

ARTÍCULO ORIGINAL / *Original*

OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y BIOCOMPATIBILIDAD DE HIDROGELES POLIMÉRICOS PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS: ESTUDIO PRELIMINAR

M. Victoria Marotta,^{1,2} Agustín H. Rojas,¹ Tamara G. Oberti¹, Juan M. Fernández^{2*}

¹ Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP – CONICET. La Plata, Argentina.

² Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CIC. La Plata, Argentina.

Resumen

La ingeniería de tejidos es una ciencia interdisciplinaria que se encuentra en constante búsqueda de materiales que puedan ayudar a reparar el tejido dañado; en nuestro caso, tejido óseo y cartilaginoso. En este trabajo obtuvimos un biomaterial utilizando alginato de sodio (polímero natural) y polielectrolito catiónico sintético (PEC) producido en nuestros laboratorios. La unión de ambos polímeros dada por fuerzas iónicas se vio incrementada gracias a la aplicación de ultrasonido. Cuando evaluamos la toxicidad *in vitro* de los biomateriales utilizando células macrofágicas RAW 264.7, encontramos que la aplicación de ultrasonido produjo un material menos tóxico con relación a cuando esta tecnología no se aplica, además de una mayor capacidad de fomentar la proliferación de células preosteoblásticas MC3T3-E1 y células condrocíticas crecidas sobre ellos. Si bien hace falta realizar experimentos adicionales, nuestro biomaterial Alginato-PEC tratado con ultrasonido resulta

ser prometedor para ser utilizado como *scaffolds* en Ingeniería de Tejidos óseo y cartilaginoso.

Palabras clave: alginato, ingeniería de tejidos, toxicidad.

OBTAINING, CHARACTERIZATION AND BIOCOMPATIBILITY OF POLYMERIC HYDROGELS FOR TISSUE ENGINEERING

Abstract

Tissue engineering is an interdisciplinary science that is constantly searching for materials that can help repair damaged tissue, in our case, bone and cartilage. In this work, we obtained a biomaterial using sodium alginate (natural polymer) and synthetic cationic polyelectrolyte (PEC) produced in our laboratories. The union of both polymers, given by ionic forces, was increased thanks to the application of ultrasound. When we evaluated the *in vitro* toxicity of the biomaterials using

*E-mail: jmfernandez@biol.unlp.edu.ar



RAW 264.7 macrophage cells, we found that the application of ultrasound produced a non-toxic material compared to when this technology is not applied, in addition to a greater capacity to promote the proliferation of MC3T3-E1 preosteoblastic cells and chondrocytic cells grown on them. Although

additional experiments are needed, our Alginate-PEC biomaterial with ultrasound is a promising approach that can be used to generate scaffolds for bone and cartilage tissue engineering.

Keywords: *alginate, tissue engineering, toxicity.*

Introducción

La destrucción del tejido óseo debido a enfermedades (osteonecrosis, tumores, osteoporosis) o a cicatrización ineficaz posterior a lesión traumática es un problema que afecta a la población mundial. Actualmente se utilizan distintas terapias para las diversas lesiones óseas. Entre ellas se encuentra la utilización de diversos materiales e injertos (según su procedencia se clasifican en: autoinjerto, aloinjerto [homólogos], xenoinjerto [heterólogo]).¹ Además, una disminución en la calidad y/o densidad mineral ósea (DMO) puede incrementar la incidencia de fracturas debido a la osteoporosis, la enfermedad ósea metabólica más frecuente. Varios trabajos en la bibliografía científica pronostican un aumento de fracturas óseas debido a osteoporosis; por ejemplo, se estima que la incidencia de fractura de cadera a causa de la osteoporosis se incrementará en un 100% hacia el año 2050,² mientras que Lu y cols. informan que el número de casos aumentaría 2,7 veces entre 2015 y 2035.³ En la Argentina, aproximadamente 264/100.000 habitantes/año deben ser atendidos por estas lesiones (que afectan mayormente a mujeres mayores de 50 años), con altas tasas de complicaciones por infecciones, e incluso de mortalidad. Estas incidencias resultan ser similares a las informadas en el resto de Latinoamérica.⁴ Se estima que el 20-40% de los adultos mayores mueren al año tras sufrir esta lesión.⁵ Además, los costos de los tratamientos resultan ser elevados;

por ejemplo en nuestro país, los costos por fractura de cadera varían entre USD 3800 y USD 5500.⁶ Por otro lado, existe una dificultad adicional en la frecuencia y reparación de fracturas cuando coexisten enfermedades que afectan el metabolismo óseo, como la diabetes mellitus.^{7,8}

Asimismo, el cartílago puede sufrir diversas alteraciones que conllevan una disminución en la matriz extracelular o en la población celular. Estos daños pueden desencadenar un proceso llamado artrosis que afecta a más de 500 millones de personas en todo el mundo,^{9,10} siendo 300 millones de ellos afectados por artrosis de cadera o rodillas con causa multifactorial, los cuales se vinculan a problemas genéticos (como, por ejemplo, mutaciones del gen de colágeno tipo 2), sistémicos, edad avanzada, sexo femenino, metabólicos (como en el caso de hemocromatosis).¹¹ Además, diversos factores mecánicos consecuencia del sobrepeso o traumatismos han demostrado ser factores de riesgo para la artrosis.¹² Otros estudios demuestran que la artrosis afecta aproximadamente al 25% de la población de mediana y alta edad en los Estados Unidos, número que iría en aumento debido al incremento en la expectativa de vida y en casos de obesidad.¹³⁻¹⁵ En la mayoría de los pacientes (63%) sometidos a artroscopia de rodillas se observan defectos focales del cartílago, permaneciendo sin síntomas durante un largo período. Sin embargo, las lesiones sintomáticas suelen ser muy dolorosas y se ha demostrado

que un paciente con una lesión del cartílago articular tiene un riesgo aumentado en 5 veces de progresar a artrosis.^{16,17}

El impacto de los tratamientos en los defectos óseos desde el punto de vista clínico y económico es sumamente grande, tanto en nuestro país como a nivel global.^{7,18} Las distintas alternativas que existen como opción en el reemplazo y restauración del tejido óseo y del tejido cartilaginoso no siempre son eficaces, debido a que poseen diversas limitaciones y desventajas. Los metales poseen una baja capacidad de osteointegración, las cerámicas son frágiles y los injertos poseen distintas desventajas, entre las cuales las principales son escasez de donantes y el rechazo. En el caso de la utilización de terapias basadas en células condrocíticas, estas pierden la estabilidad fenotípica con el tiempo.^{9,13,19} Además, en paralelo al aumento de la población global y la expectativa de vida, las frecuencias y los costos antes descritos irán en aumento.

Frente a esta problemática surge como alternativa de tratamiento la Ingeniería de Tejidos, una ciencia interdisciplinaria que utiliza conceptos de diversas disciplinas tales como Medicina, Veterinaria, Bioquímica, Farmacia, Ingeniería, Química y Física para sintetizar materiales que sirvan para regenerar o reparar los tejidos dañados, no solo desde el punto de vista estructural sino también funcional.²⁰ Los tres pilares fundamentales de la Ingeniería de tejidos son *scaffolds* o matriz tridimensional, células y factores de crecimientos o moléculas de señalización. Cada uno de ellos garantizan los mecanismos de acción de los autoinjertos: los *scaffolds* proveen de soporte para el crecimiento de las células y movimiento de nutrientes y desechos (osteoconducción); las células se encargan de sintetizar el tejido óseo (osteogénesis) mientras que los factores de crecimiento guían el comportamiento celular (osteoinducción).

Actualmente existe una gran cantidad de estudios dedicados al diseño de *scaffolds* adecuados para ser utilizados en la regeneración

de distintos tipos de tejidos, los cuales han involucrado diversos tipos de materiales como: polímeros, cerámicas, metales o vidrios bioactivos o distintas combinaciones de ellos para potenciar sus cualidades. Una forma de obtención de los biomateriales es la formación de hidrogeles, los cuales pueden ser definidos como una red polimérica tridimensional con capacidad de absorber y retener grandes cantidades de agua.²¹ Estos pueden ser confeccionados utilizando macromoléculas naturales o polímeros sintéticos que presentan una capacidad intrínseca para interactuar con las células, así como una biodegradabilidad adecuada y una alta biocompatibilidad. En particular, los hidrogeles elaborados con polímeros sintéticos permiten el control preciso de las propiedades estructurales, funcionales y mecánicas.²² De esta manera, los hidrogeles resultan ser promisorios sobre otro tipo de *scaffolds* debido a que presentan un comportamiento mecánico, de hinchamiento y lubricante similar al cartílago articular; su naturaleza viscoelástica facilita la transferencia de la carga mecánica y permite que las células cargadas en ellos adquieran una morfología esférica, característica del fenotipo condrogénico.^{23,24} Además, los *scaffolds* utilizados deben cumplir una serie de requisitos: ser biocompatibles, no tóxicos, biodegradables y de una estructura porosa, la cual permita la infiltración de las células.

Nuestro grupo de trabajo cuenta con amplia experiencia en el diseño y caracterización de *scaffolds* para ingeniería de tejido óseo y cartilaginoso, con un enfoque destacado en la caracterización biológica, particularmente en relación con la citotoxicidad. Utilizando polímeros de origen natural o sintético hemos obtenido un gran número de *scaffolds* tridimensionales con una alta biocompatibilidad, que no presentan citotoxicidad y pueden ser degradados por reacciones hidrolíticas, enzimáticas o mediadas por macrófagos.²⁵⁻²⁹

El objetivo general de este trabajo es realizar estudios de caracterización preliminar



de un hidrogel a partir de un polímero natural y uno sintético, compatibilizado con ultrasonido, el cual pueda actuar como *scaffold*. De esta forma, el biomaterial podrá, una vez implantado en el tejido dañado, servir como soporte y guiar la reparación del tejido óseo y cartílago.

La elección de los polímeros se centra en experiencia previa: por un lado, el alginato ha demostrado ser un polímero versátil, fácilmente obtenible de algas pardas invasoras de nuestras costas y que mejora la capacidad condroinductora cuando es incorporado en un hidrogel de polihidroxietil metacrilato.^{30,31} Además, es conocida la capacidad del alginato para formar hidrogeles a partir de la interacción electrostática con cationes bivalentes u otros polímeros que contengan cargas positivas en su estructura.³² En este caso, con el fin de obtener un hidrogel que nos permita regular las propiedades del alginato, se sintetizó un polímero policatiónico utilizando acetato de vinilo y N,N-dimetilaminoetilo metacrilato.

Materiales y métodos

Obtención de los hidrogeles

Síntesis del copolímero AcV-co-DMAEMA

Para la síntesis del copolímero polielectrolito catiónico (PEC) se utilizaron dos monómeros: acetato de vinilo (AcV) y N,N-dimetilaminoetilo metacrilato (DMAEMA). La elección del AcV en la síntesis se basa en que posee un comportamiento de polimerización aleatorio y ya ha sido empleado en nuestro grupo de trabajo para fines similares.²⁹ Por su parte, el DMAEMA fue elegido por ser un monómero catiónico (posee amina terciaria en su estructura),

lo que favorece la compatibilización gracias a la formación de puentes salinos con polímero aniónico (como el alginato) a un pH de trabajo adecuado (Figura 1).

Los monómeros fueron purificados antes de su utilización. Para el caso del AcV se realizó una destilación por arrastre a presión reducida; por otro lado, el DMAEMA fue purificado por filtración en columna de alúmina básica. Ambas purificaciones se llevaron a cabo para eliminar los inhibidores de polimerización presentes en los reactivos. Como iniciador de polimerización se utilizó azobisisobutironitrilo (AIBN), el cual fue purificado mediante recristalización a partir de metanol.

La síntesis del copolímero PEC se realizó por mecanismo de polimerización radicalaria convencional. Brevemente, en un Erlenmeyer se agregaron los monómeros AcV y DMAEMA y el iniciador AIBN. Se tapó la boca del Erlenmeyer con un *septum*, se colocó en baño de hielo/agua en oscuridad y se burbujeó la mezcla de reacción con N₂ durante 30 minutos. La reacción se llevó a cabo en baño térmico a 60 °C y oscuridad por 17 h y se obtuvo una solución viscosa. Se detuvo la reacción con metanol y se conservó a -20 °C a fin de lograr la precipitación del polímero. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en tetrahidrofurano (THF). La solución de PEC en THF se dejó gotear sobre hexano a fin de purificar el polímero sintético, en el cual –luego de precipitar– se descartó el sobrenadante y se secó en tambor de vacío hasta llegar a peso constante. En todos los casos, se determinó el porcentaje de conversión (%C) con la siguiente ecuación:

$$\%C = \frac{\text{masa de copolímero PEC}}{\sum_{i=1}^n \text{masa de monómeros}} \times 100 = \frac{\text{masa de copolímero PEC}}{\text{masa de AcV} + \text{masa de DMAEMA}} \times 100$$

Ecuación (1)

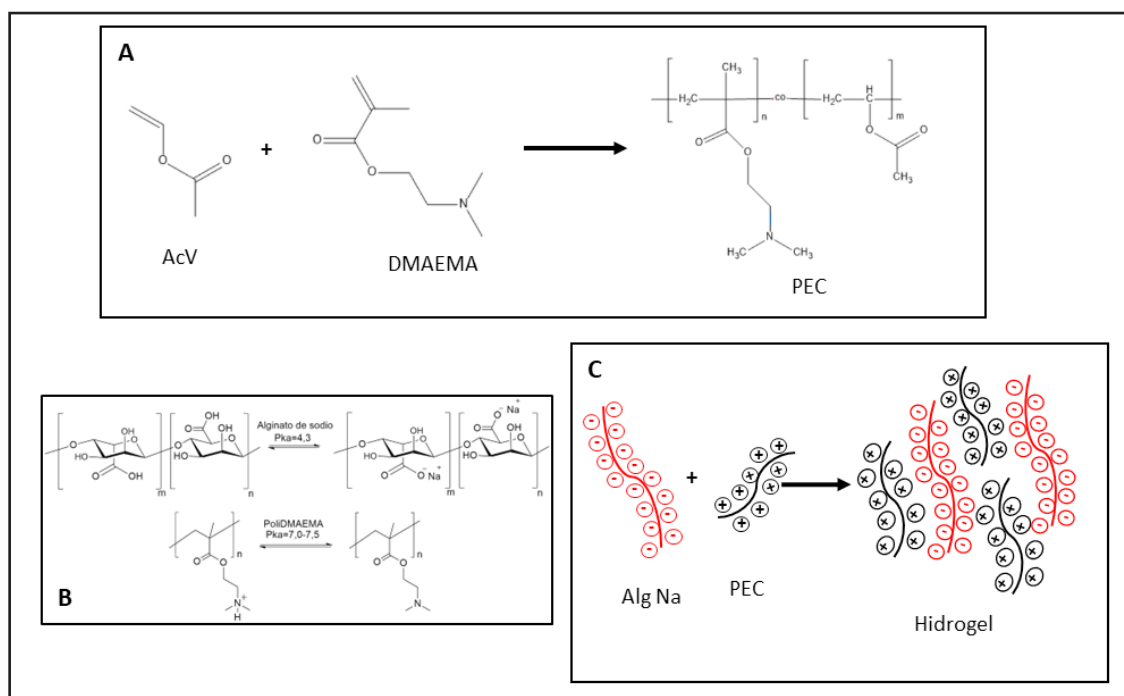


Figura 1. A) Estructura de los monómeros acetato de vinilo (AcV) y N,N-dimetilaminoetil metacrilato (DMAEMA) para la obtención del polielectrolito catiónico (PEC). B) Estructura iónica y no iónica dependiendo del pH de los grupos carboxílicos del alginato de sodio y de la amina terciaria del DMAEMA en PEC. C) Formación del hidrogel mediante fuerza iónicas sin sonicar.

Caracterización del copolímero mediante resonancia magnética nuclear (RMN)

La composición DMAEMA:AcV del PEC ha sido evaluada mediante resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN). Para ello se empleó un equipo Burker Avance Neo 500[®], solubilizando la muestra en cloroformo- d_3 durante las 24 h previas al análisis y utilizando tetrametilsilano (TMS) como patrón interno.

Para el polímero sintetizado se puede calcular la proporción de los monómeros comparando la integración de la señal mediante la siguiente ecuación:

$$F_{AcV} = \frac{2I(OCH)}{I(OCH_2) + 2I(OCH)}$$

Ecuación (2)

donde F_{AcV} es la fracción molar de AcV en el copolímero PEC, $I_{(OCH)}$ corresponde a la intensidad del H unido al grupo acetilo (véase sección resultados y discusión: figura 2A, 4,89 ppm, H asignado = H) y $I_{(OCH_2)}$ al grupo metileno del DMAEMA (figura 2A, 4,07 ppm, H asignado = C).

La fracción de DMAEMA se dedujo de la siguiente manera:

$$F_{DMAEMA} = 1 - F_{AcV}$$

Ecuación (3)

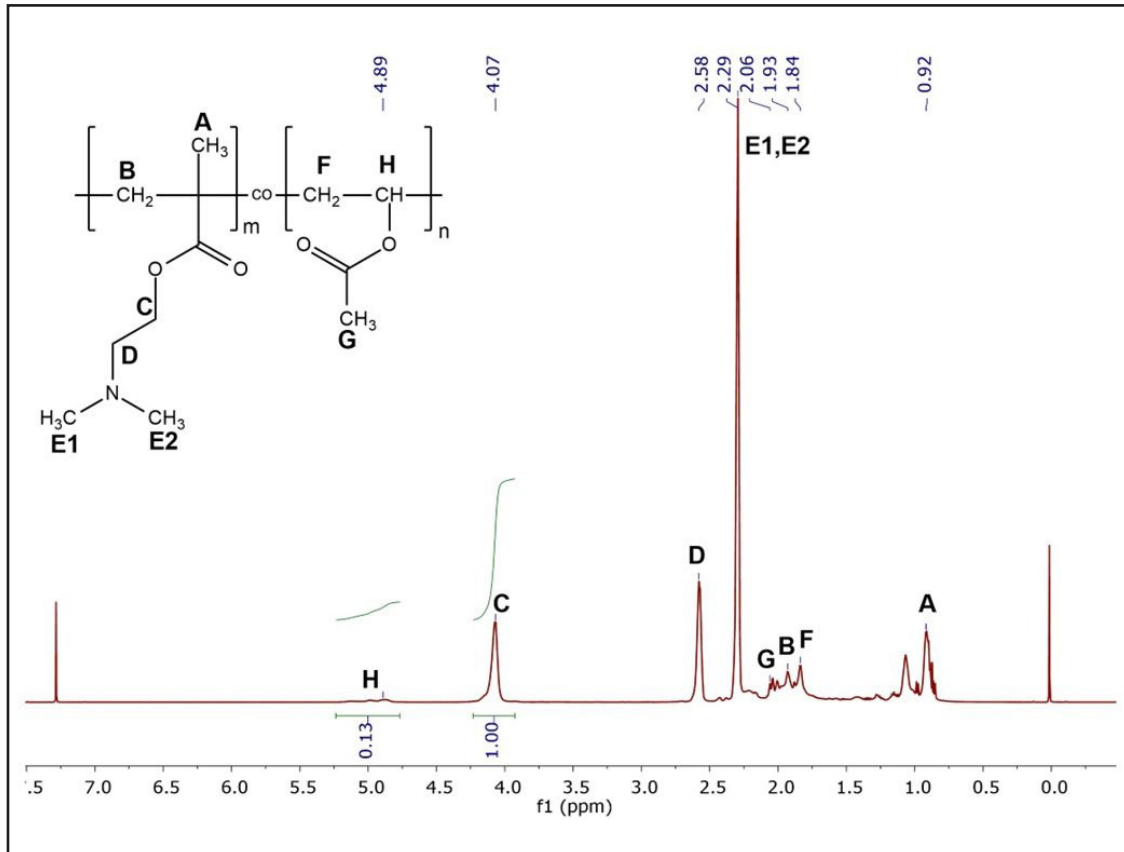


Figura 2. Espectro de ^1H -RMN de PEC empleada para determinar la integración de señales.

Obtención de los hidrogeles alginato-PEC:

El hidrogel se obtuvo a partir del polielectrolito sintético (PEC) y alginato de sodio (polímero natural) mediante entrecruzamiento físico debido a interacciones iónicas establecidas de los dos polímeros que, a $\text{pH}=7$, contienen cargas opuestas (Figura 1). Para mejorar las propiedades del material se compatibilizaron ambos polímeros por ultrasonido, utilizando un equipo HD 60 Bandelin SONOPULS® con accesorios de punta plana TT 12 de titanio, que funciona a una frecuencia de 20 kHz. Se usó una potencia de salida de 37 W en todos los experimentos y la temperatura del recipiente de vidrio con camisa de refrigeración se ajustó a $25,00 \pm 0,02$ °C usando un

termostato MGW Lauda Thermostar RCS6®, según la metodología.³³

El primer paso consistió en preparar las soluciones de polímeros (PEC y AlgNa) en agua destilada, las cuales se agitaron durante 24 h para lograr su total disolución. Los hidrogeles se prepararon mediante el goteo de la solución de AlgNa sobre la solución de PEC, bajo agitación constante y ultrasonido durante un tiempo determinado en una relación final de masa de 2 g de PEC por cada 1 g de alginato de sodio. También se preparó una mezcla con igual proporción que no fue sometida a ultrasonido, para ser utilizada como control con fines comparativos. Luego del proceso de obtención la mezcla se colocó en placas

de teflón tras descartar el sobrenadante y se dejó en el freezer a -20 °C durante toda la noche. Finalmente, las membranas se liofilizaron en un equipo de laboratorio modelo Scientz 10N® (Hinotek, China), hasta alcanzar peso constante.

Caracterización de los hidrogeles alginato-PEC

Hinchamiento

Se estudió la capacidad que tienen los hidrogeles para incorporar agua a la matriz. Para ello, una porción de estos (sin sonicar y sonicado) fueron colocados en agua destilada a 37 °C, midiendo el cambio de peso de la matriz en distintos tiempos. Una vez transcurrido el tiempo estipulado, las muestras se retiraron del medio, se secaron superficialmente y se determinó su peso. El porcentaje de hinchamiento (*swelling*, Sw) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%Sw = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100$$

Ecuación (4)

donde M_t corresponde a la masa de la muestra hinchada al tiempo t y M_0 es la masa inicial de la membrana.

Caracterización biológica de los hidrogeles

Para los estudios de biocompatibilidad y citotoxicidad se utilizaron células preosteoblásticas MC3T3-E1, células condrocíticas de rata y células RAW 264.7. Las células condrocíticas fueron aisladas del cartílago xifoide de ratas Sprague-Dawley, según la técnica descrita previamente.²⁹ El protocolo de obtención de las células condrocíticas a partir de las ratas fue llevado a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud, y fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Protocolo CICUAL N.º 019-06-15) de Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de

La Plata (UNLP), Argentina. Las células fueron cultivadas en medio DMEM-10% suero fetal bovino (SFB) penicilina/estreptomicina (medio basal) a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂, hasta alcanzar la confluencia (10 días de cultivo). Al cabo de este período, fueron tripsinadas y sembradas sobre los biomateriales.

Evaluación de citotoxicidad

El estudio de la eventual citotoxicidad de los hidrogeles fue llevado a cabo mediante el dosaje de óxido nítrico (NO) liberado hacia el medio de cultivo por RAW 264.7 utilizando el método de Griess.^{34,35} Para eso se colocaron los hidrogeles en una placa con pocillos, se lavaron con PBS estéril, se expusieron a luz ultravioleta por 15 minutos y se agregó medio basal (RPMI + 2% de SFB) con células RAW 264.7. Luego de 3 y 24 horas de cultivo se evaluó la liberación de NO al medio de cultivo.³⁵ Como control positivo de toxicidad, las células fueron cultivadas en presencia de lipopolisacárido (LPS).

Viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad de las células RAW 264.7, líneas preosteoblásticas MC3T3E1 y células condrocíticas luego de 3 y 24 horas de cultivo sobre los hidrogeles. Para ello, los materiales fueron cortados y colocados en placa de pocillo, se lavaron con PBS estéril, se expusieron al UV durante 15 min y se cultivaron las células sobre ellos utilizando como medio de cultivo DMEM + 2% SFB. A los tiempos establecidos, una cantidad de células viables se determinó mediante el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Este es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y de color amarillo. Al ser reducido por enzimas mitocondriales intactas el MTT se convierte en un compuesto de color violeta e insoluble en agua (formazan). Luego de los tiempos establecidos, se retiró el medio de cultivo, se lavaron los hidrogeles con PBS y se lisaron



las células con dimetilsulfóxido liberando el MTT reducido por las mitocondrias, el cual fue cuantificado midiendo su absorbancia a 570 nm. La intensidad de la absorbancia es directamente proporcional al número de células viables.³⁵

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el test-t de Student para las muestras asumiendo varianzas iguales, o mediante ensayos de ANOVA usando un único factor para comparar las muestras, según corresponda. Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando la probabilidad sea $p < 0,05$.

Resultados y discusión

La Ingeniería de tejidos es una ciencia interdisciplinaria en busca de materiales que puedan, una vez implantados en el órgano dañado, guiar su reparación. En este trabajo realizamos los primeros ensayos de caracterización de un hidrogel obtenido a partir de alginato (un polímero natural) y un polielectrolito catiónico sintético (PEC).

Caracterización del polielectrolito catiónico

En la figura 1 se pueden ver los monómeros utilizados y la estructura del PEC obtenido. El porcentaje de conversión (% C) promedio de las reacciones de polimerización, calculado con la ecuación 1, fue del 72,8%. La técnica de resonancia magnética nuclear nos permite determinar la estructura molecular de las sustancias. Con esta técnica es posible analizar cuatro elementos: ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . En el caso de compuestos orgánicos, estudiando los espectros de ^1H y ^{13}C es posible obtener información muy precisa, ya que estos elementos son los principales componentes de estas sustancias.³⁶ La identificación y determinación de la composición de comonómeros en el copolímero se realizó mediante ^1H -RMN. Debido a que las señales de los hidrógenos son características

de cada monómero, es posible determinar la composición de comonómeros en el copolímero integrando las señales específicas. En la figura 2 se muestra el espectro del copolímero con las asignaciones estructurales. La figura 2A muestra el espectro completo, donde la señal a $\delta = 0$ corresponde al estándar interno tetrametilsilano (TSM) y la señal a $\delta = 7,28$ ppm corresponde al solvente (cloroformo deuterado). Las asignaciones de los diferentes tipos de hidrógenos se detallan en la tabla 1. Fue posible observar señales particulares para cada monómero, cuyas asignaciones concuerdan con los datos de bibliografía.^{37,38}

Luego, al reemplazar el valor obtenido a partir de la integración de la señal (véase Figura 2) en la ecuación 2 y 3 se obtuvo que $F_{\text{DMAEMA}} = 0,81$ y $F_{\text{AcV}} = 0,19$. Sobre la base de este resultado podemos inferir que el monómero más reactivo es el DMAEMA, ya que la fracción de comonómeros en la mezcla inicial fue de $X_{\text{DMAEMA}} = 0,55$ y $X_{\text{AcV}} = 0,45$.

Caracterización de los hidrogeles

Como se indicó en la sección experimental, luego de preparar ambas soluciones de polímeros (alginato de sodio y PEC) a $\text{pH}=7$, se prepararon los hidrogeles mediante el goteo de una de las soluciones sobre la otra, bajo agitación constante, con ultrasonido y sin él durante 40 min en un tiempo determinado. Después de separar el precipitado del sobrenadante, el complejo polielectrolito se colocó en moldes de teflón, se llevó a freezer y, por último, se liofilizó hasta lograr peso constante. La elección de pH del medio se debió a la necesidad de poseer ambos polímeros en la forma ionizada. Como se puede observar en la figura 1B, el pKa del alginato de sodio es 4.3, mientras que el pKa del Poli-DMAEMA entre 7.0-7.5; así, eligiendo el pH de 7, ambos polímeros se encuentran ionizados, el alginato presenta cargas negativas, mientras que el polímero sintético presenta cargas positivas.^{39,40}

Tabla 1. Asignaciones de los desplazamientos de ¹H-RMN

Hidrógeno	Desplazamiento (ppm)	Asignación
A	0,92	-CH3 cadena principal de la unidad repetitiva DMAEMA
B	1,93	-CH2- cadena principal de la unidad repetitiva DMAEMA
C	4,07	-OCH2- grupo pendiente unidad repetitiva DMAEMA
D	2,58	-CH2N- grupo pendiente unidad repetitiva DMAEMA
E	2,29	-NCH3 grupo pendiente unidad repetitiva DMAEMA
F	1,84	-CH2- cadena principal de la unidad repetitiva AcV
G	2,06	-CH3 grupo pendiente unidad repetitiva AcV
H	4,89	-CH- cadena principal unidad repetitiva AcV

Un importante desafío en la síntesis de biomateriales es conseguir un material que sea estable y, al mismo tiempo, garantice una estructura homogénea cuando se mezclan los componentes (en este caso, polímeros). Para mejorar la compatibilización se han desarrollado diversos métodos entre los cuales se destaca el uso de ultrasonido. Las ondas ultrasónicas de baja frecuencia provocan cambios estructurales y químicos en los sistemas de polímeros generando la rotura de cadenas poliméricas, principalmente cerca del centro de las cadenas, lo que conduce a la formación de macrorradicales.^{41,42} Estos pueden reaccionar a través de procesos de transferencia o combinación, lo que modifica la distribución inicial del peso molecular, generando incluso polímeros ramificados. Se ha demostrado que este proceso sonoquímico puede derivar en la unión de radicales entre polímeros de distinta naturaleza, lo que amplía las posibilidades de compatibilización.^{27,42-44} La estabilidad mecánica ganada de un hidrogel que ha sido expuesto un proceso de entrecruzamiento químico, como en este caso el ultrasonido, puede demostrarse evaluando la capacidad de hinchamiento o *swelling* del material.^{28,45,46} En la figura 3 observamos el % de hinchamiento, luego de aplicar la ecuación 4, de ambos hidrogeles Alg-PEC sonificado y sin sonificar. Observamos que ambos hidrogeles presentan

una cinética de hinchamiento típica, las cuales poseen dos regiones características: la primera es un aumento lineal del *swelling* en función del tiempo, seguido de una segunda parte donde el hinchamiento de la matriz polimérica llega a un valor máximo, permaneciendo constante ya que se ha alcanzado el equilibrio. Encontramos una rápida incorporación de agua por parte de ambas muestras en los primeros 30 min y luego se alcanza el equilibrio a 40 min logrando un porcentaje de *swelling* máximo (%Smáx) de 143 para la muestra sin sonificar y de 110 en el caso de la muestra con sonicación a los 60 min. Encontramos que el hidrogel sin sonificar absorbe más solvente (en nuestro caso agua) que el hidrogel que ha sido expuesto a ultrasonido; esto se debe a que la condensación de los macrorradicales desarrollados ha generado entrecruzamiento químico entre las moléculas poliméricas, dando lugar a una estructura tridimensional más rígida y por ende con menos grados de libertad para el movimiento de las cadenas, lo que repercute en una menor capacidad de absorber el solvente.

Una característica importante de los biomateriales resulta ser su biocompatibilidad, es decir, que posea la capacidad de colaborar en reparar el tejido de interés sin desencadenar efectos tóxicos.⁷ Para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron células RAW 2647, que derivan

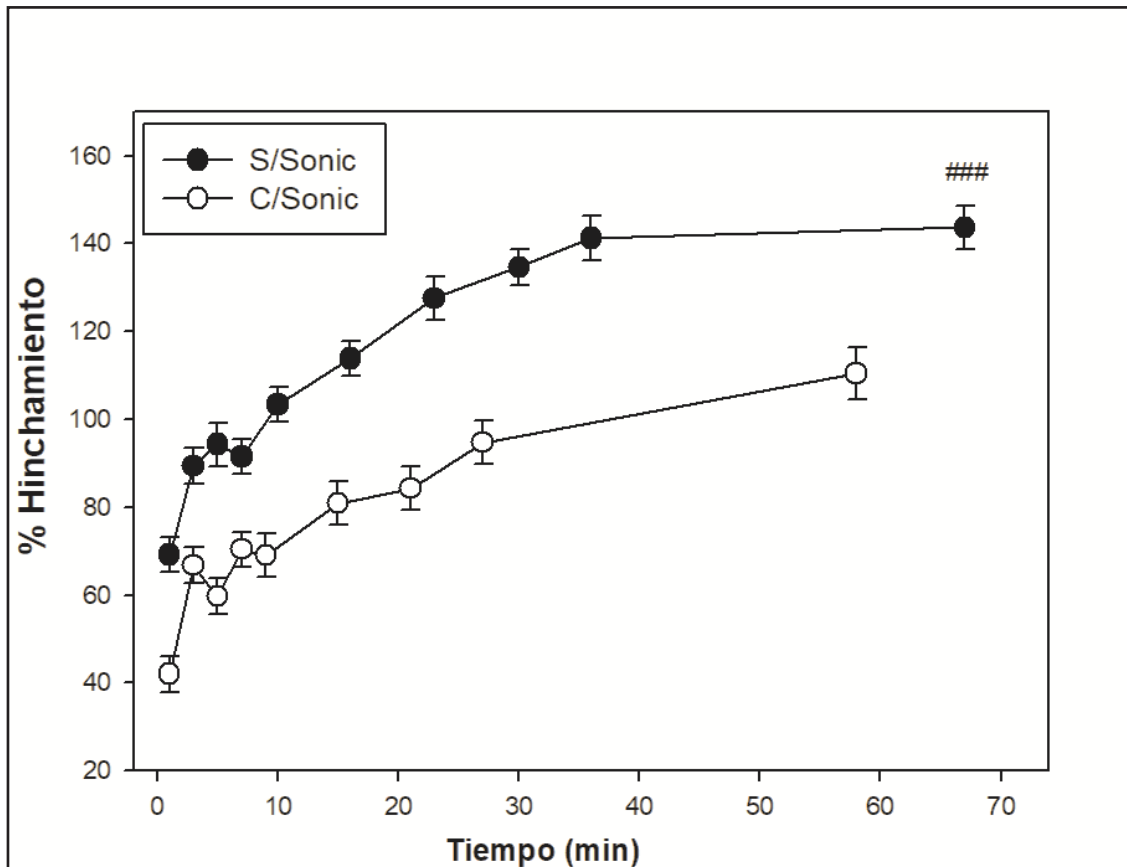


Figura 3. Porcentaje (%) de hinchamiento en agua para los hidrogeles con sonicado y sin él. ###: $p < 0,001$ con respecto al sonicado.

de macrófagos murinos (*Mus musculus*) obtenidos a partir de un tumor inducido por la inyección intraperitoneal del virus de leucemia Abselon en ratones macho adultos de la cepa BALB/c. Estas células crecen adhiriéndose a las superficies de cultivo estándares y poseen morfología monocítica.⁴⁷ La línea celular expresa distintos marcadores de citotoxicidad tales como síntesis de interleuquinas, producción de óxido nítrico (NO), expresión de óxido nítrico sintasa (NOS) y, además, poseen capacidad de diferenciarse hacia macrófagos con alta capacidad fagocítica.^{48,49} Por este motivo constituyen un excelente modelo biológico *in vitro* para estudios de citotoxicidad y degradación

de distintos materiales y sustancias.³⁵ En la figura 4A se puede observar la producción y liberación de NO al medio de cultivo por parte de las células RAW264.7 tanto a 3 h como a 24 h de cultivo crecidas sobre los hidrogeles. Como control y control positivo de toxicidad se utilizaron las células crecidas sobre los pocillos sin o con LPS, respectivamente. Encontramos que las células crecidas sobre los hidrogeles sin sonicar produjeron un aumento significativo en la producción de NO con respecto al control e hidrogel con sonicación tanto a 3 h como a 24 h, pero significativamente menor que el control positivo. En cambio, las células crecidas sobre el hidrogel con sonicación

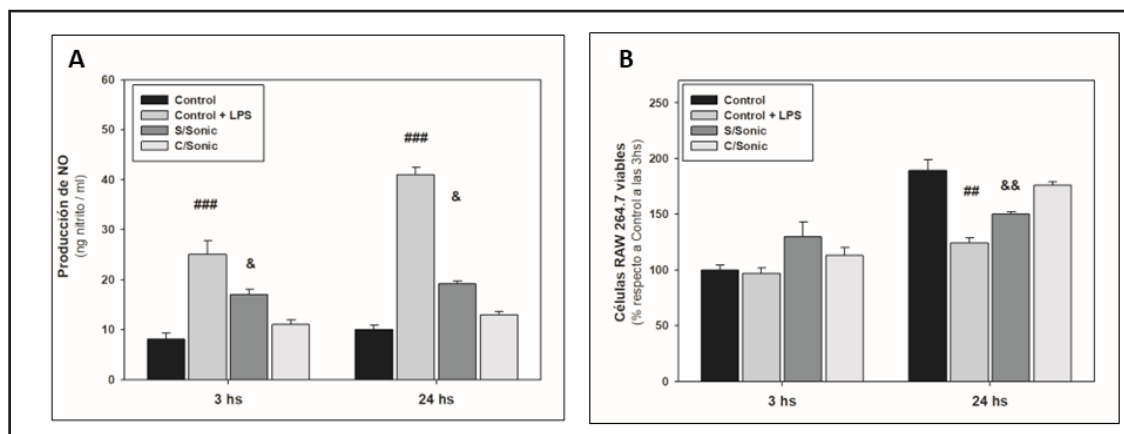


Figura 4. A) Producción de NO luego de 3 y 24 h de las células RAW264.7 crecidas sobre los hidrogeles, control y control más lipopolisacárido (LPS). B) Viabilidad de las células RAW 264.7 cultivadas sobre las distintas condiciones a 3 h y 24 h. ###: $p < 0,001$ con respecto al resto de las condiciones en igual tiempo de cultivo; &: $p < 0,05$ con respecto a control e hidrogel con sonicación en igual tiempo de cultivo; &&: $p < 0,01$ con respecto a control e hidrogel con sonicación en igual tiempo de cultivo.

produjeron para ambos tiempos niveles de NO similares a los de las células control. Para ambos tiempos también hemos evaluado la viabilidad de las células crecidas sobre las distintas condiciones.

Como se ve en la figura 4B, no hubo diferencia significativa en la viabilidad celular luego de 3 h; en cambio, después de 24 h, hubo menos células viables sobre el hidrogel sin sonicación con respecto al control, no así sobre el hidrogel sonificado, en el cual no hubo diferencia con respecto al control. Estos resultados sugieren que la interacción lograda por ultrasonido de los polímeros que componen el biomaterial produce un material menos citotóxico para las células y una superficie más propicia para su crecimiento, debido probablemente a la homogeneidad lograda en la muestra.

Debido a que los hidrogeles aquí evaluados han sido diseñados para ser utilizados como *scaffolds* en Ingeniería de Tejidos tanto óseo como cartilaginoso, resulta importante saber

cómo es el comportamiento de células específicas de estos tejidos sobre los biomateriales. En la figura 5 se pueden observar los resultados al evaluar la viabilidad celular de las células MC3T3E1 y células condrocíticas sobre los hidrogeles. En la figura 5A encontramos que al cabo de 3 h no hubo diferencia significativa en la cantidad de células MC3T3E1 entre los hidrogeles y control. Después de 24 h de cultivo, las células proliferaron menos sobre ambos hidrogeles con respecto al control, lo cual es un hecho comúnmente encontrado, pues los pocillos de cultivo están diseñados para aumentar la proliferación celular;^{29,31,33} no obstante, las células mostraron una mayor proliferación sobre el hidrogel que fue obtenido con sonicación que el que se obtuvo sin sonicación. En la figura 5B se evaluó la proliferación de las células condrocíticas y encontramos un efecto similar al de las células MC3T3E1, con la salvedad de que no hubo diferencia en la proliferación de las células condrocíticas sobre los hidrogeles sin

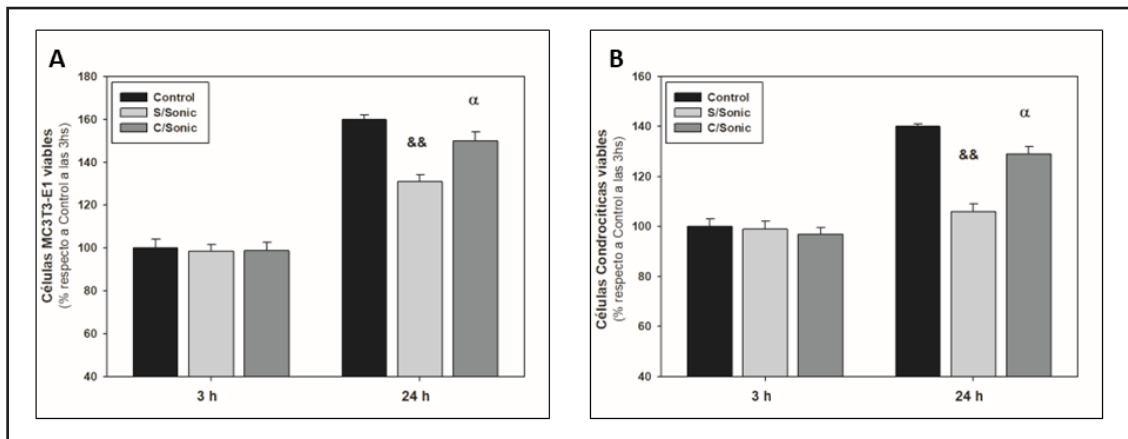


Figura 5. Viabilidad de las células preosteoblásticas MC3T3E1 (A) y células condrocíticas (B) crecidas sobre control, hidrogel sin sonicación e hidrogel con sonicación. &&: $p < 0,01$ con respecto a control e hidrogel con sonicación en igual tiempo de cultivo; α : $p < 0,05$ con respecto a control en igual tiempo de cultivo.

sonicar entre ambos tiempos ($99\% \pm 3\%$ a 3 h vs. $106\% \pm 3\%$ a 24 h).

La estrategia del uso de alginato como polianión entrecruzado con poliacrilamida para obtener biomaterial que pueda servir como *scaffold* en ingeniería de tejido también ha sido utilizada por otros autores. Recientemente, Singh y Pramanik han desarrollado un sistema tridimensional de complejos polielectrolitos con distintas proporciones de alginato y quitosano. Demostraron que el aumento de proporción de alginato aumenta la capacidad de hinchamiento del material; además, mostraron que la cantidad de células de osteosarcoma Saos-2 viables crecidas sobre todos los biomateriales aumentaron durante los 5 días en que se evaluó la proliferación celular.⁵⁰ En otro trabajo interesante, Xue y cols. desarrollaron un hidrogel utilizando alginato y poly-L-ornitina como PEC con función de *carrier* de células para ingeniería de tejido.⁵¹

En conclusión, hemos sintetizado un poliacrilamida que, al ser utilizado junto a alginato de sodio con ultrasonido, permitió obtener un novedoso

e interesante biomaterial con capacidad de rápido hinchamiento, no citotóxico y biocompatible durante el período de tiempo estudiado. Si bien los resultados aquí detallados son prometedores, deben ser desarrollados estudios adicionales a fin de mejorar la caracterización de los materiales; por ejemplo, estudios de degradación y propiedades mecánicas. Además, debido a que el objetivo del presente estudio es comenzar a caracterizar los biomateriales, los resultados de pruebas adicionales nos permitirán evaluar la capacidad osteoinductora, condroinductora y angiinductora de los hidrogeles para luego realizar estudios en modelos *in vivo* y poder conocer la eficacia y seguridad del uso de estos como biomaterial en el área Ingeniería de Tejidos óseo y cartilaginoso.

Agradecimientos: Este trabajo fue subsidiado por ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PICT 2019-1007), por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires.

MVM es Lic. en Biotecnología y Biología Molecular de la FCE, UNLP; AHR es becario posdoctoral de CONICET; TGO y JMF son miembros de la Carrera del Investigador del CONICET.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Recibido: abril 2024

Aceptado: septiembre 2024

Referencias

1. Azi ML, Aprato A, Santi I, Kfuri M Jr, Masse A, Joeris A. Autologous bone graft in the treatment of post-traumatic bone defects: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskeletal Disord* 2016;14:465.
2. Morosano M, Masoni A, Sánchez A. Incidence of hip fractures in the city of Rosario, Argentina. *Osteoporos Int* 2005;16:1339.
3. Lu Y-C., Lin Y-C., Lin Y-K., Liu Y-J. Prevalence of Osteoporosis and Low Bone Mass in Older Chinese Population Based on Bone Mineral Density at Multiple Skeletal Sites. *Scientific Reports* 2016;6:25206.
4. Rojas Padilla LG, Quintero Hernández S, Jiménez Ávila J, López Cervantes RE, Amadei R, Pesciallo C, et al. Hip fracture care – Latin America. *OTA Int* 2020;3(1):e064.
5. Garabano G, Cubecino A, de Bielke HS, Robador N, Olivetto JM, Sierto M, Gamarra D. Epidemiología de la fractura de cadera en la Argentina. *Rev Asoc Arg Ortop Traumatol* 2020;85:437-446.
6. IOF2022 <https://www.osteoporosis.foundation/sites/iofbonehealth/files/2022-09/LATAM%20Audit%202021%20-%20Secci%C3%B3n%20General%20-%20FINAL.pdf>
7. Fernández JM. Importancia de la angiogénesis en el diseño de scaffolds para ingeniería de tejido óseo. *Actual Osteol* 2020;16(3):211-31.
8. Schurman L, Bagur A, Claus-Hermsberg H, Messina OD, Negri A, Sánchez AI. Guías para diagnóstico, prevención y tratamiento de la osteoporosis 2007. *Rev Arg Osteol* 2007;6:27-42.
9. Vinatier C, Guicheux J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Ann Phys Rehab Med* 2016;59:139-44.
10. Yao Q, Wu X, Tao C, Gong W, Chen M, Qu M, et al. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8(1):56.
11. Giorgino R, Albano D, Fusco S, Peretti GM, Mangiavini L, Messina C. Knee Osteoarthritis: Epidemiology, Pathogenesis, and Mesenchymal Stem Cells: What Else Is New? An Update. *Int J Mol Sci* 2023;24(7):6405.
12. Allen KD, Thoma LM, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage* 2022;30:184-95.
13. Correa D, Lietman SA. Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions. *Semin Cell Dev Biol* 2017;62:67-77.
14. Grotle M, Hagen KB, Natvig B, Dahl FA, Kvien TK. Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: an epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskel Dis* 2008;9:132-6.
15. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatric Med* 2010;26:355-69.
16. Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Ann Intern Med* 2000;133:321-8.



17. Ritcher W. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *J Int Med* 2009;266:390-405.
18. Loures FB, Chaoubah A, Oliveira VM, Almeida AM, Campos EM, Paiva EP. Economic analysis of surgical treatment of hip fracture in older adults. *Rev Saude Publica* 2015;49:12.
19. Krajewska-Włodarczyk M, Owczarczyk-Saczonek A, Placek W, Osowski A, Wojtkiewicz J. Articular Cartilage Aging-Potential Regenerative Capacities of Cell Manipulation and Stem Cell Therapy. *Int J Mol Sc* 2018;19:623-48.
20. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;14:920-6.
21. Spiller KL, Maher SA, Lowman AM. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17(4):281-99
22. Suamte L, Tirkey A, Barman J, Babu PJ. Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. *Smart Mater Manufact* 2023;1:100011.
23. Liu M, Zeng X, Ma C, Yi H, Ali Z, Mou X, et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Res* 2017;5:17014.
24. Costa L, Silva-Correia J, Oliveira JM, Reis RL. Gellan Gum-Based Hydrogels for Osteochondral Repair. En: Oliveira JM, Pina S, Reis RL, San Roman J (eds). *Osteochondr Tiss Eng* 2018;1058:281-304.
25. Cortizo MS, Molinuevo MS, Cortizo AM. Biocompatibility and biodegradation of polyester and polyfumarate based-scaffolds for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:33-42.
26. Belluzo MS, Medina LF, Cortizo AM, Cortizo MS. Ultrasonic compatibilization of polyelectrolyte complex based on polysaccharides for biomedical applications. *Ultrasonics Sonochem* 2016;30:1-8.
27. Fernández JM, Molinuevo MS, Cortizo AM, McCarthy AD, Cortizo MS. Characterization of poly (ϵ -caprolactone)/ Polyfumarate blends as scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomat Sci Polym E* 2010;21(10):1297-312.
28. Fernández JM, Oberti TG, Vikingsson L, Gomez-Ribelles JL, Cortizo AM. Biodegradable polyester networks including hydrophilic groups favor BMSCs differentiation and can be eroded by macrophage action. *Polym Deg Stab* 130;2016:38-46.
29. Lastra ML, Molinuevo MS, Cortizo AM, Cortizo MS. Fumarate Copolymer-Chitosan Cross-Linked Scaffold Directed to Osteochondrogenic Tissue Engineering. *Macromol Bioc* 2017;17:1600219.
30. Torres ML, Fernández JM, Dellatorre FG, Cortizo AM, Oberti TG. Purification of alginate improves its biocompatibility and eliminates cytotoxicity in matrix for bone tissue engineering. *Algal Res* 2019;40:101499.
31. Torres ML, Oberti TG, Fernández JM. HEMA and Alginate-based chondrogenic semi-interpenetrated hydrogels: Synthesis and Biological Characterization. *J Biomat Sci Polym E* 2021; 32(4):504-23.
32. Zhang M, Zhao X. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. *Int J Biol Macromol* 2020;162:1414-28
33. Belluzo MS, Medina LF, Molinuevo MS, Cortizo MS, Cortizo AM. Nanobiocomposite based on natural polyelectrolytes for bone regeneration. *J Biomed Mater Res Part A* 2019;108:1467-78.
34. Fernández JM, Cortizo MS, Cortizo AM. Fumarate/Ceramic Composite Based Scaffolds for Tissue Engineering: Evaluation of Hydrophylicity, Degradability, Toxicity and Biocompatibility. *J Biomat Tiss Eng* 2014;4:227-34.
35. Hurtado Cuba AG, Borgeaud M, Belluzo MS, Oberti TG, Fernández JM. Estudio de biocompatibilidad de matrices poliméricas combinadas, responsivas al pH, con potencial aplicación en ingeniería de tejido óseo. *Actual Osteol* 2023;19:128-43.
36. Ibbett RN (eds). NMR spectroscopy of

- polymers. New Delhi: Springer Science & Business Media; 1993
37. Ni H, Yang Y, Chen Y, Liu J, Zhang L, Wu M. Preparation of a poly(DMAEMA-co-HEMA) self-supporting microfiltration membrane with high anionic permselectivity by electrospinning. *e-Polymer* 2016;17:149-57.
 38. Cherifi BI, Belbachir M, Rahmouni A. Green anionic polymerization of vinyl acetate using Maghnite-Na⁺ (Algerian MMT): synthesis characterization and reactional mechanism. *Discov Chem Eng* 2021;1:5.
 39. Dong Z, Wei H, Mao J, Wang D, Yang M, Bo S, Ji X. Synthesis and responsive behavior of poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) brushes grafted on silica nanoparticles and their quaternized derivatives. *Polymer* 2012;53:2074-84.
 40. Yan P, Lan W, Xie J. Modification on sodium alginate for food preservation: A review. *Trends Food Sci Tech* 2024;143:104217.
 41. Suslick KS, Price GJ. Applications of ultrasound to materials chemistry. *Annu Rev Mater Sci* 1999;29(1):295-326.
 42. Feng W, Isayev AI. In situ compatibilization of PP/EPDM blends during ultrasound aided extrusion. *Polymer* 2004;45(4):1207-16.
 43. Tabata M, Miyazawa T, Kobayashi O, Sohma J. Direct evidence of main-chain scissions induced by ultrasonic irradiation of benzene solutions of polymers. *Chem Phys Lett* 1980;73(1):178-80.
 44. Lebovitz AH, Gray MK, Chen AC, Torkelson JM. Interpolymer radical coupling reactions during sonication of polymer solutions. *Polymer* 2023;44(10):2823-28.
 45. Oh JS, Isayev AI, Rogunova MA. Continuous ultrasonic process for in situ compatibilization of polypropylene/natural rubber blends. *Polymer* 2023;44(8):2337-49.
 46. El Sherbiny IM, Yacoub MJ. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract* 2013;3: 316-42.
 47. Radulescu DM, Neacsu IA, Grumezescu AM, Andronescu E. New Insights of Scaffolds Based on Hydrogels in Tissue Engineering. *Polymers* 2022;14(4):799.
 48. Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 1978;15(1):261-7.
 49. Denlinger LC, Fiset PL, Garis KA, et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *J Biol Chem* 1996;271(1):337-42.
 50. Singh AK, Pramanik K. Fabrication and investigation of physicochemical and biological properties of 3D printed sodium alginate-chitosan blend polyelectrolyte complex scaffold for bone tissue engineering application. *J Appl Polym Sci* 2023;140:e53642.
 51. Xue W, Liu B, Zhang H, et al. Controllable fabrication of alginate/poly-L-ornithine polyelectrolyte complex hydrogel networks as therapeutic drug and cell carriers. *Acta Biomater* 2022;138:182-92.