

Biocompatibilidad *in vitro* de superóxido dismutasa en interacción con polímero e hidrogeles de carboximetilcelulosa ensayado con fibroblastos humanos.

Yoel Alfonso Acosta , David Roberto Martínez Llaneras.
Centro de Investigación LABIOFAM Mtz.
Carretera central. Km 5, Gelpy, Matanzas. Cuba.

RESUMEN

La enzima superóxido dismutasa (SOD) se modificó químicamente con carboximetilcelulosa (CMC) mediante dos métodos diferentes. Algunos hidrogeles de este polisacárido se prepararon con 54 y 91% de entrecruzamiento y la enzima fue incorporada en el hidrogel por adsorción. La actividad específica de la SOD se evaluó tanto en los conjugados como en los sistemas enzima-hidrogel, mediante el método de la xantina oxidasa. La actividad específica de la SOD es mayor cuando interactúa con el hidrogel de CMC que cuando se encuentra formando conjugados (SOD-CMC_{polímero}). Además, el efecto de los conjugados de SOD-CMC_{polímero} y de los sistemas de SOD-CMC_{hidrogel} sobre los fibroblastos humanos se determinó al medir el índice de inhibición de la proliferación celular (CPII) *in vitro*. La morfología de la célula se analizó por microscopía electrónica en términos de área y perímetro. En general, la interacción de SOD con CMC (polímero e hidrogeles) reduce el CPII, de modo que el sistema de CMC (hidrogel) con 54% de entrecruzamiento es el que menos inhibió la proliferación celular CPII=4.4±2.4.

Palabras claves: biocompatibilidad, carboximetilcelulosa, superóxido dismutasa, fibroblastos humanos.

ABSTRACT

In vitro biocompatibility of superoxide dismutase interacting with carboxymethylcellulose polymer and hydrogel tested with human fibroblasts. Superoxide dismutase (SOD) was chemically modified with carboxymethylcellulose (CMC) polymer by two different methods. Moreover, SOD was trapped into the hydrogels of CMC with 54 and 91% crosslinking degrees. Using the xanthine oxidase-nitroblue tetrazolium assay, the specific activity of SOD bound to the CMC polymer or trapped in hydrogels was evaluated. The biological activity was higher in SOD-CMC hydrogels than in SOD-CMC polymer conjugates. The effect of conjugates SOD-CMC_{polymer} and systems SOD-CMC_{hydrogels} towards human fibroblasts was evaluated measuring the cell proliferation inhibition index (CPII) *in vitro*. Moreover, cell morphology was evaluated by electronic microscopy analysis. Both surface and perimeter of adhered cells were analysed. In general the addition of SOD to the CMC polymer and hydrogels reduces their CPII: the system of CMC with 54% cross-linking shows the lowest CPII value.

Keywords: biocompatibility, carboxymethylcellulose, superoxide dismutase, human fibroblasts.

INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre agentes antioxidantes se encuentran entre las principales investigaciones en el campo de las ciencias médicas por su extensa aplicación en la reducción de los efectos causados por daño oxidativo, en particular la enzima superóxido dismutasa. El efectivo empleo de proteínas como medicamento se dificulta por varias razones: tienen un tiempo de vida media corto en la circulación sanguínea, por lo que su efecto farmacológico se puede obtener solo por repetidas dosis. Además, cuando se administran por vía oral, estas macromoléculas son destruidas por enzimas proteolíticas a través del tracto digestivo. Una de las estrategias más eficaces para el mejoramiento de las propiedades funcionales de las enzimas es su modificación covalente con macromoléculas hidrosolubles. Los biocatalizadores modificados pueden ser empleados como fármacos para administración parenteral en animales y seres humanos. Durante los últimos años se ha utilizado un gran número de polímeros naturales y sintéticos como agentes modificadores para las enzimas [1-3].

Muchos polisacáridos en forma de hidrogel se han usado en aplicaciones farmacéuticas y médicas. Los hidrogeles son redes tridimensionales, sintetizadas a partir de polímeros hidrofílicos, los cuales pueden absorber gran cantidad de agua. En general, estos poseen una buena biocompatibilidad; además, los dominios hidrofóbicos de su superficie pueden promover la adhesión celular [4].

Los geles de carboximetilcelulosa (CMC) pueden ser favorecidos para uso comercial debido a su bajo costo. La CMC es un polisacárido soluble que se obtiene por carboxilación de la celulosa. Se emplea como agente emulsificante en la industria farmacéutica, en la producción de cosméticos y en la industria alimentaria. En la biomedicina se usa para prevenir adherencias pos-operatorias y cicatrices epidurales [5]. En este sentido, se pretende demostrar el efecto de la modificación química de la SOD con CMC, la síntesis de algunos sistemas liberadores de SOD con el empleo de CMC sobre las propiedades farmacológicas y el índice de inhibición de la proliferación celular de los fibroblastos humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de conjugados de SOD

A. SOD-CMC_{oxidado}: la CMC fue previamente activada por un tratamiento con periodato como ha sido descrito por Villalonga y cols. (2000) [6]. Para unir el polímero oxidado a la SOD, 25 mg de la enzima disuelta en 10 mL de solución reguladora de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.2, se mezclaron con 400 mg de CMC activada, y se agitó a 4 °C en la oscuridad durante 1 h. Se adicionaron 20 mg de NaBH₄ y la mezcla resultante se mantuvo en agitación constante durante 6 h. Posteriormente esta solución se dializó contra una solución reguladora de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.0, y luego se aplicó a una columna de filtración por gel Fractogel EMD BioSEC (S) (2.6 x 60 cm) equilibrada con la misma solución reguladora que contenía 100 mM de NaCl. La fracción que contenía el conjugado polisacárido-enzima se colectó y conservó a 4 °C.

B. SOD-CMC_{EDAC}: este conjugado se preparó a partir de la adición de 20 mg 1-etil-3(3-dimetil aminopropil) hidrocloreuro carbodiimida (EDAC) a una mezcla reaccionante que contenía 160 mg de CMC y 10 mg de la enzima disuelta en 4 mL de solución reguladora de fosfato de potasio 50 mM, pH 6.0. La solución se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y durante 16 h a 4 °C. Finalmente, se dializó y purificó tal como se describió en la preparación del conjugado de SOD-CMC_{oxidado}.

Caracterización de los conjugados enzimáticos

El contenido proteico de los conjugados enzimáticos se determinó por colorimetría mediante el método descrito por Lowry y cols [7]. La concentración de proteínas en las soluciones de la enzima nativa y modificada se calculó por espectrofotometría a 258 nm teniendo en cuenta los siguientes parámetros: SOD: $\epsilon_{258\text{ nm}} = 1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; M(SOD) = 32 kDa.

Todas las mediciones espectrofotométricas descritas en el presente trabajo se realizaron en un espectrofotómetro UV/VIS Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Suecia). El contenido de carbohidratos de las preparaciones enzimáticas: SOD-CMC_{oxidado} y SOD-CMC_{EDAC} se determinó por colorimetría mediante el método del fenol-ácido sulfúrico [8] con el empleo de la glucosa como patrón. El grado de modificación de los grupos amino se determinó a partir de la cantidad de grupos amino libres con o-ftalaldehído con el empleo de la glicina como patrón [9].

Síntesis de hidrogeles

Los hidrogeles de CMC se sintetizaron como ha sido descrito por Magnani A. y cols. (2000). Previamente la sal sódica de CMC se convirtió en sal CMC-TBA, luego se añadió yoduro de 2-cloro-1-metilpiridina (CMPJ) de forma estequiométrica para activar el 50 y el 100% de los grupos carboxílicos, según sea el caso. Y por último se añadió 1.3 diamino-propano, como agente reticulante junto con 3 o 4 gotas de trietilamina como catalizador, según describieron Magnani A. y cols. [10]. Transcurrido el tiempo requerido, los geles se colectaron por filtración y posteriormente se lavaron con etanol y agua.

El ensayo de ninhidrina se realizó siguiendo el procedimiento reportado por Barbucci y cols. (2000), para corroborar que no había grupos amino libres procedentes del 1.3 diamino propano.

Titulación potenciométrica

La reticulación real de los hidrogeles se determinó por titulación potenciométrica en los hidrogeles hinchados [11]. Posteriormente, se sumergieron 10 mg de hidrogel en 1 mL de una solución acuosa de SOD (6.6 mg/mL) durante 72 h, tiempo suficiente para que se hinchen los hidrogeles a 4 °C y, de esta manera, obtener los sistemas liberadores de SOD. Luego se liofilizaron estos sistemas.

Actividad específica

La actividad específica de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y de los derivados enzimáticos se evaluó mediante el método de la xantina oxidasa nitroblue tetrazolium [12].

Cinética de liberación de droga de los sistemas SOD-CMC_{hidrogel}

Los sistemas (SOD-CMC_{hidrogel}) se pusieron en pequeñas bolsas permeables al agua y se sumergieron en recipientes con 10 mL de agua a 4 °C. A intervalos de 12, 24, 48, 72 y 96 h, se tomaron 2 mL del medio para realizar mediciones de absorbancia con el objetivo de verificar la liberación de SOD [13].

Índice de inhibición de la proliferación celular.

La citotoxicidad de los conjugados SOD-CMC_{polímero} y de los sistemas SOD-CMC_{hidrogel} se evaluó a partir de la medición del índice de inhibición de la proliferación celular de los fibroblastos humanos *in vitro* (CPII). Los fibroblastos de la piel de los seres humanos se cultivaron en un medio completo DMEM de manera rutinaria.

Estas células fueron suspendidas con el empleo de tripsina-EDTA (1x) y resuspendidas en un medio fresco DMEM. Posteriormente, se dispensaron con pipeta en cada hueco de la placa multiwell de 24 hoyos, 5×10^3 células/cm² (fibroblastos humanos primarios C54), donde previamente se había puesto en el fondo una cubierta de vidrio de 12 mm de diámetro. Finalmente, las células fueron incubadas a 37 °C; CO₂ al 5%; O₂ al 95%. Después que las células estaban adheridas a la cubierta de vidrio, el índice de inhibición de la proliferación celular (CPII) se evaluó mediante una prueba similar a la descrita por De Groot y cols. (2001). En el caso de los conjugados de SOD-CMC_{polímero}, se retiró el medio de cultivo y se añadió a las células 1 mL de las soluciones experimentales [solución SOD (0.7 mg/mL), solución CMC (10 mg/mL), conjugados solución (10.7 mg/mL)]. En el control del cultivo, se refrescó el medio.

Todas las muestras se prepararon por triplicado. El crecimiento y la morfología de las células se evaluaron con el empleo de un microscopio Olympus BX 40, a las 24, 48 y 72 h. Después de las 72 h de sembradas y cultivadas, el medio y las muestras fueron removidos de cada hoyo. Las cubiertas de vidrio con las células adheridas se lavaron con tampón de fosfato pH = 7.4 (PBS) para liberarlas de residuos del medio y de células muertas. Las células adheridas al vidrio se fijaron con formaldehído al 4% en agua destilada, durante 8 min y se lavaron dos veces con PBS y una con agua destilada. El recuento de las células se realizó por microscopía óptica.

Para cada muestra (experimentales y control), se calculó el índice de proliferación celular (CPII) según la siguiente expresión:

$$\text{CPII} = 100\% \left(\frac{\text{media del no. de células en las muestras experimentales}}{\text{media del no. de células en las muestras control}} \times 100\% \right)$$

Posteriormente, se evaluó la morfología de las células según su superficie y perímetro, con el empleo de la microscopía electrónica y de un programa para procesar las imágenes (disponible en Internet en <http://rsb.info.nih.gov/nhi-image/>), desarrollado por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos. El análisis estadístico de los datos se realizó con el Origin Pro 7.0 (Origin Lab Corporation, EE.UU.).

Las células adheridas a las cubiertas de vidrio se deshidrataron con un gradiente de etanol (al 50, 70 y 90%) en agua destilada, 10 min cada vez. Finalmente se pusieron a secar a temperatura ambiente durante toda la noche, después se fijó a

un portamuestra y se metalizó. La metalización se obtiene en ambos casos bombardeando con partículas de oro, en condiciones de vacío durante 120 s. El filamento de oro se calienta con una corriente de 60 mA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los conjugados e hidrogeles En la tabla 1 se reporta la composición de carbohidratos y grupos amino libres de los conjugados de SOD-CMC preparados.

En la tabla 2 se muestra el grado real de entrecruzamiento obtenido por análisis potenciométrico en los geles sintetizados a base de CMC. En el caso del gel que teóricamente debía estar reticulado al 50%, por potenciometría se obtuvo que el grado de reticulación alcanzado fue de 54%, y en el caso del que debía presentar el mayor grado de reticulación, el entrecruzamiento logrado fue de 91%, lo que corrobora la eficiencia del proceso de síntesis, el cual es necesario controlar en este proceso.

De acuerdo con los resultados, el contenido de carbohidratos en los derivados de SOD, la relación polímero-proteína es 1.8 mol y 1.2 mol de polímero por mol de proteína, para los conjugados de CMC_{oxidado} y CMC_{EDAC}, respectivamente. Además, el grado de modificación de estos conjugados se calculó teniendo en cuenta la cantidad de grupos amino libres en la SOD antes y después de la glicosidación. En el caso de CMC_{oxidado} fue del 52% y en el conjugado de CMC_{EDAC}, del 60%; la SOD retuvo el 68 y el 78% de su actividad inicial después de la modificación con CMC_{oxidado} y CMC_{EDAC}, respectivamente.

El grado de reducción de la actividad enzimática de los conjugados está fundamentalmente asociado con el impedimento estérico originado por las moléculas de polímeros acopladas a la enzima, lo cual puede limitar la difusión del sustrato al sitio catalítico de la SOD [14].

En general los resultados concuerdan con los reportados por otros autores que modificaron la SOD con polímeros polianiónicos, al ligarlos a la enzima a través de sus grupos amino libres [15].

La figura 1 muestra la comparación de la cinética de liberación de SOD de los geles de CMC con 54 y 91% de entrecruzamiento. La primera fase de la curva de liberación de SOD (antes de las 24 h), se comporta como una cinética de primer orden, es decir, la enzima es liberada por un mecanismo de difusión. Probablemente en esta fase se libera la SOD adsorbida en la superficie externa del gel. La segunda fase (después de 24 h) tiene un comportamiento de orden cero, independiente de la concentración de SOD en el hidrogel.

En esta fase se liberó la SOD que interactúa directamente con el gel. La enzima fue liberada del sistema SOD-CMC al 54% más rápido que del sistema SOD-CMC al 91%. En el primer caso, la meseta es alcanzada a las 48 h, mientras que en el segundo, la cantidad de SOD permanece constante en el sistema después de las 72 h. La cantidad de SOD liberada por SOD-CMC al 91% es mayor que la liberada por SODCMC al 54%: el 58% del contenido total en el primero y el 49% en el segundo caso. Esto probablemente se debe a la mayor presencia de grupos cargados negativamente en SOD-CMC al 54%, lo que favorece la interacción entre la enzima y el hidrogel.

Es importante destacar que la SOD conserva un mayor porcentaje de su actividad específica cuando está adsorbida en el hidrogel al compararla con los conjugados (Tabla 3).

Tabla 1. Contenido de carbohidrato y cantidad de grupos amino libres de la SOD nativa y modificada.

Formas enzimáticas	Contenido de Carbohidratos (% w/w) M ± SD	Cantidad de grupos NH ₂ libres (mol/mol proteínas) M ± SD
SOD	-	22 ± 1.1
SOD-CMC _{ox}	62 ± 3.1	11 ± 0.5
SOD-CMC _{edac}	53 ± 2.7	9 ± 0.5

Tabla 2. Valoración potenciométrica de los geles de CMC

Reticulación teórica (%)	COO ⁻ titulados	COO ⁻ reticulación	Reticulación real (%)
CMC 50	0.0674	0.0790	54
CMC 100	0.0103	0.1361	91

Se evaluó el efecto de las muestras sobre la proliferación de fibroblastos humanos como un índice de biocompatibilidad [4]. Esta prueba de biocompatibilidad *in vitro* se requiere para evaluar la citotoxicidad de nuevos materiales con posible aplicación médica.

La toxicidad *in vitro* se realizó con fibroblastos humanos (una línea estabilizada) después de 72 h de incubación. Se determinó el índice de inhibición de la proliferación celular (CPII), y se evaluó la morfología de la célula teniendo en cuenta el área de superficie y el perímetro, aspectos que aparecen reflejados en la tabla 4, ya que la forma que toma la célula al entrar en contacto con el medio puede indicar si este es citotóxico o no.

Tabla 3. Evaluación de la actividad enzimática de la SOD en los conjugados y los hidrogeles.

Muestra	Actividad específica (U/mg)
Nativa SOD	3500 ± 12 (100%)
SOD-CMC _{oxidado} conjugado	2400 ± 09 (68%)
SOD-CMC _{EDAC} conjugado	2735 ± 17 (78%)
SOD-CMC 54% hidrogel	3000 ± 11 (86%)
SOD-CMC 91% hidrogel	2800 ± 15 (80%)

El valor de CPII obtenido significa que la presencia de CMC en el medio de cultivo empeora las condiciones de vida de la célula, respecto al control negativo de poliestireno, pues esta condición reduce el área de contacto de las células con la cubierta de vidrio del fondo de la placa y desarrolla algunos seudópodos largos.

Esta característica es propia de un estado activado de la célula cuando está tratando de unir el citoesqueleto al sustrato para emigrar a una “superficie mejor”, y al mismo tiempo evitar el contacto con el entorno. En la figura 3 las células que crecieron en presencia de SOD presentan una morfología particular, la cual indica que se encuentra en condiciones favorables de vida en ese medio.

Se pudo apreciar que la morfología de las células que crecieron en presencia de los conjugados SODCMC es semejante a las que crecieron en contacto con la SOD nativa, lo cual significa que las células no repelen el contacto con los conjugados.

Los valores de CPII de la solución de SOD fue de 14 y las células cambiaron su forma y alcanzaron un gran área de contacto, y los pocos seudópodos que presentaron eran cortos. Esto indica que la célula no evita el contacto con el medio.

Los hidrogeles de CMC con 54 y 91% de entrecruzamiento mostraron valores de CPII menores que los polímeros de CMC que no se entrecruzaron (46.9%). Esto puede deberse a que los geles presentan una superficie tridimensional que favorece la adhesión celular. Los valores de CPII disminuyeron después de la adsorción de la SOD (Figura 2), lo cual indica que la unión de la enzima con el gel lo hace aún más biocompatible.

El valor de CPII de la SOD-CMC con 54% (4 ± 2) fue el menor de todos, muy similar al del poliestireno que se usó como control negativo, y el promedio de los valores de área y perímetro de las células fue el mayor, lo cual significa que estas células presentan un área extensa de adhesión y gran cantidad de seudópodos filamentosos cortos, sinónimo de biocompatibilidad con el material en el que se desarrollan.

Las células en SOD-CMC al 91% tuvieron menor área de contacto y menos seudópodos filamentosos en comparación con el sistema SOD-CMC 54%.

Figura 1. Cinética de liberación de los sistemas SOD-CMC_{hidrogeles}. (SOD-CMC 54% ■; SOD-CMC 91% ●)

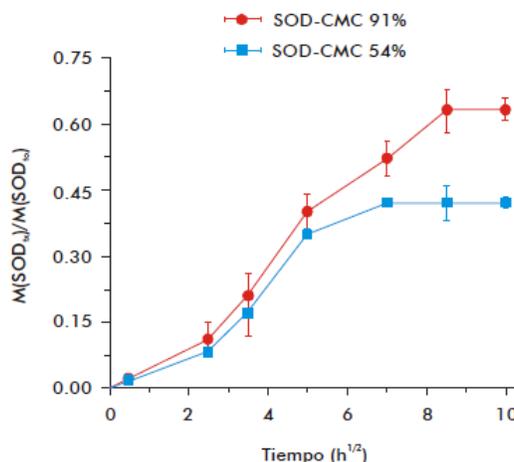


Tabla 4. Valores del índice de inhibición de la proliferación celular, área y perímetro.

Muestras	Área (μm^2) M \pm SE	Perímetro (μm) M \pm SE
PVC (control positivo)	0	0
Polistireno (control negativo)	3888 \pm 35	533 \pm 14
Hidrogel CMC 91%	2432.2 \pm 349.7	363.7 \pm 17.9
Hidrogel CMC 54%	1877.1 \pm 122.8	382.4 \pm 18.1
Sistema (SOD-CMC 54%) Sistema (SOD-CMC 91%) Solución SOD	4130.9 \pm 187.1	516.4 \pm 30.2
Solución CMC	2539.4 \pm 272.5	339.3 \pm 13.2
Conjugado (SOD-CMC _{oxidado})	3539.3 \pm 404.8	491.5 \pm 33.5
Conjugado (SOD-CMC _{EDAC})	1345.2 \pm 144.7	548.3 \pm 43.1
Conjugado (SOD-CMC _{EDAC})	2598.1 \pm 173.8	397.5 \pm 15.9
Conjugado (SOD-CMC _{oxidado})	2564.8 \pm 202.2	359.8 \pm 21.1

CPIL: Índice de inhibición de la proliferación celular después de 72 h de incubación.

PVC: Cloruro de polivinilo estabilizado con estaño.

Recientemente se han desarrollado novedosos métodos de entrega de agentes terapéuticos que utilizan los polisacáridos (como portadores a los sitios de acción). Estos se han empleado para la preparación de los conjugados de proteínas con otras macromoléculas que permiten retener la actividad de las proteínas [16, 17], aumentar la duración de su efecto y disminuir la inmunogenicidad de estas proteínas. Se puede mencionar como ejemplo algunas enzimas con potenciales aplicaciones terapéuticas como peroxidasa [18], catalasa [19] y superóxido dismutasa [20], entre otras muchas.

Además se han reportado otras nuevas aplicaciones, como las formulaciones de liposomas, resultados que sugieren que los polisacáridos son los agentes prometedores para mejorar la entrega de fármacos [21].

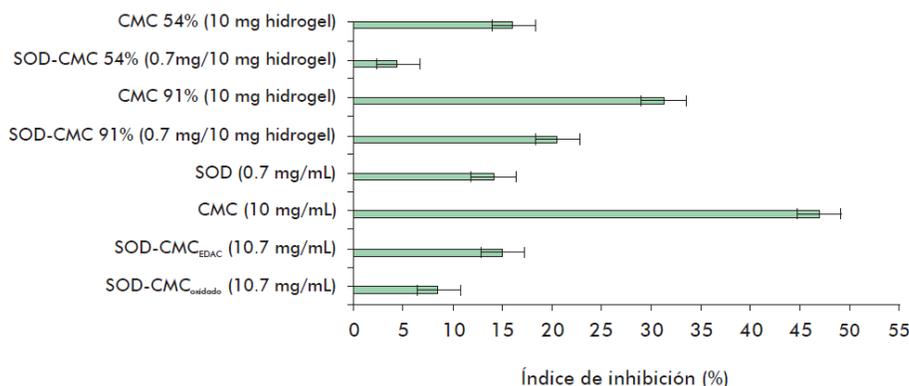
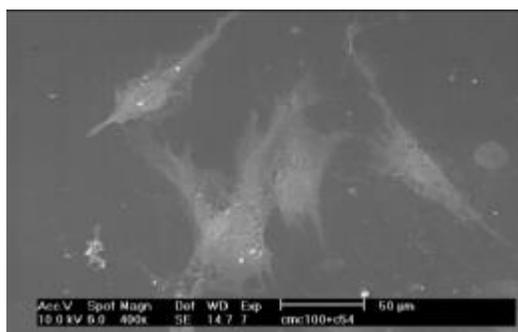
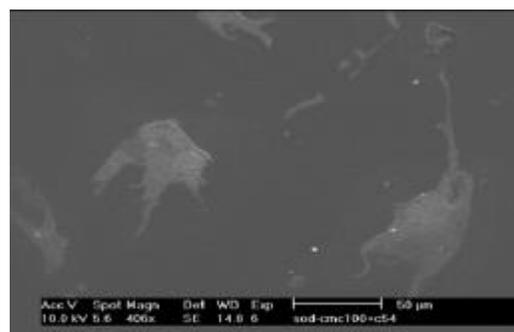


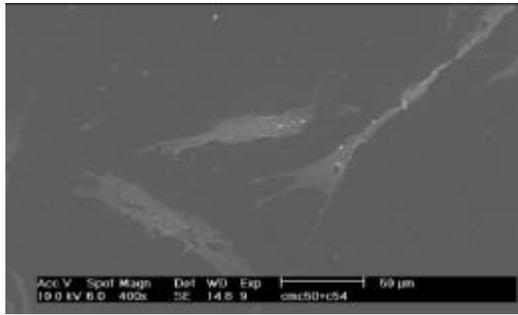
Figura 2. Resultados del índice de inhibición de la proliferación celular de fibroblastos humanos en presencia de CMC_{polímero}, SOD nativa y sus derivados.



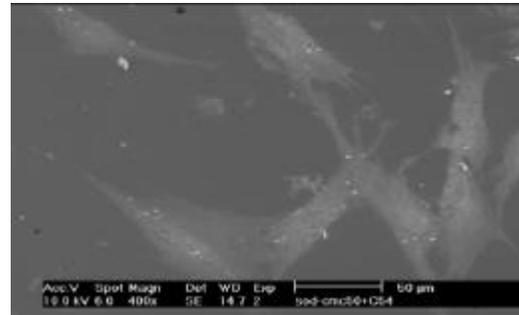
Cultivo en presencia de CMC al 91%



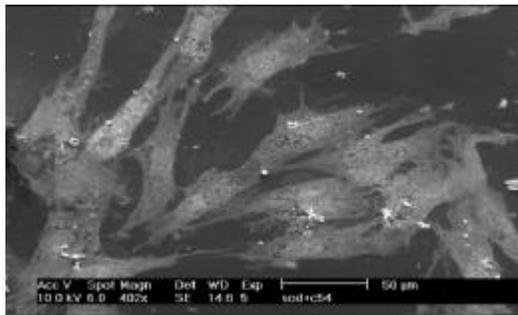
Cultivo en presencia de SOD-CMC al 91%



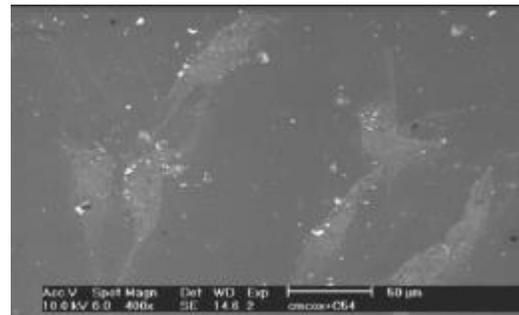
Cultivo en presencia de CMC al 54%



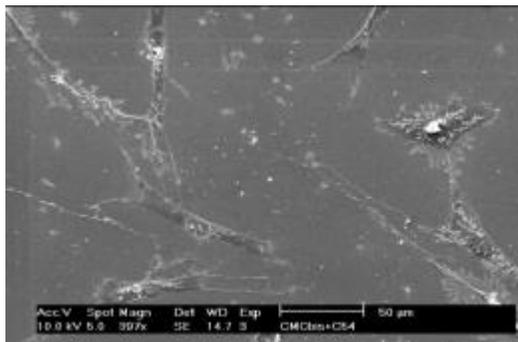
Cultivo en presencia de SOD-CMC al 54%



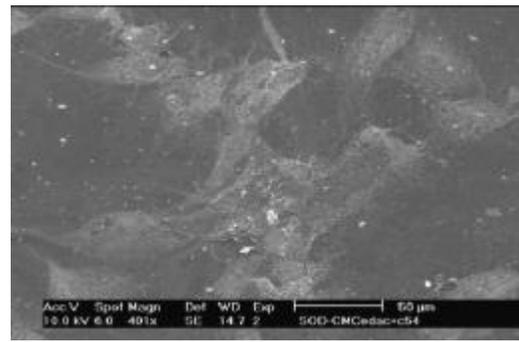
Cultivo en presencia de solución SOD



Cultivo en presencia de solución SOD-CMC_{oxidado}



Cultivo en presencia de solución de CMC



Cultivo en presencia de solución SOD-CMC_{EDAC}

Figura 3. Análisis SEM (Scanning electromicroscopy) de la morfología de las células de fibroblastos humanos. La morfología de células en solución de SOD y sus derivados, muestra una mayor área de contacto y pocos pseudópodos cortos. Las células en solución de polímero de CMC, reducen su área de contacto con la cubierta de vidrio y desarrollan algunos pseudópodos largos. Las células que presentaron menor área de contacto con la cubierta de vidrio y menos pseudópodos fueron las que crecieron en SOD-CMC al 54%.

Existen evidencias que suscitan que el tratamiento local de heridas por quemaduras con los barredores de radicales libres enzimáticos como el Cu/Zn SOD recombinante y encapsulado en liposomas, tienen un efecto beneficioso, pues disminuyen la magnitud del daño tisular que sucede a las quemaduras [22]. Los sistemas portadores de SOD reportados en este trabajo constituyen un buen vehículo para transportar la SOD a zonas lesionadas, en las que aparezca un aumento de radicales superóxidos o una disminución de la cantidad y/o actividad de la enzima, como sucede en las lesiones tisulares que funcionan como sistemas controlados liberadores de SOD.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

1. Darias R, Herrera I, Fragoso A, Cao R, Villalonga R. Supramolecular interactions mediated thermal stabilization for α -amylase modified with a β -cyclodextrin- carboxymethyl-cellulose polymer. *Biotechnology Letters* 2002;24:1665-8.
2. Darias R, Villalonga R. Functional stabilization of cellulose by covalent modification with chitosan. *J Chem Technol Biotechnol* 2001;76:489-93.
3. Villalonga R, Villalonga ML, Gómez L. Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethyl-cellulose. *J Mol Catal. B-enzimatic* 2002; 10:483-90.
4. De Groot CJ, Marja JA, Welmoed NE, Caie JA, Phantinga JA, Otter WD, *et al.* *In vitro* biocompatibility of biodegradable extran-based hydrogels tested with human fibroblasts. *Biomaterials* 2001; 22:1197-203.
5. Sannino A, Madaghiele M, Conversano F, Mele G, Maffezzoli A, Netti PA, *et al.* Cellulose Derivative-Hyaluronic Acid-Based Microporous Hydrogels Cross Linked through Divinyl Sulfone (DVS) To Modulate Equilibrium Sorption Capacity and Network Stability *Biomacromolecules* 2004;5(1):92-6.
6. Villalonga R, Villalonga ML, Gómez L. Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. *J Mol Catal B-enzimatic* 2000; 10:483-90.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
8. Dubois MK, Gilles A, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956;28:350-6.
9. Abuchowski A, McCoy JR, Palzuck NC, Van Es T, Davis FF. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J Biol Chem* 1977; 252:3582-6.
10. Magnani A, Rappuoli R, Lamponi S, Barbucci R. Novel polysaccharide hydrogels: characterization and properties. *Polym Adv Technol* 2000;11:488-95.
11. Barbucci R, Magnani A, Consumi M. Swelling Behaviour of Carboxymethylcellulose hydrogels in relation to crosslinking, pH and charge density. *Macromol* 2000;33:7475-80.
12. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Anal Biochem* 1971; 44:276-87.
13. Queiroz AC, Santos JD, Monteiro FJ, Gibson IR, Knowles JC. Adsorption and release studies of sodium ampicillin from hydroxyapatite and glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Biomaterials* 2002;22(11):1393-400.
14. Caliceti P, Schiavon O, Sartore L, Monfardini C, Veronese FM. Active site protection of proteolytic enzymes by poly(ethylene glycol) surface modification. *J Bioact Compat Polym* 1993;8:41-51.
15. Sakurai K, Miyazaki K, Kodera Y, Nishimura H, Shingu M, Inada Y. Antiinflammatory activity of superoxide dismutase conjugated with sodium hyaluronate. *J Glycoconj* 1997;14(6): 723-8.
16. Khajeh K, Naderi-Manesh H, Ranjbar B, Moosavi-Movahedi A, Nemat-Gorgani M. Chemical modification of lysine residues in *Bacillus a*-amylases: effect on activity and stability. *Enzyme Microb Technol* 2001;28:543-9.
17. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 2001; 101:1869-79.
18. Morawski B, Lin Z, Cirino P, Joo H, Bandara G, Arnold FH. Functional expression of horseradish peroxidase in *S. cerevisiae* and *P. pastoris*. *Protein Eng* 2000;13:377-84.
19. Costa SA, Tzanov T, Carneiro AF, Paar A, Gübitz GM, Cavaco-Paulo A. Studies of stabilization of native catalase using additives. *Enzyme Microb Technol* 2002; 30:387-91.

20. Sonmez K, Demirogullari B, Turkyilmaz Z, Karabulut BS, Kale N, Basaklar AC. Effects of polyethyleneglycolsuperoxide dismutase (PEG-SOD) and pentoxifylline on small intestinal anastomoses established in the 24th hours of reperfusion: an experimental study in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001; 110(1-2):97-106.
21. Mehvar R. Recent trends in the use of polysaccharides for improved delivery of therapeutic agents: pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives. *Curr Pharm Biotechnol* 2003;4(5):283-302.
22. Vorauer-Uhl K, Furnschliel E, Wagner A, Ferko B, Katinger H. Reepithelialization of experimental scalds effected by topically applied superoxide dismutase: controlled animal studies. *Wound Repair Regen* 2002;10(6):366-71.