *Journal of Rheology*, 1987, **31**, 683-697.
39. J. I. Kim, C. Chun, B. Kim, J. M. Hong, J.-K. Cho, S. H. Lee and S.-C. Song, *Biomaterials*, 2012, **33**, 218-224.
40. L. Rodriguez-Arco, I. A. Rodriguez, V. Carriel, A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, P. Kuzhir, J. D. G. Duran and M. T. Lopez-Lopez, *Nanoscale*, 2016, **8**, 8138-8150.
41. M. T. Lopez-Lopez, I. A. Rodriguez, L. Rodriguez-Arco, V. Carriel, A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, A. Zubarev and J. D. G. Duran, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2017, **431**, 110-114.
42. H.-M. Yun, S.-J. Ahn, K.-R. Park, M.-J. Kim, J.-J. Kim, G.-Z. Jin, H.-W. Kim and E.-C. Kim, *Biomaterials*, 2016, **85**, 88-98.
43. R. M. Christensen, *Mechanics of Composite Materials*, Malabar:Krieger Publishing Company, 1991.
44. R. Messing, N. Frickel, L. Belkoura, R. Strey, H. Rahn, S. Odenbach and A. M. Schmidt, *Macromolecules*, 2011, **44**, 2990-2999.
45. H. Fischer, I. Polikarpov and A. F. Craievich, *Protein Science*, 2004, **13**, 2825-2828.
46. R. G. Larson, *The Structure and Rheology of Complex Fluids*, Oxford University Press, New York, 1999.
47. T. Mitsumata, A. Honda, H. Kanazawa and M. Kawai, *Journal of Physical Chemistry B*, 2012, **116**, 12341-12348.

48. I. Agirre-Olabide, M. J. Elejabarrieta and M. M. Bou-Ali, *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, 2015, **26**, 1880-1886.
49. N. M. Wereley, A. Chaudhuri, J. H. Yoo, S. John, S. Kotha, A. Suggs, R. Radhakrishnan, B. J. Love and T. S. Sudarshan, *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, 2006, **17**, 393-401.
50. E. Moghimi, A. R. Jacob, N. Koumakis and G. Petekidis, *Soft Matter*, 2017, **13**, 2371-2383.
51. C. W. Macosko, *Rheology: Principles, Measurements and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 1994.
52. A. V. Bychkova, O. N. Sorokina, A. L. Kovarski, A. B. Shapiro, V. B. Leonova and M. A. Rosenfeld, *Biofizika*, 2010, **55**, 605-611.
53. H. C. F. Cote, S. T. Lord and K. P. Pratt, *Blood*, 1998, **92**, 2195-2212.
54. P. Zeliszewska, A. Bratek-Skicki, Z. Adamczyk and M. Ciesla, *Langmuir*, 2014, **30**, 11165-11174.
55. G. Hudryclergeon, G. Marguerie, L. Pouit and M. Suscillon, *Thrombosis Research*, 1975, **6**, 533-541.
56. M. W. Mosesson, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2005, **3**, 1894-1904.
57. N. Hassan, V. Verdinelli, J. M. Ruso and P. V. Messina, *Soft Matter*, 2012, **8**, 6582-6592.
58. E. A. G. Kalaf, R. Flores, J. G. Bledsoe and S. A. Sell, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2016, **63**, 198-210.
59. A. Grosberg and A. Khokhlov, *Statistical Physics of Macromolecules*, Springer, Berlin, 1994.
60. M. A. Rodriguez, M. T. Lopez-Lopez, J. D. G. Duran, M. Alaminos, A. Campos and I. A. Rodriguez, *Cryobiology*, 2013, **67**, 355-362.
61. R. W. Chan and I. R. Titze, *Journal of the Acoustical Society of America*, 1999, **106**, 2008-2021.
62. L. P. Pitaevskii and E. M. Lifshits, *Physical Kinetics*, Butterworth-Heinemann, 1999.
63. F. Campos, A. B. Bonhome-Espinosa, L. Garcia-Martinez, J. D. G. Duran, M. T. Lopez-Lopez, M. Alaminos, M. C. Sanchez-Quevedo and V. Carriel, *Biomedical Materials*, 2016, **11**, 055004.
64. I. Garzon, V. Carriel, A. Belen Marin-Fernandez, A. Celeste Oliveira, J. Garrido-Gomez, A. Campos, M. del Carmen Sanchez-Quevedo and M. Alaminos, *Plos One*, 2012, **7**, e51961.
65. L. Garcia-Martinez, F. Campos, C. Godoy-Guzman, M. del Carmen Sanchez-Quevedo, I. Garzon, M. Alaminos, A. Campos and V. Carriel, *Histochemistry and Cell Biology*, 2017, **147**, 83-95.
66. E. Zaccarelli, *Journal of Physics-Condensed Matter*, 2007, **19**, 323101.
67. N. A. Dudukovic and C. F. Zukoski, *Langmuir*, 2014, **30**, 4493-4500.

68. D. E. Discher, P. Janmey and Y. L. Wang, *Science*, 2005, **310**, 1139-1143.
69. R. E. Rosensweig, *Ferrohydrodynamics*, Cambridge: Cambridge University Press, 1985.
70. D. Borin, D. Guenther, C. Hintze, G. Heinrich and S. Odenbach, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2012, **324**, 3452-3454.