



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

**ESTUDIO DE LA RELACION ESTRUCTURA-PROPIEDADES EN
ANDAMIOS ELECTROHILADOS HECHOS A BASE DE
QUITOSANO Y POLICAPROLACTONA PARA SU POSIBLE USO EN
INGENIERIA DE TEJIDOS DE NERVIO PERIFÉRICO**

Tesis que presenta

ENA DEYLA BOLAINA LORENZO

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

MATERIALES POLIMÉRICOS

Mérida Yucatán, Noviembre 2016

A Dios

A mis padres Dilio y Mary

A Yareli

A mis hermanos y sobrinas

A mi esposo José de Jesús

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada número 169398.

Agradezco sinceramente a mi asesor Dr. José Manuel Cervantes Uc por su invaluable apoyo académico, y por su amistad durante todos estos años.

De manera especial agradezco a mi coasesor, Dr. Manuel Monleón Pradas quien amablemente me aceptó para realizar una estancia en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad Politécnica de Valencia. Con su apoyo y orientación fue posible el desarrollo de las pruebas de biocompatibilidad.

A la Dra. Cristina Martínez Ramos por sus enseñanzas en las prácticas de laboratorio durante los ensayos celulares.

Quiero agradecer el apoyo económico por parte de CONACyT para la realización de la estancia en la Universidad Politécnica de Valencia, a través del programa “Becas mixtas”.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez y al Dr. Humberto Vázquez Torres, por su orientación y consejos a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento al Q. I. Santiago Duarte, al Dr. Wilberth Antonio Herrera Kao y al Dr. Hugo Carrillo por sus consejos y ayuda técnica en la realización de los experimentos.

A todos mis amigos de Mérida, mis compañeros de generación y especialmente al grupo de Biomateriales por su amistad y apoyo sincero.

También agradezco sinceramente a mis amigos de Valencia, quienes hicieron de mi estancia una experiencia única.

Contenido

| | |
|---|-----|
| Lista de figuras | v |
| Lista de tablas | vii |
| Resumen | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| Introducción..... | 3 |
| Capítulo 1. Marco teórico..... | 6 |
| 1.1 Sistema nervioso | 6 |
| 1.1.1 Lesiones en el sistema nervioso periférico..... | 7 |
| 1.1.2 Estrategias para la reparación de nervios periféricos | 8 |
| 1.2 Ingeniería de tejidos de nervios periféricos | 10 |
| 1.2.1 Biopolímeros utilizados en la fabricación de andamios para regeneración nerviosa | 12 |
| 1.2.1.1 Quitosano | 14 |
| 1.2.1.2 Policaprolactona | 15 |
| 1.2.2 Mezclas para la fabricación de andamios..... | 16 |
| 1.3 Diseño y elaboración de andamios tridimensionales | 17 |
| 1.4 Antecedentes | 21 |
| Justificación | 23 |
| Hipótesis | 23 |
| Objetivos..... | 24 |
| Capítulo 2. Metodología | 25 |
| 2.1 Materiales..... | 25 |
| 2.2 Preparación de los andamios electrohilados | 25 |
| 2.3 Caracterización fisicoquímica de los andamios electrohilados | 27 |
| 2.3.1 Microscopía electrónica de barrido | 27 |
| 2.3.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier | 27 |
| 2.3.3 Angulo de contacto..... | 27 |
| 2.3.4 Absorción de humedad..... | 28 |

| | | |
|-----------------------|--|----|
| 2.3.5 | Calorimetría diferencial de barrido | 29 |
| 2.3.6 | Análisis termogravimétrico | 30 |
| 2.3.7 | Cromatografía de permeación en gel | 30 |
| 2.4 | Caracterización biológica de los andamios | 30 |
| 2.4.1 | Esterilización de los andamios | 30 |
| 2.4.2 | Ensayo de citotoxicidad usando fibroblastos | 30 |
| 2.4.3 | Ensayo de viabilidad celular usando células de Schwann..... | 32 |
| 2.4.4 | Tratamiento con poli-D-lisina | 33 |
| 2.4.5 | Morfología celular | 33 |
| Capítulo 3. | Resultados y discusión..... | 35 |
| 3.1 | Caracterización fisicoquímica de los andamios electrohilados | 35 |
| 3.1.1 | Microscopía electrónica de barrido | 35 |
| 3.1.2 | Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier | 38 |
| 3.1.3 | Ángulo de contacto..... | 41 |
| 3.1.4 | Absorción de humedad..... | 42 |
| 3.1.5 | Calorimetría diferencial de barrido | 45 |
| 3.1.6 | Análisis termogravimétrico | 51 |
| 3.1.7 | Cromatografía de permeación en gel | 53 |
| 3.2 | Caracterización biológica | 55 |
| 3.2.1 | Ensayo de citotoxicidad usando fibroblastos | 56 |
| 3.2.2 | Morfología de fibroblastos L929 sobre los andamios electrohilados | 58 |
| 3.2.3 | Ensayo de viabilidad usando células de Schwann | 60 |
| 3.2.4 | Morfología de las células de Schwann sobre andamios electrohilados | 62 |
| 3.2.5 | Tratamiento superficial de los andamios con poli-D-lisina | 66 |
| Conclusiones..... | | 69 |
| Recomendaciones | | 70 |
| Referencias | | 71 |
| Anexos | | 82 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 Anatomía de los nervios periféricos..... | 7 |
| Figura 1.2 Representación de las lesiones en los nervios periféricos..... | 8 |
| Figura 1.3 Principios básicos de la ingeniería de tejidos..... | 11 |
| Figura 1.4 Estructura del quitosano..... | 15 |
| Figura 1.5 Estructura de la PCL..... | 15 |
| | |
| Figura 2.1 Diagrama del sistema de electrohilado..... | 26 |
| | |
| Figura 3.1 Imágenes de SEM y distribución de diámetros de fibras de andamios electrohilados, (a) PCL, (b) 5%Q, (c) 10%Q, (d) 25%Q y (e) Q..... | 36 |
| Figura 3.2 Espectros de FTIR de los andamios electrohilados..... | 39 |
| Figura 3.3 Espectros de FTIR de quitosano comercial (Q comercial) quitosano electrohilado (Q) y quitosano electrohilado tratado con glutaraldehído (Q-GA)..... | 40 |
| Figura 3.4 Porcentaje de absorción de humedad de andamios electrohilados: (a) 53% H. R, (b) 97% H. R..... | 43 |
| Figura 3.5 Ajuste de Fick para absorción de humedad de Q a 97% H. R..... | 44 |
| Figura 3.6 Termogramas de DSC de andamios electrohilados obtenidos en el primer (a) y segundo (b) calentamiento..... | 46 |
| Figura 3.7 Temperatura de fusión (a) y grado de cristalinidad (b) de los andamios electrohilados (ANOVA una vía, * $p < 0.05$ en comparación con la PCL). | 49 |
| Figura 3.8 Relación entre el diámetro y el grado de cristalinidad de las fibras..... | 50 |
| Figura 3.9 Curvas de pérdida de masa versus temperatura (a) y primera derivada de la pérdida de masa versus temperatura (b) de los andamios electrohilados. | 52 |
| Figura 3.10 Primera derivada de la pérdida de masa versus temperatura del andamio de quitosano electrohilado sin y con tratamiento de glutaraldehído. La curva de pérdida de masa versus temperatura se muestra en el gráfico insertado. | 53 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.11 Cromatogramas de los andamios electrohilados | 54 |
| Figura 3.12 Especímenes utilizados en los ensayos biológicos. | 55 |
| Figura 3.13 Biocompatibilidad de andamios de PCL y Q-GA con fibroblastos L929 por contacto indirecto (CN: Control negativo, CP: Control positivo) (ANOVA de una vía con $p < 0.05$ y análisis de Tukey)..... | 56 |
| Figura 3.14 Biocompatibilidad de fibroblastos L929 por contacto directo (ANOVA de una vía con $p < 0.05$ y prueba de Tukey). | 57 |
| Figura 3.15 Imágenes de microscopía confocal (b, d) y de SEM (a, c) del cultivo de células L929 sobre andamios de PCL (a, b) y de Q-GA (c, d). | 59 |
| Figura 3.16 Viabilidad de células de Schwann sembradas sobre andamios electrohilados de PCL, Q-GA, 5%Q, 10%Q y 25%Q (ANOVA de una vía, $p < 0.05$ versus PCL)..... | 60 |
| Figura 3.17 Imágenes de SEM de los andamios con células de Schwann sembradas sobre andamios electrohilados de (a) PCL, (b) Q, (c) 5%Q, (d) 10%Q y (e) 25%Q. | 63 |
| Figura 3.18 Imágenes de microscopio confocal de andamios de (a) PCL, (b) Q, (c) 5%Q, (d) 10%Q y (e) 25%Q. El p75 (expresado por células de Schwann, verde), así como las fibras de actina (rojo) y el núcleo (azul) fueron marcados en las células de Schwann. | 65 |
| Figura 3.19 Población de SC sobre andamios electrohilados con y sin recubrimiento de poli-D-lisina..... | 67 |
| Figura 3.20 Imágenes de SEM (a, c) y microscopio confocal (b, d) de andamios de Q sin tratamiento (a, b) y con tratamiento de PDL (c, d). El p75 (expresado por células de Schwann, verde) y el núcleo (azul) fueron marcados en las células de Schwann. | 68 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 2.1 Composición porcentual en peso e identificación de los andamios electrohilados | 26 |
| Tabla 3.1 Diámetro promedio de las nanofibras electrohiladas en los andamios preparados en este trabajo (ANOVA, de una sola vía; * $p < 0.05$ en comparación con PCL) | 37 |
| Tabla 3.2 Porcentaje atómico de carbono, oxígeno, nitrógeno y flúor | 37 |
| Tabla 3.3 Ángulo de contacto de los andamios electrohilados (ANOVA, de una sola vía; * $p < 0.05$ en comparación con PCL) | 42 |
| Tabla 3.4 Masa molar promedio en número (M_n), masa molar promedio en peso (M_w) e índice de polidispersidad ($IP = M_w/M_n$) de los andamios electrohilados | 55 |

Resumen

En este trabajo se elaboraron andamios electrohilados a partir de mezclas de policaprolactona (PCL) y quitosano (Q), con 0, 5, 10, 25 y 100% en peso de quitosano y se estudió el efecto de la composición sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los andamios. Por medio de microscopía electrónica de barrido se observó que se obtuvieron andamios con fibras homogéneas y orientadas aleatoriamente. El diámetro de las fibras mostró una disminución con respecto a la cantidad de quitosano. Además, el ángulo de contacto y la absorción de humedad fueron influenciados por la hidrofilia del quitosano.

El análisis por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier confirmó la presencia del quitosano y de la policaprolactona en los andamios. La composición elemental fue analizada por espectroscopia de energía dispersiva de rayos X donde, además de carbono, oxígeno y nitrógeno, se detectó flúor proveniente de los disolventes utilizados para la fabricación de las fibras. De acuerdo al análisis por calorimetría diferencial de barrido, el porcentaje de cristalinidad se vio influenciado por la presencia del quitosano. La temperatura de degradación máxima de los andamios también fue afectada por la cantidad de quitosano en el andamio. Los resultados del ensayo de citotoxicidad utilizando fibroblastos mostraron que los andamios pueden considerarse como materiales no citotóxicos. Los estudios de biocompatibilidad de los andamios con células de Schwann demostraron que las células se adhirieron a todos los materiales; además se observó proliferación celular en el andamio con 5% de quitosano después del primer y tercer día. El ensayo inmunocitoquímico confirmó que las células mantuvieron su fenotipo característico puesto que expresaron la proteína p75, después de 5 días de cultivo. Estos resultados sugieren que los andamios de quitosano y policaprolactona poseen características sobresalientes para su uso potencial en ingeniería de tejidos de nervio periférico.

Abstract

In this work, polymeric scaffolds based on polycaprolactone and chitosan blends containing 0, 5, 10, 25 and 100 wt.% of the chitosan were electrospun and then evaluated in order to study the relationship between scaffold composition and their physicochemical and biological properties. Morphological analysis indicated that the electrospun scaffolds developed in this study are conformed by homogeneous and randomly oriented fibers. Statistical analysis of fiber diameter from different scaffold formulations suggests that fiber diameters decrease as the content of chitosan increases.

Contact angle and water uptake of blend scaffolds are influenced by hydrophilic features of chitosan. Fourier transform infrared spectroscopic analysis verified the presence of chitosan and polycaprolactone in electrospun scaffolds. Elemental composition was analyzed by energy-dispersive X-ray spectroscopy. Carbon, oxygen and nitrogen were the main constituents of the scaffolds. Fluorine atoms from solvent traces were also detected. Based on differential scanning calorimetry results, crystallinity percent was influenced by chitosan content. Maximum degradation temperature was also affected by presence of chitosan in blend scaffolds. Results from fibroblast cytotoxicity assays indicated that electrospun scaffolds developed in this study are non-cytotoxic materials. Cell adhesion of Schwann cell on electrospun scaffolds was confirmed by biocompatibility test. After the first and third days of seeded, cell proliferation was observed in scaffolds containing 5% by weight of chitosan. Immunochemical analysis confirmed cell phenotype as they expressed specific p75 marker, after five days of culture. Blend scaffolds based on chitosan and polycaprolactone possess promising features that can be exploited in peripheral nerve therapies.

Introducción

Los nervios periféricos son estructuras macroscópicas que contienen axones sensores y motores cuya función principal es transmitir señales desde y hacia la columna vertebral.

Las lesiones de los nervios periféricos son comunes y afectan a un 2.8% de los pacientes con algún tipo de trauma, cada año. Por lo general, estas lesiones conducen a una discapacidad permanente. En los Estados Unidos 360,000 personas sufren de parálisis en alguna de sus extremidades superiores mientras que en Europa anualmente se registran 300,000 casos de lesiones en nervios periféricos. Este tipo de lesiones representan un problema a nivel mundial y un reto para la ciencia [1, 2].

La regeneración natural del nervio es posible cuando el daño es de unos pocos milímetros. Si el daño es severo, el tratamiento estándar es el trasplante del tejido u órgano dañado. Sin embargo, la demanda excede por mucho la disponibilidad, debido a que el número de órganos de donadores humanos es limitado [3].

En este contexto, la ingeniería de tejidos surge como una alternativa cuando el trasplante de órganos no es viable. Con esta estrategia es posible evitar los riesgos asociados con el trasplante de órganos, como son: rechazo del implante, transmisión de enfermedades, o la terapia posterior con inmunosupresores, la cual puede generar reacciones secundarias. Las diferentes aplicaciones en ingeniería de tejidos involucran el uso de andamios tridimensionales, cuya función es servir como un soporte temporal para el crecimiento y maduración de las células aisladas [4, 5].

Se espera que los andamios mimeticen la matriz extracelular del tejido que se desea reemplazar, por lo que debe facilitar la adhesión y proliferación celular.

Un andamio ideal para regeneración de nervios periféricos debe ser biocompatible y biodegradable. Además, debe ser poroso para permitir el intercambio de nutrientes y debe mantener su forma para evitar la compresión del nervio durante el proceso de regeneración [6, 7].

Los polímeros naturales y sintéticos son los materiales más utilizados para la elaboración de andamios en ingeniería de tejidos. Por un lado, los polímeros naturales normalmente facilitan la adhesión y diferenciación celular; sin embargo, sus propiedades mecánicas suelen ser insuficiente. Por otra parte, los polímeros sintéticos son más fáciles de procesar que los naturales, además de tener mejores propiedades mecánicas; no obstante la falta de interacción con las células limita su uso en el campo biomédico [5].

La policaprolactona es un polímero sintético de gran interés, gracias a que es biodegradable, es de fácil fabricación, posee buenas propiedades mecánicas y además se ha demostrado que es biocompatible [8]. Sin embargo, su naturaleza hidrófoba limita su uso en ingeniería de tejidos [9]. La combinación o modificación de la policaprolactona con otros polímeros naturales, o con otros compuestos, es una estrategia para mejorar sus propiedades de biocompatibilidad, al mismo tiempo que se aprovechan sus propiedades mecánicas. Con esta estrategia, es posible satisfacer los requerimientos necesarios para facilitar la adhesión y proliferación de las células sembradas, sin sacrificar las propiedades mecánicas.

En el capítulo 1 de este trabajo se describe brevemente la anatomía de los nervios periféricos y las lesiones más comunes. También se presenta una revisión bibliográfica acerca de la importancia de los polímeros para aplicaciones médicas y en especial para la ingeniería de tejidos de nervios periféricos. El capítulo 2 describe detalladamente los materiales y la metodología utilizada para la fabricación y caracterización de los andamios

poliméricos. El capítulo 3 presenta el resultado de los análisis fisicoquímicos y biológicos de los andamios poliméricos, así como la discusión de los mismos. Finalmente, se presentan las conclusiones a las que se llegaron con los resultados obtenidos en este trabajo.

Capítulo 1. Marco teórico

1.1 Sistema nervioso

El sistema nervioso es un sistema sofisticado que regula y coordina las actividades del cuerpo humano. Tiene dos divisiones principales, el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico. El sistema nervioso central consiste de la columna vertebral y el cerebro, mientras que el sistema nervioso periférico involucra todos los nervios que se ramifican desde la médula espinal hacia las extremidades [10].

El sistema nervioso central está compuesto por células gliales como oligodendrocitos y astrocitos. Los oligodendrocitos se encargan de la mielinación y soporte de los axones, mientras que los astrocitos mantienen la barrera hematoencefálica. Esta barrera se encarga de filtrar algunas moléculas necesarias para la función neuronal, a la vez que impide el paso de sustancias tóxicas. Además, el sistema nervioso central contiene microglías, células que cumplen la función de sistema inmunitario [11].

Los nervios periféricos son estructuras macroscópicas que contienen axones sensores y motores; su función principal es transmitir señales desde y hacia la columna vertebral [12]. Las capas principales de los nervios periféricos, desde la más interna hasta la más externa, se denominan endoneuro, perineuro y epineuro (Figura 1.1). El endoneuro es la capa que rodea a los axones con sus respectivas células de Schwann, y está compuesta principalmente de fibras orientadas de colágeno. Después, se encuentra el perineuro que está formado de muchas capas de fibroblastos y colágeno, las cuales rodean varios grupos de axones para formar fascículos [13]. Finalmente, la capa más externa es el epineuro, que mantiene unidos a los fascículos nerviosos y cuya función es

soportar los esfuerzos de tensión y compresión derivados del movimiento de las extremidades [12].

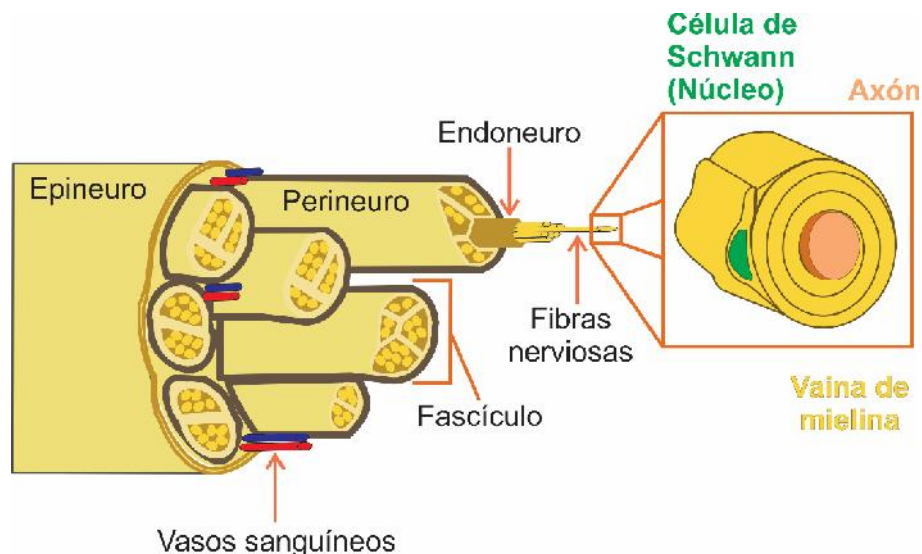


Figura 1.1 Anatomía de los nervios periféricos

1.1.1 Lesiones en el sistema nervioso periférico

Las lesiones en el sistema nervioso periférico se clasifican en tres grupos, neuropraxia, axonotmesis y neurotmesis (Figura 1.2). La neuropraxia puede ser causada por una contusión o compresión del nervio y provoca la pérdida temporal de la función nerviosa. La axonotmesis involucra la interrupción total de la mielina y el axón, pero en el extremo distal, la lesión causa denervación completa. En este caso, dado que el perineuro y endoneuro no sufren daños, es muy probable la regeneración y reinervación del axón. Cuando la lesión produce la desconexión total del nervio, se denomina neurotmesis; este tipo de daño sólo puede ser tratado con métodos quirúrgicos [14]. Cuando ocurre esta lesión, el segmento proximal empieza a hincharse, pero el daño es mínimo comparado con el segmento distal. La degeneración Walleriana, donde el citoesqueleto de los axones y la mielina se desintegran,

es la principal causa de la degeneración del segmento distal, [13]. Los macrófagos y las células de Schwann se encargan de remover los desechos resultantes de la degradación, como parte del proceso de degeneración Walleriana. Otra función importante de las células de Schwann es que empiezan a proliferar y alinearse por sí solas para formar las bandas de Bungner, además de secretar los factores necesarios para la regeneración axonal [11].

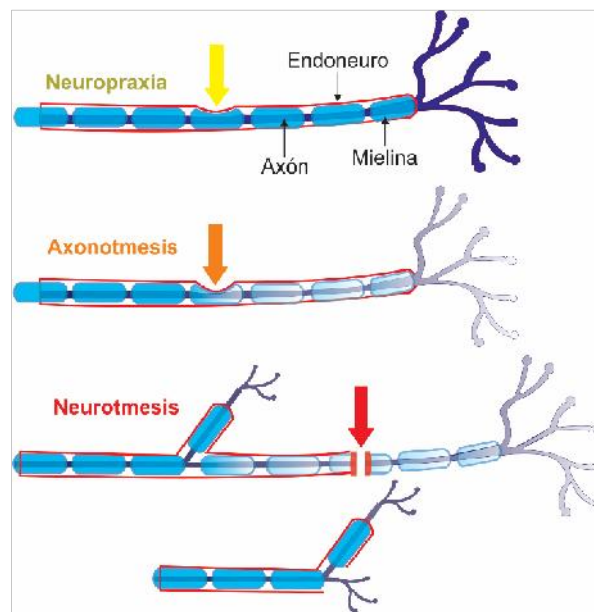


Figura 1.2 Representación de las lesiones en los nervios periféricos

1.1.2 Estrategias para la reparación de nervios periféricos

La autorregeneración de los axones es posible cuando las lesiones son de unos cuantos milímetros (1-2 mm); si el daño es mayor, la sutura directa es el método quirúrgico más utilizado [15]. Este método es recomendable cuando la lesión es de hasta 3 cm; si es mayor, éste ya no es recomendable debido a que la tensión ejercida en el nervio podría inhibir la regeneración nerviosa. En lesiones mayores, los autoinjertos (nervios del mismo paciente) o aloinjertos

(nervios de un donador) son las alternativas empleadas con mayor frecuencia. El procedimiento con autoinjertos, considerado el “estándar de oro”, consiste en extraer tejido sano de otra parte del cuerpo, y utilizarlo para unir los segmentos dañados. Sin embargo, en este procedimiento se requieren dos intervenciones quirúrgicas, una para la extracción del nervio sano y otra para la reparación del nervio dañado [10]. En la terapia con aloinjertos el tejido sano se obtiene de otra persona (alogénico) o de otra especie (xenogénico). A pesar de los beneficios conseguidos con este procedimiento, las principales desventajas del uso de aloinjertos están relacionadas con la respuesta inmune no deseada, rechazo del implante, transmisión de enfermedades y falta de donadores [16].

Aunque el autoinjerto es la terapia estándar en el tratamiento de lesiones en nervios periféricos, la manipulación del nervio dañado no siempre va a garantizar la recuperación de las funciones perdidas. Por esta razón, se han desarrollado implantes sintéticos a base de biomateriales, donde el objetivo es la reconexión de los segmentos distales. [12].

Las desventajas en el uso de los trasplantes mencionados anteriormente, dieron paso al desarrollo de conductos tubulares, es decir, estructuras artificiales diseñadas para guiar la regeneración de axones. La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos ha aprobado el uso de algunos conductos guía que demostraron poseer características que estimulan el proceso de regeneración.

Los dispositivos Salubridge™ y Salutunnel™ son conductos guía hechos a partir de un hidrogel de polialcohol vinílico. Estos andamios permiten mantener una proporción de agua similar al tejido humano, aunque su naturaleza no reabsorbible puede inducir tensión y compresión en el nervio regenerado. Entre los dispositivos de origen natural, específicamente de

colágeno tipo I, se pueden mencionar: NeuraGen™, Neuroflex™, NeuroMatrix™, NeuraWrap™ y NeuroMend™. Las principales ventajas de estos dispositivos son su biocompatibilidad con diferentes tipos de células, además que son reabsorbibles. Sin embargo, las variaciones de un lote a otro pueden generar diferencias en las propiedades del material y comprometer su desempeño *in vivo*. Algunos dispositivos de origen sintético también gozan de la aprobación de la FDA. El Neurotube® y el Neurolac® elaborados a base de poliácido glicólico y poli(L-láctico-co-ε-caprolactona) respectivamente, han demostrado tener una eficacia comparable al “estándar de oro” en defectos de hasta 2 cm. Sin embargo, Neurotube® tiene una alta tasa de degradación, mientras que la rigidez del Neurolac® puede dificultar la sutura [2].

Aunque estos dispositivos han tenido buenos resultados como guías para la reparación nerviosa, aún no es posible prescindir de los autoinjertos, particularmente en defectos largos [13].

1.2 Ingeniería de tejidos de nervios periféricos

La ingeniería de tejidos representa un campo multidisciplinario relativamente nuevo que aplica los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida, para restaurar, mantener o mejorar la función de tejidos y órganos [17]. La estrategia general involucra la expansión de células en un andamio temporal tridimensional, con el adecuado suministro de sustancias biológicas para formar un “tejido nuevo”. Posteriormente se lleva a cabo la implantación del constructo donde éste funcionará como un verdadero reemplazo (Figura 1.3) [18, 19].

Para la ingeniería de tejidos, un andamio poroso tridimensional debe cumplir algunas funciones importantes tales como: proveer la forma adecuada para facilitar la generación de un tejido de tamaño y volumen útil; debe facilitar la

transmisión de señales moleculares y mecánicas a las células y soportar la adhesión celular para que cumplan sus funciones biológicas dentro del andamio y, por último, deben funcionar como matriz extracelular temporal hasta que la regeneración o reparación del daño se haya completado [12, 20]. Idealmente, los andamios para la ingeniería de tejidos deben cumplir varios criterios de diseño: 1) el material debe ser biocompatible y biodegradable; no debe inducir inflamación ni generar subproductos tóxicos; 2) el material debe favorecer la adhesión y proliferación celular, y permitir que las células mantengan sus funciones celulares; 3) los andamios deben mantener una arquitectura estructuralmente estable durante el proceso de regeneración; 4) los poros en los andamios deben estar interconectados para favorecer la infiltración celular y el crecimiento interno del tejido de manera uniforme y, finalmente, 5) el material debe ser semipermeable para permitir el intercambio de oxígeno y nutrientes [2, 18].

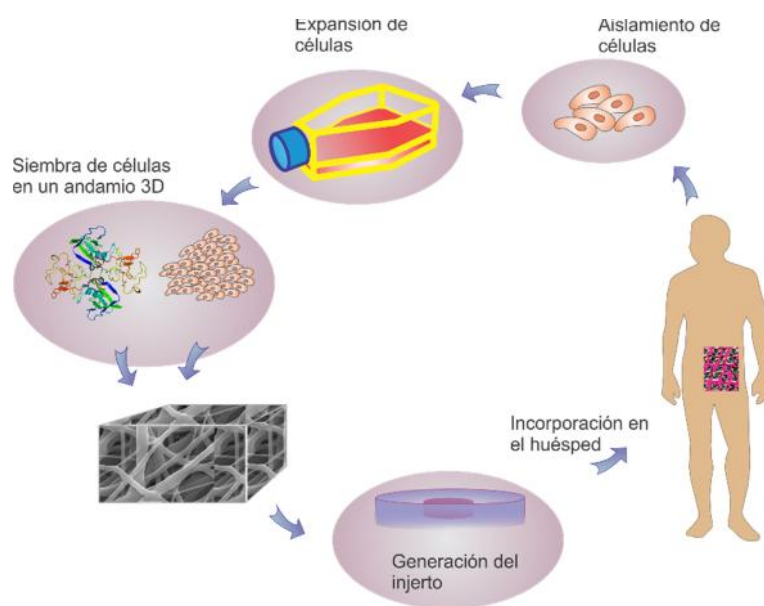


Figura 1.3 Principios básicos de la ingeniería de tejidos

1.2.1 Biopolímeros utilizados en la fabricación de andamios para regeneración nerviosa

En virtud de que los andamios deben servir temporalmente durante el proceso de regeneración tisular, es preferible el uso de polímeros biodegradables, ya sean naturales o sintéticos, en lugar de los no-biodegradables.

Los polímeros naturales son comúnmente utilizados en la fabricación de andamios, ya que son biológicamente similares a la matriz extracelular nativa, lo cual permite la interacción de las células con estos materiales. Esta característica facilita la adhesión, proliferación, y diferenciación celular [21]. En este sentido destacan los andamios de colágeno, elaborados en forma de conductos tubulares, como el Neuragen™, Neuroflex™, NeuroMatrix™, NeuroWrap™ y NeuroMend™, los cuales se encuentran disponibles comercialmente para uso clínico en la reparación de nervios periféricos y son recomendables para lesiones de hasta 3 cm [2]. En investigaciones recientes, el colágeno se ha combinado con pequeñas cantidades de otros compuestos, como los glicosaminoglicanos [22], los cuales son incorporados para mejorar las interacciones del andamio (a base de colágeno) con las células.

La gelatina, derivada de la desnaturalización del colágeno, es otro de los polímeros naturales utilizados para fabricar andamios para nervios periféricos. Por ejemplo, Chen *et al.* [23] utilizaron un andamio de gelatina para reparar un defecto en el nervio ciático de una rata y observaron la regeneración de algunas fibras nerviosas.

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Debido a que la quitina es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos y además es difícil de procesar, es más común utilizar su derivado (el quitosano) para diferentes aplicaciones [24]. El quitosano, es un producto derivado del proceso de desacetilación de la quitina y se ha

demostrado que es biocompatible con células nerviosas como las células de Schwann [25, 26].

A pesar de lo anterior, una de las principales desventajas de los andamios hechos a base de polímeros naturales es que son solubles en agua. Con el objetivo de mejorar la estabilidad de estas matrices poliméricas en medio acuoso, se han utilizado glutaraldehído o genipina como agentes entrecruzantes para los polímeros antes mencionados [23, 27, 28]. Otra desventaja común con el uso de polímeros naturales es la heterogeneidad en las propiedades mecánicas y tasas de degradación, debido a la variabilidad entre lotes. Por otra parte, las propiedades mecánicas son inadecuadas para algunas aplicaciones donde se requiere que los andamios soporten esfuerzos por tiempos prolongados [29, 30].

Los polímeros sintéticos ofrecen ciertas ventajas sobre los polímeros naturales para la elaboración de andamios. Son materiales flexibles y sus características se pueden ajustar para obtener materiales con propiedades mecánicas y de degradación específicas para un tejido determinado [1]. Por ejemplo, el poliácido láctico (PLA) es un poliéster biodegradable de fácil procesamiento obtenido a partir del ácido láctico que puede ser empleado en la fabricación de andamios, aunque su biocompatibilidad no es del todo ideal; de hecho, algunos estudios se han centrado en mejorar la biocompatibilidad de este polímero, añadiendo nanopartículas o mezclándolo con polímeros naturales [31, 32]. El poliácido glicólico (PGA) es un poliéster alifático biodegradable, formado a partir de la polimerización del ácido glicólico. Neurotube® es un dispositivo comercial desarrollado a partir de PGA. Ambos polímeros (PLA y PGA) se degradan por hidrólisis de los enlaces ésteres de la cadena principal y sus productos de degradación (ácido láctico y/o glicólico) son metabolizados vía ciclo de Krebs [33, 34]. Con la copolimerización del PLA y PGA, es

posible obtener el poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), el cual presenta mejores propiedades que los homopolímeros precursores. Las características de degradación del PLGA se pueden ajustar controlando la fracción de ácido láctico en la formulación [35].

Otro polímero sintético usado ampliamente en ingeniería de tejidos es la policaprolactona (PCL). La tasa de degradación de la PCL es más lenta que la del PLA, PGA y PLGA, por lo que es más adecuado para soportes que deben mantener su estructura por varios meses [1, 33]. Esto es importante si se considera que la regeneración y maduración de los axones ocurre a una tasa de 1 mm/día aproximadamente [36]. La desventaja principal de los polímeros sintéticos es su pobre biocompatibilidad, que no permite una adecuada adhesión celular y representa una limitante para la regeneración del tejido dañado [13].

Dada la importancia de la PCL y el quitosano, en la siguiente sección se detallan los aspectos medulares de estos biopolímeros.

1.2.1.1 Quitosano

El quitosano es un polisacárido que se obtiene a partir de la deacetilación de la quitina y su naturaleza obedece al porcentaje de grupos amino presentes a lo largo de la cadena principal o grado de deacetilación. Por lo tanto, el quitosano es un copolímero compuesto de unidades acetiladas (N-acetilglucosamina) y deacetiladas (glucosamina) unidas por enlaces glicosídicos $\beta(1-4)$. La estructura de este polímero se muestra en la Figura 1.4. Generalmente, el material es considerado quitosano cuando es posible disolverlo en disoluciones ácidas diluidas, lo cual ocurre arriba del 60% de deacetilación [24, 37]. Debido a su origen animal (crustáceos), las propiedades del quitosano son variables, lo que provoca inconsistencias en sus

características fisicoquímicas [38]. La presencia de grupos amino en la estructura del quitosano, le proporciona características útiles en el campo de los biomateriales. Se ha demostrado la capacidad del quitosano para soportar la adhesión y crecimiento de células de tejido nervioso, osteoblastos, keratinocitos y fibroblastos [26, 39].

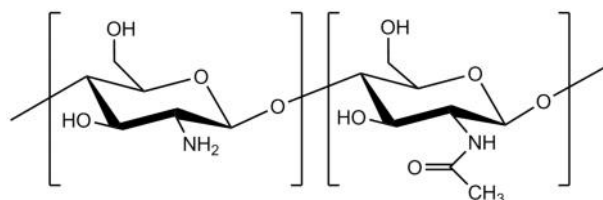


Figura 1.4 Estructura del quitosano

1.2.1.2 Policaprolactona

La policaprolactona (PCL) es un poliéster alifático semicristalino formado a partir de la polimerización por apertura de anillo de la ϵ -caprolactona (Figura 1.5). Este polímero se degrada en ácido caproico y puede permanecer *in vivo* hasta por dos años [33, 40]. En algunas investigaciones se ha modificado el tiempo de degradación de la PCL con la adición de polímeros naturales [41, 42]. Otros polímeros sintéticos biodegradables como el PLA y el PLGA también han sido utilizados para este mismo fin (para reducir el tiempo de degradación) [43, 44]. La biocompatibilidad de la PCL con células de tejido nervioso periférico ha sido ampliamente reportada [45-49].

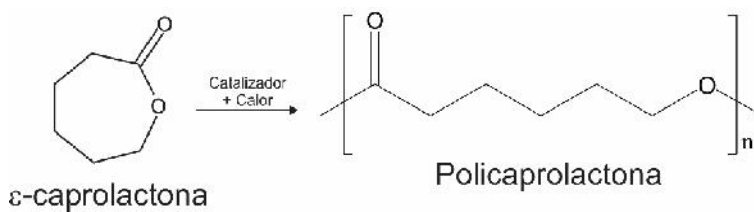


Figura 1.5 Estructura de la PCL

1.2.2 Mezclas para la fabricación de andamios

La PCL es uno de los polímeros sintéticos más utilizados como biomaterial para aplicaciones en tejido óseo, cartílago, piel y regeneración nerviosa, ya que posee buenas propiedades mecánicas y, además, está aprobado por la FDA como material para uso biomédico [50]. Sin embargo, su naturaleza hidrófoba limita funciones celulares como la adhesión, migración, proliferación y diferenciación [51]. Para mejorar su desempeño en la reparación de nervios periféricos, esta característica (su carácter hidrófobo) puede ser modificada con la adición de polímeros naturales, obteniendo mayor proliferación de células nerviosas en andamios hechos a base sólo de PCL [48, 52].

Algunos andamios elaborados a base de polímeros naturales, poseen propiedades mecánicas deficientes para su uso potencial como andamios en la regeneración de nervio periférico [29, 30]. El método más utilizado para mejorar las propiedades mecánicas involucra la combinación de un polímero natural con uno sintético. El desarrollo de materiales híbridos permite aprovechar las propiedades de dos o más polímeros y regular las características del andamio final [21]. Zhong *et al.* lograron incrementar el módulo elástico a compresión de hidrogeles de quitosano, utilizando hasta 50% p/p de PCL como material de refuerzo [53]. Kai *et al.* utilizaron nanofibras electrohiladas de gelatina/PCL para aumentar el módulo de compresión de hidrogeles de gelatina [54]. Sarasam *et al.* determinaron que la composición 50:50 de quitosano/PCL presentó mejores propiedades mecánicas y de adhesión celular comparadas con las exhibidas por los polímeros individuales [55]. La mezcla de PGA/gelatina es otro sistema, en donde el objetivo fue regular la resistencia y el módulo elástico a tensión del

andamio final [56]. En algunos casos, los andamios son entrecruzados con glutaraldehído, manteniendo su biocompatibilidad [57, 58].

Algunas investigaciones tienen especial interés en mezclas de polímeros naturales, por ejemplo, colágeno/quitosano. El primero se encuentra naturalmente en el cuerpo humano y el segundo posee una estructura similar a los glicosaminoglicanos. Ambos son componentes de la matriz extracelular. De acuerdo a Chen *et al.*, se puede obtener una mezcla miscible a partir de colágeno y quitosano, y de esta forma fabricar andamios con características muy similares a la matriz extracelular [59]. La gelatina también se ha utilizado para fabricar andamios, aunque su principal limitación es su solubilidad en medio acuoso. Chiono *et al.* [60] agregaron quitosano para mejorar la estabilidad de la gelatina, y además para obtener andamios de origen natural, completamente biodegradables y biocompatibles.

En resumen, la preparación de mezclas poliméricas es una de las formas que han sido exploradas en la obtención de andamios con propiedades específicas, para aplicaciones en tejido óseo [61], liberación de fármacos [62], hidrogeles [53] y reparación de nervios periféricos [52].

1.3 Diseño y elaboración de andamios tridimensionales

Para tener una funcionalidad adecuada, un andamio debe poseer parámetros estructurales óptimos, que permitan la infiltración y la migración celular en el andamio. Además, este material no debe interferir con actividades celulares como la adhesión sobre el sustrato, extensión, proliferación y orientación, las cuales son necesarias para la formación del nuevo tejido [63].

Hay varias características fundamentales que los andamios deben poseer para la reparación de nervios periféricos: 1) facilidad para formar un conducto con sección transversal uniforme, 2) deben ser fabricados con materiales

biocompatibles y preferentemente biodegradables, 3) su estructura debe ser estable para evitar colapsos, 4) deben ser fáciles de implantar usando técnicas microquirúrgicas y, finalmente 5) deben mantener sus propiedades mecánicas, biológicas y químicas después de la esterilización [6].

Existen diversos métodos para fabricar andamios porosos y obtener configuraciones específicas. La técnica más simple es hacer películas por evaporación del disolvente y lixiviación usando partículas orgánicas o sales, las cuales son removidas posteriormente para obtener una estructura con poros interconectados. Usando esta técnica, Wan *et al.* [64] obtuvieron andamios de quitosano/PCL con 70% de porosidad y una estructura interconectada. Aunque las películas obtenidas fueron muy delgadas, se pueden unir varias películas para obtener andamios de mayor espesor [65].

También se han fabricado andamios en forma de conductos tubulares, por el método de extrusión. El polímero fundido se hace pasar a través de una boquilla que define la geometría y dimensiones finales del andamio. Aunque con esta técnica se obtienen tubos de pared densa [66], se ha combinado con lixiviación de partículas para generar poros en las paredes del conducto [67, 68]. Otro método para obtener andamios tubulares consiste en inyectar soluciones poliméricas en un molde con la forma y dimensiones requeridas para el andamio. Con este método se pueden elaborar andamios tubulares sencillos [69, 70] o multicanal [71].

Otro parámetro muy importante en la fabricación de andamios es la porosidad, ya que los espacios vacíos contribuyen positivamente tanto en la infiltración celular, como en la formación de la matriz extracelular [72]. Algunos polímeros son procesados en forma de hidrogeles, estructuras altamente porosas que tienen la capacidad de retener agua. Normalmente se fabrican a partir de polisacáridos como quitosano [53, 73] o alginato [74]. En la

reparación de nervios periféricos, los hidrogeles se han utilizado como relleno de conductos tubulares [75, 76].

El electrohilado es una técnica con la cual es posible la formación de estructuras fibrilares por medio de campos eléctricos. Esta técnica es popular en ingeniería de tejidos dado que las fibras obtenidas mediante esta técnica mimetizan las propiedades a escala nanométrica de la matriz extracelular nativa [77]. En el tejido nativo, las proteínas de la matriz extracelular (50-150 nm) son de 1 a 2 órdenes de magnitud más pequeñas que las células; esto permite que la célula esté en contacto con varias fibras a la vez [30]. Con esta técnica es posible producir andamios con una arquitectura bien definida, incluyendo tamaño de poro controlado, diámetro de fibra y topografía [78]. Básicamente, un sistema de electrohilado consiste de tres componentes principales: una fuente de alto voltaje, un *spinneret* o capilar que normalmente es una aguja de diámetro conocido y un plato colector. Se utiliza una fuente de alto voltaje para suministrar una carga de cierta polaridad a una solución polimérica, la cual es acelerada hacia un colector de polaridad opuesta [79].

Durante el proceso, la solución polimérica se carga en la jeringa unida a una aguja metálica. Se aplica un voltaje suficientemente alto que supere la tensión superficial de la gota situada en la punta de la aguja y así formar lo que se conoce como cono de Taylor, el cual se prolonga para formar un flujo continuo. El fluido llega al colector debido a la diferencia de potencial eléctrico entre la solución polimérica que fluye a través de la aguja, y el colector. El movimiento aleatorio del chorro que tiene lugar antes de llegar a la placa, permite la evaporación del disolvente, para finalmente obtener una malla compuesta de fibras [80].

Teniendo en cuenta estos aspectos, se han desarrollado andamios con diferentes características. Chew *et al.* observaron que la topografía del

andamio influye considerablemente en la morfología celular. Las células de Schwann cultivadas sobre películas de PCL adoptaron una orientación aleatoria, y extendieron su citoesqueleto sobre la superficie lisa del andamio. En cambio, cuando las células estuvieron en contacto con andamios electrohilados, éstas respondieron a las señales topográficas (morfología fibrilar alineada), extendiendo su citoesqueleto a lo largo de las fibras [81].

Por otro lado, la alineación de las fibras no sólo contribuye a una mejora de la resistencia mecánica a tensión en la dirección paralela a la orientación de las fibras, sino que también ocasiona que las células extiendan su citoesqueleto en una sola dirección [22, 82].

Los andamios obtenidos por electrohilado poseen un alto grado de porosidad y una gran área superficial disponible, no sólo para la adhesión celular, sino para la inmovilización de proteínas. Los andamios electrohilados de quitosano demostraron ser un buen soporte para la adhesión de células de Schwann y axones en proceso de regeneración. Este efecto se mejoró con la inmovilización de un péptido derivado de la laminina-1 en la superficie de las fibras [25]. Las dimensiones de las fibras también favorecen los procesos celulares. Por ejemplo, Yang *et al.* reportaron mayor tasa de diferenciación de células madre neurales adheridas sobre nanofibras, comparadas con aquellas que fueron sembradas en soportes con fibras de orden micro [83].

Las mezclas poliméricas, a partir de materiales naturales y sintéticos, son la base de muchos andamios electrohilados. La estrategia común es que las fibras estén compuestas en su mayoría de un polímero sintético que proporcione la resistencia mecánica del andamio, mientras que el polímero natural contribuya a modificar propiedades superficiales como el carácter hidrófilo, el cual ha sido asociado con diferentes procesos celulares como adhesión, migración, proliferación y regeneración axonal. Además, la estructura fibrilar

tridimensional aumenta el área superficial y la porosidad, necesarios para la adhesión celular e intercambio de nutrientes [9, 48, 52].

1.4 Antecedentes

La PCL es un poliéster alifático, biodegradable y biocompatible que posee buenas propiedades mecánicas. Sin embargo, su característica hidrófoba, su lenta tasa de degradación y la falta de sitios de reconocimiento celular limita su uso como biomaterial. Por otro lado, el quitosano es un polímero natural que, gracias a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y propiedades antimicrobianas ha sido ampliamente estudiado para aplicaciones en el área biomédica. Sus principales desventajas están relacionadas con su baja estabilidad mecánica [9, 84, 85].

La mezcla de quitosano con PCL es una alternativa para aprovechar las características biológicas, mecánicas y de degradación de los polímeros individuales. Prabhakaran *et al.* [9] reportaron la obtención de andamios electrohilados compuestos de quitosano y PCL. La tasa de proliferación de células de Schwann fue más alta en los andamios de quitosano/PCL que en los andamios de PCL. El incremento en la tasa de proliferación está asociado a la modificación del carácter hidrófobo, así como a la presencia de grupos amino en el quitosano. Cooper *et al.* estudiaron la conducta de adhesión y proliferación de células de Schwann (derivadas de un schwannoma de rata) y células PC-12 (derivadas de un feocromocitoma de rata) sobre nanofibras electrohiladas orientadas y no orientadas fabricadas a base de quitosano/PCL 25:75 p/p. Aunque la orientación de las fibras no tuvo influencia en la proliferación celular, sí modificó las características de adhesión. Las células de Schwann exhibieron una morfología bipolar y alargada en andamios con fibras alineadas, mientras que, la morfología fue extendida en fibras orientadas

al azar. Bhattarai *et al.* [47] cultivaron células de Schwann sobre nanofibras de PCL, nanofibras de quitosano/PCL y películas de quitosano/PCL. Las células cultivadas sobre las nanofibras de quitosano/PCL mostraron una morfología extendida, mientras que, en las nanofibras de PCL y la película de quitosano/PCL mantuvieron una morfología esférica, lo cual indica una pobre adhesión al sustrato. Junka *et al.* [49] funcionalizaron andamios electrohilados de quitosano/PCL con laminina para incrementar la proliferación de células de Schwann sobre estos materiales.

Estos estudios demuestran que los andamios hechos a base de mezclas de quitosano/PCL poseen características únicas que pueden ser aprovechadas en terapias de regeneración nerviosa. Sin embargo, los reportes mencionados anteriormente trabajan una sola composición de la mezcla polimérica. Esta información, aunque es valiosa, no es suficiente para establecer el efecto de la composición de los andamios sobre sus propiedades fisicoquímicas y biológicas.

En este trabajo se desarrollaron andamios a base de quitosano y PCL, variando la concentración de los polímeros. El objetivo fue estudiar el efecto de la composición sobre las propiedades fisicoquímicas y de biocompatibilidad de los andamios obtenidos. Los andamios fueron elaborados por la técnica de electrohilado, para obtener una estructura porosa.

Justificación

Se estima que cada año las lesiones en nervios periféricos representan el 2.8% de los pacientes que experimental algún traumatismo, lo que muchas veces deriva en la discapacidad del afectado. En los Estados Unidos 360,000 personas sufren de parálisis en alguna de sus extremidades superiores, mientras que en Europa, anualmente se registran 300,000 casos de lesiones en nervios periféricos [1, 2]. Aunque la regeneración natural de los nervios periféricos es posible en lesiones pequeñas, en la mayoría de los casos es necesario remplazar el tejido dañado. Debido a que la disponibilidad de donadores es limitada, se requieren otras alternativas como el uso de andamios que contribuyan a la reconstrucción del tejido nervioso.

Hipótesis

La incorporación de pequeñas cantidades de quitosano en los andamios porosos hechos a base de policaprolactona, modificará las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de biocompatibilidad con las células de Schwann, en los andamios generados. La concentración óptima de quitosano permitirá tener el más alto grado de biocompatibilidad.

Objetivos

General

Estudiar la relación estructura-propiedades en andamios hechos a base de quitosano y policaprolactona, obtenidos mediante la técnica de electrohilado,

Específicos

- Optimizar las variables del proceso de electrohilado (flujo, voltaje y la distancia del colector) para la obtención de andamios.
- Caracterizar fisicoquímicamente los andamios obtenidos, mediante microscopía electrónica de barrido, espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, análisis termogravimétrico, calorimetría diferencial de barrido y ángulo de contacto.
- Estudiar la biocompatibilidad de los andamios utilizando fibroblastos y células de Schwann.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Materiales

La policaprolactona (PCL, Mn: 70,000-90,000) y el quitosano de bajo peso molecular (Mv=54,900 g/mol, determinado por viscosimetría, y 78% grado de deacetilación determinado por ¹H RMN) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Los disolventes 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, 99% de pureza), diclorometano (DCM, 99.5% de pureza) y ácido trifluoroacético (TFA, 99% de pureza) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El glutaraldehído (GA, solución al 25%) también fue adquirido de Sigma-Aldrich.

2.2 Preparación de los andamios electrohilados

Para obtener fibras de la mezcla quitosano/PCL se prepararon soluciones individuales de estos polímeros. El quitosano (4 p/v) se disolvió en TFA/DCM (70:30 v/v) y se dejó agitar por 4 h a 50 °C en una placa de agitación y calentamiento, mientras que la PCL (12 p/v) se disolvió en HFIP y se mantuvo en agitación durante 2.5 h. Posteriormente ambas soluciones se mezclaron para obtener soluciones con 0, 5, 10, 25 y 100% p/p de quitosano, identificadas como PCL, 5%Q, 10%Q, 25%Q y Q respectivamente (Tabla 2.1)

Las soluciones poliméricas se colocaron en una jeringa estándar de 10 ml unida a una aguja de 0.6 mm de diámetro interno (20G). Se aplicó un voltaje de 25 kV y se mantuvo una tasa de alimentación de 0.5 ml/h. Las fibras se colectaron sobre una placa metálica plana, forrada con papel aluminio, colocada a 15 cm de la punta de la aguja (Figura 2.1). La humedad relativa de la cámara de electrohilado se mantuvo entre 35-50% usando gel de sílice.

Tabla 2.1 Composición porcentual en peso e identificación de los andamios electrohilados

| Andamios | Contenido de PCL (%) | Contenido de quitosano (%) | Identificación |
|----------|----------------------|----------------------------|----------------|
| 1 | 100 | 0 | PCL |
| 2 | 95 | 5 | 5%Q |
| 3 | 90 | 10 | 10%Q |
| 4 | 75 | 25 | 25%Q |
| 5 | 0 | 100 | Q |

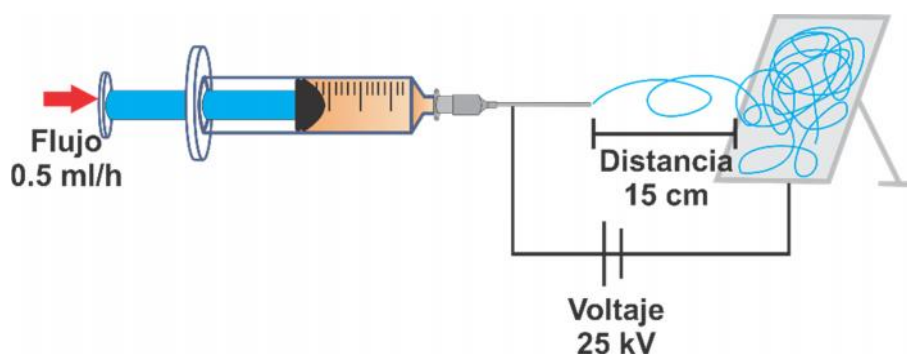


Figura 2.1 Diagrama del sistema de electrohilado

Durante experimentos previos, se ensayaron diferentes niveles de tasa de alimentación, voltaje y distancia aguja-colector. Las condiciones que permitieron obtener andamios con fibras de diámetro homogéneo y libres de defectos fueron seleccionadas para los experimentos posteriores.

Las nanofibras de Q fueron inestables en agua, debido a los residuos ácidos utilizados para hacer las soluciones, por lo que los andamios fueron tratados con glutaraldehído (GA) para mejorar su estabilidad en los medios acuosos utilizados durante la caracterización biológica. Para esto, los andamios de Q se colocaron en un recipiente cerrado junto con 0.5 ml de GA al 25% que se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente el material se

lavó repetidas veces con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. El Q tratado con glutaraldehído (Q-GA) se utilizó en los cultivos celulares.

2.3 Caracterización fisicoquímica de los andamios electrohilados

2.3.1 Microscopía electrónica de barrido

La morfología de los andamios se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM), con un equipo marca JEOL, modelo JSM 6360LV. Antes del análisis, los andamios se colocaron en un soporte de aluminio y se recubrieron con oro. Se obtuvieron cinco imágenes de cada andamio, mismas que fueron analizadas con el paquete informático Image Pro Plus para medir el diámetro de las fibras. La composición elemental de los andamios se estudió por medio de microanálisis por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) usando un sistema Oxford Inca Energy 2000 acoplado al SEM. Se analizaron tres puntos seleccionados al azar.

2.3.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

Los andamios electrohilados se analizaron por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) con un equipo Thermo Scientific Nicolet 8700. El estudio se hizo por el método de reflectancia total atenuada (ATR) usando un cristal de germanio. Se hicieron 100 barridos en un intervalo de número de onda de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

2.3.3 Ángulo de contacto

Para conocer las características hidrófilas de los andamios, se depositó una gota de agua con una jeringa común de 0.3 ml. El ángulo formado entre la

gota y la superficie se midió con un analizador Tantec modelo CAM-PLUS-MICRO X6. El experimento se repitió al menos 5 veces para cada andamio.

2.3.4 Absorción de humedad

Cinco especímenes de cada tipo de andamio se secaron a presión reducida durante dos días. Posteriormente, todos los especímenes se almacenaron bajo 51% o 97% de humedad relativa (H. R.) usando sulfato de sodio decahidratado o nitrato de magnesio hexahidratado, respectivamente. Se tomó la masa de las muestras hasta que se alcanzó el equilibrio. El porcentaje de absorción de humedad (AH) está dado por:

$$A(t) = \frac{m_t - m_0}{m_0} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde m_0 es la masa de la muestra antes de la exposición a la humedad y m_t es la masa de la muestra después de t h. Se reportó el promedio y la desviación estándar de cinco muestras por cada andamio.

Los datos obtenidos de absorción de humedad al 97% H. R. fueron evaluados de acuerdo a la ley de Fick. Esta ley relaciona el porcentaje de absorción de humedad con respecto al tiempo, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{M(t)}{M_\infty} = \frac{4}{L} \sqrt{\frac{D}{\pi}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde $M(t)$ y M representan la absorción de agua en el tiempo t y en el equilibrio, respectivamente; L es el espesor del espécimen y D es el

coeficiente de difusión. Esta ecuación es válida únicamente a tiempos cortos o cuando $M(t)/M < 0.6$.

2.3.5 Calorimetría diferencial de barrido

Las propiedades térmicas se estudiaron por medio de calorimetría diferencial de barrido utilizando un equipo DSC-7 Perkin Elmer, en atmósfera de nitrógeno. Aproximadamente 3 mg de muestra se colocaron en charolas de aluminio semiherméticas y se calentaron de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una tasa de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

La temperatura de transición vítrea (T_g), la temperatura de fusión (T_m) y la entalpía de fusión (ΔH_m) fueron determinadas tanto, en la primera como en la segunda corrida. Por su parte, la temperatura de cristalización (T_c) y la entalpía de cristalización (ΔH_c) fueron obtenidas en la corrida de enfriamiento (entre ambos calentamientos). El grado de cristalinidad (X , relativo a la PCL) de los andamios se determinó de acuerdo a la siguiente relación:

$$X_P = \frac{\Delta H_m}{w_P * \Delta H_m^{\circ}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde H_m es la entalpía de fusión de la PCL obtenida experimentalmente, w_{PCL} es la fracción de PCL en el andamio y H_m° es la entalpía de la PCL con 100% de cristalinidad tomada como 139.5 J/g [66].

2.3.6 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se realizó en un equipo Perkin Elmer TGA 7, en atmósfera de nitrógeno. Las muestras se analizaron de 50 °C a 600 °C con una tasa de calentamiento de 10 °C/min.

2.3.7 Cromatografía de permeación en gel

Los pesos moleculares de los andamios electrohilados se determinaron por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) en un equipo HP Agilent 1100 usando dos columnas acopladas Zorbax 60S y 1000S. Los análisis se realizaron con dimetilformamida (DMF) como disolvente, con un flujo de 1ml/min a 50 °C. Las columnas se calibraron con estándares de poliestireno monodisperso de 530 Da a 426,600 Da.

2.4 Caracterización biológica de los andamios

2.4.1 Esterilización de los andamios

Se cortaron andamios de 8 mm de diámetro, para ajustarlos a la forma circular de una placa de cultivo de 48 pozos. Antes de llevar a cabo las pruebas biológicas, todos los materiales se esterilizaron con soluciones de etanol (70%, 50% y 30%) y agua ultrapura en condiciones estériles. Se utilizaron anillos de PCL para mantener los andamios en el fondo del pozo. Antes de la siembra de células, los materiales se incubaron con medio de cultivo toda la noche.

2.4.2 Ensayo de citotoxicidad usando fibroblastos

El ensayo de citotoxicidad fue realizado por contacto directo e indirecto, de acuerdo a la norma internacional ISO 10993-5 [86]. Los fibroblastos de ratón (L929, ATCC) en su octavo pase, fueron primero cultivadas como una monocapa en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Life

technologies), 10% de suero fetal bovino (FBS, Life technologies) y 1% de solución antibiótica y antimicótica de penicilina/estreptomicina (P/S, Sigma aldrich). Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en frascos de cultivo de 75 cm². Cuando se alcanzó 80% de confluencia, las células se despegaron por digestión enzimática y se midió la densidad con el contador automático, así como con la cámara de Neubauer.

Contacto indirecto

El ensayo MTT es el método para cuantificar la viabilidad de las células con base en la reducción de la sal amarilla de tetrazolio a cristales púrpura de formazán que lleva a cabo la enzima deshidrogenasa secretada por la mitocondria de las células metabólicamente activas. La cantidad de cristales de formazán púrpura relaciona el número de células viables de manera lineal [26].

Se sembraron células L929 en placas de 96 pozos a una densidad de 1×10^4 células por pozo, mientras que los andamios se incubaron con medio de cultivo de fibroblastos considerando la relación superficie/volumen de 6 mm²/ml [87]. Después de 24 h, el medio de cultivo de las células fue remplazado con los extractos obtenidos de los andamios. El ensayo de citotoxicidad se realizó empleando el reactivo comercial bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT, Roche, 14650007) a 24, 48 y 72 h. Durante el procedimiento, el medio de cultivo se reemplazó con 100 µl de una solución de MTT (MTT en DMEM sin rojo fenol 1:9) y se incubó por 2.5 h. Finalmente, la solución de MTT se reemplazó con 100 µl de 2-propanol y se midió la absorbancia a 550 nm con el espectrofotómetro de placas (Victor 3, Perkin Elmer). Se reportó el promedio de tres mediciones por cada día de ensayo. Se utilizaron cubreobjetos de vidrio y una película de látex como

control positivo y negativo respectivamente. De acuerdo al estándar ISO, si la viabilidad de las células es más de 70%, el material se considera no citotóxico.

Contacto directo

Se estudió la actividad metabólica después de 1, 3 y 6 días de cultivo, utilizando el reactivo comercial (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS). El compuesto tetrazolio del MTS puede ser metabolizado por la mitocondria de las células vivas en cristales de formazán que tienen la característica de ser solubles en el medio de cultivo [88].

Se sembraron células L929 directamente sobre los andamios a una densidad de 5×10^4 células. Después de 1, 3 y 6 días, se extrajo el medio de cultivo y los andamios se lavaron con búfer de fosfato salino (PBS). Las muestras fueron incubadas con 400 ml de solución de MTS (MTS en DMEM sin rojo fenol 1:5) por 3 h a 37 °C. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100 μ l que fueron transferidas a una placa de 96 pozos y se midió la absorbancia a 490 nm con el espectrofotómetro de placas (Victor 3, Perkin Elmer).

2.4.3 Ensayo de viabilidad celular usando células de Schwann

Las células de Schwann de rata (SC, Innoprot, P10301) fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), 5% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) y 1% de suplemento de crecimiento de SC. Las células se incubaron en frascos de cultivo de 75 cm² a 37°C y 5% de CO₂, remplazando el medio de cultivo cada dos días. Cuando se alcanzó 80% de confluencia, las células se despegaron por digestión enzimática con tripsina al 1% y se midió la cantidad de células con el contador automático, así como con la cámara de Neubauer.

La viabilidad de las células adheridas se determinó después de 1, 3 y 5 días de cultivo. Se extrajo el medio de cultivo de los pozos, y los andamios se lavaron con PBS. Posteriormente las muestras fueron incubadas con 400 μ l de solución de MTS (MTS en DMEM sin rojo fenol 1:5) por 3 h a 37 °C. Después, la solución de cada pozo se transfirió a una placa de 96 pozos (100 μ l/pozo) y se midió la absorbancia a 490 nm. Se analizaron cuatro muestras por cada andamio.

2.4.4 Tratamiento con poli-D-lisina

Antes de los cultivos, los andamios electrohilados se esterilizaron de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.5.1. Una hora antes de la siembra, algunos materiales fueron tratados con poli-D-lisina (PDL) (P6407, Sigma Aldrich) al 0.1%, a temperatura ambiente. Después de 5 días se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente los núcleos celulares se tiñeron con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (1/5000) durante 10 min y se observaron en el microscopio de fluorescencia. El conteo de núcleos se hizo a partir de 5 imágenes.

2.4.5 Morfología celular

Estudio inmunocitoquímico

El estudio inmunocitoquímico se realizó después de 5 días de cultivo. Las células adheridas a los andamios se fijaron con PFA por 20 min. Posteriormente las muestras fueron lavadas dos veces con búfer de fosfato (PB) y una solución permeabilizante (0.1% v/v Tritón X-100 en 10% de suero fetal bovino) por 2 h. Después, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario p75 toda la noche (1:100, AB8874, Abcam). Este anticuerpo

reconoce el factor de crecimiento nervioso, el cual está presente en las células de Schwann. Seguidamente, se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa flúor 488 anti-conejo (1/200, Life technologies, A-11008) y faloidina FITC 555 (1/200) durante 2 h. Finalmente los núcleos celulares se marcaron con DAPI (1/5000) y se observaron en el microscopio de fluorescencia Zeiss Confocal Microscope LSM 780.

Morfología celular

La morfología celular se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un microscopio electrónico Hitachi S-4800. Las células se fijaron con una solución de GA al 3.5% durante una hora y posteriormente con tetraóxido de osmio al 2% por 2 h. Después de varios lavados con agua destilada y soluciones de etanol, las muestras se enjuagaron con soluciones de hexametildisilazano (1:2, 1:1 y 1:0 hexametildisilazano:etanol) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las muestras se recubrieron con oro antes del análisis de SEM.

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Caracterización fisicoquímica de los andamios electrohilados

3.1.1 Microscopía electrónica de barrido

Las imágenes de SEM, así como la distribución de diámetros de los andamios electrohilados se muestran en la Figura 3.1. Como se puede apreciar, se obtuvieron fibras orientadas aleatoriamente en todos los casos: quitosano (Q), policaprolactona (PCL) y mezclas de Q/PCL, con tres composiciones diferentes. Debe señalarse que tanto las condiciones del electrohilado como los disolventes utilizados, fueron elegidos de tal manera que se obtuvieran andamios electrohilados con fibras homogéneas y sin perlas (beads).

Los andamios de PCL presentaron fibras con diámetros de alrededor de 240 ± 40 nm; mientras que en los andamios de Q las fibras obtenidas fueron más delgadas, con un diámetro promedio de 110 ± 30 nm (ver Tabla 3.1). Al igual que se ha observado en otros estudios [61, 89], las mezclas de Q/PCL produjeron fibras con diámetros intermedios, y con tendencia a disminuir con el aumento en la cantidad de Q. Esta disminución en el diámetro está relacionada con la naturaleza policationica del Q, ya que la adición de este polímero incrementa la conductividad y a su vez genera mayor densidad de carga en el flujo, lo cual produce mayor estiramiento en las fibras [61, 89]. En el caso de la PCL, tanto la conductividad como la densidad de carga son menores, por lo que ocurre el efecto contrario [90]. El diámetro de las fibras también está influenciado por la concentración de las soluciones iniciales. Es decir, la solución de PCL está más concentrada que la solución del Q, pues experimentalmente no es viable obtener fibras sólo de PCL y sólo de Q utilizando la misma concentración. El análisis estadístico confirmó que existe diferencia significativa entre el diámetro promedio de las fibras de PCL y de sus mezclas.

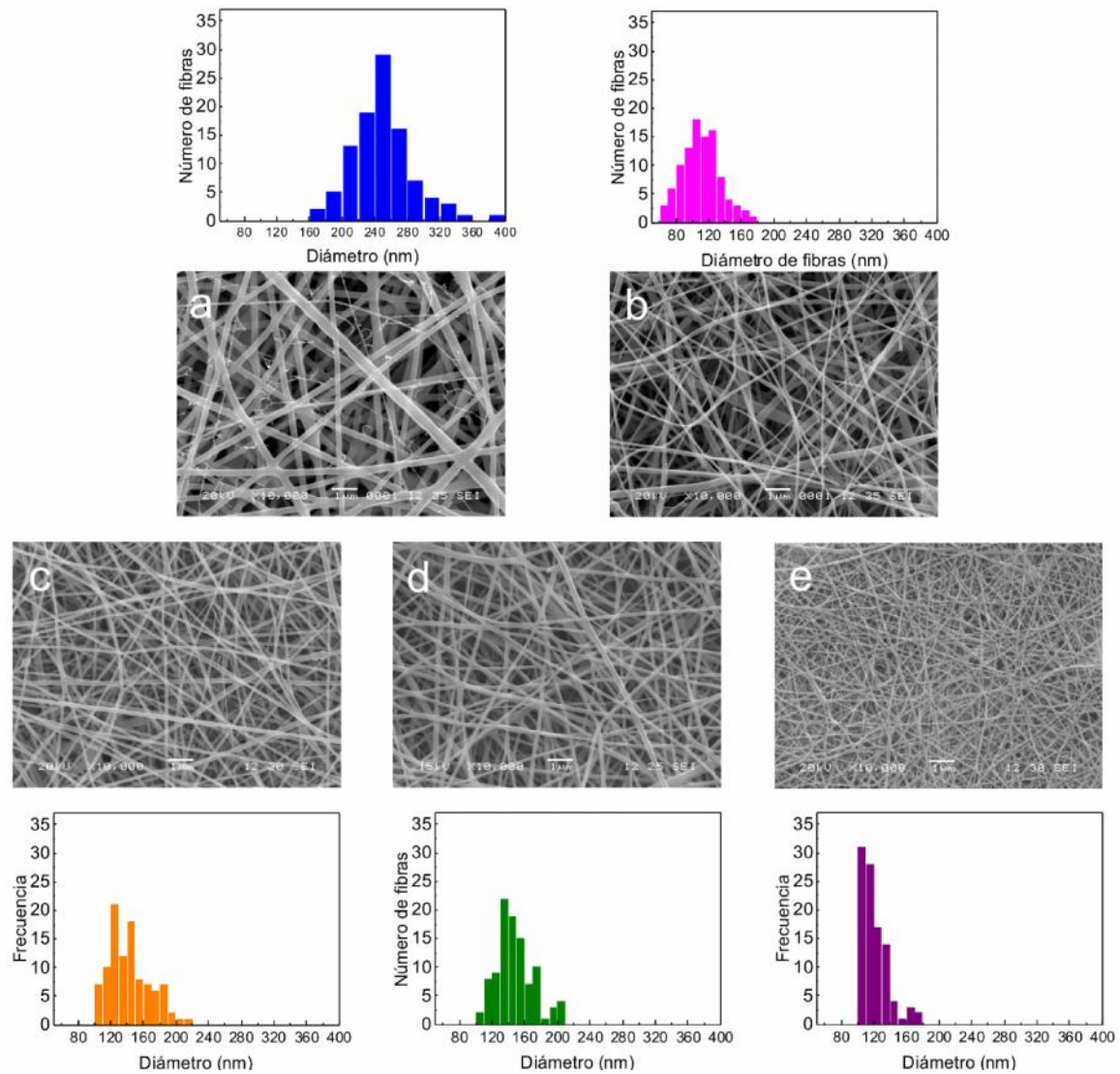


Figura 3.1 Imágenes de SEM y distribución de diámetros de fibras de andamios electrohilados, (a) PCL, (b) 5%Q, (c) 10%Q, (d) 25%Q y (e) Q

Tabla 3.1 Diámetro promedio de las nanofibras electrohiladas en los andamios preparados en este trabajo (ANOVA, de una sola vía; * $p < 0.05$ en comparación con PCL).

| Andamio | PCL | 5%Q | 10%Q | 25%Q | Q |
|---------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| D (nm) | 240 ± 40 | 140 ± 30* | 150 ± 20* | 120 ± 20* | 110 ± 30* |

Tabla 3.2 Porcentaje atómico de carbono, oxígeno, nitrógeno y flúor determinadas por EDX.

| Andamio | C (%) | O (%) | N (%) | F (%) |
|---------|------------|------------|------------|------------|
| PCL | 71.8 ± 0.1 | 27.4 ± 0.1 | - | 0.8 ± 0.2 |
| 5%Q | 80.5 ± 0.8 | 9.9 ± 1.0 | 8.7 ± 0.3 | 0.8 ± 0.1 |
| 10%Q | 77.2 ± 3.6 | 12.0 ± 2.5 | 9.4 ± 1.4 | 1.2 ± 0.1 |
| 25%Q | 75.4 ± 7.8 | 10.9 ± 3.9 | 10.8 ± 3.6 | 2.5 ± 0.2 |
| Q | 42.5 ± 0.4 | 29.0 ± 0.2 | 10.2 ± 0.5 | 18.1 ± 0.2 |
| Q-GA | 60.6 ± 2.2 | 18.0 ± 1.3 | 21.0 ± 1.2 | 0.7 ± 0.1 |

También se realizó un análisis de la composición elemental superficial de los materiales, mediante Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos-X (EDX) y los resultados se muestran en la Tabla 3.2. Como se esperaba, el carbono y el oxígeno fueron los principales elementos detectados en los andamios, aunque también se encontró nitrógeno en las muestras que tenían quitosano. Además, se detectó la presencia de flúor, proveniente de los residuos de los disolventes 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol y ácido

trifluoroacético (TFA), utilizados durante el electrohilado. La mayor concentración de flúor (18.1%) se detectó en el andamio de Q, lo cual puede estar relacionado con la formación de sales de amina a partir de la interacción entre el ácido trifluoroacético y los grupos amino del Q [91]. A pesar de lo anterior, el porcentaje de flúor se redujo fuertemente, a sólo el 0.65%, después de que los andamios fueron entrecruzados con glutaraldehído (como se recordará, este procedimiento fue llevado a cabo para poder realizar la caracterización biológica de los andamios de Q, ya que éstos resultaron ser solubles en agua).

3.1.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

Los espectros de FTIR de los andamios electrohilados de quitosano (Q), policaprolactona (PCL) y Q/PCL se muestran en la Figura 3.2. En el espectro de la PCL, se observa la banda de absorción correspondiente al estiramiento del enlace C=O del grupo éster en 1724 cm^{-1} . Las bandas en 2946 cm^{-1} y 2866 cm^{-1} corresponden al estiramiento asimétrico y simétrico de los grupos metileno (CH_2). La señal en 1240 cm^{-1} pertenecen al estiramiento C-O y, la señal en 1186 cm^{-1} corresponden a los estiramientos asimétricos y simétricos del enlace C-O-C [46, 52, 66].

El espectro del Q muestra una banda muy amplia en 3405 cm^{-1} asociada al estiramiento de los enlaces N-H y O-H, además de los picos en 2931 y 2895 cm^{-1} correspondientes al estiramiento del enlace C-H de los grupos metileno. Las señales debidas a la estructura tipo sacárido aparecen en 1201 cm^{-1} , 1137 cm^{-1} y 1090 cm^{-1} . La banda que aparece en 1670 cm^{-1} pertenece al grupo C=O de la amida I del Q.

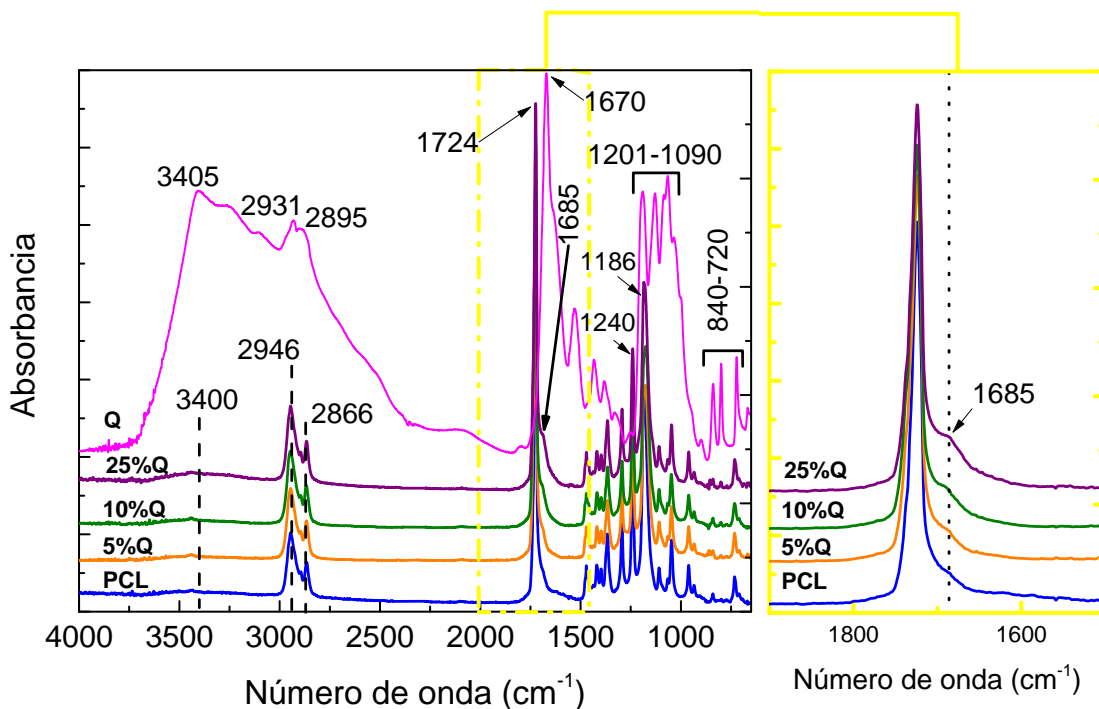


Figura 3.2 Espectros de FTIR de los andamios electrohilados

Los espectros de las mezclas con diferentes cantidades de Q, son muy similares al espectro de la PCL, aunque con algunas diferencias. Los andamios con 5, 10 y 25% de Q muestran una banda alrededor de 3400 cm^{-1} , que corresponde a los enlaces O-H y N-H del Q. Además, se observa la aparición de una señal en 1685 cm^{-1} atribuida al estiramiento del grupo carbonilo de la amida I del Q [9, 89, 92].

Es interesante notar que la banda relacionada al estiramiento del grupo C=O de la amida I, que normalmente aparece en 1648 cm^{-1} (Figura 3.3, línea negra) [42, 93] se desplazó a 1670 cm^{-1} en el andamio electrohilado. Este comportamiento ha sido observado por otros autores [9, 61, 85] y se debe a la protonación de los grupos amino ($-\text{NH}_3^+$), inducido por el TFA [85, 91, 94]. Además de lo anterior, la existencia de tres picos de absorción en 840, 800 y

720 cm^{-1} indican la presencia de TFA residual en las fibras de Q en forma de sales de amina [91, 94], tal como se observó en el análisis de EDX. Para eliminar los residuos ácidos normalmente se utiliza el entrecruzamiento con glutaraldehído (GA) o la neutralización con un compuesto básico tal como el hidróxido de amonio (NH_4OH). Sin embargo, el NH_4OH parece ser muy agresivo ya que ocasiono la pérdida de la morfología fibrilar en los andamios de Q (ver Anexos, Figura A1). Por ello, los andamios fueron tratados con glutaraldehído (Q-GA) y analizados nuevamente con FTIR. Después del tratamiento, las bandas entre 840-720 desaparecieron y apareció una banda alrededor de 1635 cm^{-1} asociada al enlace imina ($\text{C}=\text{N}$) (Figura 3.3).

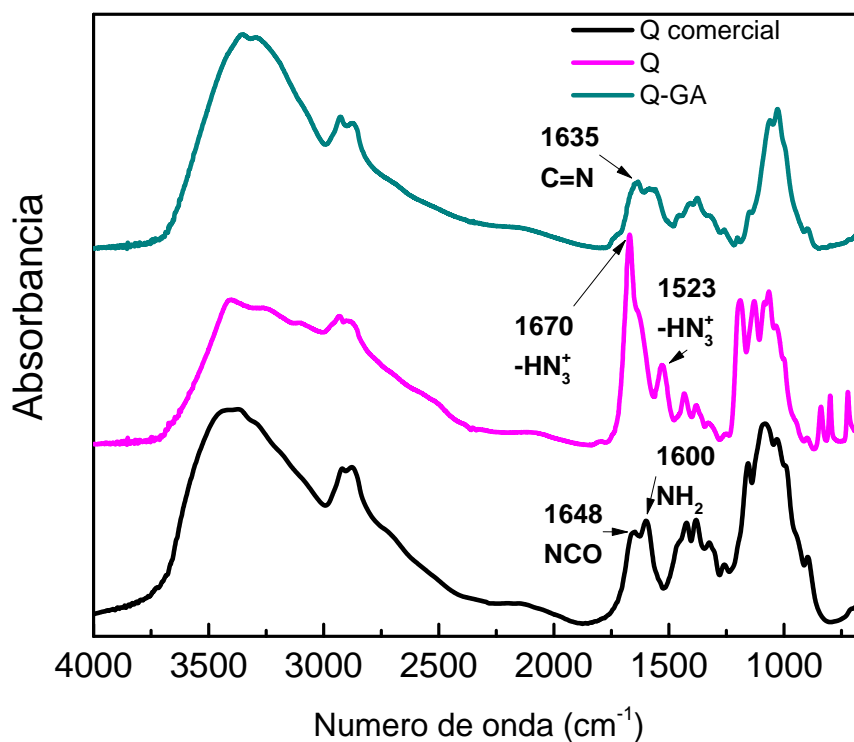


Figura 3.3 Espectros de FTIR de quitosano comercial (Q comercial) quitosano electrohilado (Q) y quitosano electrohilado tratado con glutaraldehído (Q-GA)

3.1.3 Ángulo de contacto

La técnica de ángulo de contacto permite detectar cambios sutiles en la composición química de la superficie de los materiales y es una manera fácil de medir el grado de hidrofilia de los andamios. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.3. Los andamios de PCL presentaron un ángulo de contacto de 113°, característico de una superficie hidrofóbica [41, 90]. En contraste, los andamios de Q, mostraron un ángulo de contacto de 39°, debido a su naturaleza hidrófila. En este sentido, conviene mencionar que el ángulo de contacto de este andamio disminuyó gradualmente hasta la disolución completa de las fibras conforme el tiempo transcurría. Es probable que este comportamiento esté relacionado con las sales de amina, especies protonadas presentes en el quitosano ($\text{NH}_3^+\text{-CF}_3\text{COO}^-$), las cuales provocan que el andamio sea soluble en agua [91, 95]. Para mejorar su estabilidad en el medio acuoso, lo cual es indispensable en los ensayos biológicos, los andamios de quitosano fueron entrecruzados con glutaraldehído. El ángulo de contacto después del entrecruzamiento fue de 52 °, lo que indica que el andamio mantuvo sus características hidrófilas.

En las mezclas se observó que el ángulo de contacto disminuyó al aumentar la cantidad de quitosano presente en el andamio. Esta tendencia ha sido reportada anteriormente y refleja una mejora en el grado de hidrofilia de los andamios electrohilados. Se espera que esta característica mejore la biocompatibilidad del andamio, ya que se ha reportado que algunas células, como las células de Schwann, tienden a proliferar más rápido y presentan mayor adhesión en superficies parcialmente hidrófilas [9, 61].

Tabla 3.3 Ángulo de contacto de los andamios electrohilados (ANOVA, de una sola vía; * $p < 0.05$ en comparación con PCL)

| Andamio | Ángulo de contacto (θ) |
|---------|---------------------------------|
| PCL | 113 \pm 7 |
| 5% Q | 98 \pm 5* |
| 10% Q | 56 \pm 3* |
| 25% Q | 52 \pm 4* |
| Q | 39 \pm 5* |

3.1.4 Absorción de humedad

Para conocer más acerca de las propiedades superficiales de los andamios, se midió la absorción de humedad (A. H.) bajo condiciones controladas de humedad relativa (H. R.). Se hicieron dos ensayos; en el primero, la humedad relativa fue del 53% y en el segundo caso fue del 97%.

Durante el ensayo a 53% H. R. (Figura 3.4a), los cambios fueron mínimos. La absorción en los andamios de policaprolactona (PCL) y sus mezclas fue alrededor de 5%, mientras que para el de quitosano (Q) fue aproximadamente 10%. En contraste, cuando los materiales se expusieron a 97% H.R (Figura 3.4b), se observó una tendencia similar a los resultados obtenidos en ángulo de contacto (Tabla 3.3); es decir, la PCL prácticamente no presentó absorción de agua, mientras que en el de Q absorbió en promedio 20% en las primeras 24 h, hasta alcanzar 100% de su peso al final del experimento (24 días).

Por otro lado, la ganancia de humedad en las mezclas fue dependiente de la composición. Los andamios con 5 y 10% de quitosano (5% Q y 10% Q, respectivamente) presentaron cambios ligeros de peso, en contraste con lo observado en el andamio con 25% de quitosano (25% Q) en donde los cambios

fueron mayores. Al parecer, el quitosano que se encuentra en la superficie de las fibras, permite la difusión de la humedad al interior del material. Con ayuda del análisis elemental se observó que parte del quitosano se encuentra en la superficie de las fibras al detectar nitrógeno en esta prueba (Tabla 3.2).

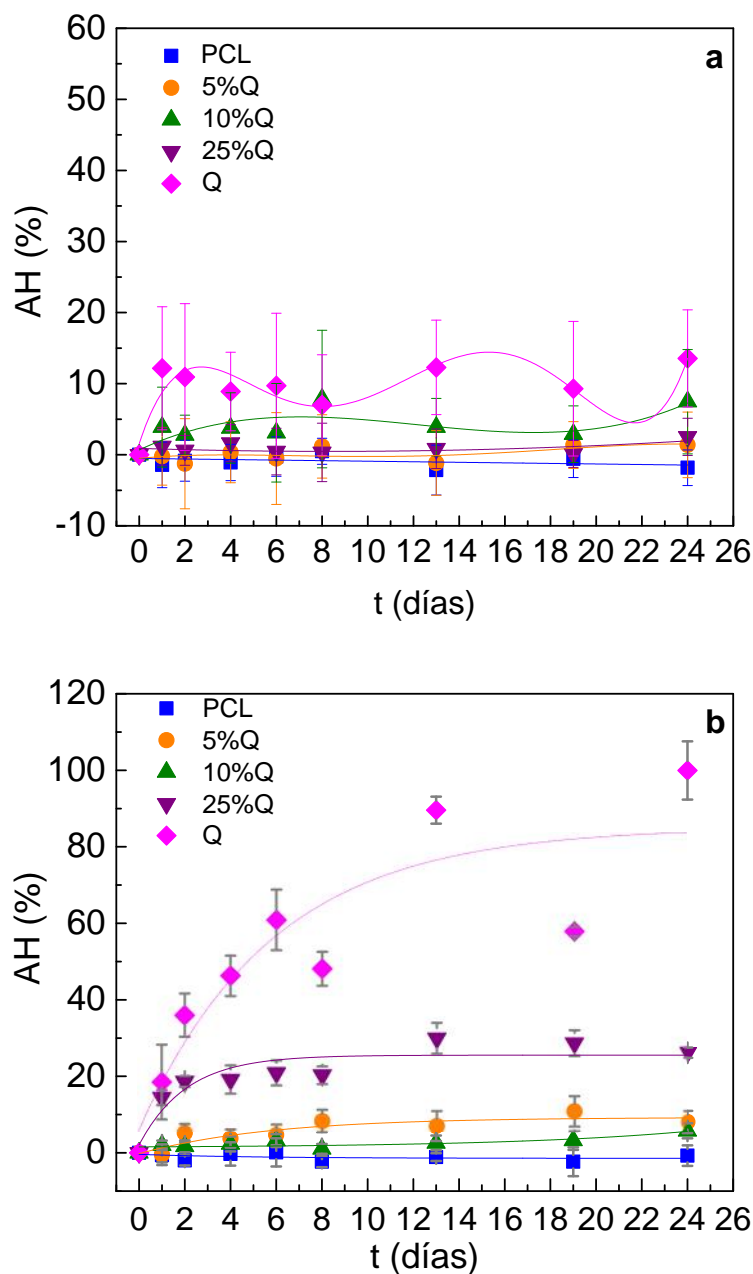


Figura 3.4 Porcentaje de absorción de humedad de andamios electrohilados: (a) 53% H. R, (b) 97% H. R

Para conocer el coeficiente de difusión, el cual está relacionado con la capacidad de difusión de un disolvente al interior de un material, se verificó el ajuste de los datos experimentales obtenidos a 97% H. R. con la ley de Fick (Ecuación 2, sección 2.3.4). El andamio de Q mostró un buen ajuste con el comportamiento tipo Fick (Figura 3.5) con una $D=1.5 \times 10^{-11} \text{ mm}^2/\text{s}$.

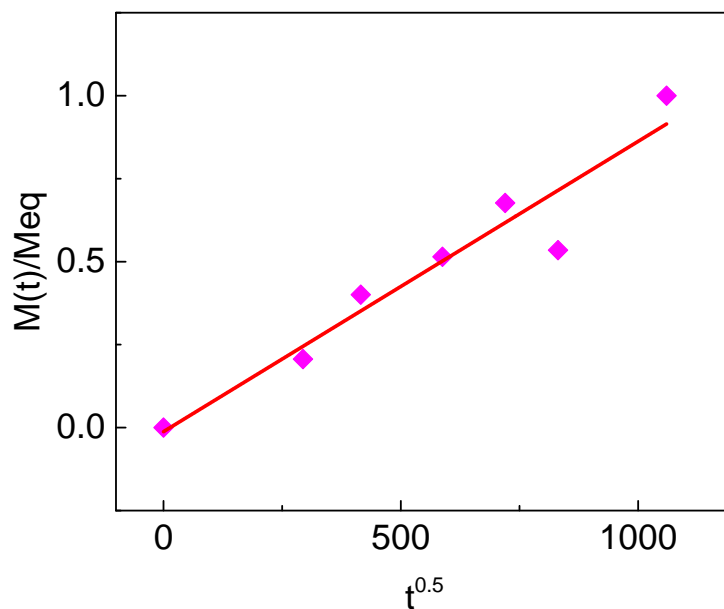


Figura 3.5 Ajuste de Fick para absorción de humedad de Q a 97% H. R

Aunque el coeficiente de difusión, D , también fue estimado para los andamios de PCL y de Q/PCL, en estos casos el ajuste fue poco preciso. Este comportamiento podría ser debido a que la absorción de agua en las mezclas depende de la hidratación del material en las zonas hidrófilas y el impedimento en las hidrófobas. Por lo tanto, se cree que la conducta exhibida por estas muestras obedecería a una cinética de orden superior.

De acuerdo a estos resultados, es claro que el grado de hidrofilia se puede regular con la cantidad de quitosano; de esta manera se pueden obtener una amplia gama de materiales con características superficiales específicas. Una

superficie completamente hidrófila minimizaría la adhesión de las proteínas necesarias para las funciones celulares, mientras que una completamente hidrófoba no permitiría la interacción célula-andamio; por ello es importante controlar las características relacionadas a la absorción de humedad [9, 96].

3.1.5 Calorimetría diferencial de barrido

Las propiedades térmicas de los andamios, obtenidas por calorimetría diferencial de barrido (DSC), se muestran en la Figura 3.7. Aunque el quitosano no presenta transiciones por esta técnica, las propiedades de la mezcla se pueden estudiar a través de los cambios en el comportamiento de la PCL. Este análisis incluyó dos ciclos de calentamiento; el primero, fue para observar los efectos del proceso de electrohilado en la cristalización de la PCL (Figura 3.6a) y, el segundo, para evaluar el comportamiento térmico real de los andamios poliméricos (Figura 3.6b). Las curvas obtenidas del segundo calentamiento muestran dos eventos endotérmicos. Este comportamiento que se ha observado en muchos polímeros cristalinos [97], podría estar asociado a la fusión de los cristales y al proceso de recristalización de los mismos. Durante el proceso de calentamiento, los cristales existentes se funden y al mismo tiempo el material fundido vuelve a cristalizar, posteriormente estos nuevos cristales se fundirán a mayor temperatura [98]. De acuerdo a lo anterior, el pico endotérmico de baja temperatura correspondería la fusión de los cristales producidos durante el electrohilado, mientras que el pico de mayor temperatura estaría asociado a la recristalización de la PCL. Por lo tanto, para este análisis se considera el pico de menor temperatura como la temperatura de fusión o T_m del andamio [99].

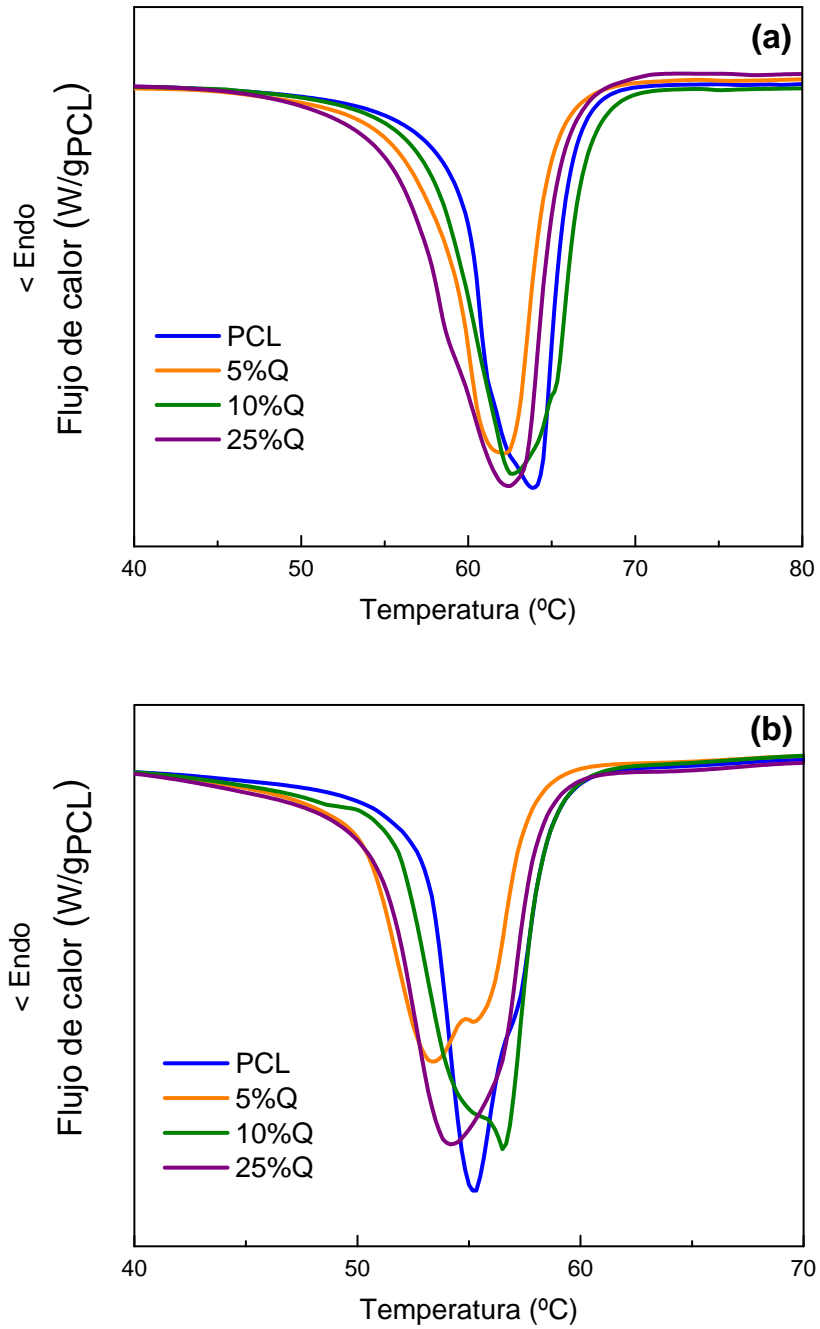


Figura 3.6 Termogramas de DSC de andamios electrohilados obtenidos en el primer (a) y segundo (b) calentamiento.

Estudios previos sobre mezclas de PCL con polisacáridos han demostrado que estos últimos interfieren en el proceso de cristalización de la PCL, por lo que la temperatura de fusión (T_m) disminuye a medida que la cantidad del polímero natural aumenta [55, 100, 101]; en otros casos, se ha reportado una tendencia más compleja [93]. En los resultados de esta investigación no se encontró una relación lineal entre la cantidad de Q y la T_m (Figura 3.6a y Figura 3.6b). Además, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los valores de T_m de los andamios de Q/PCL y la T_m del andamio de PCL, en ninguno de los dos calentamientos (Figura 3.7a).

Por otra parte, cabe señalar que los valores de T_m obtenidos en el primer calentamiento son mayores que los obtenidos en el segundo calentamiento. Esto puede ser atribuido a que el proceso de electrohilado promueve la cristalización de la PCL, ya que la PCL comercial (pellet) no mostró este comportamiento (Anexos, Figura A2).

El porcentaje de cristalinidad (X) mostró una tendencia similar a la observada con la T_m de los andamios de PCL; en el primer calentamiento se obtuvieron valores más altos de X que en el segundo calentamiento. Además, se puede notar que este parámetro aumenta ligeramente al aumentar la cantidad de quitosano en el andamio, aunque el análisis estadístico reveló que sólo hubo diferencia significativa entre el andamio 25%Q y la PCL (Figura 3.7b).

Malheiro *et al.* han sugerido que el Q tiene un efecto nucleante, lo que induciría la formación de cristalitos con menos defectos [93]. Ellos también reportan que este fenómeno está relacionado con el diámetro de las fibras. De acuerdo a Wong *et al.* [102] el electrohilado mejora el grado de cristalinidad debido a la alineación de las cadenas de PCL en dirección a las fibras. También señalan que el grado de orientación es mayor, mientras más pequeño sea el diámetro de las fibras. De manera análoga al análisis realizado por

Wong *et al.* se estudió la relación entre el diámetro de las fibras (reportadas en la Tabla 3.1) y el grado de cristalinidad (observado en la Figura 3.7b). Se puede notar que los resultados obtenidos en esta investigación presentan una tendencia similar a lo observado por Wong *et al.* [102], es decir, el grado de cristalinidad aumenta conforme disminuye el diámetro de las fibras (Figura 3.8).

Por otra parte, es un hecho conocido que la temperatura de transición vítrea (T_g) de un polímero pueden experimentar variaciones respecto de su valor convencional, si éste se encuentra formando parte de una mezcla polimérica miscible o parcialmente miscible. Con esto en mente, y teniendo en cuenta que la T_g de la PCL (pellet) fue de $-63\text{ }^\circ\text{C}$, se procedió al análisis de los termogramas obtenidos para todos los andamios electrohilados preparados en este trabajo (ver Anexos, Figura A3). Desafortunadamente, en ninguno de los casos fue posible observar de una manera clara la T_g de los andamios, por lo que no fue posible determinarla. Esto es debido, probablemente, a que los materiales obtenidos por el proceso de electrohilado son muy porosos y poco densos, por lo que sólo fue posible analizar algunos miligramos del material, lo cual dificultó la observación de la T_g .

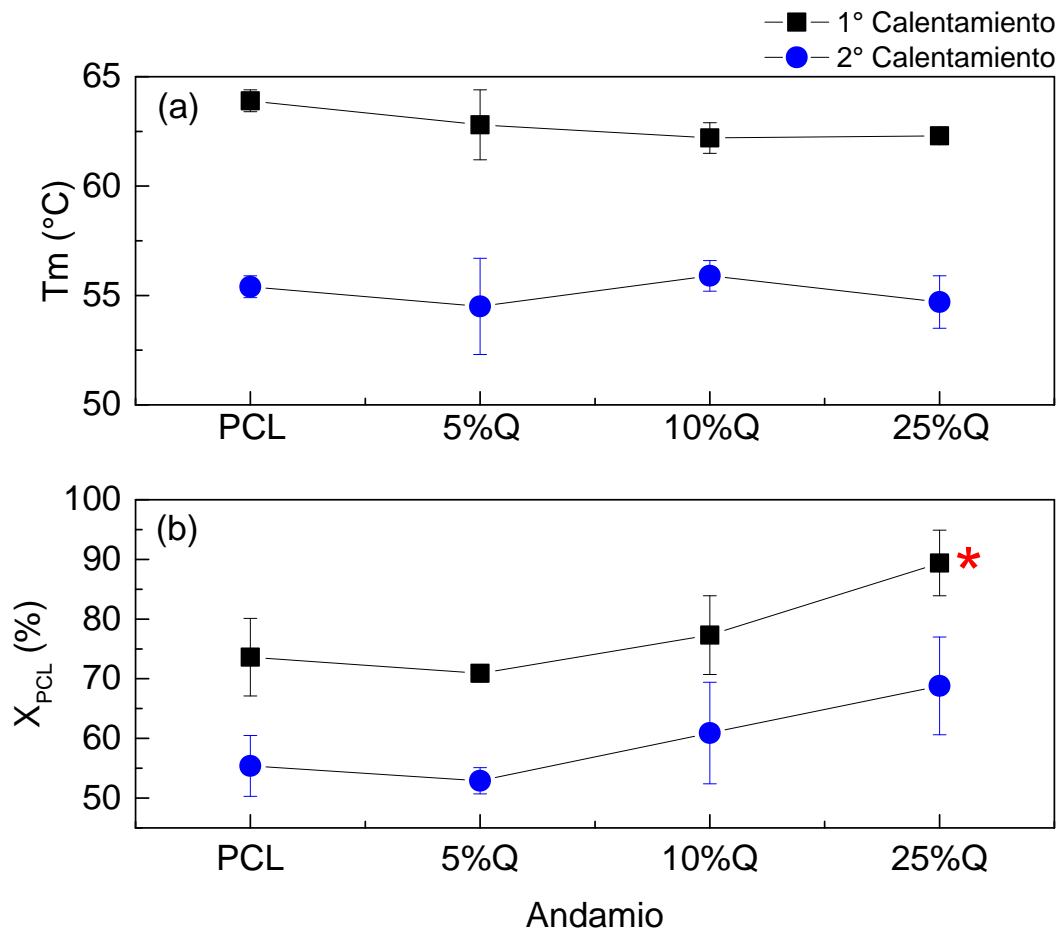


Figura 3.7 Temperatura de fusión (a) y grado de cristalinidad (b) de los andamios electrohilados (ANOVA una vía, $*p < 0.05$ en comparación con la PCL).

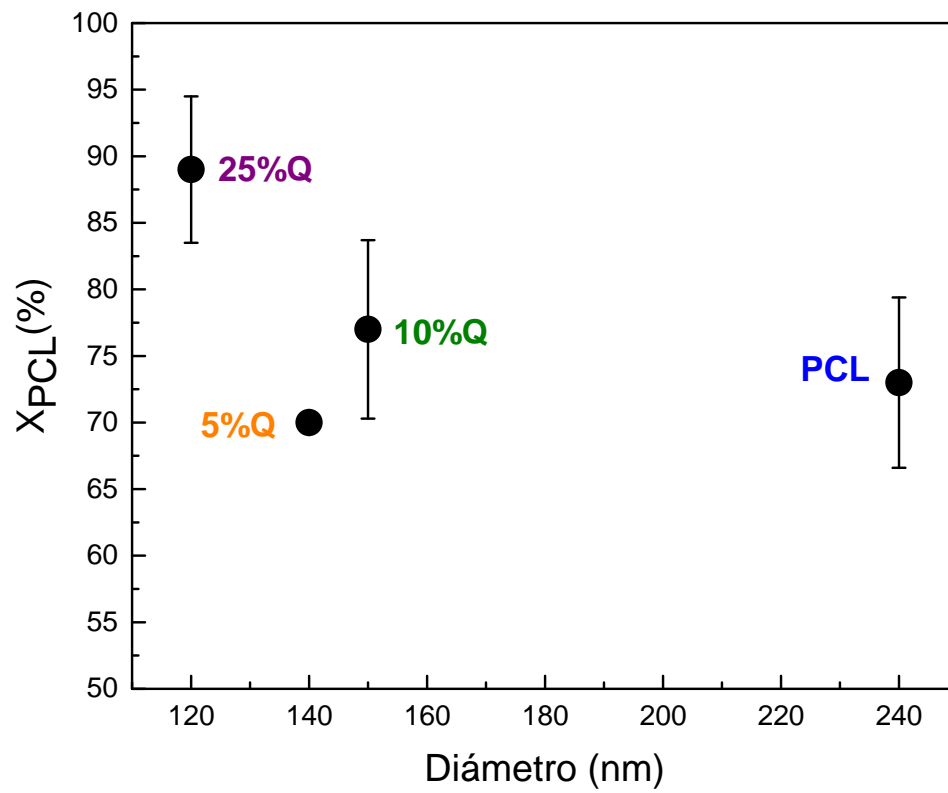


Figura 3.8 Relación entre el diámetro y el grado de cristalinidad de las fibras.

3.1.6 Análisis termogravimétrico

Se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) para conocer la estabilidad térmica de los materiales. Las curvas de pérdida de masa (Figura 3.9a) mostraron que los andamios de PCL y Q/PCL con diferentes cantidades, se degradan en una etapa, mientras que el Q presenta más etapas de degradación. Este comportamiento se aprecia mejor en las curvas de la primera derivada que se muestran en la Figura 3.9b. El andamio de quitosano (Q) presentó una ligera pérdida de masa alrededor de 60 °C, la cual está relacionada con la pérdida de agua. Posteriormente se registraron dos procesos de degradación; uno a 256 °C y el otro a 290 °C. Este comportamiento estaría relacionado con las especies protonadas que fueron detectadas en el análisis por FTIR. Chen *et al.* [103] estudiaron la descomposición de nanofibras de quitosano y seda. Ellos sugirieron que el primer pico (257 °C) corresponde a la descomposición de la sal $\text{NH}_3^+\text{-CF}_3\text{COO}^-$, mientras que el segundo pico (291 °C) corresponde a la descomposición del Q. Después del tratamiento con glutaraldehído, el Q-GA presenta un sólo proceso de degradación, alrededor de 290 °C, asociado con la descomposición del quitosano. Debido a la neutralización de las especies protonadas durante la reacción de entrecruzamiento, el pico en 256 °C ya no se observa [95] (Figura 3.10). El andamio de policaprolactona (PCL) muestra un sólo proceso de degradación en 358 °C, el cual ocurre antes si se compara con la PCL comercial ($T_{d_{\max}} \text{ pellet}=424$ °C). Algunos estudios sugieren que la hidrólisis ácida que experimenta la PCL por parte del TFA provoca la reducción en la $T_{d_{\max}}$ [47, 104]. La Figura 3.9b también muestra que la temperatura de degradación máxima de los andamios de las mezclas se desplaza a menores temperaturas al aumentar la cantidad de quitosano en el andamio [105]. Debido a que se requiere utilizar mayor cantidad del

disolvente ácido para la disolución del quitosano, se produce mayor degradación en la PCL.

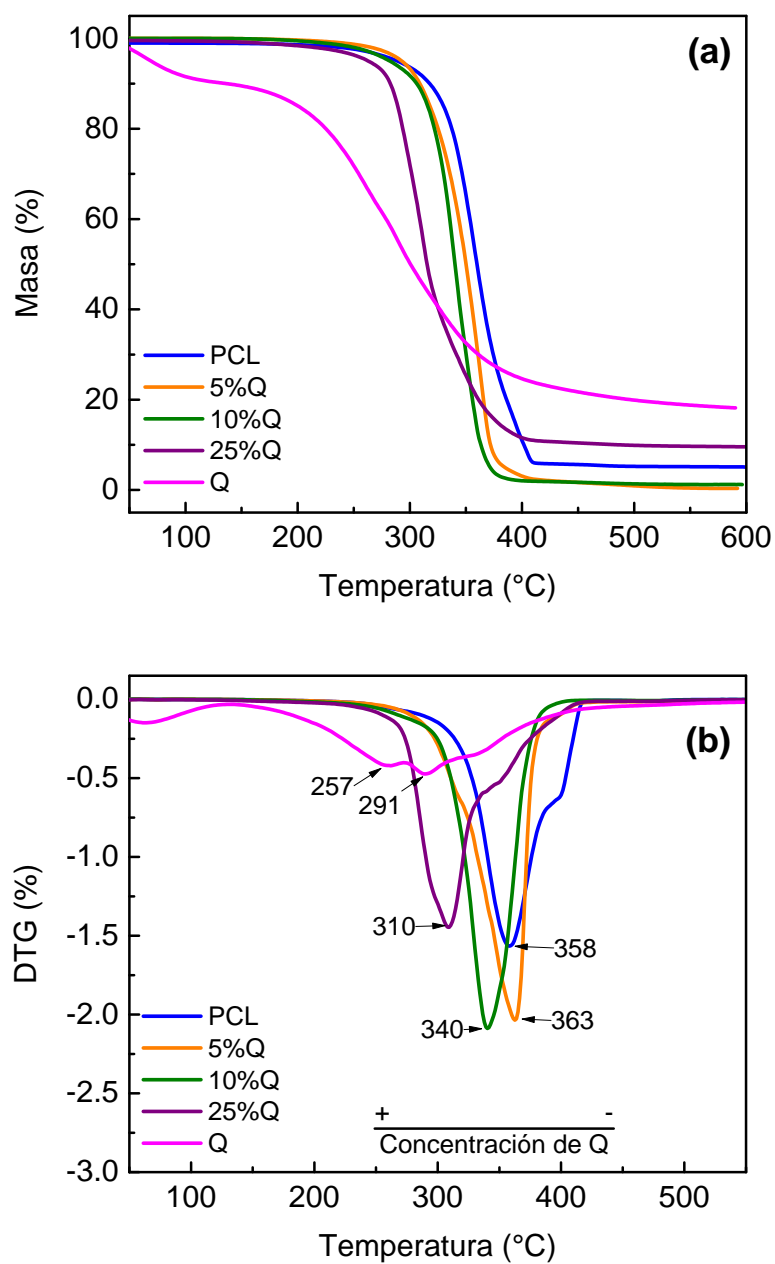


Figura 3.9 Curvas de pérdida de masa versus temperatura (a) y primera derivada de la pérdida de masa versus temperatura (b) de los andamios electrohilados.

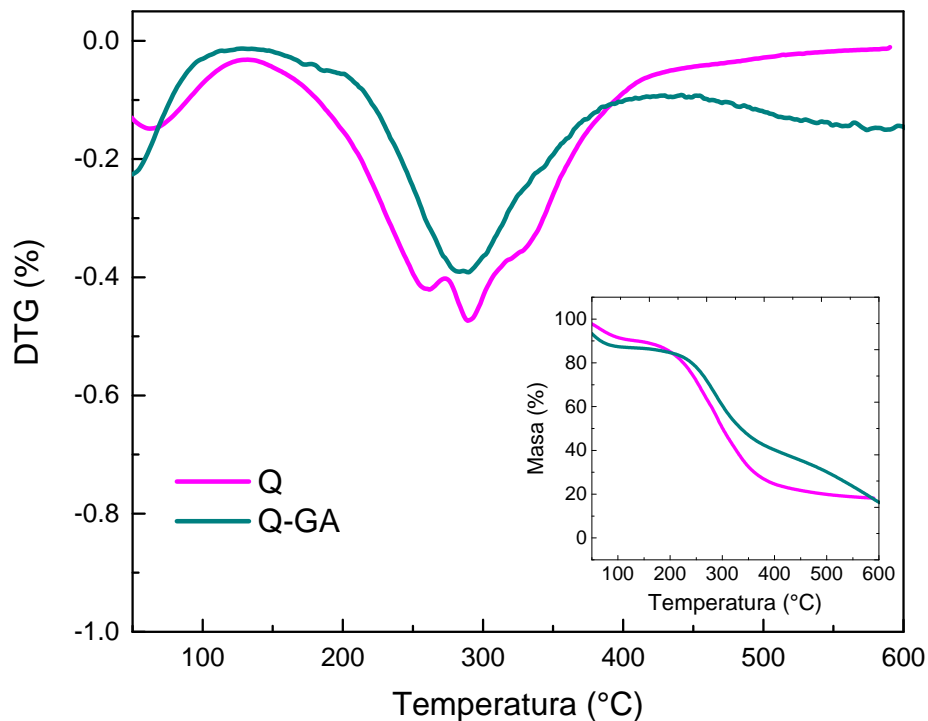


Figura 3.10 Primera derivada de la pérdida de masa versus temperatura del andamio de quitosano electrohilado sin y con tratamiento de glutaraldehído.

La curva de pérdida de masa versus temperatura se muestra en el gráfico insertado.

3.1.7 Cromatografía de permeación en gel

Los pesos moleculares de los diferentes andamios obtenidos por electrohilado fueron medidos por cromatografía de permeación en gel (GPC). La Figura 3.11 muestra los cromatogramas de los andamios de Q/PCL con diferentes concentraciones de quitosano. Las curvas de los andamios con 5%Q, 10%Q y 25%Q presentan una distribución de pesos moleculares más amplia que la curva de PCL. La aparición de especies de menor peso molecular puede estar relacionada con la hidrólisis ácida de la PCL debido al TFA [47].

Aparentemente, la curva del andamio de quitosano es más pequeña que el resto de las curvas; sin embargo, se debe mencionar que la solubilidad de esta muestra en el disolvente empleado en el GPC (DMF) es parcial. La Tabla 3.4 presenta los resultados obtenidos de la masa molar promedio en peso (M_w), la masa molar promedio en número (M_n), y el índice de polidispersidad ($PI=M_w/M_n$). Cabe hacer hincapié en que, aunque estos parámetros fueron medidos como equivalentes de poliestireno, los resultados nos ofrecen una idea de los cambios que ocurren en los andamios durante el proceso de electrohilado.

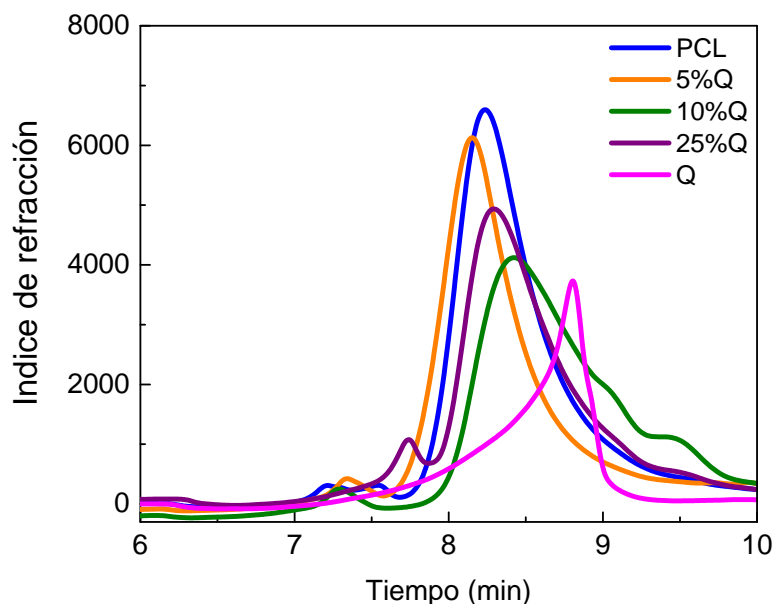


Figura 3.11 Cromatogramas de los andamios electrohilados

Tabla 3.4 Masa molar promedio en número (Mn), masa molar promedio en peso (Mw) e índice de polidispersidad (IP=Mw/Mn) de los andamios electrohilados.

| Andamios | Mn g/mol (10^4) | Mw g/mol (10^4) | IP (Mw/Mn) |
|----------|------------------------|------------------------|---------------|
| PCL | 1.78 | 2.97 | 1.66 |
| 5/95 | 2.82 | 3.87 | 1.37 |
| 10/90 | 1.00 | 1.91 | 1.90 |
| 25/75 | 1.66 | 2.51 | 1.51 |
| Q | 1.56 | 2.70 | 1.72 |

3.2 Caracterización biológica

Para la realización de los ensayos biológicos, los andamios colectados en la placa plana del equipo de electrohilado, se cortaron en forma circular, de un tamaño de 8 mm de diámetro, tal como se muestra en la Figura 3.12.

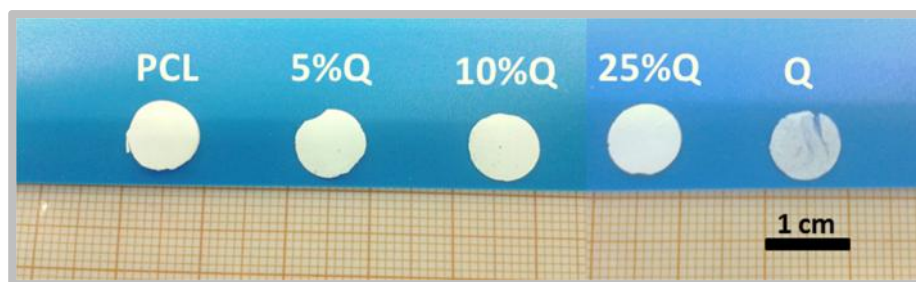


Figura 3.12 Especímenes utilizados en los ensayos biológicos.

3.2.1 Ensayo de citotoxicidad usando fibroblastos

Los andamios electrohilados se prepararon a partir de soluciones poliméricas empleando disolventes orgánicos, los cuales se evaporan durante la formación de las fibras. Sin embargo, las trazas de disolventes atrapadas en las fibras, pueden inducir citotoxicidad. Con la finalidad de evaluar el potencial de estos materiales para el cultivo celular, se eligieron los andamios de policaprolactona (PCL) y quitosano (Q) para el ensayo de citotoxicidad indirecta usando fibroblastos L929. El estudio se realizó de acuerdo a la norma ISO 10993-5, la cual establece que un material no es citotóxico siempre que su viabilidad celular sea mayor al 70%.

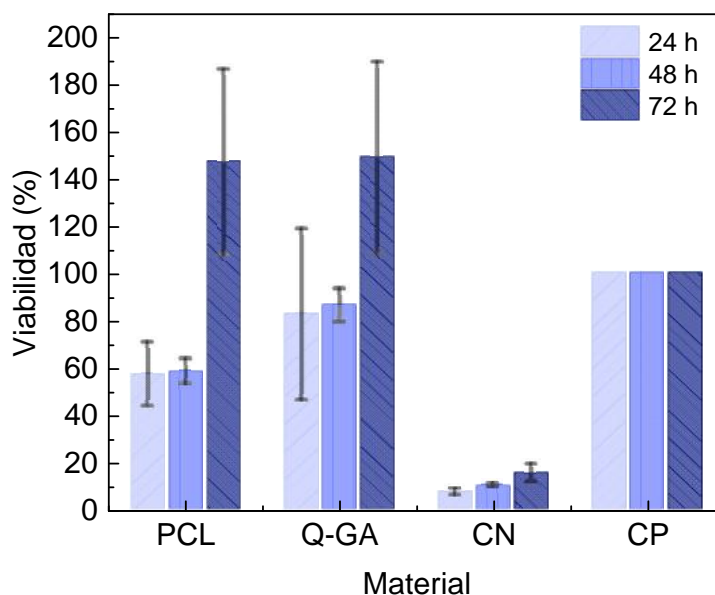


Figura 3.13 Biocompatibilidad de andamios de PCL y Q-GA con fibroblastos L929 por contacto indirecto (CN: Control negativo, CP: Control positivo) (ANOVA de una vía con $p < 0.05$ y análisis de Tukey).

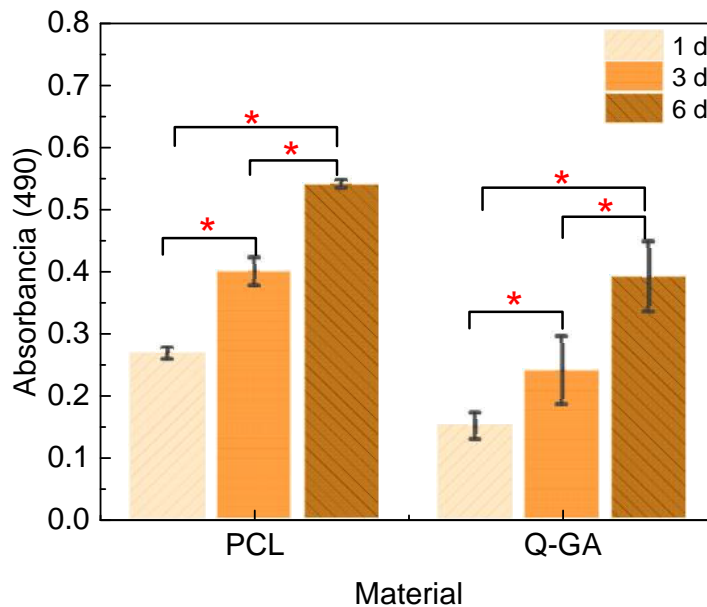


Figura 3.14 Biocompatibilidad de fibroblastos L929 por contacto directo (ANOVA de una vía con $p < 0.05$ y prueba de Tukey).

Durante las primeras 48 h, la viabilidad de la PCL fue menor al 70%, pero después de 72 h este porcentaje se incrementó, por lo que se puede decir que el material no es citotóxico. Este comportamiento puede estar relacionado con la liberación de trazas de disolventes durante los dos primeros días. En contraste, los andamios de Q mantuvieron una viabilidad celular arriba del 80%, a pesar de haber sido entrecruzados con glutaraldehído (GA) (Figura 3.13). El comentario anterior obedece a que algunos estudios señalan que la presencia de trazas de GA pueden ser citotóxicas [58] (aunque este efecto puede ser minimizado haciendo lavados con agua para eliminar los residuos [106, 107]). Cabe señalar que estos resultados se obtuvieron con extractos sin diluir. Posteriormente las células L929 se pusieron en contacto directo con los andamios de PCL y de quitosano. La Figura 3.14 muestra claramente que conforme transcurre el tiempo (aumento de días) se incrementa el número de

células cuando están en contacto directo con el andamio, lo cual indica que los fibroblastos proliferaron tanto en la PCL como en el Q-GA. Estos resultados demuestran que los andamios electrohilados no son citotóxicos, de acuerdo a los parámetros establecidos por la norma ISO 10993-5.

3.2.2 Morfología de fibroblastos L929 sobre los andamios electrohilados

La morfología que presentan las células L929 sobre los andamios electrohilados se observó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y microscopía confocal, después de 6 días de cultivo (Figura 3.15).

Las imágenes de SEM muestran que las células sembradas sobre la PCL exhiben una forma semiesférica y se encuentran formando aglomeraciones (Figura 3.15a), incluso en algunas zonas se logran apreciar las fibras que conforman el andamio. En contraste, las células se extendieron considerablemente sobre el andamio de quitosano (Figura 3.15b), cubriendo gran parte de la superficie estudiada, sin que sea posible distinguir las fibras electrohiladas. Este fenómeno está relacionado con diferencias en la tasa de proliferación celular sobre cada tipo de sustrato, tal y como fue reportado en otros estudios [108, 109]. De acuerdo al estudio de viabilidad (Figura 3.13), después de 6 días, la población de células en el andamio de PCL se duplicó, mientras que en el de Q el incremento fue casi del triple; es decir, la tasa de proliferación en el andamio de Q fue mayor, por lo que alcanzó confluencia más rápido. Es interesante señalar la forma alineada que adoptaron algunos fibroblastos. Esta conformación ya ha sido observada en otras investigaciones, sobre todo en aquellas que utilizan andamios hechos de polímeros naturales como el colágeno [108, 109]. En contraste, las células mantienen una forma semiesférica en otras superficies como la PCL [110]. Para el análisis con

microscopio confocal, el citoesqueleto de las células fue teñido con faloidina (verde) mientras que los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Las imágenes de la Figura 3.15 permiten observar claramente el núcleo y la membrana de las células L929 sobre los andamios de PCL (Figura 3.15b) y de Q-GA (Figura 3.15d).

De acuerdo a estos resultados, los andamios de Q y de PCL no son citotóxicos y, además tienen una buena capacidad de soportar la adhesión celular. Por lo tanto, los andamios de mezclas hechos a partir de estos mismos materiales no deben presentar toxicidad.

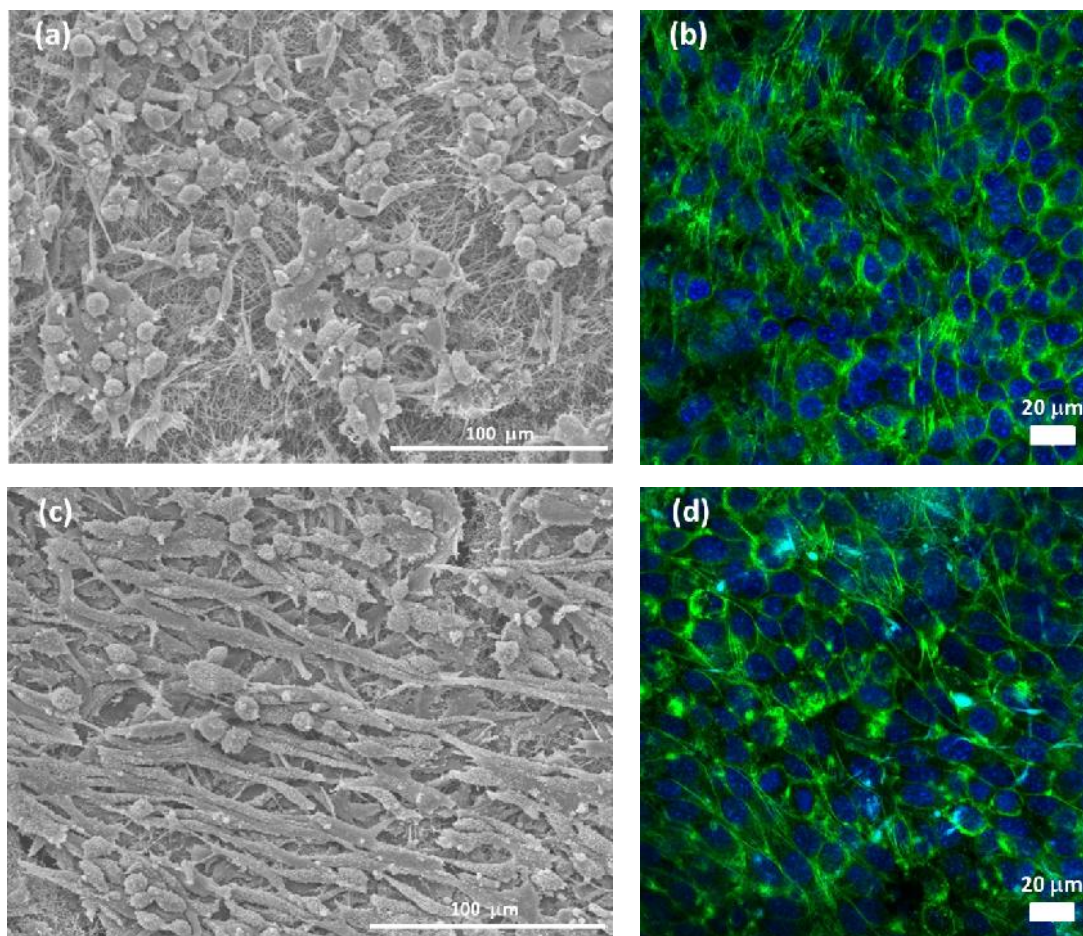


Figura 3.15 Imágenes de microscopía confocal (b, d) y de SEM (a, c) del cultivo de células L929 sobre andamios de PCL (a, b) y de Q-GA (c, d).

3.2.3 Ensayo de viabilidad usando células de Schwann

Las células de Schwann (SC) se encuentran en el endoneuro, que junto con el epineuro y el perineuro componen la estructura de los nervios periféricos [12]. Estas células son muy importantes en la regeneración de nervios periféricos, pues promueven el crecimiento axonal [13] secretando moléculas bioactivas y/o factores que favorecen la regeneración, guiando los axones. Por ello, las SC son un buen modelo para evaluar biológicamente aquellos materiales diseñados para reparación de nervios periféricos.

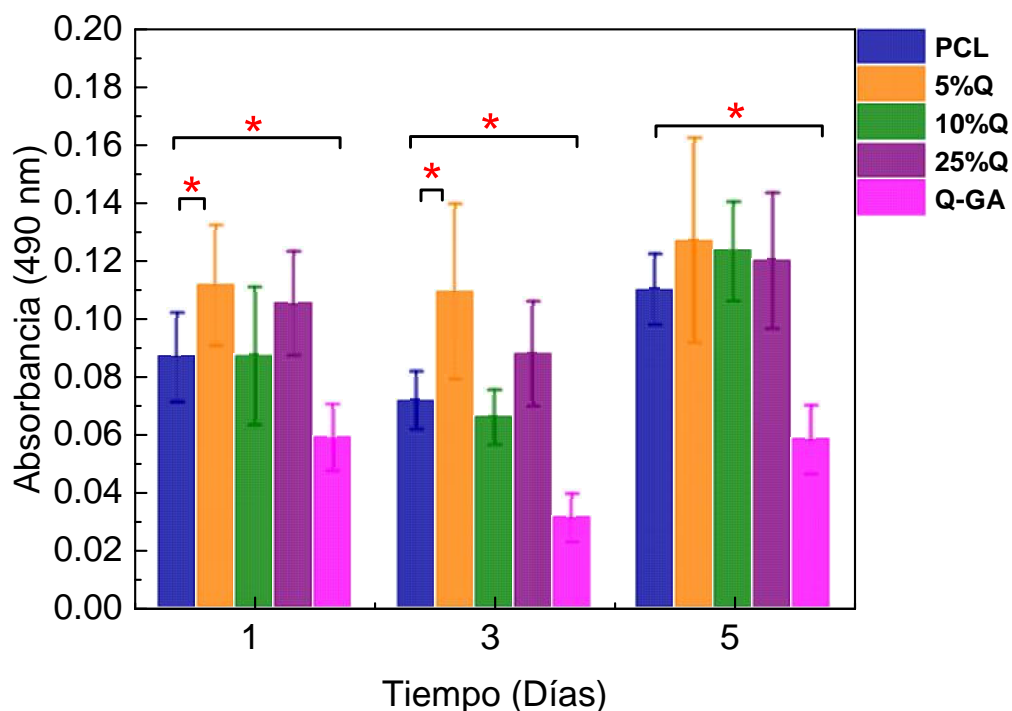


Figura 3.16 Viabilidad de células de Schwann sembradas sobre andamios electrohilados de PCL, Q-GA, 5%Q, 10%Q y 25%Q (ANOVA de una vía, $p < 0.05$ versus PCL).

Se cultivaron SC sobre los andamios electrohilados y se estudió su viabilidad a 1, 3 y 5 días (Figura 3.16). Las células mantuvieron su actividad metabólica durante los cinco días de estudio, aunque no se observó proliferación de éstas conforme transcurrió el tiempo (durante el período estudiado). Este comportamiento puede estar relacionado con la lenta tasa de proliferación de las SC en andamios electrohilados, tal como se ha reportado por Suwantong *et al.* [111]. No obstante, se observaron algunas diferencias importantes durante el estudio. En el primer día, la viabilidad del andamio con 5%Q fue significativamente mayor que en el de PCL. Este mismo comportamiento se observó a los 3 días donde nuevamente el andamio con 5%Q tuvo mayor número de células que el andamio de PCL. Fukunishi *et al.* [112] prepararon andamios de Q/PCL y encontraron que una porción pequeña de quitosano en la mezcla es suficiente para mejorar la compatibilidad biológica de la PCL. Los resultados de la Figura 3.16 sugieren que pequeñas cantidades de quitosano mejoran la biocompatibilidad de las mezclas.

La Figura 3.16 también muestra que el Q-GA fue el material que presentó menor viabilidad durante todo el estudio. Sangsanoh *et al.* [113] estudiaron la viabilidad de SC en andamios electrohilados de PCL y de quitosano; ellos observaron que las nanofibras de PCL presentaron mayor viabilidad que las nanofibras de quitosano en 1, 3 y 5 días. El quitosano es un polímero natural de mucho interés en aplicaciones médicas debido a que posee una estructura similar a los glicosaminoglicanos. Estos compuestos están presentes en la matriz extracelular, y se conocen por modular la actividad neural y la extensión de las neuritas [13], por lo que el uso de matrices con estructuras químicas similares podrían imitar algunas de las propiedades de la matriz extracelular. Además, la naturaleza hidrófila del quitosano está íntimamente relacionada con la proliferación y adhesión celular [9]. Sin embargo, un

material altamente hidrófilo no necesariamente induce mejor biocompatibilidad a corto plazo. Algunas células como los fibroblastos, las células endoteliales y las epiteliales se adhieren y proliferan mejor en superficies con ángulos de contacto de alrededor de 60° [96, 114]. Los resultados de los experimentos de ángulo de contacto en agua (ver Tabla 3.3), y de absorción de humedad utilizando un medio acuoso (ver Figura 3.4) confirmaron el carácter hidrófilo del Q, así como su capacidad de absorber agua. Por lo tanto, la baja viabilidad celular del Q con respecto a la PCL y a las mezclas de Q/PCL probablemente está relacionada con la baja absorción de proteínas y a la presencia de trazas de disolventes derivadas del proceso de electrohilado.

En general, se observa que la variación en la relación Q/PCL originan cambios que se ven reflejados en varios aspectos como el tamaño de las fibras y grados de hidrofilia en los andamios electrohilados que a su vez tiene un efecto sinérgico en la viabilidad celular.

3.2.4 Morfología de las células de Schwann sobre andamios electrohilados

La morfología de las SC sembradas sobre los andamios electrohilados fue analizada por SEM, después de cinco días de cultivo (Figura 3.17). Como se observa en la Figura, después de este período de tiempo, las SC adoptaron una morfología fusiforme en todos los materiales estudiados. Además, es posible apreciar cómo las células extendieron su citoplasma en forma de fibrillas delgadas y alargadas a través de todo el sustrato. Esto indica que las células están bien adheridas al material, ya que de lo contrario la morfología celular sería semiesférica [26, 113].

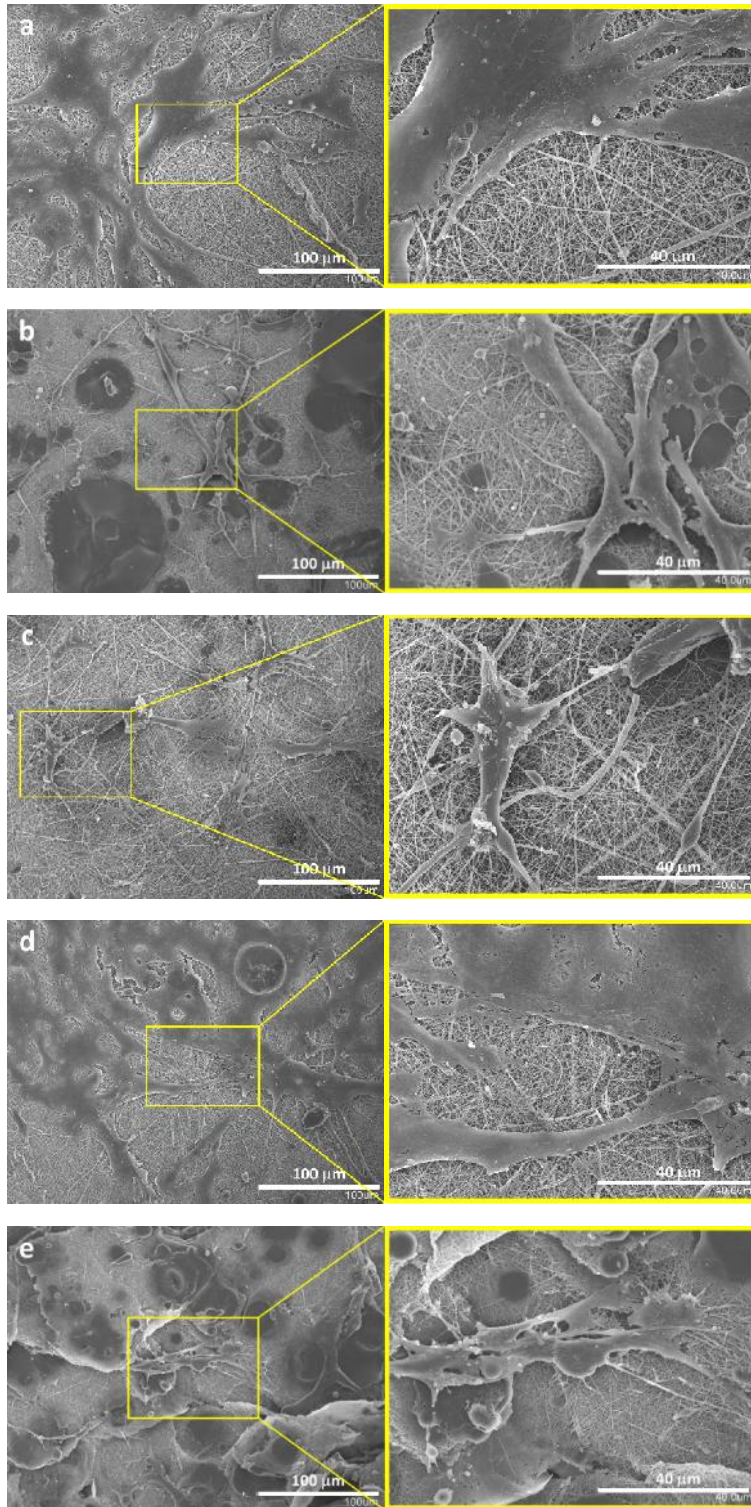


Figura 3.17 Imágenes de SEM de los andamios con células de Schwann sembradas sobre andamios electrohilados de (a) PCL, (b) Q, (c) 5%Q, (d) 10%Q y (e) 25%Q.

Por otra parte, se realizó un análisis inmunocitoquímico para estudiar la viabilidad de las células adheridas sobre la superficie de los andamios electrohilados. Las imágenes de microscopía confocal (Figura 3.18) confirmaron la existencia de células viables, a través de la expresión del marcador p75 (verde). Este marcador es específico de las células de Schwann y está relacionado con el factor de crecimiento neuronal. El núcleo celular fue teñido con DAPI (azul).

Las imágenes de microscopía confocal confirmaron la adhesión de las células de Schwann en todos los andamios electrohilados. A pesar del bajo nivel de proliferación del quitosano en el ensayo MTS, las células igualmente se adhirieron sobre este sustrato. Como se puede ver en la Figura 3.18, las SC extendieron su citoplasma en todos los andamios electrohilados. Sin embargo, todas las mezclas de polímeros (5%Q, 10%Q y 25%Q) promovieron una mejor distribución celular. En contraste, las células SC permanecieron aglomeradas en los andamios de PCL y de manera más notable en el andamio de Q. Estos resultados indican que las células adoptan diferentes características de adhesión, en función de las propiedades del sustrato. Como se mencionó anteriormente, el andamio de PCL es altamente hidrófobo mientras que el Q es hidrófilo. La mezcla de estos dos polímeros permite regular el nivel de hidrofobia/hidrofilia de la superficie del andamio, que a su vez produce una mayor interacción de las células con el material, y que se ve reflejado en una mejor distribución celular y en una mayor extensión de los procesos celulares [115], comparados con los andamios de los polímeros solos. De acuerdo con Shao *et al.* [116], las diferencias en la morfología celular también están relacionadas con funciones celulares específicas, como la expresión de las proteínas necesarias para la regeneración de tejidos. Por lo

tanto, es posible combinar las ventajas de la PCL y del Q para obtener andamios que permitan regular la morfología, distribución y adhesión celular.

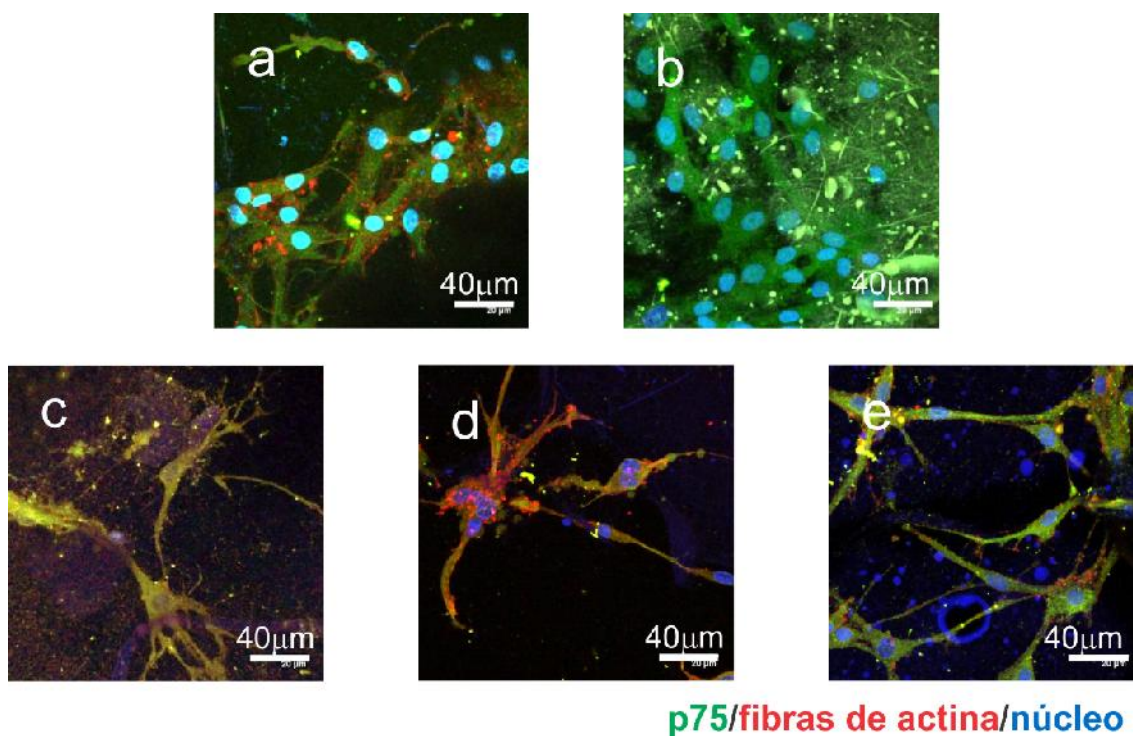


Figura 3.18 Imágenes de microscopio confocal de andamios de (a) PCL, (b) Q, (c) 5% Q, (d) 10% Q y (e) 25% Q. El p75 (expresado por células de Schwann, verde), así como las fibras de actina (rojo) y el núcleo (azul) fueron marcados en las células de Schwann.

3.2.5 Tratamiento superficial de los andamios con poli-D-lisina

La adhesión celular es un proceso que ocurre en dos etapas. El primer paso involucra la adsorción celular no específica y, posteriormente, se lleva a cabo la adsorción específica. Previo a la adhesión específica, es necesario que las proteínas de adhesión secretadas por las células sean adsorbidas por el material [117].

Los andamios electrohilados fueron recubiertos con poli-D-lisina (PDL), para estudiar el efecto del tratamiento con esta proteína en la adhesión de las SC. Después de 5 días de cultivo, las células SC se adhirieron a los materiales con y sin PDL (Figura 3.19). El tratamiento superficial no produjo diferencia significativa en la población celular de los andamios de PCL, 5%Q, 10%Q, 25%Q. Sin embargo, es interesante notar que el andamio de Q tratado con PDL mostró mayor número de células que el andamio sin la proteína.

En las imágenes de microscopía confocal se aprecia que hay mayor número de células en los andamios de Q con tratamiento de PDL que en los no tratados. Además, en las imágenes de SEM se aprecia una morfología fusiforme de las SC en los dos casos (Figura 3.20). El tratamiento con proteínas, previo a la siembra celular, es un método útil para mejorar la adhesión de las SC en los andamios de Q.

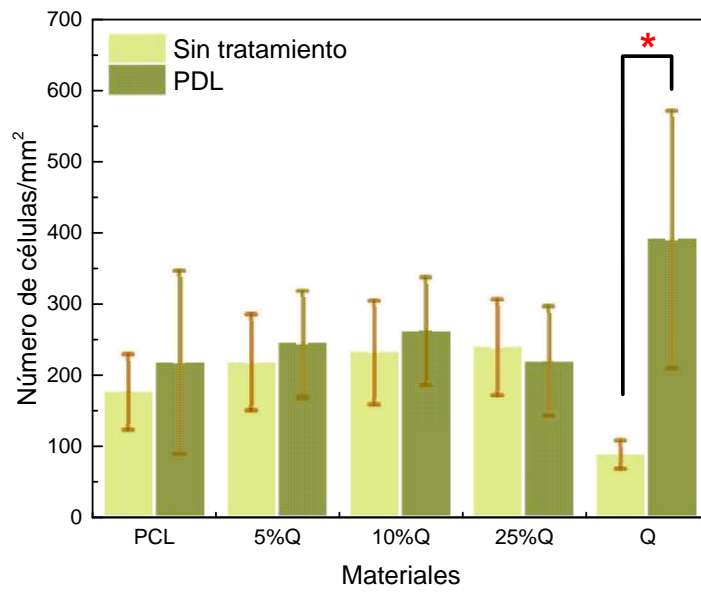


Figura 3.19 Población de SC sobre andamios electrohilados con y sin recubrimiento de poli-D-lisina

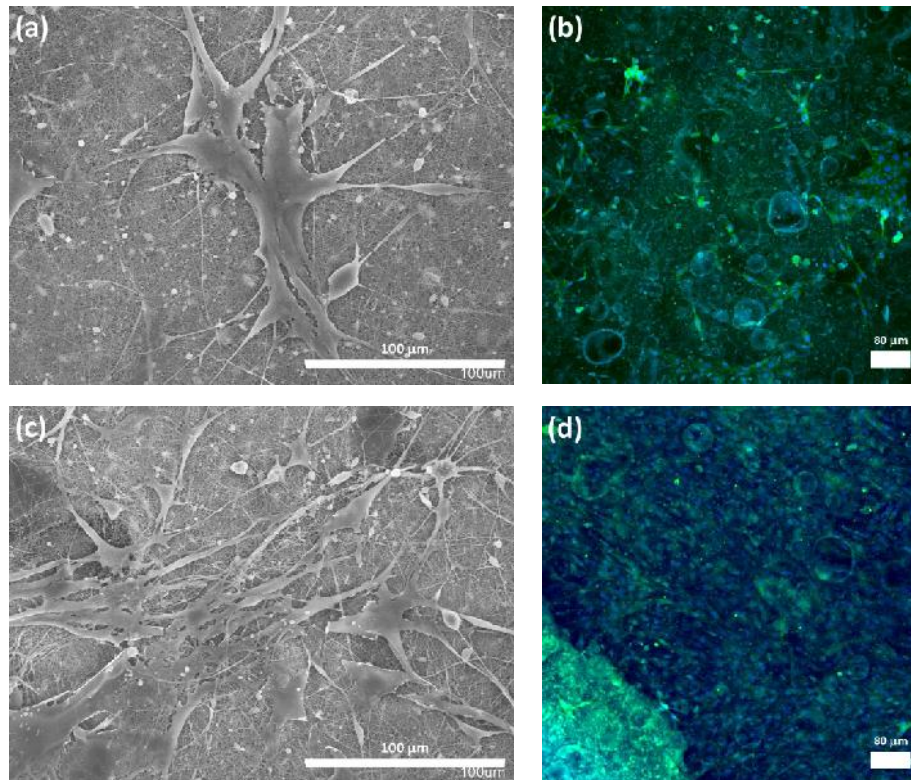


Figura 3.20 Imágenes de SEM (a, c) y microscopio confocal (b, d) de andamios de Q sin tratamiento (a, b) y con tratamiento de PDL (c, d). El p75 (expresado por células de Schwann, verde) y el núcleo (azul) fueron marcados en las células de Schwann.

Conclusiones

Se obtuvieron andamios de policaprolactona (PCL), quitosano (Q), así como de la mezcla de ambos polímeros a tres diferentes concentraciones, y se estudiaron las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los andamios.

El diámetro de las nanofibras de los andamios disminuyó con el incremento en la cantidad de quitosano.

Por medio de FTIR y EDX se detectó la presencia de disolvente residual en los andamios de Q, el cual fue prácticamente eliminado con el tratamiento a base de glutaraldehído.

La incorporación de Q a los andamios produjo materiales con mayor carácter hidrófilo; además, el ensayo de absorción de humedad demostró que parte del Q se encuentra en la superficie del andamio.

La PCL experimentó hidrólisis ácida debido al ácido trifluoroacético utilizado en la preparación de las nanofibras. Esto provocó una disminución en la estabilidad térmica de los andamios. El análisis de GPC mostró la presencia de fracciones de peso molecular diferente a la distribución principal, lo cual probablemente esté relacionado con la degradación. La temperatura de fusión de la PCL no fue modificada en las mezclas, aunque el grado de cristalinidad parece aumentar con un incremento de la cantidad de Q en el andamio.

El estudio biológico demostró que las células de Schwann se adhirieron a la superficie de todos los andamios, aunque el andamio con 5%Q mostró la mayor proliferación celular en los días 1 y 3. El análisis inmunocitoquímico confirmó la viabilidad de las células presentes en los materiales, lo que sugiere que los andamios a base de Q/PCL son buenos candidatos para ser usados en ingeniería de tejidos de nervio periférico.

Recomendaciones

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que los andamios elaborados a base de mezcla de quitosano y policaprolactona poseen características físicas y de biocompatibilidad que son adecuadas para su uso en el tratamiento de lesiones en nervios periféricos. No obstante, para futuras investigaciones se recomienda:

- Reducir el tiempo de mezclado de las soluciones para evitar la hidrólisis ácida de la PCL.
- Caracterizar la porosidad de los andamios, ya que es un parámetro importante para el proceso de infiltración celular.
- Realizar la caracterización mecánica de los andamios, principalmente ensayos a tensión.
- Establecer una metodología viable para implantar el andamio en condiciones *in vivo* a partir de la película fibrosa y así formar el conducto tubular mimetizando la geometría de un nervio periférico

Referencias

- [1] G. Ciardelli, V. Chiono, Materials for peripheral nerve regeneration, *Macromol Biosci* 6(1) (2006) 13-26.
- [2] S. Kehoe, X.F. Zhang, D. Boyd, FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy, *Injury* 43(5) (2012) 553-72.
- [3] N. Sarvazyan, Creation of Living Tissue: An Engineering Feat, in: B. Obradovi (Ed.), *Cell and Tissue Engineering*, Springer Berlin Heidelberg, Belgrade, Serbia, 2012, pp. 1-8.
- [4] M.Ø. Andersen, J. Kjems, RNA Interference Enhanced Implants, in: M. Zilberman (Ed.), *Active Implants and Scaffolds for Tissue Regeneration*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011, pp. 145-165.
- [5] R. Langer, J. Vacanti, Tissue engineering, *Science* 260(5110) (1993) 920-926.
- [6] V. Chiono, C. Tonda-Turo, G. Ciardelli, Chapter 9 Artificial Scaffolds for Peripheral Nerve Reconstruction, in: R.J. Bradley, R.A. Harris, P. Jenner (Eds.), *International Review of Neurobiology*, Academic Press, United States of America, 2009, pp. 173-198.
- [7] D. Arslantunali, T. Dursun, D. Yucel, N. Hasirci, V. Hasirci, Peripheral nerve conduits: technology update, *Medical Devices: Evidence and Research* 7 (2014) 405-24.
- [8] T.K. Dash, V.B. Konkimalla, Polymeric modification and its implication in drug delivery: poly-epsilon-caprolactone (PCL) as a model polymer, *Molecular pharmaceutics* 9(9) (2012) 2365-2379.
- [9] M.P. Prabhakaran, J.R. Venugopal, T.T. Chyan, L.B. Hai, C.K. Chan, A.Y. Lim, S. Ramakrishna, Electrospun biocomposite nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering, *Tissue engineering. Part A* 14(11) (2008) 1787-97.
- [10] K. Tuzlakoglu, R.L. Reis, Biodegradable Polymers for Guided Nerve Regeneration, in: R.L. Reis, J.S. Román (Eds.), *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Taylor & Francis, United States of America, 2004, pp. 544-550.
- [11] I.P. Clements, J.M. Munson, R.V. Bellamkonda, Chapter II.6.14 - Neuronal Tissue Engineering in: B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons (Eds.), *Biomaterials Science* Academic Press, Canada, 2013, pp. 1291-1306.
- [12] P. Dalton, A. Harvey, M. Oudega, G. Plant, Chapter 20 - Tissue engineering of the nervous system, in: B. Clemens van, T. Peter, L. Anders, H.

- Jeffrey, F.W. David, C. Ranieri, D.d.B. Joost, J. Sohler (Eds.), Tissue engineering, Academic Press, Burlington, 2008, pp. 611-647.
- [13] C.E. Schmidt, J.B. Leach, Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration, Annual review of biomedical engineering 5 (2003) 293-347.
- [14] M.G. Burnett, E.L. Zager, Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review, Neurosurgical focus 16(5) (2004) E1.
- [15] C. Murray-Dunning, S.L. McArthur, T. Sun, R. McKean, A.J. Ryan, J.W. Haycock, Three-Dimensional Alignment of Schwann Cells Using Hydrolysable Microfiber Scaffolds: Strategies for Peripheral Nerve Repair, in: J.W. Haycock (Ed.), 3D Cell Culture Methods and Protocols, Humana Press, United States of America, 2010, pp. 155-166.
- [16] J.B. Recknor, S.K. Mallapragada, Nerve Regeneration: Tissue Engineering Strategies, in: J.P. Fisher, A.G. Mikos, J.D. Bronzino (Eds.), Tissue engineering, CRC Press, United States of America, 2006, pp. 19_1-19_22.
- [17] C.W. Patrick Jr, A.G. Mikos, L.V. McIntire, Prospectus of Tissue Engineering, in: C.W. Patrick Jr, A.G. Mikos, L.V. McIntire (Eds.), Frontiers in Tissue Engineering, Pergamon, Oxford, 1998, pp. 3-11.
- [18] G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, Scaffold Design for Tissue Engineering, Macromolecular Bioscience 2(2) (2002) 67-77.
- [19] C.A.v. Blitterswijk, L. Moroni, J. Rouwkema, R. Siddappa, J. Sohler, Tissue engineering – an introduction, in: B. Clemens van, T. Peter, L. Anders, H. Jeffrey, F.W. David, C. Ranieri, D.d.B. Joost, J. Sohler (Eds.), Tissue engineering, Academic Press, Burlington, 2008, pp. xii-xxxvi.
- [20] J. Igwe, A. Amini, P. Mikael, C. Laurencin, S. Nukavarapu, Nanostructured Scaffolds for Bone Tissue Engineering, in: M. Zilberman (Ed.), Active Implants and Scaffolds for Tissue Regeneration, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, 2011, pp. 169-192.
- [21] M. Gomes, H. Azevedo, P. Malafaya, S. Silva, J. Oliveira, G. Silva, R. Sousa, J. Mano, R. Reis, Chapter 6 - Natural Polymers in tissue engineering applications, in: B. Clemens van, T. Peter, L. Anders, H. Jeffrey, F.W. David, C. Ranieri, D.d.B. Joost, J. Sohler (Eds.), Tissue engineering, Academic Press, Burlington, 2008, pp. 145-192.
- [22] A. Timnak, F.Y. Gharebaghi, R.P. Shariati, S.H. Bahrami, S. Javadian, H. Emami Sh, M.A. Shokrgozar, Fabrication of nano-structured electrospun collagen scaffold intended for nerve tissue engineering, Journal of materials science. Materials in medicine 22(6) (2011) 1555-67.
- [23] Y.-S. Chen, J.-Y. Chang, C.-Y. Cheng, F.-J. Tsai, C.-H. Yao, B.-S. Liu, An in vivo evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin

peripheral nerve guide conduit material, *Biomaterials* 26(18) (2005) 3911-3918.

[24] R. Jayakumar, S.V. Nair, T. Furuike, H. Tamura, Perspectives of Chitin and Chitosan Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering, in: D. Eberli (Ed.), *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, InTech, China, 2011, pp. 205-224.

[25] W. Wang, S. Itoh, A. Matsuda, T. Aizawa, M. Demura, S. Ichinose, K. Shinomiya, J. Tanaka, Enhanced nerve regeneration through a bilayered chitosan tube: the effect of introduction of glycine spacer into the CYIGSR sequence, *Journal of biomedical materials research. Part A* 85(4) (2008) 919-28.

[26] P. Sangsanoh, O. Suwantong, A. Neamnark, P. Cheepsunthorn, P. Pavasant, P. Supaphol, In vitro biocompatibility of electrospun and solvent-cast chitosan substrata towards Schwann, osteoblast, keratinocyte and fibroblast cells, *European Polymer Journal* 46(3) (2010) 428-440.

[27] M.M. Beppu, R.S. Vieira, C.G. Aimoli, C.C. Santana, Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption, *Journal of Membrane Science* 301(1-2) (2007) 126-130.

[28] J.A. Matthews, G.E. Wnek, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, Electrospinning of Collagen Nanofibers, *Biomacromolecules* 3(2) (2002) 232-238.

[29] P.S. Wolfe, S.A. Sell, G.L. Bowlin, Natural and Synthetic Scaffolds, in: N. Pallua, C.V. Suscheck (Eds.), *Tissue engineering: From lab to clinic*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, 2011, pp. 41-67.

[30] C.P. Barnes, S.A. Sell, E.D. Boland, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(14) (2007) 1413-1433.

[31] N.D. Luong, I.-S. Moon, D.S. Lee, Y.-K. Lee, J.-D. Nam, Surface modification of poly(l-lactide) electrospun fibers with nanocrystal hydroxyapatite for engineered scaffold applications, *Materials Science and Engineering: C* 28(8) (2008) 1242-1249.

[32] Y. Hong, C. Gao, Y. Xie, Y. Gong, J. Shen, Collagen-coated polylactide microspheres as chondrocyte microcarriers, *Biomaterials* 26(32) (2005) 6305-6313.

[33] R. van Dijkhuizen-Radersma, L. Moroni, A.v. Apeldoorn, Z. Zhang, D. Grijpma, Chapter 7 - Degradable polymers for tissue engineering, in: B. Clemens van, T. Peter, L. Anders, H. Jeffrey, F.W. David, C. Ranieri, D.d.B. Joost, J. Sohier (Eds.), *Tissue engineering*, Academic Press, Burlington, 2008, pp. 193-221.

- [34] J.-M. Lü, X. Wang, C. Marin-Muller, H. Wang, P.H. Lin, Q. Yao, C. Chen, Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology, *Expert review of molecular diagnostics* 9(4) (2009) 325-341.
- [35] K. Kim, M. Yu, X. Zong, J. Chiu, D. Fang, Y.-S. Seo, B.S. Hsiao, B. Chu, M. Hadjiargyrou, Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(d,l-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications, *Biomaterials* 24(27) (2003) 4977-4985.
- [36] T. Gordon, K.M. Chan, O.A.R. Sulaiman, E. Udina, N. Amirjani, T.M. Brushart, Accelerating axon growth to overcome limitations in functional recovery after peripheral nerve injury, *Neurosurgery* 65(4) (2009) A132-A144.
- [37] C.K.S. Pillai, W. Paul, C.P. Sharma, Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Progress in Polymer Science* 34(7) (2009) 641-678.
- [38] F. Croisier, C. Jérôme, Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *European Polymer Journal* 49(4) (2013) 780-792.
- [39] T. Freier, H.S. Koh, K. Kazazian, M.S. Shoichet, Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation, *Biomaterials* 26(29) (2005) 5872-5878.
- [40] D.M. Yoon, J.P. Fisher, Polymeric scaffolds for tissue engineering applications, in: J.P. Fisher, A.G. Mikos, J.D. Bronzino (Eds.), *Tissue engineering*, CRC Press, United States of America, 2006, pp. 8_1-8_18.
- [41] W. Yu, W. Zhao, C. Zhu, X. Zhang, D. Ye, W. Zhang, Y. Zhou, X. Jiang, Z. Zhang, Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly(-caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate, *BMC Neuroscience* 12(1) (2011) 1-14.
- [42] S. Gautam, C.-F. Chou, A.K. Dinda, P.D. Potdar, N.C. Mishra, Fabrication and characterization of PCL/gelatin/chitosan ternary nanofibrous composite scaffold for tissue engineering applications, *Journal of Materials Science* 49(3) (2014) 1076-1089.
- [43] M. Sun, S. Downes, Physicochemical characterisation of novel ultra-thin biodegradable scaffolds for peripheral nerve repair, *Journal of materials science. Materials in medicine* 20(5) (2009) 1181-92.
- [44] Y.-j. Liu, H.-l. Jiang, Y. Li, K.-j. Zhu, Control of dimensional stability and degradation rate in electrospun composite scaffold composed of poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(-caprolactone), *Chinese Journal of Polymer Science* 26(1) (2008) 63-71.
- [45] M.P. Prabhakaran, J. Venugopal, C.K. Chan, S. Ramakrishna, Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Nanotechnology* 19(45) (2008) 455102.

- [46] L. Ghasemi-Mobarakeh, M.P. Prabhakaran, M. Morshed, M.H. Nasr-Esfahani, S. Ramakrishna, Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C* 30(8) (2010) 1129-1136.
- [47] N. Bhattarai, Z. Li, J. Gunn, M. Leung, A. Cooper, D. Edmondson, O. Veiseh, M.-H. Chen, Y. Zhang, R.G. Ellenbogen, M. Zhang, Natural-Synthetic Polyblend Nanofibers for Biomedical Applications, *Advanced Materials* 21(27) (2009) 2792-2797.
- [48] E. Schnell, K. Klinkhammer, S. Balzer, G. Brook, D. Klee, P. Dalton, J. Mey, Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly- ϵ -caprolactone and a collagen/poly- ϵ -caprolactone blend, *Biomaterials* 28(19) (2007) 3012-3025.
- [49] R. Junka, C.M. Valmikinathan, D.M. Kalyon, X. Yu, Laminin Functionalized Biomimetic Nanofibers for Nerve Tissue Engineering, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* 3(4) (2013) 494-502.
- [50] X. Gu, F. Ding, Y. Yang, J. Liu, Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration, *Progress in Neurobiology* 93(2) (2011) 204-230.
- [51] C.H. Kim, M.S. Khil, H.Y. Kim, H.U. Lee, K.Y. Jahng, An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and proliferation, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 78(2) (2006) 283-90.
- [52] L. Ghasemi-Mobarakeh, M.P. Prabhakaran, M. Morshed, M.H. Nasr-Esfahani, S. Ramakrishna, Electrospun poly(epsilon-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Biomaterials* 29(34) (2008) 4532-9.
- [53] X. Zhong, C. Ji, A.K. Chan, S.G. Kazarian, A. Ruys, F. Dehghani, Fabrication of chitosan/poly(epsilon-caprolactone) composite hydrogels for tissue engineering applications, *Journal of materials science. Materials in medicine* 22(2) (2011) 279-88.
- [54] D. Kai, M.P. Prabhakaran, B. Stahl, M. Eblenkamp, E. Wintermantel, S. Ramakrishna, Mechanical properties and in vitro behavior of nanofiber-hydrogel composites for tissue engineering applications, *Nanotechnology* 23(9) (2012) 095705.
- [55] A. Sarasam, S.V. Madihally, Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications, *Biomaterials* 26(27) (2005) 5500-5508.
- [56] H. Hajiali, S. Shahgasempour, M.R. Naimi-Jamal, H. Peirovi, Electrospun PGA/gelatin nanofibrous scaffolds and their potential application

in vascular tissue engineering, *International Journal of Nanomedicine* 6 (2011) 2133–2141.

[57] M.V. Jose, V. Thomas, D.R. Dean, E. Nyairo, Fabrication and characterization of aligned nanofibrous PLGA/Collagen blends as bone tissue scaffolds, *Polymer* 50(15) (2009) 3778-3785.

[58] L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu, C. Han, Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering, *Biomaterials* 24(26) (2003) 4833-41.

[59] Z.G. Chen, P.W. Wang, B. Wei, X.M. Mo, F.Z. Cui, Electrospun collagen–chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell, *Acta Biomaterialia* 6(2) (2010) 372-382.

[60] V. Chiono, E. Pulieri, G. Vozzi, G. Ciardelli, A. Ahluwalia, P. Giusti, Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications, *J Mater Sci: Mater Med* 19(2) (2008) 889-898.

[61] X. Yang, X. Chen, H. Wang, Acceleration of osteogenic differentiation of preosteoblastic cells by chitosan containing nanofibrous scaffolds, *Biomacromolecules* 10(10) (2009) 2772-8.

[62] S. Sahoo, A. Sasmal, R. Nanda, A.R. Phani, P.L. Nayak, Synthesis of chitosan–polycaprolactone blend for control delivery of ofloxacin drug, *Carbohydrate Polymers* 79(1) (2010) 106-113.

[63] H. Tabesh, G. Amoabediny, N.S. Nik, M. Heydari, M. Yosefifard, S.O.R. Siadat, K. Mottaghy, The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration, *Neurochemistry International* 54(2) (2009) 73-83.

[64] Y. Wan, B. Xiao, S. Dalai, X. Cao, Q. Wu, Development of polycaprolactone/chitosan blend porous scaffolds, *J Mater Sci: Mater Med* 20(3) (2009) 719-724.

[65] H. Wu, Y. Wan, X. Cao, S. Dalai, S. Wang, S. Zhang, Fabrication of chitosan-g-polycaprolactone copolymer scaffolds with gradient porous microstructures, *Materials Letters* 62(17–18) (2008) 2733-2736.

[66] V. Chiono, G. Vozzi, M. D'Acunto, S. Brinzi, C. Domenici, F. Vozzi, A. Ahluwalia, N. Barbani, P. Giusti, G. Ciardelli, Characterisation of blends between poly(ε-caprolactone) and polysaccharides for tissue engineering applications, *Materials Science and Engineering: C* 29(7) (2009) 2174-2187.

[67] G.R.D. Evans, K. Brandt, S. Katz, P. Chauvin, L. Otto, M. Bogle, B. Wang, R.K. Meszlenyi, L. Lu, A.G. Mikos, C.W. Patrick Jr, Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration, *Biomaterials* 23(3) (2002) 841-848.

- [68] M.S. Widmer, P.K. Gupta, L. Lu, R.K. Meszlenyi, G.R. Evans, K. Brandt, T. Savel, A. Gurlek, C.W. Patrick, Jr., A.G. Mikos, Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration, *Biomaterials* 19(21) (1998) 1945-55.
- [69] B.S. Liu, Fabrication and evaluation of a biodegradable proanthocyanidin-crosslinked gelatin conduit in peripheral nerve repair, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 87A(4) (2008) 1092-1102.
- [70] S. Wang, M.J. Yaszemski, A.M. Knight, J.A. Gruetzmacher, A.J. Windebank, L. Lu, Photo-Crosslinked Poly(-caprolactone fumarate) Networks for Peripheral Nerve Regeneration: Physical Properties and Preliminary Biological Evaluations, *Acta biomaterialia* 5(5) (2009) 1531-1542.
- [71] L. Yao, G.C.W. de Ruitter, H. Wang, A.M. Knight, R.J. Spinner, M.J. Yaszemski, A.J. Windebank, A. Pandit, Controlling dispersion of axonal regeneration using a multichannel collagen nerve conduit, *Biomaterials* 31(22) (2010) 5789-5797.
- [72] D. Hutmacher, T. Woodfield, P. Dalton, J. Lewis, Chapter 14 - Scaffold design and fabrication, in: B. Clemens van, T. Peter, L. Anders, H. Jeffrey, F.W. David, C. Ranieri, D.d.B. Joost, J. Sohler (Eds.), *Tissue engineering*, Academic Press, Burlington, 2008, pp. 403-454.
- [73] K.E. Crompton, J.D. Goud, R.V. Bellamkonda, T.R. Gengenbach, D.I. Finkelstein, M.K. Horne, J.S. Forsythe, Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering, *Biomaterials* 28(3) (2007) 441-449.
- [74] P. Prang, R. Müller, A. Eljaouhari, K. Heckmann, W. Kunz, T. Weber, C. Faber, M. Vroemen, U. Bogdahn, N. Weidner, The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels, *Biomaterials* 27(19) (2006) 3560-3569.
- [75] C. Víctor, G.-G. Juan, H.-C. Pedro, G. Ingrid, G.-G. Salomé, S.-M. José Antonio, S.-Q. María del Carmen, C. Antonio, A. Miguel, Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration, *Journal of Neural Engineering* 10(2) (2013) 026022.
- [76] P.S. Hill, P.J. Apel, J. Barnwell, T. Smith, L.A. Koman, A. Atala, M. Van Dyke, Repair of peripheral nerve defects in rabbits using keratin hydrogel scaffolds, *Tissue engineering. Part A* 17(11-12) (2011) 1499-505.
- [77] Q.P. Pham, U. Sharma, A.G. Mikos, Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review, *Tissue engineering* 12(5) (2006) 1197-211.

- [78] T.J. Sill, H.A. von Recum, Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials* 29(13) (2008) 1989-2006.
- [79] N. Bhardwaj, S.C. Kundu, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances* 28(3) (2010) 325-347.
- [80] Y.-S. Lee, T. Livingston Arinzeh, Electrospun Nanofibrous Materials for Neural Tissue Engineering, *Polymers* 3(1) (2011) 413.
- [81] S.Y. Chew, R. Mi, A. Hoke, K.W. Leong, The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation, *Biomaterials* 29(6) (2008) 653-61.
- [82] S.Y. Chew, R. Mi, A. Hoke, K.W. Leong, The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation, *Biomaterials* 29 (2008).
- [83] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna, Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering, *Biomaterials* 26(15) (2005) 2603-10.
- [84] K.T. Shalumon, K.H. Anulekha, C.M. Girish, R. Prasanth, S.V. Nair, R. Jayakumar, Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture, *Carbohydrate Polymers* 80(2) (2010) 413-419.
- [85] A. Cooper, N. Bhattarai, M. Zhang, Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan-PCL fibers for nerve tissue regeneration, *Carbohydrate Polymers* 85(1) (2011) 149-156.
- [86] I. 10993, Evaluación biológica de productos sanitarios Parte 5 Ensayos de citotoxicidad in vitro, International Organization for Standardization, 2009.
- [87] I. 10993, Biological evaluation of medical devices, Part 12 Sample preparation and reference materials, 2012.
- [88] S.I. Jeong, M.D. Krebs, C.A. Bonino, J.E. Samorezov, S.A. Khan, E. Alsberg, Electrospun chitosan-alginate nanofibers with in situ polyelectrolyte complexation for use as tissue engineering scaffolds, *Tissue engineering. Part A* 17(1-2) (2011) 59-70.
- [89] L. Van der Schueren, I. Steyaert, B. De Schoenmaker, K. De Clerck, Polycaprolactone/chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system, *Carbohydrate Polymers* 88(4) (2012) 1221-1226.
- [90] S.R. Gomes, G. Rodrigues, G.G. Martins, M.A. Roberto, M. Mafra, C.M.R. Henriques, J.C. Silva, In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study, *Materials Science and Engineering: C* 46 (2015) 348-358.

- [91] P. Sangsanoh, P. Supaphol, Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions, *Biomacromolecules* 7(10) (2006) 2710-4.
- [92] A.R. Sarasam, R.K. Krishnaswamy, S.V. Madihally, Blending chitosan with polycaprolactone: effects on physicochemical and antibacterial properties, *Biomacromolecules* 7(4) (2006) 1131-8.
- [93] V.N. Malheiro, S.G. Caridade, N.M. Alves, J.F. Mano, New poly(ϵ -caprolactone)/chitosan blend fibers for tissue engineering applications, *Acta Biomaterialia* 6(2) (2010) 418-428.
- [94] M. Hasegawa, A. Isogai, F. Onabe, M. Usuda, Dissolving states of cellulose and chitosan in trifluoroacetic acid, *Journal of Applied Polymer Science* 45(10) (1992) 1857-1863.
- [95] D.M. Correia, M.A. Gámiz-González, G. Botelho, A. Vidaurre, J.L. Gomez Ribelles, S. Lanceros-Mendez, V. Sencadas, Effect of neutralization and cross-linking on the thermal degradation of chitosan electrospun membranes, *J Therm Anal Calorim* 117(1) (2014) 123-130.
- [96] Y. Arima, H. Iwata, Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers, *Biomaterials* 28(20) (2007) 3074-3082.
- [97] J. Runt, I.R. Harrison, 9. Thermal Analysis of Polymers, in: R.A. Fava (Ed.), *Methods of experimental physics*, Academic Press, United States of America, 1980, pp. 287-337.
- [98] M. Al-Hussein, G. Strobl, A Comparative Study of the Mechanisms of Initial Crystallization and Recrystallization after Melting in Syndiotactic Polypropene and Isotactic Polystyrene, in: G. Reiter, J.-U. Sommer (Eds.), *Polymer Crystallization*, Springer Berlin Heidelberg, Germany, 2003, pp. 48-63.
- [99] T. Ikejima, K. Yagi, Y. Inoue, Thermal properties and crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyric acid) in blends with chitin and chitosan, *Macromolecular Chemistry and Physics* 200(2) (1999) 413-421.
- [100] T. Senda, Y. He, Y. Inoue, Biodegradable blends of poly(ϵ -caprolactone) with α -chitin and chitosan: specific interactions, thermal properties and crystallization behavior, *Polymer International* 51(1) (2002) 33-39.
- [101] H. She, X. Xiao, R. Liu, Preparation and characterization of polycaprolactone-chitosan composites for tissue engineering applications, *Journal of Materials Science* 42(19) (2007) 8113-8119.
- [102] S.-C. Wong, A. Baji, S. Leng, Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly(ϵ -caprolactone), *Polymer* 49(21) (2008) 4713-4722.

- [103] J.P. Chen, S.H. Chen, G.J. Lai, Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture, *Nanoscale research letters* 7(1) (2012) 170.
- [104] S. Jana, A. Cooper, F. Ohuchi, M. Zhang, Uniaxially aligned nanofibrous cylinders by electrospinning, *ACS applied materials & interfaces* 4(9) (2012) 4817-24.
- [105] H. Zhang, X. Luo, X. Lin, X. Lu, Y. Zhou, Y. Tang, Polycaprolactone/chitosan blends: Simulation and experimental design, *Materials & Design* 90 (2016) 396-402.
- [106] V. Sencadas, D.M. Correia, C. Ribeiro, S. Moreira, G. Botelho, J.L. Gómez Ribelles, S. Lanceros-Mendez, Physical-chemical properties of cross-linked chitosan electrospun fiber mats, *Polymer Testing* 31(8) (2012) 1062-1069.
- [107] Y. Liu, L. Ma, C. Gao, Facile fabrication of the glutaraldehyde cross-linked collagen/chitosan porous scaffold for skin tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C* 32(8) (2012) 2361-2366.
- [108] Y.Z. Zhang, J. Venugopal, Z.M. Huang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, Characterization of the Surface Biocompatibility of the Electrospun PCL-Collagen Nanofibers Using Fibroblasts, *Biomacromolecules* 6(5) (2005) 2583-2589.
- [109] J.R. Venugopal, Y. Zhang, S. Ramakrishna, In vitro culture of human dermal fibroblasts on electrospun polycaprolactone collagen nanofibrous membrane, *Artificial organs* 30(6) (2006) 440-6.
- [110] M. Chen, P.K. Patra, S.B. Warner, S. Bhowmick, Role of fiber diameter in adhesion and proliferation of NIH 3T3 fibroblast on electrospun polycaprolactone scaffolds, *Tissue engineering* 13(3) (2007) 579-87.
- [111] O. Suwantong, S. Waleetorncheepsawat, N. Sanchavanakit, P. Pavasant, P. Cheepsunthorn, T. Bunaprasert, P. Supaphol, In vitro biocompatibility of electrospun poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats, *International Journal of Biological Macromolecules* 40(3) (2007) 217-223.
- [112] T. Fukunishi, C.A. Best, T. Sugiura, T. Shoji, T. Yi, B. Udelsman, D. Ohst, C.S. Ong, H. Zhang, T. Shinoka, C.K. Breuer, J. Johnson, N. Hibino, Tissue-Engineered Small Diameter Arterial Vascular Grafts from Cell-Free Nanofiber PCL/Chitosan Scaffolds in a Sheep Model, *PloS one* 11(7) (2016) e0158555.
- [113] P. Sangsanoh, S. Waleetorncheepsawat, O. Suwantong, P. Wutticharoenmongkol, O. Weeranantanapan, B. Chuenjitbuntaworn, P. Cheepsunthorn, P. Pavasant, P. Supaphol, In vitro biocompatibility of

schwann cells on surfaces of biocompatible polymeric electrospun fibrous and solution-cast film scaffolds, *Biomacromolecules* 8(5) (2007) 1587-94.

[114] S.H. Kim, H.J. Ha, Y.K. Ko, S.J. Yoon, J.M. Rhee, M.S. Kim, H.B. Lee, G. Khang, Correlation of proliferation, morphology and biological responses of fibroblasts on LDPE with different surface wettability, *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 18(5) (2007) 609-22.

[115] J.L. Ivirico, D.M. Cruz, M.C. Monros, C. Martinez-Ramos, M.M. Pradas, Synthesis and properties of caprolactone and ethylene glycol copolymers for neural regeneration, *Journal of materials science. Materials in medicine* 23(7) (2012) 1605-17.

[116] H.J. Shao, Y.T. Lee, C.S. Chen, J.H. Wang, T.H. Young, Modulation of gene expression and collagen production of anterior cruciate ligament cells through cell shape changes on polycaprolactone/chitosan blends, *Biomaterials* 31(17) (2010) 4695-705.

[117] G. Haipeng, Z. Yinghui, L. Jianchun, G. Yandao, Z. Nanming, Z. Xiufang, Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials, *Journal of Biomedical Materials Research* 52(2) (2000) 285-295.

Anexos

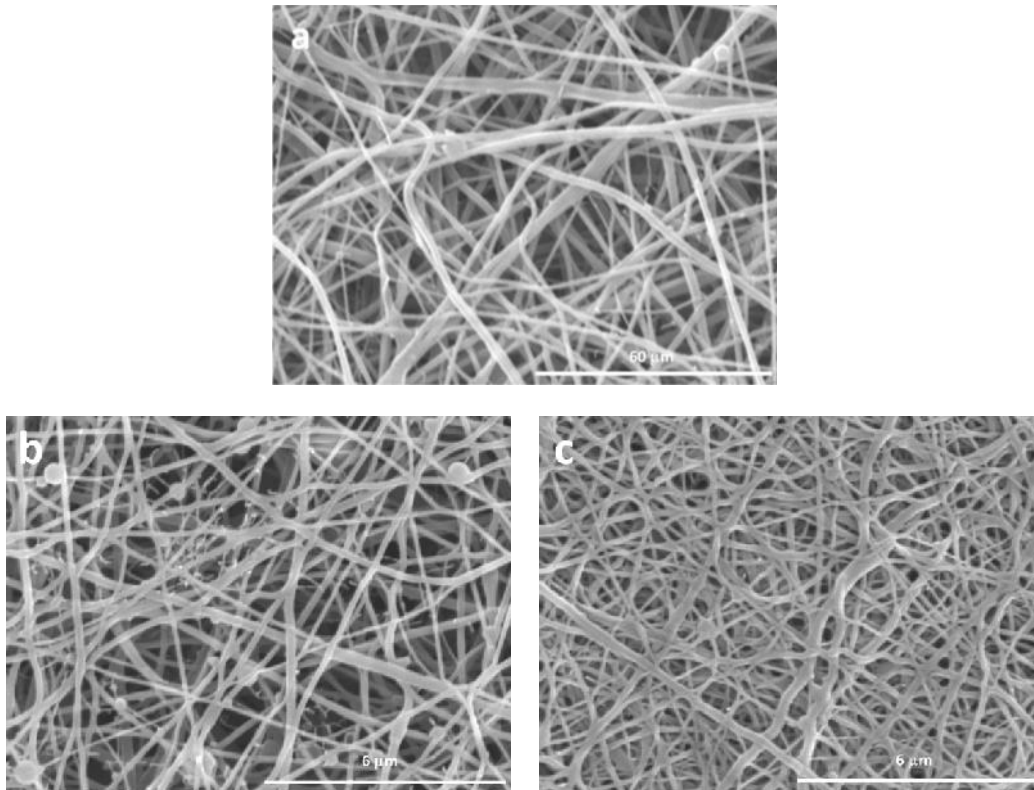


Figura A1 Andamios de quitosano con diferentes tratamientos: (a) quitosano sin tratamiento, (b) quitosano tratado con vapor de glutaraldehído (andamios en contacto con vapor de glutaraldehído al 25%) y (c) quitosano tratado con hidróxido de amonio (andamios sumergidos por 5 min en una solución al 14%). El tratamiento con vapor de GA con vacío no modificó la forma de las fibras. Por otra parte, las fibras tratadas con hidróxido de amonio presentaron irregularidades con respecto a la forma original de las fibras debido a que el tratamiento es muy agresivo.

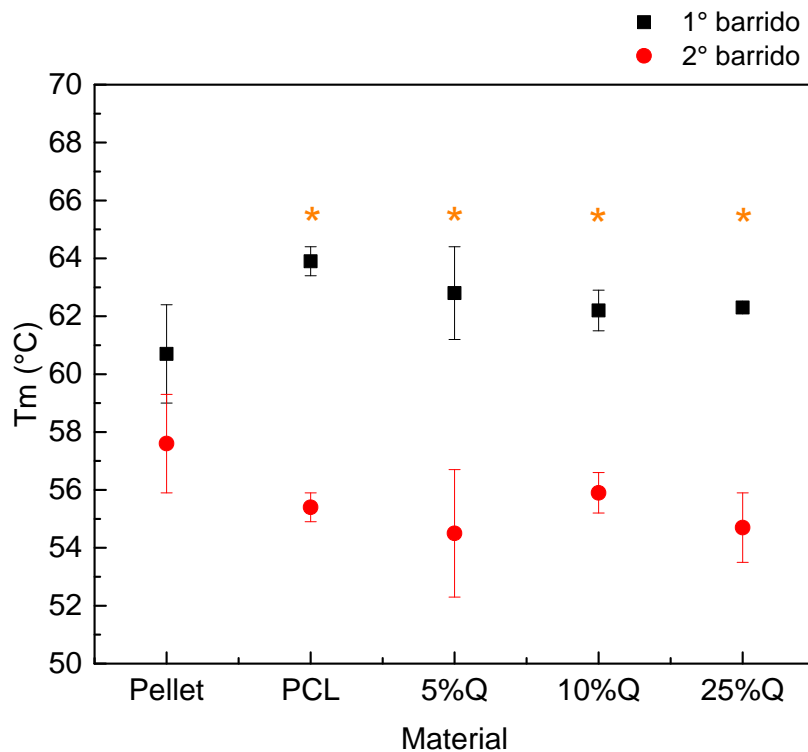


Figura A2. Temperatura de fusión (T_m) de andamios electrohilados, obtenidos en el primer y segundo barrido de calentamiento. Se observa que la T_m del primer calentamiento es significativamente mayor que en el segundo calentamiento en los andamios, lo cual se debe al proceso de electrohilado. Este comportamiento no fue observado en el material de referencia, es decir, el pellet, debido a que éste no fue sometido a ningún tipo de tratamiento previo al análisis de DSC. (*ANOVA una vía y $*p < 0.05$. Se comparó la T_m del primer barrido con la T_m del segundo barrido, para cada material).

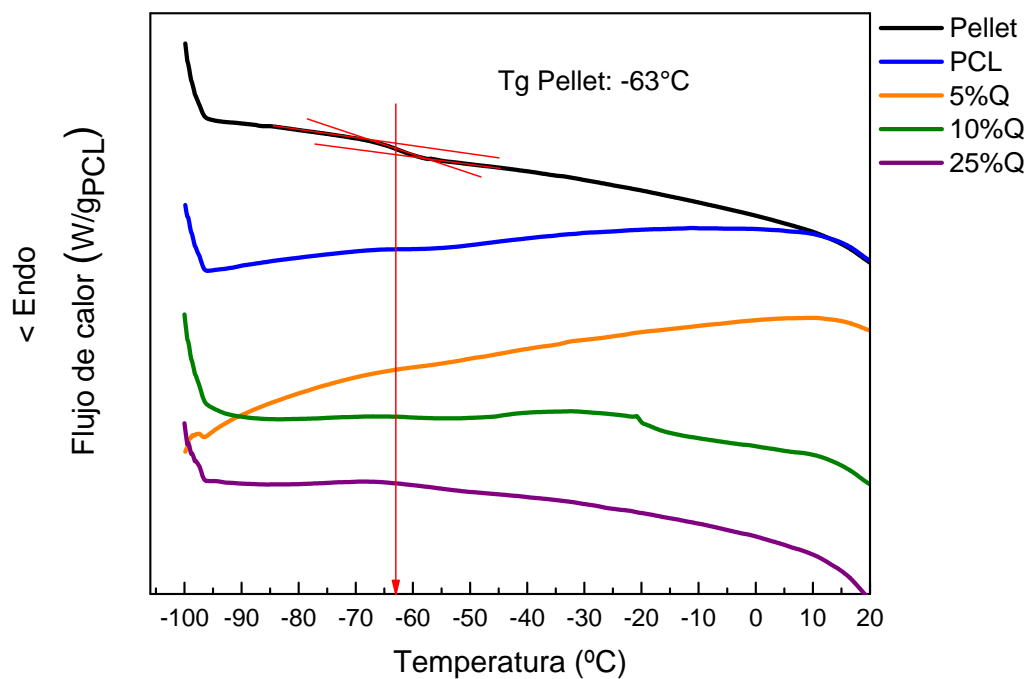


Figura A3. Termogramas de DSC de los andamios electrohilados y del pellet de PCL obtenidos en el segundo calentamiento. La temperatura de transición vítrea (T_g) de la PCL (pellet) fue de $-63\text{ }^\circ\text{C}$. En los andamios electrohilados, la transición vítrea no es clara.