



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

# Máster Oficial Interuniversitario en Ingeniería Biomédica

TRABAJO FIN DE MASTER

DESARROLLO DE SCAFFOLDS SEMIDEGRADABLES DE  
MATRIZ DE POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA)/POLI(ETIL  
ACRILATO) COMO SISTEMAS DE CONTENCIÓN TISULAR

EWERTOWSKA, ELŻBIETA

DIRECTOR/ES:

Dra. Vallés Lluch, Ana

Dr. Monleón Pradas, Manuel

*Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, Universitat Politècnica de València*

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar quiero agradecer muchísimo a mis directores: Ana Vallés Lluch y Manuel Monleón Pradas por toda la ayuda, consejos y dirección que he recibido de vosotros. Sobre todo te lo agradezco a ti, Ana por todo el apoyo y motivación aportada y tu esfuerzo y paciencia para que consiguiese realizar este trabajo bien y a tiempo. Significó mucho para mi.*

*Querría agradecer también a Cristina el trabajo aportado en la parte biológica del trabajo y toda la ayuda y tiempo sacrificado para sacarla adelante.*

*El trabajo no saldría de esta forma y con tanto éxito si no fuera por ti, Manu, que me ayudaste a dar los primeros pasos en este laboratorio y me ayudaste hasta el final, con las cosas grandes y con las tonterías. En tu compañía lo pasé de risa y a lo grande así que gracias por todo, literalmente.*

*Laura, este laboratorio vive gracias a ti. Te agradezco las veces que te molesté por algún equipo o ensayo y siempre me ayudaste con toda la tranquilidad del mundo.*

*Paloma y Gema, mis compañeras de labo, gracias a vosotras toda la cantidad enorme de trabajo la realizamos a tiempo. ¡Sois estupendas, chicas!*

*En fin, el tiempo que pasé en el CBIT ha sido tan agradable también gracias a unas chicas encantadoras... Line, Laia, María Noel... y el resto de la gran compañía. ¡Gracias!*

## RESUMEN

Hoy en día en el campo de ingeniería tisular se siguen avanzando numerosas tecnologías y produciendo distintos biomateriales con un solo objetivo de adaptar cada producto a las complejas necesidades de cada individuo. Considerando el área que abarca la regeneración del tejido, la ciencia se enfrenta a múltiples variables que condicionan el éxito de la metodología empleada. Es el caso de tejidos cuyo proceso regenerativo combina largos periodos temporales, alto riesgo de rechazo de autoinjertos y limitaciones anatómicas para poder insertar un implante, así pues una posible solución se encuentra en la implementación de andamiajes 3D sintéticos (*scaffolds*) acondicionados para promover el crecimiento de células madre y formación del tejido. Como uno de ellos, los andamiajes (*scaffolds*) semidegradables sintetizados a base de la matriz semiinterpenetrada (semi-IPN) de poli(etil acrilato) (PEA) entrecruzado y poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), que aquí se presentan son un material novedoso y muy prometedor para esta aplicación. Mediante la polimerización de etil acrilato en disolución se logra formar una red semi-IPN de PEA interpenetrada con un componente biodegradable de PCL. Además de cumplir con los requerimientos básicos del biomaterial sobre la biocompatibilidad, y a pesar de una estructura muy porosa ofrece unas buenas propiedades mecánicas como la resistencia y elasticidad. Al ser parcialmente degradable, al cabo del periodo de degradación se mantiene como un soporte adicional de refuerzo del tejido regenerado. También se ha confirmado que la síntesis de ambos polímeros favorece la proliferación celular y mejora su adhesión al material.

**Palabras clave:** ingeniería tisular, *scaffold*, semidegradable, poli(etil acrilato), poli( $\epsilon$ -caprolactona), regeneración, polimerización redox

## ABSTRACT

Nowadays, numerous technologies from the field of tissue engineering are in continuous development of new different biomaterials with one goal to adapt each product to the specific need of one individual. Taking into consideration the area that covers the subject of tissue regeneration, the science deals with uncountable variables on which the final success of a methodology used relies. In case of tissues that combine long regeneration periods with a risk of autografts rejection and anatomical limitations for the introduction of new implants, the possible solution lays in synthetic 3D *scaffolds* adjusted for stem cell proliferation and new tissue formation. One of them are semidegradable *scaffolds* synthesized as semi-interpenetrated networks of poly(ethyl acrylate) (PEA) crosslinked with poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), which presents a novel and promising material for the previously mentioned application. By means of solution polymerization of ethyl acrylate we manage the formation of a PEA network that is interpenetrated with biodegradable component, PCL. As well as the basic requirements about biocompatibility of a biomaterial are fulfilled, and despite of a highly porous structure, it offers good mechanical properties such as resistance and elasticity. Moreover, because of partially degradable characteristics, once the degradation period is accomplished, it provides an additional support for regenerated tissue. Furthermore, it was confirmed that the synthesis of both polymers enhances cell proliferation and adhesion to the material.

**Keywords:** tissue engineering, semidegradable *scaffold*, poly(ethyl acrylate), poly( $\epsilon$ -caprolactone), regeneration, redox polymerization

## ABREVIATURAS

BPO	Peróxido de benzoílo
BSA	Albúmina de suero bovino
CN	Control negativo
CP	Control positivo
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMT	N,N-dimetil-p-toluidina
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EA	Etil acrilato
EGDMA	Etilenglicol dimetacrilato
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
HMDS	Hexametildisilizano
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio de bromuro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
P/S	Penicilina-estreptomicina
PBS, PB	Tampón fosfato
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PEA	Poli(etil acrilato)
PFA	Paraformaldehído
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TGA	Análisis termogravimétrico
TMA	Análisis termo-mecánico

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN A LA INGENIERÍA TISULAR.....	6
1.1.	PAPEL REGENERATIVO DE <i>SCAFFOLDS</i> EN INGENIERÍA TISULAR.....	8
1.2.	BIOMATERIALES EN INGENIERÍA TISULAR.....	12
1.3.	POLÍMEROS: POLI(ETIL ACRILATO) Y POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA).....	14
1.4.	PROBLEMÁTICA ASOCIADA A LA POLIMERIZACIÓN REDOX DEL MATERIAL SEMIDegradable.....	16
1.5.	POSIBLES APLICACIONES .....	18
2.	OBJETIVOS .....	19
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
3.1.	SÍNTESIS DE LOS MATERIALES .....	20
3.1.1.	Fabricación de las plantillas porogénicas .....	20
3.1.2.	Preparación de disoluciones de etil acrilato y poli( $\epsilon$ -caprolactona) .....	21
3.1.3.	Polimerización redox de films .....	22
3.1.4.	Polimerización redox de <i>scaffolds</i> .....	23
3.2.	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MECÁNICA, <i>FILMS</i> Y <i>SCAFFOLDS</i> . .....	23
3.2.1.	Caracterización de micropartículas y plantilla de gelatina .....	23
3.2.2.	Medida de densidad de los <i>films</i> .....	24
3.2.3.	Medida de porosidad de los <i>scaffolds</i> .....	24
3.2.4.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) .....	24
3.2.5.	Análisis termogravimétrico .....	25
3.2.6.	Calorimetría diferencial de barrido .....	25
3.2.7.	Degradación acelerada de los <i>scaffolds</i> .....	25
3.2.8.	Degradación lenta de los <i>scaffolds</i> .....	26
3.2.9.	Extracción de PCL de los <i>scaffolds</i> .....	26
3.2.10.	Ensayo de compresión de los <i>scaffolds</i> .....	26
3.4.	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA .....	27
3.4.1.	Esterilización de los <i>scaffolds</i> .....	27
3.4.2.	Estudio de citotoxicidad por contacto indirecto (extracto de los polímeros) .....	27
3.4.3.	Estudio de adhesión celular por contacto directo de células ADSCs .....	28
3.4.4.	Estudio de morfología celular de células ADSCs .....	28
3.4.5.	Estudio de viabilidad celular por contacto directo .....	29
3.4.6.	Estudio de la distribución celular en los <i>scaffolds</i> .....	29

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1.	CARACTERIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS Y PLANTILLA DE GELATINA...	31
4.2.	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MECÁNICA - <i>FILMS</i> .....	32
4.2.1.	Medida de densidad.....	32
4.2.2.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier .....	33
4.2.3.	Calorimetría diferencial de barrido.....	35
4.3.	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MECÁNICA – <i>SCAFFOLDS</i> .....	38
4.3.1.	Morfología y porosidad .....	38
4.3.2.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier .....	41
4.3.3.	Análisis termogravimétrico .....	43
4.3.4.	Degradación acelerada.....	44
4.3.5.	Degradación lenta .....	45
4.3.6.	Extracción de PCL después de la degradación lenta .....	46
4.3.7.	Calorimetría diferencial de barrido.....	48
4.3.8.	Ensayo de compresión .....	53
4.3.9.	Análisis comparativo de los <i>scaffolds</i> con PEA reticulado al 4%.....	56
4.4.	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA .....	57
4.4.1.	Selección de materiales para la caracterización biológica .....	57
4.4.2.	Estudio de citotoxicidad por contacto indirecto.....	58
4.4.3.	Estudio de morfología celular de ADSCs .....	61
4.4.4.	Estudio de viabilidad celular por contacto directo .....	62
4.4.5.	Ensayos de inmunohistoquímica .....	63
5.	CONCLUSIONES.....	65
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	66
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	72

# 1. INTRODUCCIÓN A LA INGENIERÍA TISULAR

Ingeniería tisular, conocida también como ingeniería de tejidos, constituye una rama de ciencias de la salud relativamente nueva que se considera fundamental para el desarrollo de la medicina regenerativa. Relaciona a su vez varias disciplinas de biomedicina empezando por la bioingeniería, las ciencias de la vida, las ciencias clínicas y terminando por la insuficiencia orgánica y pérdidas de tejidos. La unión de esas disciplinas se basa en aplicar principios, técnicas y métodos de la ingeniería a las ciencias biológicas con el fin de entender y restaurar los procesos que ocurren en el organismo (Charles W., Mikos, & McIntire, 1998).

Asimismo, el objetivo principal de la ingeniería tisular es proveer nuevas terapias a las pacientes con fallos del funcionamiento de los órganos, adaptadas a cada individuo para su recuperación mediante la regeneración del tejido. Su desarrollo se considera una alternativa prometedora capaz de ocupar el lugar de terapias basadas en fármacos, terapias génicas o trasplantes de órganos existentes. Los costes que conllevan dichos métodos no son la única razón por la cual se busca otras soluciones, ya que los tratamientos no siempre resultan ser eficientes e involucran numerosos efectos secundarios. En la última década se observa una demanda creciente de órganos para trasplantes y un aumento continuo de la desproporción entre la necesidad y la oferta de órganos que existe en el mercado (Gómez, Arredondo, Páez, & Manyalich, 2012; Gómez, Pérez, & Manyalich, 2014; Sanz, Boni, Ghirardini, Nanni Costa, & Manyalich, 2005; Tabarrok, 2009). El déficit de donantes y un número elevado de pacientes en espera lleva a la sociedad a crear una selección de los individuos más adecuados para la sustitución de órganos. Dicha selección en forma indirecta contribuye a la mortalidad de los que no han podido beneficiar de este tipo de tratamiento.

También aparecen las cuestiones de naturaleza moral y controversias respecto al uso de órganos donados. Estos se consiguen a base de consentimiento informado firmado anteriormente por un donante vivo o recién fallecido y deben ser un acto voluntario y de caridad. Sin embargo pueden provocar “un interés de la sociedad en la muerte” (Jensen, 2011) pues lo que en principio pretendía evitar la muerte de unos a su vez involucra la muerte de otros. Otro método novedoso, muy interesante es emplear los autoinjertos para descartar la necesidad de un donante. No obstante, se enfrenta a un mayor problema que es el área del cuerpo necesario para cultivar y desarrollar un tejido u órgano de cierto tamaño sobre el mismo paciente y posteriormente desplazarlo en el lugar destinado (Charles W. et al., 1998; Saltzman, 2004). Sin embargo, mientras todos estos métodos se basan en las técnicas de reemplazo de órganos, la mayoría de los casos podría encontrar su solución en tal sólo una reparación o remodelado del tejido dañado que a su vez podría resultar incluso una opción mejor y más eficaz (Ingber, Madri, & Folkman, 1987; Mooney, Cima, & Langer, 1992).

El desarrollo de medicina regenerativa tiene su origen en la observación de naturaleza y los procesos regenerativos observados en órganos con habilidad de autoregenerarse como por ejemplo piel, hígado o fetos (Baddour, Sousounis, & Tsonis, 2012). El mecanismo de regeneración está basado en el diseño de las características funcionales de todos los componentes que participarán en el

proceso regenerativo y determinarán el resultado final. Juntos, forman una estructura llamada la triada de la ingeniería de tejidos que consiste en primer lugar en las células, habitualmente progenitoras o primarias o diferenciadas asociadas a los factores de crecimiento y cultivadas en una arquitectura tridimensional organizada que sirve de microambiente y soporte para la adhesión celular (Nerem & Schutte, 2014; O'Brien, 2011). El mayor interés en la ingeniería de tejidos se centra en las células vivas y sus componentes extracelulares ya que forman parte de los mecanismos del desarrollo y del estímulo de tejidos dañados para su reparación. El hecho de si el órgano que es más o menos susceptible a regenerar, el tipo de células elegidas y la capacidad de memoria que tienen determina la eficiencia del proceso regenerativo (Baddour et al., 2012; Bessonov et al., 2015). La implementación de moléculas señalizadoras, secretadas por las células aportadas incluye los factores de crecimiento o factores quimiotácticos que al ser suministrados de forma correcta y conforme la necesidad del órgano de interés podrían promover la proliferación de células ya existentes en el tejido sin ser imprescindible el empleo de las células externas. Se trata de una idea futurista del campo de terapias moleculares que aún queda por investigar (Nerem & Schutte, 2014).

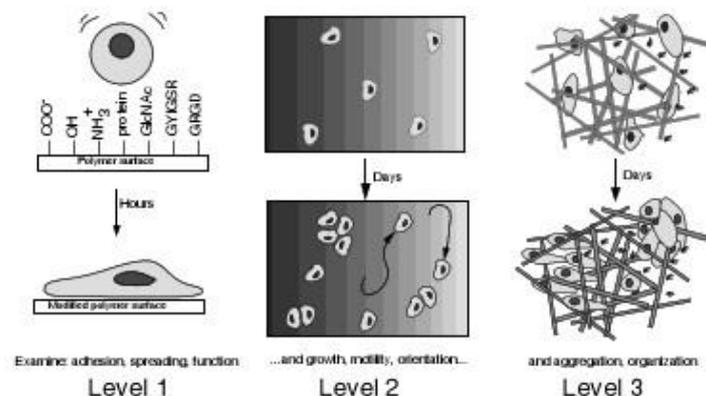
No obstante, los intentos de inyectar directamente en el lugar de implantación las células aisladas con el fin de obtener un crecimiento organizado de tejido demostraron las limitaciones en la viabilidad celular y formación de estructuras deseadas (Jirtle & Biles, 1980; Mooney et al., 1992). Es por eso que se reconoce un rol importante que en todo el proceso juega la matriz adicional, *scaffold*, que aparte de ser un soporte físico, servirá como sustrato de adhesión celular que sin influir en su funcionalidad promoverá la proliferación celular (Mikos, Wald, Sarakinos, Leite, & Langer, 1992). La estrategia de trasplante celular emplea las estructuras elaboradas a partir de los polímeros naturales y sintéticos con capacidad de degradarse con el tiempo debido a los procesos fisiológicos del propio cuerpo. Por ello, deben poseer una cierta característica para mimetizar sus equivalentes tejidos biológicos. Esto, entre otros, abarca el tipo de material empleado, su morfología, porosidad, área de contacto o la facilidad de procesar y sus propiedades mecánicas (Mikos et al., 1992). Finalmente, otro reto que presenta la regeneración de tejidos está en la implantación de la matriz en un sistema vivo que además de conllevar un riesgo de rechazo depende de interacción tanto del material como de las células dentro del cuerpo (Seidi & Ramalingam, 2012; Furth, Atala, Innovations, & Carolina, 2014).

### 1.1. PAPEL REGENERATIVO DE SCAFFOLDS EN INGENIERÍA TISULAR

Los *scaffolds* juegan un rol crucial en la ingeniería tisular. Se encuentran entre los factores clave, determinantes del éxito en desarrollo de cualquier tejido, que son: (a) células creadoras del tejido, (b) soporte estructural proporcionado por un *scaffold*, (c) moléculas señalizadoras bioactivas que regulan el proceso celular y (d) interacciones en nivel matriz – células que promueven el remodelado y crecimiento de un nuevo tejido (Seidi & Ramalingam, 2012). Todos ellos, en conjunto inician un proceso regenerativo caracterizado en general por dos fases:

la primer etapa *in vitro* del cultivo celular sobre el andamiaje y el segundo, *in vivo* en la cual el material está implantado al paciente.

Puesto que el andamiaje tridimensional promueve la proliferación celular y direcciona las células hacia formar una estructura deseada, el tipo de arquitectura que presenta dicho *scaffold* se considera de suma importancia. Las características de su macro e microestructura como la porosidad, el tamaño de poros o su interconectividad, a largo plazo determinarán la migración, adhesión y crecimiento celular y por tanto la formación de matriz extracelular (ME) (Mandal & Kundu, 2009). Asimismo, los poros son un elemento necesario para la formación del tejido. Su mayor tamaño permite el aporte de nutrientes, eliminación de productos metabólicos y difusión de gases tan necesarios para la supervivencia de las células (Griffon, Sedighi, Schaeffer, Eurell, & Johnson, 2006). Sin embargo, puede ser causa de su peor adhesión si no está adaptado a la densidad y el tamaño de células necesarias para una eficiente adhesión. En cambio, los materiales con poros más pequeños presentan un comportamiento contrario con mejor adhesión y proliferación celular al coste de un menor grado de expansión de ME (Oh, Park, Kim, & Lee, 2007). Para distintas aplicaciones el diámetro máximo medio de poros más óptimo varía desde 5  $\mu\text{m}$  para la neovascularización, por 150  $\mu\text{m}$  en la regeneración del hígado y células musculares lisas venosas hasta los tamaños mayores de 500  $\mu\text{m}$  en caso de tejidos fibrovasculares. Se confirma que el máximo grosor para construir un tejido sin que tenga la red intrínseca de capilares es entre 150-200  $\mu\text{m}$  debido a la insuficiencia en el suministro de oxígeno y nutrientes dentro del material (Annabi, Nichol, Ph, Zhong, & Ji, 2010; Oh et al., 2007). Junto con el tamaño de poros, el rol determinante en la nutrición y migración celular es una buena interconectividad de los poros. La insuficiencia del material en este aspecto puede incluso impedir el proceso del crecimiento celular a pesar de que posea una mayor porosidad (Yang, Leong, Du, & Chua, 2001). La porosidad definida como el volumen porcentual del espacio libre en un sólido es otro parámetro cuyo aumento puede intensificar la secreción de ME.



**Figura 1.** El diseño de materiales poliméricos para ingeniería tisular. Tres características que definen los biomateriales para ingeniería tisular: adhesión y distribución celular (Level 1), migración y crecimiento celular (Level 2), agregación celular y organización del tejido (Level 3).

Por otro lado, el grado de porosidad tendrá un efecto crucial sobre las propiedades mecánicas del material, ya que la rigidez del *scaffold* disminuirá con el aumento de porosidad (Annabi et al., 2010). Establecer un equilibrio entre estas tres variables es uno de los elementos principales en la regeneración de los tejidos.

Existen diversos métodos de fabricación de los *scaffolds*. Cada uno de ellos presenta algunas ventajas y limitaciones dependiendo de la aplicación y material a diseñar. Entre los más populares utilizados para obtener porosidad se encuentran freeze drying, separación de fases, electrospinning y solvent casting. El método de freeze-drying consiste en congelación del polímero en suspensión líquida (emulsión) y eliminación del solvente mediante liofilización. En la morfología de los *scaffolds* influyen la temperatura y velocidad de congelación. La técnica es simple y conveniente para un amplio rango de materiales. Sin embargo, no permite controlar el tamaño de poros ni la interconectividad. Los materiales resultan muy sensibles al tratamiento térmico y presentan poca estabilidad estructural y resistencia mecánica. Además, es un método de alto coste energético que con el mayor tiempo de procesado se suma a ser ineficiente económicamente (Annabi, 2012; Trachtenberg, Kasper, Mikos, & Cam, 2014). En la separación de fases, el polímero se disuelve en un solvente orgánico con moléculas activas para producir una disolución homogénea. Al enfriar la mezcla se provoca una inestabilidad térmica que resulta en la separación de fases entre la fase rica en polímero y otra pobre que generara los poros. El método permite controlar la porosidad y el tamaño de poros; no obstante, no favorece la formación de interconexiones entre ellos y requiere abundante uso del solvente (Wei & Ma, 2008). Sin embargo presenta ventajas en cuanto a las aplicaciones de administración de fármacos ya que las moléculas bioactivas no entran en contacto con solvente durante el proceso. Otro método conocido como electrospinning emplea el uso de voltaje para producir unos materiales micro y nanofibrosos. Se les fabrica mediante la proyección del polímero en estado líquido y cargado electrostáticamente en una superficie metálica donde se solidifica formando fibras (Doshi & Reneker, 1995). La técnica se considera simple y rápida; sin embargo, debido a las restricciones en el control de la deposición de fibras, los *scaffolds* fabricados por este método presentan poca integridad mecánica.

Un *scaffold* poroso se puede obtener también mediante solvent casting. Como las otras técnicas, este método se puede usar con diversos polímeros naturales y sintéticos. Consiste de tres etapas básicas que empiezan por la dispersión del porógeno en el polímero en disolución acuosa u orgánica. Después de que el material con partículas de un determinado tamaño se solidifique, el porógeno se elimina. La técnica no requiere muchos recursos, se caracteriza por mayor porosidad y permite la incorporación de otros compuestos. Por otro lado, las estructuras obtenidas no demuestran buena interconectividad, se detectan los restos de solventes y porógeno dentro de la matriz lo que también puede afectar la bioactividad del material (Trachtenberg et al., 2014). Sin duda, su mayor ventaja es la posibilidad de modificar el tamaño de partículas y porosidad de forma controlada. Es la técnica más adecuada para desarrollar los materiales a pequeña escala en sus etapas iniciales, ya que también sólo permite fabricar materiales de hasta 3 mm de grosor (Grandi et al., 2011).

La elección de material para la plantilla porogénica en el método solvent casting está determinada por su accesibilidad, estabilidad bajo las condiciones de procesado, capacidad de procesar y formar bolas del tamaño deseado y por último, la más eficaz y cómoda eliminación de porógeno del *scaffold*. Además de eso, hay que tener en cuenta el tipo de solvente capaz de disolver el porógeno sin que afecte la matriz polimérica. En numerosos casos se emplean los agentes tóxicos cuya eliminación requiere tiempo y un lavado cuidadoso ya que perjudican la viabilidad celular. Se demostró que la naturaleza del mismo porógeno puede influir sobre las interacciones entre el *scaffold* y las células (Annabi et al., 2010). Otro elemento importante es la geometría de partículas que del mismo modo afecta la geometría de la matriz polimérica formada. La circularidad de las microesferas mejora la interconectividad de los poros respecto al material de la misma porosidad fabricado con las partículas cúbicas. El porógeno más típico que cumple la mayoría de los requisitos es la sal (NaCl). En cuanto a los materiales alternativos, se considera los azúcares (sacarosa, glucosa), gelatina y parafina. Tanto los azúcares como la sal se caracterizan por una forma cuadrilateral en su estado inicial y por tanto sin ningún procesamiento previo proporcionarían una estructura con pocas conexiones y unos poros irregulares no favorables para las células. Todos ellos, en lugar de solventes orgánicos requieren como disolvente agua que es el solvente más neutro de todos los existentes, dado que no afectará al polímero. Ahora bien, un procesado adicional para obtener las micropartículas, en el caso de sal requiere un tratamiento a temperaturas muy altas. El tratamiento necesario para obtener las micropartículas de fructosa les hace muy sensibles a la temperatura y humedad (Wei & Ma, 2006). Por tanto, presentan muchas inconveniencias a la hora de tener que tamizar con disolventes hidrófobos como por ejemplo hexano, mantener en estado hermético a bajas temperaturas y por lo último polimerizar si la reacción es exotérmica. En tal caso para el pre-procesado es la gelatina la que resulta más fácil de manejar. Uno de los métodos de fabricación de micropartículas de gelatina es por emulsión (Liang, Chang, Lin, & Sung, 2002). Sus propiedades químicas permiten trabajar a temperaturas por debajo de 60°C y eliminarla con agua sin que se queden los restos de ella entre las trabéculas del *scaffold*. Además, la gelatina, como es un material muy común en fabricación de *scaffolds*, no provoca ningún efecto secundario y por tanto como porógeno, sus restos pueden resultar hasta beneficiosos para la proliferación celular (Gong, Ma, Zhou, & Li, 2008). La desventaja que presenta es la temperatura que necesita para diluirse en agua, ya que en la temperatura ambiente, la gelatina tiende a absorber agua e hincharse.

## 1.2. BIOMATERIALES EN INGENIERÍA TISULAR

El término biomaterial, según la presente Consensus Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), se define como un material diseñado para interactuar como una interfaz con un sistema biológico para evaluar, curar, mejorar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Los biomateriales están presentes en todos los campos de medicina existentes. El tipo de material empleado depende de las necesidades particulares de cada aplicación. Estos pueden ser algunos ejemplos: los materiales protésicos, los stents o marcapasos en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, para fabricar los lentes de contacto o implantes dentales. Otras aplicaciones incluyen vendajes, sistemas de administración de medicamentos, las matrices para encapsulación de células o la piel artificial. Además de los polímeros, para la elaboración de todo el tipo de herramientas médicas e implantes se utilizan metales, cerámica o vidrio (Shi, 2005).

El requerimiento básico y común para todo el tipo biomateriales es la biocompatibilidad, una característica esencial para comprender qué son exactamente los biomateriales. Dicha biocompatibilidad define el material como “capaz de llevar a cabo una función deseable con respecto a una terapia médica, sin producir efectos indeseables locales o sistémicos en el recipiente o beneficiario de esta terapia, generando una respuesta celular o tisular apropiadamente benéfica en una situación específica y optimizando el rendimiento clínicamente para esta terapia” (Williams, 2008). La respuesta celular o tisular estará influenciada por las propiedades del material y su superficie. Esto incluye, entre otros, la composición del material, su morfología, hidrofiliidad/hidrofobicidad, constantes elásticas (p.ej., módulo de elasticidad, módulo de cizalla, constante de Poisson), grado de cristalinidad o simetría molecular. Las interacciones y la estabilidad entre el material y el portador del implante variarán también dependiendo del periodo de implantación del biomaterial. Por ejemplo, los implantes dentales, válvulas cardíacas, marcapasos o injertos vasculares son unos de los aparatos médicos diseñados para una terapia a largo plazo, por tanto se caracterizarán por la máxima resistencia mecánica y dureza, realizados con los agentes bioactivos para su buena adaptación al sistema corporal. Para mantener la homeostasis se optimizará la interacción del cuerpo con el material, utilizando aquellos poco degradables y no corrosivos que son por ejemplo cerámicas o aleaciones de titanio (Williams, 2008).

Sin embargo, gracias a los avances continuos en ingeniería tisular, las posibilidades reales de crear un tejido natural completo promovieron la ciencia hacia el desarrollo de las sistemas implantables degradables. La base de dichos sistemas son *scaffolds* tridimensionales, fabricados de materiales biodegradables con el fin de inducir el crecimiento de células o tejido para recuperar y mantener las funciones específicas de un órgano en particular. En el campo de biomedicina, los *scaffolds* pasaron a ser unos de los materiales más populares para la regeneración de tejidos. Su ventaja como materiales temporales respecto a implantes a largo plazo es un menor periodo de interacción que evita problemas enfrentados en caso de periodos largos que son infecciones, formación

del tejido fibroso (cicatricial) y la necesidad de reimplantar el material (Lichun & Mikos, 1996).

Por tanto, cuanto más diversidad de técnicas de su fabricación hay, más aún de variedad de biomateriales utilizados para obtener los *scaffolds* para la medicina regenerativa. En general, con aplicaciones para tejidos blandos se emplean polímeros naturales y sintéticos. Los más utilizados del origen natural son la fibrina, colágeno y los polisacáridos: quitosano, quitina y ácido hialurónico. Su mayor ventaja es la capacidad de remodelarse *in vivo* y mantener la composición original de la matriz. Puesto que preservan las proteínas en la matriz extracelular, inducen buena respuesta celular y permiten su integración mediante las moléculas señalizadoras. Por otro lado, se caracterizan por una rápida degradación, lo cual crea la necesidad de entrecruzarlos con glutaraldehído por ejemplo antes de implantar como soporte del tejido a largo plazo. Dicho tratamiento muchas veces afecta a la habilidad de integrarse con células, por lo que resulta sólo parcialmente beneficioso. Además, puesto que son de origen animal, los biomateriales naturales causan complicaciones xenogénicas (Bliley & Marra, 2014). En cambio los polímeros sintéticos se consideran menos inmunogénicos porque no provocan a respuesta inmune crónica.

Entre la variedad de los polímeros sintéticos predominan los poliésteres: ácido poliláctico con ácido glicólico (PLLA, PLGA), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), ácido metacrílico y poliésteres alifáticos. Todos ellos se someten a la degradación al azar por hidrólisis que puede estar controlada por propiedades del material como la cristalinidad, temperatura de transición vítrea, el grado de entrecruzamiento o hidrofobicidad, para sincronizarse con el proceso de remodelado tisular (Tognana, Padera, Chen, Vunjak-Novakovic, & Freed, 2005). Aunque se evidencia que en el proceso pueden participar también las enzimas del propio tejido o agentes químicos tales como por ejemplo radicales libres, la mayor parte de estos polímeros se degrada mediante hidrólisis, cuyo producto final son los monómeros, dímeros u oligómeros solubles en agua y no tóxicos para el organismo (Ali, Doherty, & Williams, 1993; Vert, Mauduit, & Li, 1994). Es importante que el polímero a degradar cumpla con sus funciones antes y durante el proceso de degradación a pesar de su constante deterioro. Uno de los elementos determinantes es la estructura química del polímero, ya que en caso de poliuretano la fragmentación del polímero es diferente debido a la hidrólisis de cadenas principales y de cadenas laterales y por tanto diferente distribución de las moléculas restantes en el material (Grossterlinden et al., 2006). Los poliésteres se caracterizan por una degradación por erosión de toda la estructura del polímero tanto en superficie como dentro del mismo. Por tanto, presentan una controlada descomposición que es una cualidad atractiva sobre todo en caso de liberación de fármacos.

Del mismo modo, todas las propiedades del polímero puro afectarán directamente a las propiedades del *scaffold* producido.

### 1.3. POLÍMEROS: POLI(ETIL ACRILATO) Y POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA)

Tanto los polímeros bioestables como los biodegradables pueden formar parte de un mecanismo de regeneración con material semidegradable. En este apartado se presenta uno de cada tipo de polímeros que podrían jugar un rol interesante en la regeneración del tejido blando.

#### Poli(etil acrilato)

Entre los polímeros más populares y utilizados en la medicina y biología, principalmente por su buena compatibilidad *in vivo*, se sitúan los acrilatos y metacrilatos. Algunos se caracterizan por ser hidrófilos (poli(hidroxietil metacrilato), PHEMA, o poli(hidroxietil acrilato), PHEA, por lo cual no favorecen la adhesión celular. Otros, tales como poli(metil metacrilato), PMMA, poli(etil metacrilato), PEMA, o poli(etil acrilato), PEA, por el contrario, son hidrófobos (Pérez Olmedilla et al., 2006). Todos tienen unas favorables propiedades mecánicas por lo que encuentran en muchas aplicaciones en ingeniería como por ejemplo odontología, en la sustitución de elementos óseos, y ortopédica, en el reemplazo de la articulación de rodilla o cadera.

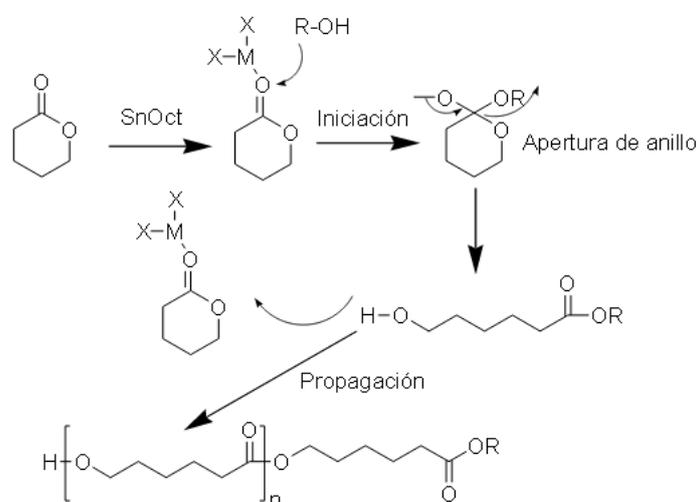
En este trabajo el mayor interés se centró en el etil éster del ácido acrílico (EA) del cual se obtiene el poli(etil acrilato) (PEA), un elastómero termoestable e hidrófobo con la transición vítrea alrededor de  $-24^{\circ}\text{C}$ . Como un poliacrilato es más blando que los polimetacrilatos debido a ausencia de grupos metilos en las cadenas poliméricas de carbono. Mientras que los polimetacrilatos se utilizan para obtener formas particulares, los poliacrilatos se aplican en casos que requieren tener un material de mucha flexibilidad y extensibilidad (O dian, 2004).

El poli(etil acrilato) en particular, se utilizó principalmente en la síntesis de varios copolímeros con fines de su aplicación posterior en medicina. Uno de los copolímeros, con poli(hidroxietil acrilato), P(EA-co-HEA) demostró un buen desempeño con células de Schwann por lo que podría ser considerado para investigar la regeneración del sistema periférico nervioso (Bahamonde, Garci, Salmero, Navarro, & Go, 2007). Del mismo modo se investigó el copolímero con hidroxietil metacrilato, P(EA-co-HEMA) como un biomaterial para la regeneración del cartílago (Pérez Olmedilla et al., 2006).

#### Poli( $\epsilon$ -caprolactona)

Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) es un poliéster alifático semicristalino, termoplástico, con la temperatura de fusión entre  $59-64^{\circ}\text{C}$  y la temperatura de transición vítrea alrededor de  $-60^{\circ}\text{C}$  que es el resultado de su naturaleza cristalina. Su peso molecular medio varía entre  $3000 - 80000 \text{ g/mol}$  (Nair & Laurencin, 2007). Se obtiene mediante polimerización vía apertura de anillo de los monómeros de caprolactona lineal ( $\epsilon$ -CL) en un rango de temperaturas  $140-150^{\circ}\text{C}$  en un proceso por lo general catalizado entre otros por ácidos orgánicos.

Como polímero resorbable, con sus propiedades viscoelásticas predomina sobre los polímeros resorbibles equivalentes, lo que le hace un polímero fácil de elaborar sobre todo a temperaturas bajas. Comparado con el ácido poliláctico (PLA) y poliglicólico (PGA) tiene un largo periodo de degradación entre 2-4 años (Woodruff & Hutmacher, 2010). No es biodegradable en los cuerpos humanos ni de animales de por sí, debido a falta de enzimas necesarias, pero se somete a degradación hidrolítica y por tanto tarda más en descomponerse. En la fase posterior a la degradación hidrolítica, siendo ya de bajo peso molecular, se somete a una degradación intracelular. En el proceso donde la difusión hacia el interior del material por el agua es lenta, predomina la erosión de superficie. En caso contrario, el polímero degrada al azar en toda su estructura.



**Figura 2.** Mecanismo de obtención de PCL mediante la polimerización de  $\epsilon$ -caprolactona por apertura del anillo.

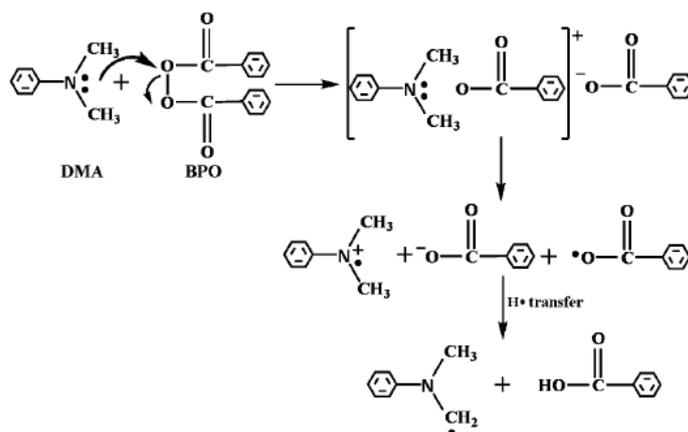
A pesar de que los productos ácidos de su hidrolisis podrían presentar un impacto negativo a la viabilidad celular (Taylor, Daniels, Andriano, & Heller, 2004), no se observaron ningunos efectos negativos locales de los tejidos (Meek & Coert, 2002). La PCL se considera uno de los polímeros sintéticos más flexibles, y aún más flexible en combinación con otros copolímeros. A temperatura ambiente es soluble en numerosos solventes tales como cloroformo, tetracloruro de carbono o tolueno e insoluble en alcohol.

Como se mencionó antes, la PCL es un material biocompatible y por tanto se usa para diversas aplicaciones en biomedicina tales como las micropartículas en liberación de fármacos, vendajes, suturas, como parte de las matrices extracelulares en ingeniería de tejidos (*scaffolds*). Las estructuras porosas de PCL se pueden fabricar mediante distintos métodos comúnmente conocidos (descritos en el apartado 1.1) sin mayor coste de producción. Entre múltiples campos de ingeniería de tejidos, los *scaffolds* de PCL se usan en la reconstrucción de tendones y ligamentos, huesos, cartílagos y en problemas cardiovasculares (Woodruff & Hutmacher, 2010).

#### 1.4. PROBLEMÁTICA ASOCIADA A LA POLIMERIZACIÓN REDOX DEL MATERIAL SEMIDegradable

Existen numerosos métodos de polimerización de poliacrilatos, y en particular de PEA. Los dos más populares son la polimerización por adición y condensación. La primera se basa en un crecimiento del polímero al engancharse un monómero tras otro a la cadena polimérica. El proceso está iniciado siempre por un radical, un catión o un anión que procede de la apertura de dobles enlaces y eliminación de parte de la molécula. El crecimiento del polímero termina cuando se termina la fuente iniciadora y los radicales libres por ambos terminales de cadena se unen a una molécula con un terminal neutralizado.

En la reacción de policondensación se crean uno o más monómeros de las distintas sustancias que al unirse formarán un dímero o una molécula más grande y se irán uniendo con otras moléculas creadas del mismo modo. También como en caso anterior, la unión de monómeros causa la pérdida de una molécula pequeña, por ejemplo el agua. En la polimerización por adición, la masa molecular es exactamente igual a la masa molecular de todos los monómeros participantes en la reacción. En el caso de la policondensación este valor no es igual, ya que las sustancias iniciales no sirven como monómeros sino para crear monómeros.



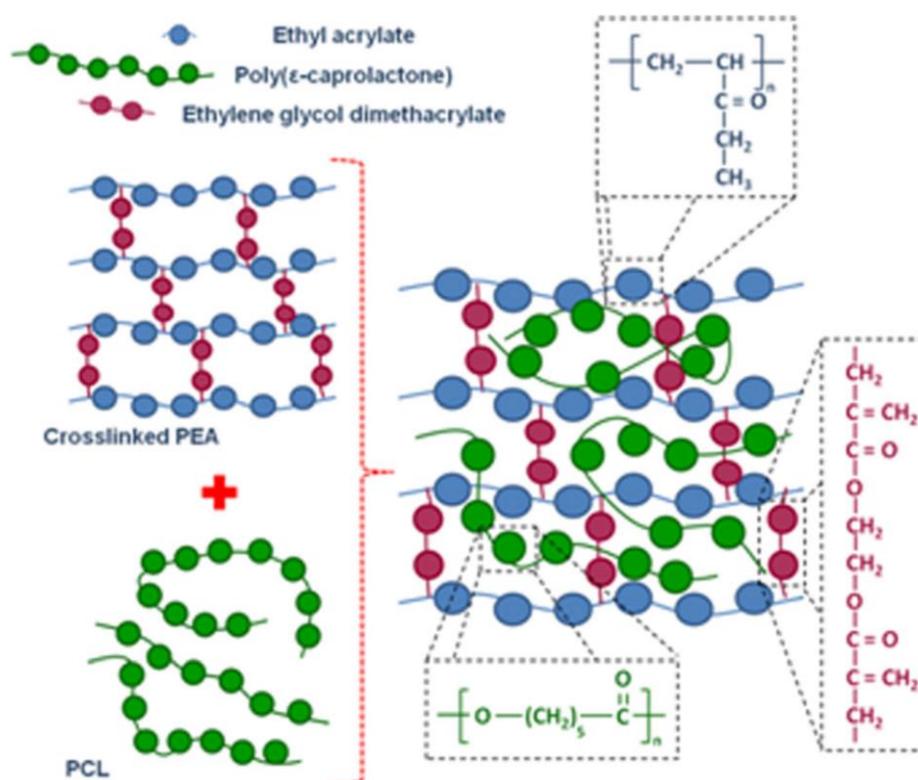
**Figura 3.** Mecanismo de iniciación redox BPO/DMA en la polimerización vía radicales libres.

Debido a la mejor eficiencia y rendimiento de la polimerización por adición redox (alto peso molecular del polímero obtenido, (Saraç, Yavuz, & Sezer, 1999)), con moderadas temperaturas del proceso y por tanto baja energía de activación, además, una corta duración y baja velocidad de síntesis, el método predomina sobre otras dos técnicas de inicialización de polimerización de adición. Estas son: iniciación térmica que puede ser catalizada (con peróxido) o, para tener más control sobre la reacción aunque con el tiempo de reacción prolongado, sin catalizadores, e iniciación fotoquímica donde para generar radicales libres se emplea la radiación ultravioleta.

Como muestra la Figura 3, la N,N-dimetilalanina (DMA) es una amina reductora que genera radicales libres de peróxido de benzoilo (BPO) y DMA mediante el desplazamiento iónico inducido por el átomo de nitrógeno de DMA. La movilidad

de moléculas de amina demostró ser tóxica pero sin embargo mediante por ejemplo el uso aminas incorporadas directamente en el polímero se puede reducir (Vazquez, Roman, Deb, & Bonfield, 1998).

En el siguiente trabajo, a base de la característica descrita, se utilizó la técnica de polimerización vía redox. Unos de los iniciadores más populares son los peróxidos. Uno de ellos, el peróxido de benzoílo (BPO) junto con la N,N – dimetil-p-toluidina (DMT), parecida en su comportamiento al DMA, se denominan el par redox, usado por años para inicializar las reacciones redox, sobre todo con monómeros de metacrilatos (Cole, Jankousky, & Bowman, 2013). La reacción consiste en la polimerización del PEA vía radicales libres, entrecruzado con un reticulador, dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA), para formar con un polímero degradable, poli(ε-caprolactona), la red semi-IPN semi-biodegradable .



**Figura 4.** Síntesis de PEA con PCL vía polimerización redox con BPO y DMT como iniciadores y EGDMA como entrecruzador.

Con el fin de emplear el material para la remodelización y regeneración de tejidos blandos, es necesario obtener una estructura tridimensional del polímero según la característica y los requerimientos de este tipo de aplicaciones. Por tanto, las condiciones de fabricación de un *scaffold* y la metodología de obtención de la estructura porosa adecuada se establecieron a base de la introducción teórica presentada anteriormente.

No obstante, el método puede presentar algunos obstáculos a la hora de polimerizar por radicales libres, entrecruzando el acrilato en presencia de otro polímero con una elevada viscosidad y sobre una plantilla porosa. Por tanto, hay de realizar diversos ensayos que permitirán determinar la composición final del material, su estructura química y las características del material obtenido en sus distintas fases de degradación.

## 1.5. POSIBLES APLICACIONES

El material presentado en el trabajo presenta propiedades atractivas para las múltiples aplicaciones en medicina. Sobre todo, se pone el enfoque en la regeneración del tejido cardíaco, cuyos defectos son unos de los más comunes en la sociedad moderna, sobre todo a los daños a los que está expuesto el ventrículo izquierdo, por lo que no son pocos los casos de dilatación ventricular. Cada defecto de la pared cardíaca resulta en los cambios significativos en la morfología del corazón denominados el remodelado ventricular, ya que siendo un músculo, el corazón está sometido a muchas presiones. Además, es un tejido de capacidad regenerativa limitada. En caso del infarto de miocardio, el tejido produce una respuesta inflamatoria debida a la eliminación de cardiomiocitos muertos por macrófagos, regulada normalmente por el suministro de fármacos. Puesto que los cardiomiocitos son unas de las células más energéticas del cuerpo, el proceso debilita significativamente el corazón. Por todo aquello, las intervenciones cardiovasculares e incluso el trasplante del órgano vuelven a ser imprescindibles. Las estrategias de ingeniería tisular para el tratamiento de este tipo de daños cardíacos son muy diversas. Sin embargo, el método que hasta la fecha se considera uno de los mejores es regenerar el tejido mediante la inducción de la proliferación de cardiomiocitos y formación de la matriz extracelular de forma controlada y estable. La opción es emplear una material tridimensional (*scaffold*) que mimetizara el fragmento del músculo cardíaco de manera que permitiera obtener la vascularización y adhesión celular, proporcionara la resistencia mecánica y degradara de forma controlada y estable para mantener la biocompatibilidad con el organismo, ya que se demostró que los implantes a largo plazo provocaban complicaciones. Además de los cardiomiocitos, se consideran alternativas las células adiposas (ADSC), del cordón umbilical, mioblastos del esqueleto, mesenquimales o de médula espinal (Venugopal et al., 2012).

Otra aplicación interesante abarca la reparación de hernia abdominal mediante una malla fabricada de un biomaterial resorbable y resistente a la actividad de microorganismos que se debe a las infecciones comunes en el lugar de aparición de hernias (Pérez-Köhler et al., 2015).

En cada una de las aplicaciones juegan un gran papel las propiedades mecánicas del material, su morfología, habilidad de interactuar con células de todo tipo y el comportamiento al estar sometido a degradación.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo se centra en diseñar un material 3D semidegradable desarrollado como un sistema de contención tisular, que podría ser útil en el caso de dilatación ventricular y consiguiente insuficiencia cardíaca, o en el caso de distensión abdominal por hernias. Puesto que se elabora un biomaterial con aplicación en tejidos biológicos y sobre todo del cuerpo humano, es necesario poder evaluar sus características fisicoquímicas y mecánicas, en principio en condiciones de laboratorio, y además de eso, la respuesta que provocará el material en un entorno biológico. En consecuencia, la fabricación de un *scaffold* conlleva diversos procesos mediante los cuales se obtendrá el andamiaje y realizará la caracterización posterior, que serán los siguientes:

- obtención de un material porógeno de microesferas de gelatina soluble en agua que servirá como una plantilla para el andamiaje microporoso de poli(etil acrilato):polilactona (PEA:PCL),
- obtención de redes semiinterpenetradas de PEA:PCL redox en forma de *scaffolds* y láminas (como muestras de control) en distintas proporciones (86:14, 71:29, 67:33) y sus homopolímeros que permitirá establecer un patrón de características entre ellos,
- caracterización fisicoquímica y mecánica de los films y los *scaffolds* para determinar las densidades, las porosidades, transiciones térmicas, composición química, resistencia y relajaciones mecánicas asociadas,
- realización de un estudio de degradación *in vitro* de los *scaffolds* en medio básico y tampón salino fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) a lo largo de los tiempos determinados y examinar las variaciones de masa, cambios morfológicos, distribución de pesos moleculares y modificaciones en la respuesta mecánica,
- por último, se determinará la viabilidad, proliferación y adhesión celular de los andamiajes y se analizará la distribución y morfología celular mediante técnicas de inmunocitoquímica.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. SÍNTESIS DE LOS MATERIALES

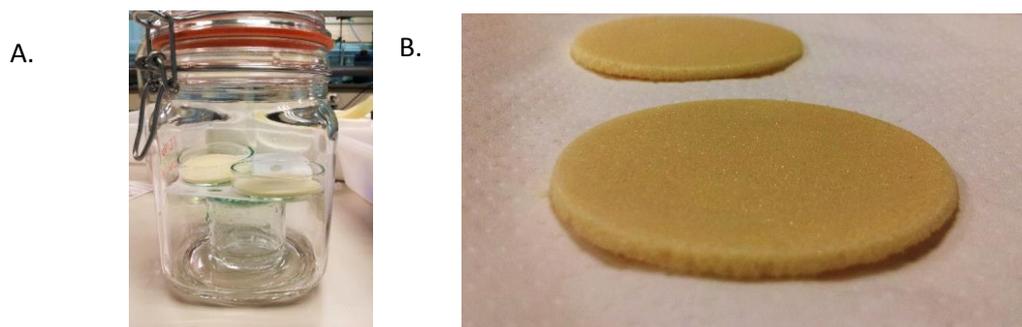
##### 3.1.1. Fabricación de las plantillas porogénicas

Para la fabricación de micropartículas se estableció un protocolo a base de dos métodos (Draghi, Resta, Pirozzolo, & Tanzi, 2005; Liang et al., 2002) adaptados a los objetivos de este trabajo. El proceso se llevó a cabo por el método de emulsión, a temperatura y en agitación.

Por tanto, primeramente se disolvió 10 g de gelatina (Scharlab) en 40 ml de agua destilada a  $T=50^{\circ}\text{C}$ . A la vez se calentó 200 ml de aceite de oliva a la misma temperatura que la gelatina. Seguidamente, la gelatina, ya muy líquida, fue inyectada mediante una jeringa ( $\varnothing$  20 mm) con aguja ( $\varnothing$  0,9 mm) en aceite a 1ml/min de velocidad. En el mismo tiempo se mantuvo agitando el aceite con una espátula a 150 l/min. Una vez se inyectó toda la gelatina, la emulsión fue enfriada a  $15^{\circ}\text{C}$  aplicando un baño de hielo. Después, se añadió acetona fría manteniendo la mezcla en agitación todo el tiempo. Se efectuaron varios lavados con acetona fría sobre un tamiz con luz de malla pequeña ( $\sim 70\ \mu\text{m}$ ) con el fin de eliminar del todo el aceite y al mismo tiempo tamizar las micropartículas de tamaño menor que el rango establecido. Finalmente, se aplicaron unos lavados primero en extracción continua y luego con papel de filtro que absorbió el resto del aceite. Se mantuvo el vacío hasta que se secaron del todo las micropartículas. Para evaporar la acetona restante se dejó un día a temperatura ambiente. Las micropartículas se almacenaron a vacío y oscuridad hasta su uso.

El proceso de obtención de una plantilla porogénica de micropartículas de gelatina empezó por tamizar las micropartículas con un sistema de dos tamices de  $250\ \mu\text{m}$  y  $100\ \mu\text{m}$  de porosidad colocados uno (el de mayor porosidad) encima del otro, con menor porosidad. Para cada plantilla se pesó 4 g de micropartículas y se colocó en una placa Petri de  $\varnothing=5\ \text{cm}$ . Así preparadas, las dos placas se insertaron a la vez en un frasco hermético de 1 l de volumen con 40 ml de agua destilada y con un soporte de teflón para evitar el contacto directo de la gelatina con el agua. El frasco cerrado herméticamente se dejó en una estufa a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 50-60min. De tal modo, la gelatina humedeció lo necesario para que se disolviera la parte superficial de las micropartículas fusionándolas entre sí por las zonas de contacto. Al cabo de este tiempo, la plantilla ya compacta y sólida y con las micropartículas unidas lo suficientemente, fue enfriada a  $T_{\text{amb}}$ . Finalmente, la plantilla fue despegada del vidrio con acetona fría, que posteriormente se eliminó mediante evaporación y secado a vacío.

Las plantillas, antes de polimerizar, fueron pulidas con un papel de lija hasta obtener una superficie plana y con poros abiertos ya que las partes exteriores de superficie podrían quedar más fundidas, dificultando la entrada de la disolución a polimerizar.



**Figura 5.** Plantillas microporosas de gelatina: A. dos porciones de gelatina en un frasco hermético antes de incubar en humedad; B. las plantillas de gelatina después de incubación.

### 3.1.2. Preparación de disoluciones de etil acrilato y poli( $\epsilon$ -caprolactona)

Puesto que era de gran interés obtener un material que pudiera degradarse en su mayor parte y a la vez permanecer lo suficientemente resistente como para sostener las células madre regeneradoras del tejido, se estudiaron los distintos gradientes de poli(etil acrilato) (PEA) y policaprolactona (PCL). Ya que en un trabajo anterior (Lozano Picazo, Pérez Garnes, Martínez Ramos, Vallés-Lluch, & Monleón Pradas, 2014) se probaron varias proporciones de los reactivos para la síntesis de láminas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) y poli (etil acrilato) mediante la polimerización redox, y se eligieron unas concentraciones óptimas para la fabricación de los *scaffolds*. Además se realizó un estudio comparativo con los films de los respectivos gradientes. Como los materiales de referencia se emplearon los homopolímeros PEA y PCL. Este es el punto de partida del trabajo que aquí se presenta.

Para obtener las composiciones tanto para los films como para los *scaffolds* se siguió el mismo protocolo. Primero se prepararon las disoluciones de etil acrilato (EA; Sigma Aldrich) respecto a poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL, Polysciences, Mw: 43,000-50,000) en las siguientes proporciones másicas,  $\omega$ : 100:0, 86:14, 71:29, 67:33 y 0:100. Todas las disoluciones fueron diluidas en 1,4-dioxano (Scharlab) que constituyó 30% de la masa total de cada disolución (Tabla 1).

**Tabla 1.** Las proporciones másicas y nomenclatura usada para los films y *scaffolds* fabricados.

Nomenclatura (PEA:PCL)	$\omega$ PEA	$\omega$ PCL	$\omega$ -dioxano
100:0	70	0	30
86:14	60	10	30
71:29	50	20	30
67:33	47	23	30
0:100	0	20	80

La reacción de polimerización se llevó a cabo vía radical empleando dos iniciadores activados por reacción REDOX: peróxido de benzoilo (BPO; Fluka) y N,N-dimetil-p-toluidina (DMT; Sigma Aldrich). Como agente entrecruzante de la red PEA se usó etilenglicol dimetacrilato (EGDMA; Sigma Aldrich). Las cantidades de cada uno se calcularon respecto a la masa de EA y fueron las siguientes: 1% de BPO, 0,33% de DMT y 2% de EGDMA. En el caso de EGDMA y DMT los pesos fueron convertidos a cantidades volumétricas según la densidad de cada uno.

La preparación de las disoluciones se efectuó a temperatura ambiente empezando por EA, PCL y 1,4-dioxano que fueron dejadas 24 horas en agitación hasta que se disolvieran las partículas de PCL. Se mantuvieron las medidas de seguridad y se evitó cualquier evaporación de reactivos asegurando los frascos con cinta de Parafilm®. Después de obtener una disolución uniforme y viscosa se añadieron BPO y EGDMA y las mezclas fueron agitadas. El último componente, DMT, debido a su rápida reacción con otros reactivos, se añadió unos instantes antes de pasar las disoluciones al molde tras unos segundos de agitación.

### 3.1.3. Polimerización redox de films

En la síntesis de los films poliméricos se utilizó un sistema constituido por dos placas de vidrio separadas con un molde de teflón de aproximadamente 1 mm de grosor y sujetos mediante unos pinzas fuertes. El espacio entre el teflón y vidrio fue cerrado con una capa de gel de sílice. A continuación las disoluciones fueron inyectadas dentro de cada molde con una pipeta de vidrio de tal manera que no se formaron las burbujas de aire. Lo siguiente fue dejarlos polimerizar hasta el día siguiente asegurándose que la hendidura estuviera cubierta con Parafilm®.

El mismo procedimiento no se pudo realizar con la mezcla de PCL y dioxano porque contenía mayor concentración de disolvente y por ello presentaba dificultades a la hora de evaporar, teniendo el molde una hendidura muy estrecha. En consecuencia la poli( $\epsilon$ -caprolactona) podría no solidificarse. Por tanto, en este caso se usó una placa Petri de vidrio como molde y se dejó la disolución solidificar a temperatura ambiente. En el cálculo de la cantidad de PCL necesaria para obtener un film del mismo grosor que los demás se tuvo en cuenta el diámetro de la placa.

Tras el proceso de polimerización, todos los films fueron lavados 12 veces en etanol (Scharlab) mínimo cada 4 horas. Durante este tiempo permanecieron agitándose en vaivén a temperatura ambiente. Por lo último, fueron secados 24 horas a temperatura ambiente y luego 8 horas a vacío en extracción continua. Las muestras se guardaron a vacío para siguientes ensayos.

#### 3.1.4. Polimerización redox de *scaffolds*

El procedimiento de polimerización de *scaffolds* fue distinto que en caso de los films debido a las dificultades de polimerizar por radicales libres sobre una plantilla porogénica de gelatina. Ya preparadas anteriormente, las disoluciones fueron distribuidas por ambas superficies de las plantillas con una pipeta y espátula. Posteriormente se aplicó un vacío brusco 5 veces por cada lado, cuyo objetivo era facilitar la penetración de poros por las disoluciones visiblemente viscosas. Tras asegurarse de que las plantillas estaban rellenas y recubiertas correctamente, se dejaron en los moldes de vidrio del mismo diámetro que las plantillas durante un día. Trascorrido este tiempo, se procedió a la eliminación de los trozos de polímeros sobrantes en las superficies de las plantillas. Para ello se empleó una cuchilla de bisturí y el papel de lija, con los que se lijaron los materiales hasta el nivel de plantilla y consiguiendo ambas caras planas.

Acto seguido, se aplicaron los lavados necesarios para eliminar las plantillas y los residuos de monómero y solvente. En primer lugar se hicieron tres lavados con agua destilada a 40°C y en agitación que permitieron disolver y eliminar las micropartículas de gelatina sin afectar a ninguno de los polímeros. La agitación se realizó con un agitador magnético separado del material con una plantilla de teflón. Seguidamente, se aplicaron 12 lavados en etanol con cambios realizados al menos cada 4 horas. Después se procedió a realizar un cambio gradual de etanol al agua destilada para evitar un colapso de la red de PEA al encontrarse de repente en contacto con agua. Por último, antes de secar cada *scaffold*, fue troquelado en inmersión en agua en discos de 5 mm de diámetro para evitar cualquier colapso de su estructura que este pudiera causar. Las muestras se secaron un día a temperatura ambiente y las siguientes 24 horas a vacío en el que permanecieron hasta su caracterización posterior.

### 3.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MECÁNICA, FILMS Y SCAFFOLDS

#### 3.2.1. Caracterización de micropartículas y plantilla de gelatina

Un estudio previo a la caracterización de los films y *scaffolds* poliméricos otorgó un análisis cuantitativo y cualitativo de las micropartículas de gelatina empleadas en fabricación de plantillas porogénicas para los andamiajes 3D. Para ello, se examinó la distribución del tamaño de micropartículas en número y volumen con un equipo Malvern Mastersizer 2000. Se utilizó un set de micropartículas de gelatina entre 50-300 µm puesto que de mayor interés era verificar cuál sería la distribución del tamaño de poros dentro de una plantilla. Posteriormente a la fabricación de la plantilla se tomaron fotografías al microscopio electrónico de barrido (SEM JSM, Hitachi S-4800, España, por sus siglas en inglés) a diferentes aumentos con el fin de analizar la morfología de micropartículas tras el procesado térmico.

### 3.2.2. Medida de densidad de los *films*

En el estudio de densidad se utilizó el principio de Arquímedes que afirma que cada cuerpo sumergido en un fluido recibe un empuje hidrostático igual que el peso del volumen del fluido que desalojó y la tercera ley de Newton sobre acción y reacción. Correspondientemente a esa definición se realizaron tres diferentes pesadas de cada material troquelado en forma de discos de 5 mm de diámetro en seco y sumergidos en n-octano (Sigma Aldrich, 99% pureza) de densidad 0,703 g/ml. Las densidades de los films se hallaron con la siguiente ecuación:

$$\rho_S = \frac{m_S}{m_S - m_A} \rho_R \quad (1)$$

donde  $\rho_S$  es la densidad del material,  $m_S$  la masa del material en seco,  $m_A$  la masa del material sumergido en octano y  $\rho_R$  es la densidad del octano. Las medidas de peso se realizaron con una balanza Mettler Toledo AX205 (Mettler-Toledo Inc., Columbus, OH, USA) y el kit de accesorios para las medidas de densidad.

### 3.2.3. Medida de porosidad de los *scaffolds*

La porosidad de los *scaffolds* PEA:PCL fue obtenida a partir de los datos de densidad de los films correspondientes. Se realizaron mediciones del peso de cada *scaffold* de 5mm de diámetro en seco e impregnado de octano. Para ello se introdujo el material en una jeringa rellena de octano y aplicó vacío hasta que las muestras se quedaron completamente sumergidas. Finalmente se calculó la porosidad según la siguiente fórmula:

$$\pi = \frac{V_p}{V_m + V_p} = \frac{m_{oc} \cdot V_{espoc}}{m_m \cdot V_{espm} + m_{oc} \cdot V_{espoc}} \quad (2)$$

donde  $\pi$  es la porosidad,  $V_p$  el volumen de los poros,  $V_m$  el volumen del material,  $m_m$  la masa del material seco,  $m_{oc}$  la masa del material en octano,  $V_{espm}$  el volumen específico del material y  $V_{espoc}$  el volumen específico de octano.

### 3.2.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Tanto para los films como para los *scaffolds* la medida se realizó a temperatura ambiente con un espectrofotómetro Thermo Nicolet Nexus (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Los espectros de las muestras films se recogieron usando Attenuated Total Reflectance Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) y fueron

cortados con las dimensiones 2,5 cmx0,5 cm. Se registró la absorbancia en el rango 500-4000 nm con 128 escaneos y una resolución de 8 cm<sup>-1</sup>.

En caso de los *scaffolds*, los espectros se tomaron usando Smart Diffuse Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (SDR-FTIR) en bromuro de potasio (KBr, FT-IR grade, ≥99%; Sigma Aldrich) en proporción másica 1%. Los discos de *scaffold* congelados previamente en nitrógeno líquido para facilitar el corte, fueron pulverizados en un mortero de mármol. Seguidamente, se mezclaron con KBr y secaron a vacío durante 2 días consecutivos. Después, con el espectrofotómetro se midió la absorbancia a temperatura ambiente con 128 escaneos y resolución de 8cm<sup>-1</sup>. Se tomó de referencia la muestra de bromuro de potasio.

### 3.2.5. Análisis termogravimétrico

El estudio termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) de los materiales se realizó con las muestras del peso entre 5-10mg. Las medidas se tomaron con un equipo TA-Instruments SDTQ600 (New Castle, DE, USA) en el rango de temperaturas entre 30-700°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Se utilizó nitrógeno como el gas de purga con un flujo de 50 ml/min.

### 3.2.6. Calorimetría diferencial de barrido

Para la caracterización por el método de calorimetría dinámica de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) se prepararon las muestras entre 4-10 mg y encapsuladas en unas cápsulas de aluminio. Empezando con la temperatura inicial de 30°C, se llevaron a cabo dos calentamientos y un enfriamiento en el rango de temperaturas de -80°C a 100°C. El equipo utilizado, Mettler Toledo DSC 823e (Mettler-Toledo Inc., Columbus, OH, USA) realizó las medidas usando un flujo de nitrógeno de 10°C/min.

### 3.2.7. Degradación acelerada de los *scaffolds*

Mediante la degradación acelerada de los *scaffolds* se pretendió analizar un proceso completo de eliminación de PCL del material en un medio básico. Para el ensayo se emplearon las muestras PEA:PCL de composiciones 71:29 y 67:33 y además las composiciones puras como las muestras de referencia. Todas ellas, en seis réplicas, tras ser pesadas, fueron incubadas a 37°C en una disolución acuosa de hidróxido sódico (NaOH; Scharlab) 5M en una proporción másica 1:50 respecto al material. Se establecieron 5 periodos de degradación que fueron: 4 días, 5 días, 6 días, 7 días y 10 días, tras los cuales los materiales y el sobrenadante fueron neutralizados con ácido clorhídrico (HCl; Sigma Aldrich) a pH 7. Además, se prepararon 5 réplicas de cada muestra que como muestras de control fueron degradadas en PBS (0,1M) durante 7 días. A continuación, los esqueletos remanentes de los *scaffolds* fueron secados y pesados nuevamente.

### 3.2.8. Degradación lenta de los *scaffolds*

El mismo procedimiento que en la degradación rápida fue empleado en el caso de degradación lenta. Esta vez las muestras en seis réplicas de las correspondientes composiciones se degradaron durante 7 días, 14 días, 28 días, 60 días y 90 días en una disolución de NaOH 0,05M a la temperatura de 37°C. El ensayo de control de cinco réplicas con PBS (0,1M) se hizo para el periodo máximo de 90 días. Después de neutralizar las muestras con HCl, los datos fueron adquiridos y procesados de la misma forma que para la degradación rápida.

### 3.2.9. Extracción de PCL de los *scaffolds*

Tras el estudio de degradación, los materiales contenían unas cantidades de PCL cuyas cadenas no llegaron a degradar y erosionar y por tanto permanecieron ocluidas en la red. Debido a eso, se pretendió mediante una extracción de la PCL restante examinar la composición de los *scaffolds* al cabo del periodo incompleto de degradación lenta. Se prepararon tres réplicas de cada material de cada tiempo de degradación incluyendo el tiempo cero. Se incubaron a 40°C en acetona durante 12 días hasta disolver del todo las muestras de PCL pura, lo que se consideró como un indicador de que la disolución fue completa. Transcurrido este tiempo, los esqueletos de PEA se extrajeron de la acetona, pasaron al dioxano y liofilizaron para evitar el colapso de su estructura tras el secado normal. El sobrenadante de cada muestra fue evaporado de acetona y disuelto durante un día en tetrahidrofurano (THF; Insulab-Panreac) para analizar la distribución de los pesos moleculares de cadenas de PCL mediante cromatografía de permeación de gel (GPC; Waters 1252 Binary HPLC Pump, Japón) mediante el índice de refracción, tomando por  $K=0,029\text{dl/g}$  y  $\alpha=0,700$  (Yuan et al., 2015). Para la curva de calibrado se utilizó un estándar de poliestireno con  $K= 0,014\text{dl/g}$  y  $\alpha=0,707$  (Wagner, 1985).

### 3.2.10. Ensayo de compresión de los *scaffolds*

Tanto con las muestras sin procesar como con los *scaffolds* sometidos a la degradación lenta se realizó un estudio de compresión a temperatura ambiente en seco con un ratio de fuerza constante de 100 mN/min, siendo la fuerza de compresión inicial 10 mN y 3000 mN de fuerza final. Para comprimir las muestras se eligieron las condiciones de deformación plana utilizando una mordaza de  $\varnothing=3$  mm para un *scaffold* de  $\varnothing=5$  mm. Con los *scaffolds* degradados, el ensayo se realizó después de su neutralización con HCl y tras dos días de desecado a temperatura ambiente y en vacío. El parámetro definitorio para la caracterización de los materiales fue el módulo de elasticidad aparente calculado como la tangente de la curva tensión-deformación en su fase inicial. Adicionalmente, se analizó la deformación final de cada material mediante el cálculo de cociente de la ordenada de curva de tensión en el origen y el módulo elástico final calculado entre 150-200 kPa.

### 3.4. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

#### 3.4.1. Esterilización de los *scaffolds*

En primer lugar, los *scaffolds* de composiciones PEA, PEA:PCL(86:14), PEA:PCL(71:29) y PCL ya troquelados en discos de 5 mm de diámetro fueron esterilizados con etanol 70. El método de esterilización consistió en un lavado de los materiales de 30 min y dos de 10 min con etanol 70 estéril en cabina de flujo laminar para mantener la esterilidad en todo el proceso. El cambio gradual de etanol al agua, necesario en caso de poli(etil acrilato) se hizo añadiendo agua MiliQ cada 15 min en proporción 2:1, 1:2 y 0:3. Finalmente, las muestras se lavaron 10 min en agua MiliQ y secaron a temperatura ambiente durante 5 min.

#### 3.4.2. Estudio de citotoxicidad por contacto indirecto (extracto de los polímeros)

En el ensayo indirecto de viabilidad celular se empleó fibroblastos de ratón de línea celular L929 (Sigma Aldrich), utilizando células en pase celular 8. Se siguió el protocolo según la norma española UNE-EN ISO 10993-5:2009 sobre el ensayo de citotoxicidad MTT. Las muestras de PEA, PEA:PCL(86:14), PEA:PCL(71:29) y PCL junto con los cubres de polietileno como control positivo y látex como control negativo se incubaron 24 horas a 37°C en medio de cultivo. Los extractos se prepararon con una proporción de 0,1 g de muestra por cada ml de medio de cultivos. El medio de cultivo de fibroblastos se obtuvo mezclando Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM alto en glucosa; Fisher) con 10% Suero Bovino Fetal (FBS; Fisher) y 100X de penicilina-estreptomina (P/S, Fisher).

Una vez descongeladas las células L929 y expandidas con la finalidad de obtener una mayor densidad celular, en tres placas de cultivo multipocillo P96 de poliestireno se sembraron fibroblastos con una densidad 10000 células por pocillo (el conteo se realizó con una cámara de Neubauer). Para cada tiempo de incubación y cada muestra se prepararon tres réplicas. Los cultivos de fibroblastos se incubaron 24 h a T=37°C con el fin de formar una monocapa en el fondo de cada pocillo. Al llevar a cabo este tiempo, el medio de cultivo en el que estaban las células fue remplazado por el extracto de los materiales. Lo siguiente fue dejar las placas incubadas 24h, 48h y 72h respectivamente a temperatura 37°C, presión de CO<sub>2</sub> 5% y con humedad superior al 90%. Tras cumplir el periodo de incubación se tomaron las fotos con un microscopio de contraste de fase Nikon ECLIPSA TS100 para analizar la morfología y proliferación celular de forma cualitativa, comparando así todas las muestras con los controles positivo y negativo.

En cada tiempo se estudió la citotoxicidad empleando el ensayo de MTT (24, 48 y 72 horas). Primero se preparó una disolución de bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Roche) y DMEM sin rojo fenol (Fisher) en proporción 1:9. Se remplazó el extracto de las muestras con la disolución MTT (100 µl por pocillo) y se dejaron incubando durante 2,5 horas. Al cabo de este tiempo, se trató

las muestras 30 s en agitación con isopropanol (Sigma Aldrich) para solubilizar los cristales de formazán. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en el equipo Victor Multilabel Counter 1420 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Para representar los resultados de viabilidad celular respecto al control positivo en unidades porcentuales se realizó el siguiente cálculo:

$$\%Viabilidad = \frac{100 \cdot Ab_m}{Ab_{CP}} \quad (3)$$

donde  $Ab_m$  es la densidad óptica del extracto de cada muestra y  $Ab_{CP}$  es la absorbancia del control positivo que en este caso eran los cubres de polietileno.

#### 3.4.3. Estudio de adhesión celular por contacto directo de células ADSCs

Se realizó un ensayo directo de adhesión celular utilizando las muestras previamente esterilizadas y acondicionadas en medio de cultivo durante 24h en el incubador. Las células madre derivadas del tejido adiposo (ADSCs), cedidas por el Dr. Juan Carlos Chachques (Hospital Pompidou, Francia), se extrajeron a partir de una biopsia de grasa del pericardio de ovejas de experimentación. Fueron expandidas y congeladas en nitrógeno líquido. Se preparó medio de cultivo con medio basal de Eagle ( $\alpha$ -MEM; Sigma Aldrich), 100X Suero Bovino Fetal (FBS, Fisher), 100X penicilina-estreptomicina (P/S, Fisher), 100X L-Glutamina (Lonza) y 1:4500 Plasmocin™ (Invivogen). Se sembraron las células ADSCs en pase celular 8 con una concentración de 120000 células por pocillo en cuatro réplicas para 1 día y otras cuatro para el día 7. Una vez las placas pasaron 45 min en incubación, se añadió más medio y dejó incubar otra vez el tiempo indicado. A continuación, se fijó los sustratos con 4% para-formaldehído (PFA; Panreac) durante 15 min. Después se realizó dos lavados con tampón fosfato (PB; 0,1M) de 5 min y finalmente se dejó en PB con azida sódica (Sigma Aldrich) al 0.05% a 4°C. En el caso de muestras cultivadas 7 días, se realizaron los cambios diarios del medio.

#### 3.4.4. Estudio de morfología celular de células ADSCs

En los tiempos estimados de evaluación biológica de las diferentes muestras (1 y 7 días), estas fueron fijadas con paraformaldehído (Panreac) al 2% más glutaraldehído (Sigma-Aldrich) al 2,5% durante 1 hora en un horno a 37°C, seguidos de dos lavados con PB 0,1M. El procedimiento de preparación de las muestras para obtener las fotografías por microscopía electrónica de barrido incluía: pos-fijación, deshidratación, desecado y recubrimiento con metal:

Pos-fijación: se prepararon dos réplicas de cada material que fueron cubiertas con tetraóxido de osmio ( $OsO_4$ ; Aname (EMS)) al 1% y agitadas durante 2 horas en oscuridad y con agitación constante. Seguidamente, se aplicaron 4 lavados de 10 min con agua destilada para eliminar los restos de osmio.

Deshidratación: el proceso de deshidratación fue graduado a través de etanol en concentraciones crecientes para evitar el encogimiento drástico de las células. Se utilizaron las disoluciones de etanol al 30%, 50%, 70%, 96% y 100%. Con cada una de las tres primeras concentraciones se hizo un lavado de 10 min y luego 3 lavados de 10 min con EtOH al 96% y 100% asegurando una completa remoción del agua. Los lavados se realizaron con disolventes enfriados a 4°C.

Desecado: eligiendo el método de secado se tomó en cuenta la fragilidad de las células y por tanto se siguió el protocolo del secado con hexametildisilano (HMDS; Sigma Aldrich) que al ser miscible en etanol es fácil de sustituir. La sustitución del etanol al 100% por HMDS fue gradual, realizando un lavado de 10 min con cada disolución en las siguientes proporciones: 2:1, 2:2, 1:2 y 0:1 (EtOH:HMDS). Después del último lavado, se eliminó el resto de HMDS y el material fue secado a temperatura ambiente *overnight* cubierto con un papel de filtro para asegurar la eliminación de todo el HMDS.

Metalización: para recubrimiento con el metal se utilizó carbono como el puente de conductividad y oro para la metalización. Los materiales fueron analizados y fotografiados al SEM JSM (Hitachi S-4800, España) a aumentos de 150X, 350X y 600X.

#### 3.4.5. Estudio de viabilidad celular por contacto directo

Además de estudiar la adhesión celular de células adiposas ADSCs, se examinó su viabilidad por contacto directo mediante un método cuantificativo que empleó (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS; Promega) de colorante. Igual que en caso del ensayo MTT, las células metabólicamente activas entran en reacción con MTS y producen formazán soluble en medio de cultivo. La cantidad del colorante absorbida por ellas se midió a 490 nm y evaluó el nivel de proliferación celular en los diferentes materiales ensayados.

Se prepararon tres réplicas de *scaffolds* de PEA, PEA:PCL(86:14), PEA:PCL(71:29) y PCL para los tiempos de 1, 4 y 7 días de cultivo *in vitro*. Las muestras se incubaron en una disolución de MTS y DMEM sin suplementos (1:5) durante 70 min a 37°C. Al cabo de este tiempo, se leyó la absorbancia a 490 nm para otras tres réplicas preparadas de cada *scaffold* del ensayo. Para el análisis de datos se tomaron las medias obtenidas para cada composición distinta mediante un espectrofotómetro Victor Multilabel Counter 1420 (Perkin Elmer, España) a 490 nm.

#### 3.4.6. Estudio de la distribución celular en los *scaffolds*

##### Marcaje por fluorescencia de núcleo y esqueleto celular:

El procedimiento de marcaje por fluorescencia se realizó con 4,6-diamino-2-fenilidol (DAPI; Sigma Aldrich) y faloidina 555 (Invitrogen). DAPI es un marcador de núcleo celular que al unirse a la secuencia de ADN en la región de adenina

permite detectar los núcleos de células fijadas o vivas. El segundo marcador, faloidina, se utilizó para visualizar la distribución de filamentos de actina en las células y así poder evaluar su capacidad de adhesión a los diferentes *scaffolds* evaluados.

En el ensayo se prepararon dos réplicas de cada tiempo y material, que en primer lugar pasaron por dos lavados con tampón fosfato PB 0,1M. Después, las muestras se agitaron 1 h en una disolución de tampón bloqueo compuesto por PB, 30% BSA (Albúmina de suero bovino; Invitrogen) y 0,1% de Triton X-100 (Sigma Aldrich). Este tratamiento tuvo como objetivo la permeabilización de células para facilitar el acceso de marcadores al interior de ellas. Al cabo de este tiempo, se hizo otro lavado con PB y luego el marcaje con faloidina en proporción 1:200 con la sustancia bloqueante que se dejó en agitación durante 1,5 h. A continuación, después de 3 lavados con PB, las células fueron marcadas con DAPI (1:10000) durante 10 min. El material sumergido en PB con azida sódica al 0.05% permaneció en la nevera hasta su estudio posterior en un microscopio confocal (Leica TCS SPE).

#### Marcaje con troponina (estudio de adhesión celular con ADSCs):

Como marcador se empleó Troponina I, un anticuerpo primario existente en el músculo cardíaco que tiende a unirse a actina. Éste participa en el movimiento y contracción de las células adiposas y les sirve también de sostén mecánico.

Dos réplicas de cada material previamente marcados con DAPI y faloidina se permeabilizaron a temperatura ambiente durante 2 h en solución bloqueo. Ésta consistía en PB, 10% FBS y 0.1% de Triton X-100. Seguidamente, se les incubó *overnight* con el anticuerpo primario rabbit policlonal Troponina I (1:100; Abcam). Al día siguiente, después de varios lavados, se añadió el anticuerpo secundario Goat anti-rabbit Alexa Fluor® 555 (Jackson ImmunoResearch) en proporción 1:200 (Invitrogen). Una vez incubados 1 h, los materiales fueron teñidos con DAPI en PB 0,1M (1:5000). Finalmente, se realizó las fotografías en el microscopio confocal (Leica TCS SPE) con un aumento de 40X.

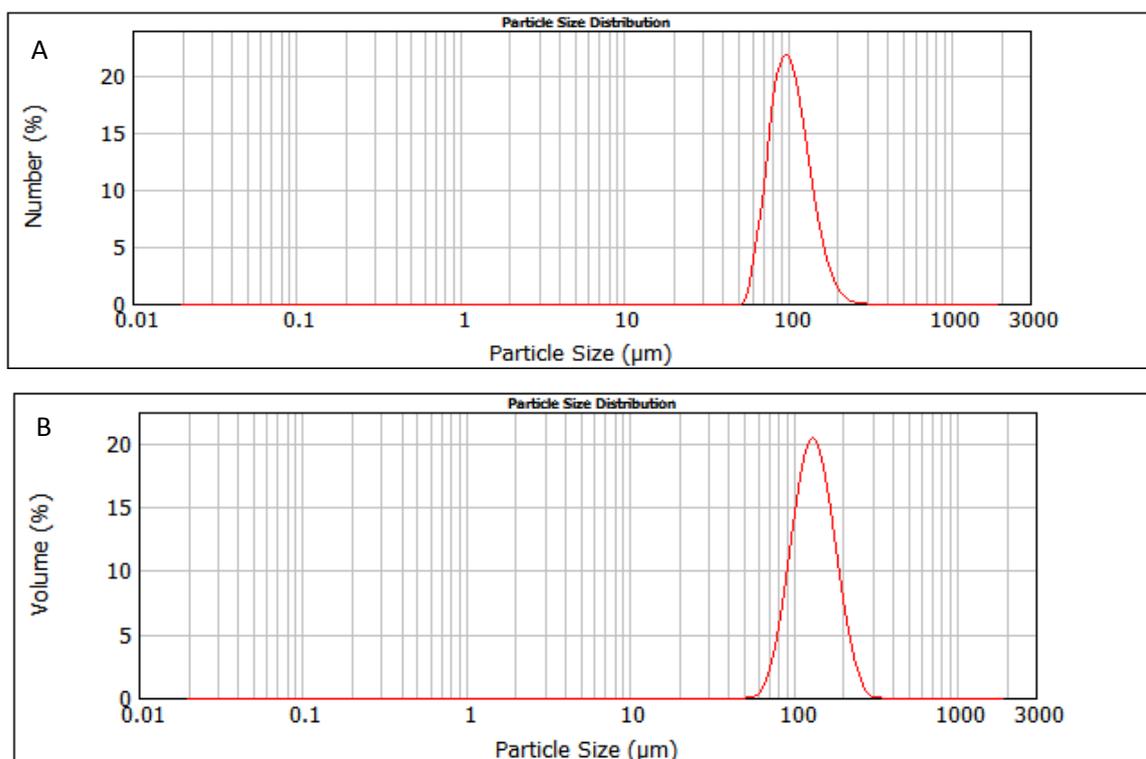
#### Marcaje con vimentina (estudio de viabilidad celular con ADSCs):

Además de los ensayos anteriores también se evaluó la expresión con un anticuerpo primario mouse monoclonal anti-vimentin clone V9 (Sigma Aldrich) sobre los citoesqueletos celulares de ADSCs adheridos a las muestras de PEA, PEA:PCL(86:14), PEA:PCL(71:29) y PCL. Para ello, al cabo de 7 días de cultivo sobre los materiales, las células fueron fijadas 15 min con para-formaldehído. Tras dos lavados de 5 min con PB, se realizó una incubación de 2 horas en la disolución de PB con 10% de FBS y 0,1% Triton X-100. Transcurrido este tiempo se realizó el marcaje *overnight* a 4°C con vimentina (1:200), al cabo del cual se aplicaron lavados con PB. La tinción se llevó a cabo con una incubación de 2 horas en una disolución de anticuerpo secundario Alexa Flour 488 Goat Antimouse IgG conjugated antibody (Invitrogen) y faloidina 555. Finalmente, fueron marcados los núcleos con DAPI a 1:1000 durante 10 min. Las fotografías se realizaron con el microscopio confocal Leica a 40X.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

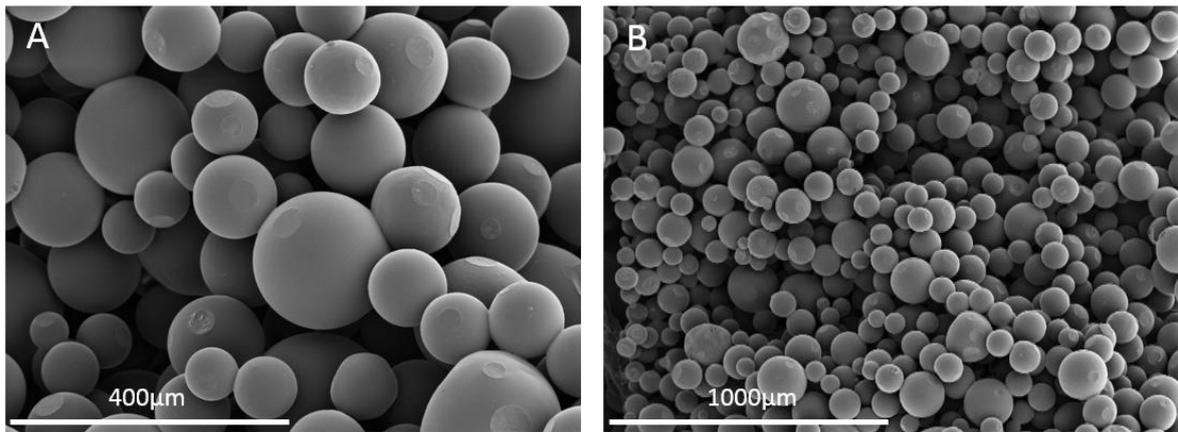
### 4.1. CARACTERIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS Y PLANTILLA DE GELATINA

Uno de los requisitos respecto al andamiaje a obtener incluía tener una porosidad regular y con diámetros dentro del rango de 100-250  $\mu\text{m}$  (Annabi et al., 2010). El estudio de la distribución del tamaño de partículas representado en la Figura 6 revela que predominan las micropartículas en rango de 91-124  $\mu\text{m}$  de diámetro en número y 120-138  $\mu\text{m}$  en volumen. Estos valores posteriormente determinarán la porosidad de los *scaffolds* fabricados.



**Figura 6.** Distribución del tamaño de partículas de gelatina en número (A) y volumen (B).

Por otro lado, las fotografías del microscopio electrónico de barrido confirman la correcta formación de la plantilla fabricada mediante humedad relativa. Entre las micropartículas cuya forma regular y redonda se observa en la imagen con mayor aumento, se observan puntos de unión entre sí, donde las micropartículas quedaron mínimamente fundidas y deformadas. En la etapa de polimerización, el espacio libre se quedará relleno de polímero. Se cree que el grado de interconexión entre las micropartículas puede dificultar la polimerización de la red PEA, puesto que las disoluciones con PCL son más viscosas y además la presencia de plantilla dificulta el proceso de unión de cadenas de PEA. Por tanto, no se debe aumentar mucho la cantidad de PCL empleada. Por el mismo motivo, es muy probable observar diferencias en la composición de los *scaffolds* y films cuyas condiciones al polimerizar facilitaban el entrecruzamiento de la matriz PEA.

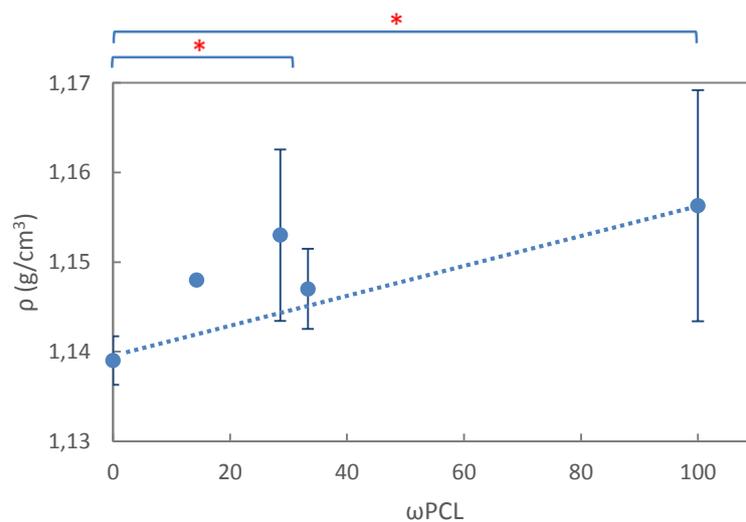


**Figura 7.** Fotografía del corte de la plantilla de micropartículas de gelatina tomada en el microscopio electrónico de barrido a A. X150, B. X50 aumentos.

## 4.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MECÁNICA - FILMS

### 4.2.1. Medida de densidad

La densidad es una de las características útiles en cuanto a la exploración del material y su comparación con otros. Además, la información sobre la densidad de cada film era crucial para poder determinar la porosidad del *scaffold* obtenido usando las mismas proporciones de reactivos y solventes.



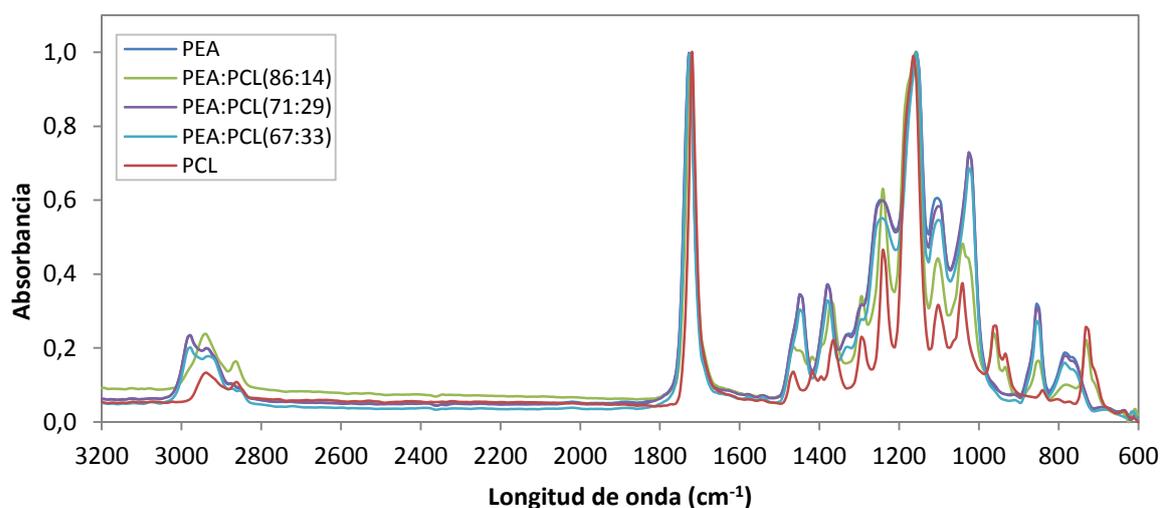
**Figura 8.** Densidad del film vs. cantidad porcentual nominal de PCL. El gráfico muestra las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 8 se mostraron las densidades de los films poliméricos de PEA, PEA:PCL (86:14), PEA:PCL (71:29), PEA:PCL (67:33) y PCL respecto a la fracción másica porcentual de PCL. Se aprecia un incremento de ella a medida que la cantidad de PCL aumenta puesto que es en parte cristalino y las cadenas cristalinas están más empaquetadas que cadenas amorfas. Sin embargo, la razón principal se debe a las cadenas de PCL que rellenan los huecos en la red de PEA por lo que el material se vuelve más denso. El resultado se aproxima también a los datos teóricos, donde la PCL tiene una densidad de  $1,145 \text{ g/ cm}^3$ , según el catálogo web (“Sigma-Aldrich,” n.d.). Entre las distintas composiciones de PEA:PCL, el aumento de densidad no es lineal pero se observa claramente que los valores son más altos que para la muestra con PEA puro. Mayor cristalinidad del material significará mayor resistencia a deformación y disolución, mayor rigidez y estabilidad dimensional.

Según los resultados de análisis estadístico existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de densidad de PEA y PEA:PCL (71:29) y entre PEA y PCL debido a una mayor dispersión de datos, mientras las densidades de las demás combinaciones no varían significativamente. Dado que la desviación estándar estimada para el film de PCL puro es elevada, este dato no se considera válido, pero dado que la media se aproxima al valor bibliográfico se lo utilizará para el cálculo de porosidad de los *scaffolds*.

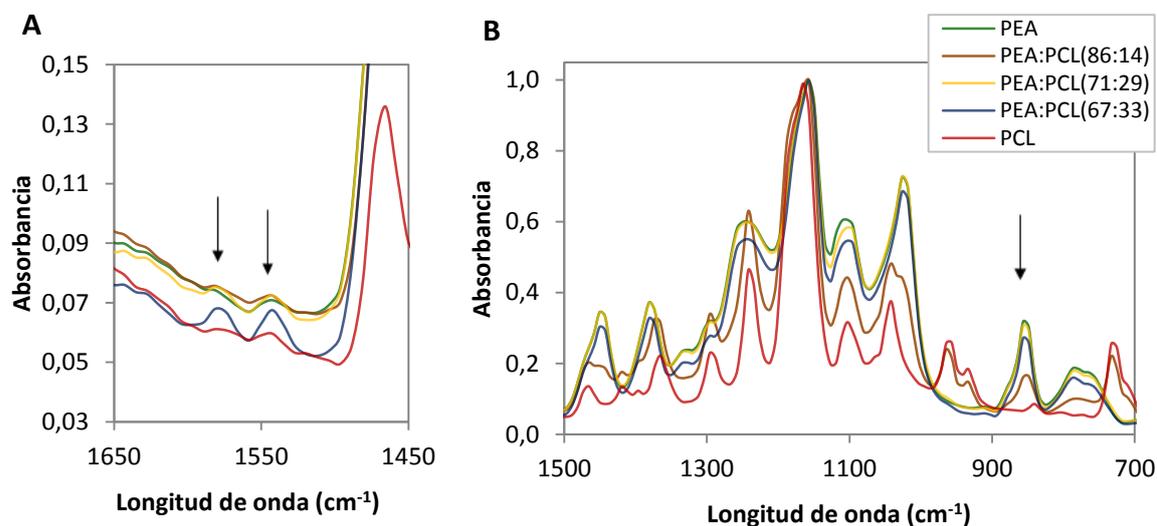
#### 4.2.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Dado que se considera importante verificar qué tipos de compuestos se lograron formar durante la síntesis polimérica, mediante la técnica FTIR se estudió en primer lugar la estructura química de los films PEA:PCL. En consecuencia, al determinar las diferencias estructurales entre las distintas concentraciones de PEA y PCL se pudo confirmar que ambos poliésteres presentan similares grupos funcionales (del Real, Wallander, Maciel, Cedillo, & Loza, 2015).



**Figura 9.** Espectro FTIR de los films de PEA:PCL.

Asimismo, en cada espectro se diferencian las vibraciones en el rango de 3100-2750  $\text{cm}^{-1}$  que indican la presencia de grupos alifáticos  $-\text{CH}_2$  simétricos y asimétricos y una banda de absorción intensa entre 1800-1650  $\text{cm}^{-1}$  que se corresponde a un enlace de carbono  $\text{C}=\text{O}$ , característico de polímeros conteniendo ésteres como es el caso de PCL, PEA y EGDMA. Además, las bandas de absorción del rango 1600-1500  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 10-A) representan los enlaces  $\text{C}=\text{C}$  de anillos aromáticos provenientes de ambos iniciadores BPO y DMT que en menor proporción se quedan enganchados en la red de PEA. Por tanto, estos picos se distinguen en todos los films excepto del PCL. También se observan bandas correspondientes a los enlaces de  $\text{C}-\text{O}$  y  $\text{C}-\text{N}$  cuyos rangos de vibración se solapan en el rango entre 1300 y 1000  $\text{cm}^{-1}$ , lo que se expresa por una intensificación de absorbancia en esta región. Mientras que el grupo  $\text{C}-\text{O}$  pertenece a los ésteres, los enlaces  $\text{C}-\text{N}$  se deben a la presencia de amina aromática de DMT presente solamente en las muestras con la red de PEA. En consecuencia, las absorbancias en este rango son más intensas para los films de PEA y sus composiciones que para el film de PCL.

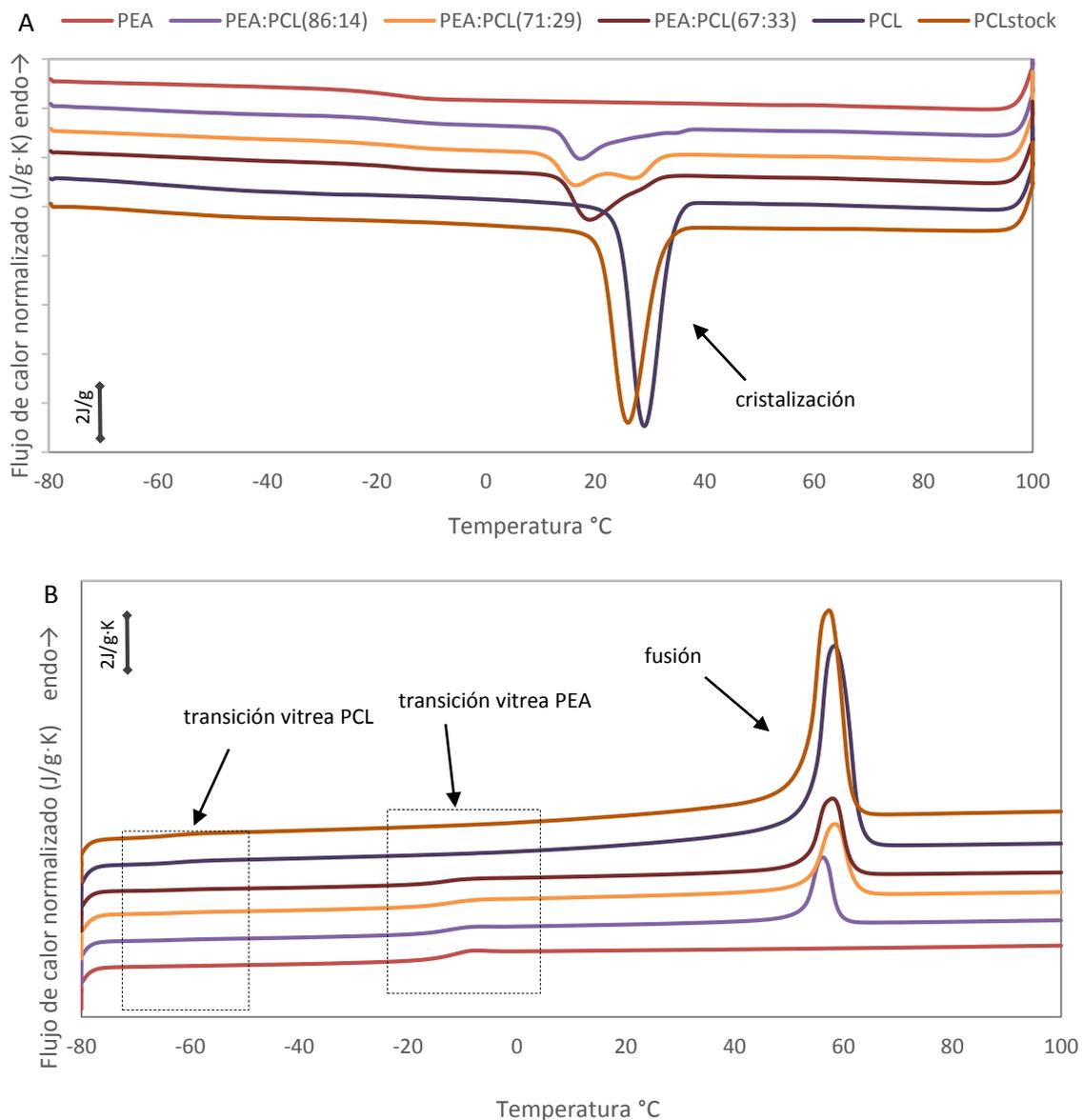


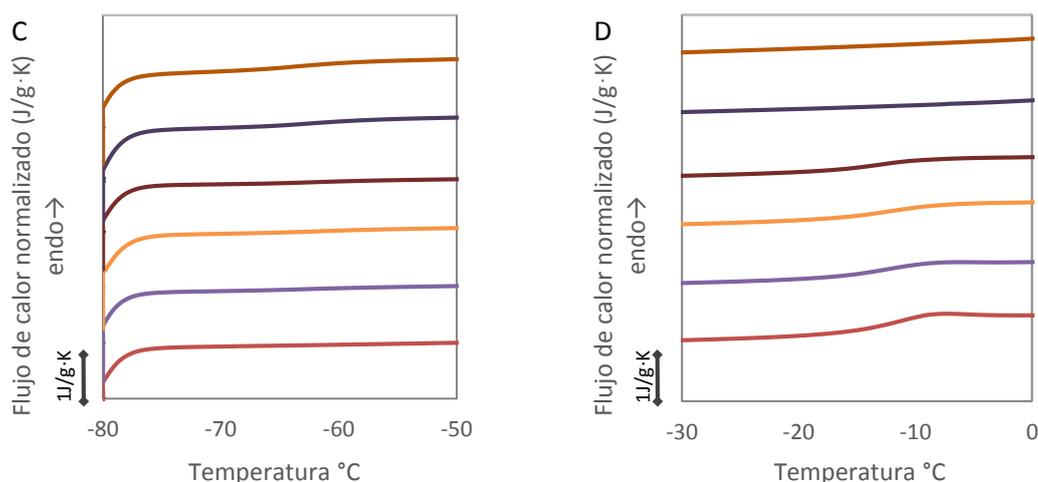
**Figura 10.** Espectros FTIR de los films de PEA:PCL en el rango: A. 1650-1450 $\text{cm}^{-1}$ , B. 1500-700 $\text{cm}^{-1}$ .

Los resultados confirman la presencia de todos los grupos funcionales de la red semi-IPN formados por la síntesis polimérica vía redox. Además, no se observó ningún componente adicional fuera de lugar, por lo que se puede decir que el material cumple con los requisitos de esta fase de investigación. Por último, la semejanza de grupos funcionales entre PEA, PCL y EGDMA no implica grandes diferencias en los espectros salvo las mencionadas a nivel de detalle.

### 4.2.3. Calorimetría diferencial de barrido

Posteriormente se utilizó el ensayo calorimétrico de los films que contienen PEA reticulado con 2% EGDMA para comprobar el grado de cristalinidad de la PCL en las muestras, analizar sus propiedades térmicas y la referencia de los materiales porosos 3D. Durante el primer calentamiento tuvo lugar un proceso de borrado de memoria térmica, lo que resultó en una disminución de la cristalinidad al realizar un enfriamiento controlado tras el primer calentamiento y lo que se puede observar en el segundo calentamiento. En la Figura 11 se representaron los termogramas de enfriamiento y segundo calentamiento ya que aportaron los datos sobre el estado actual de los materiales. A medida que la cantidad de PCL en el film aumenta, se observa un incremento de los picos endotérmicos de la temperatura de fusión de PCL (~58°C) junto con los picos exotérmicos a la temperatura de cristalización de PCL (20-30°C) observadas en el enfriamiento.





**Figura 11.** Representación de termograma DSC de los films PEA:PCL expresado en unidades de calor específico en función de la temperatura durante: A. enfriamiento, B. segundo calentamiento, C.  $T_{gPCL}$ , D.  $T_{gPEA}$ . Los espectros fueron desplazados verticalmente para una mejor visualización.

Cuanto más cristalino es el material y más PCL lleva, más grande en el área bajo el pico. También cuanto mayor anchura tiene el pico, más heterogéneo es, lo que observamos en caso de las combinaciones de PEA:PCL. Además aparece un desplazamiento de temperaturas de cristalización de PCL hacia temperaturas menores a medida de que disminuye su proporción en la muestra. Al obtener un pico adicional en el enfriamiento de film PEA:PCL(71:29), se tiene en cuenta el segundo para los cálculos, siendo el primero, a temperatura más alta, una indicación de alguna impureza en este material.

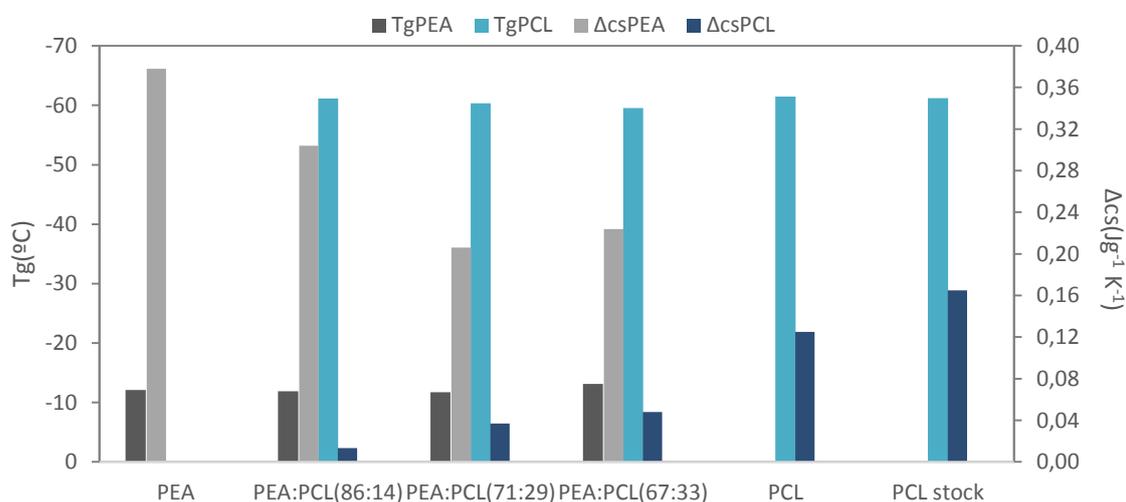
Seguidamente, se aprecian los pequeños cambios del flujo de calor a temperaturas alrededor de  $-63^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ , relativos a las temperaturas de transición vítrea de PCL y PEA, respectivamente. La supuesta razón de tan pequeñas variaciones es la formación abundante de cristales de PCL que enmascaran la señal de la red amorfa de PEA dificultando su detección.

**Tabla 2.** Temperaturas de transiciones térmicas del segundo calentamiento: vítrea ( $T_g$ ), de fusión ( $T_m$ ), calores específicos ( $\Delta c_s$ ), entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) y transiciones del enfriamiento: de cristalización ( $T_c$ ) y entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ ) de los films de composiciones PEA:PCL.

Material	$T_{gPEA}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta c_{sPEA}$ ( $\text{Jg}^{-1} \text{K}^{-1}$ )	$T_{gPCL}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta c_{sPCL}$ ( $\text{Jg}^{-1} \text{K}^{-1}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_m$ ( $\text{Jg}^{-1}$ )	$T_c$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_c$ ( $\text{Jg}^{-1}$ )
PEA	-12,10	0,378	-	-	-	-	-	-
PEA:PCL(86:14)	-11,90	0,304	-61,13	0,013	56,86	-8,92	17,22	12,67
PEA:PCL(71:29)	-11,74	0,206	-60,35	0,037	58,12	-17,84	16,79	18,03
PEA:PCL(67:33)	-13,14	0,224	-59,55	0,048	57,60	-19,37	19,34	18,95
PCL	-	-	-61,48	0,125	58,36	-55,43	29,74	57,31
PCL stock	-	-	-61,18	0,165	56,71	-55,79	26,66	56,86

De acuerdo con las observaciones previas y los datos resumidos en la Tabla 2 y presentados en la Figura 12, las temperaturas  $T_{gPEA}$  y  $T_{gPCL}$  aumentan para cada

composición de los films conforme aumenta la cantidad de PCL y disminuye la de PEA, manteniendo sin embargo los valores aproximados a los obtenidos para los homopolímeros. Por tanto, se concluye que las cadenas poliméricas de ambos polímeros aunque sintetizados se someten al movimiento a las mismas temperaturas que siendo homopolímeros y que no hay constreñimientos significativos al movimiento de segmentos de cadenas por encontrarse combinados. También se observa a mayores concentraciones de PCL la tendencia decreciente de  $\Delta c_{sPEA}$  y creciente de  $\Delta c_{sPCL}$ , lo que se explica por el aumento de las partes amorfa y cristalina de PCL en el material y disminución consecutiva de la fase amorfa de PEA. Puesto que cada composición consiste en su mayor parte en PEA, el valor  $\Delta c_{sPEA}$  se mantiene siempre mayor que  $\Delta c_{sPCL}$ . Además de eso, la Tabla 2 demuestra que la parte fundida del polímero corresponde a la parte cristalizada durante la medida, porque los valores de entalpías de fusión, aunque con pequeñas variaciones, equivalen a los de la entalpía de cristalización.



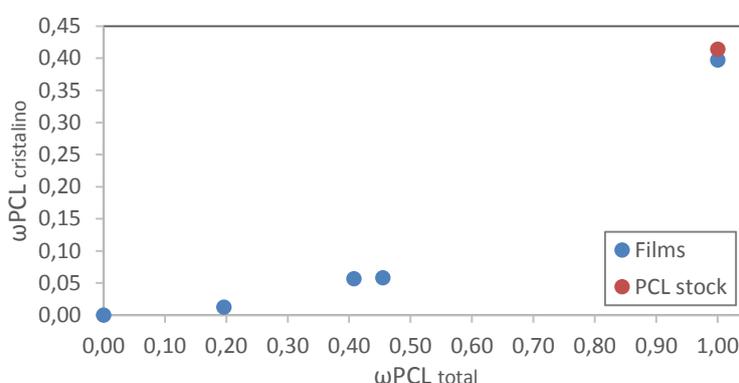
**Figura 12.** Comparación de las temperaturas de transición vítrea de PEA y PCL en los films PEA:PCL y sus respectivos saltos de calor específico al atravesar la transición vítrea.

Para el análisis de cantidades empíricas de cada polímero en su fase amorfa y cristalina (en el caso de PCL), se utilizaron los valores experimentales de DSC. Para el cálculo de la parte amorfa de PEA en cada semi-IPN se tomó en cuenta el valor del salto entálpico obtenido para el film de PEA puro; el cociente entre ambos se consideró como la fracción másica de PEA experimental en cada composición. Para el cálculo de las fases de PCL se empleó, por un lado, la entalpía del monocristal de PCL con el valor de -139,5 J/g (Pitt et al., 1981), por la cual se dividió el área bajo el pico de fusión de cada semi-IPN para calcular la fracción de PCL cristalina. La fracción de PCL amorfa se calculó de manera análoga a como se hizo para el PEA. Como era de suponer, los resultados en la Figura 13 indican un aumento de cristalinidad desde el 6% en los materiales conteniendo PEA y PCL hasta el 40% en el homopolímero de PCL, debido a la mayor presencia de PCL y siendo siempre la parte amorfa de PCL mayor que la parte cristalina. Mayor concentración de PCL facilita el proceso de cristalización

mientras con poca cantidad las moléculas están más dispersas entre cadenas de PEA, lo que dificulta su empaquetamiento. Como se puede ver en la Tabla 3, los valores experimentales de film de PCL elaborado por *solvent-casting* equivalen a los valores obtenidos para PCL del *stock* (frasco comercial sin elaborar).

**Tabla 3.** Representación en fracción másica de las cantidades experimentales de PEA, PCL amorfo, y PCL cristalino en los films, para cada composición nominal.

	PEA	PEA:PCL (86:14)	PEA:PCL (71:29)	PEA:PCL (67:33)	PCL	PCL stock
$\omega_{PEA}$ amorfo	1,000	0,804	0,545	0,593	0,000	0,000
$\omega_{PCL}$ total	0,000	0,196	0,455	0,407	1,000	1,000
$\omega_{PCL}$ cristalino	0,000	0,013	0,058	0,057	0,397	0,414
$\omega_{PCL}$ amorfo	0,000	0,183	0,397	0,351	0,603	0,586



**Figura 13.** Representación en fracción PCL total en la muestra vs. parte cristalina de PCL.

### 4.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MECÁNICA – SCAFFOLDS

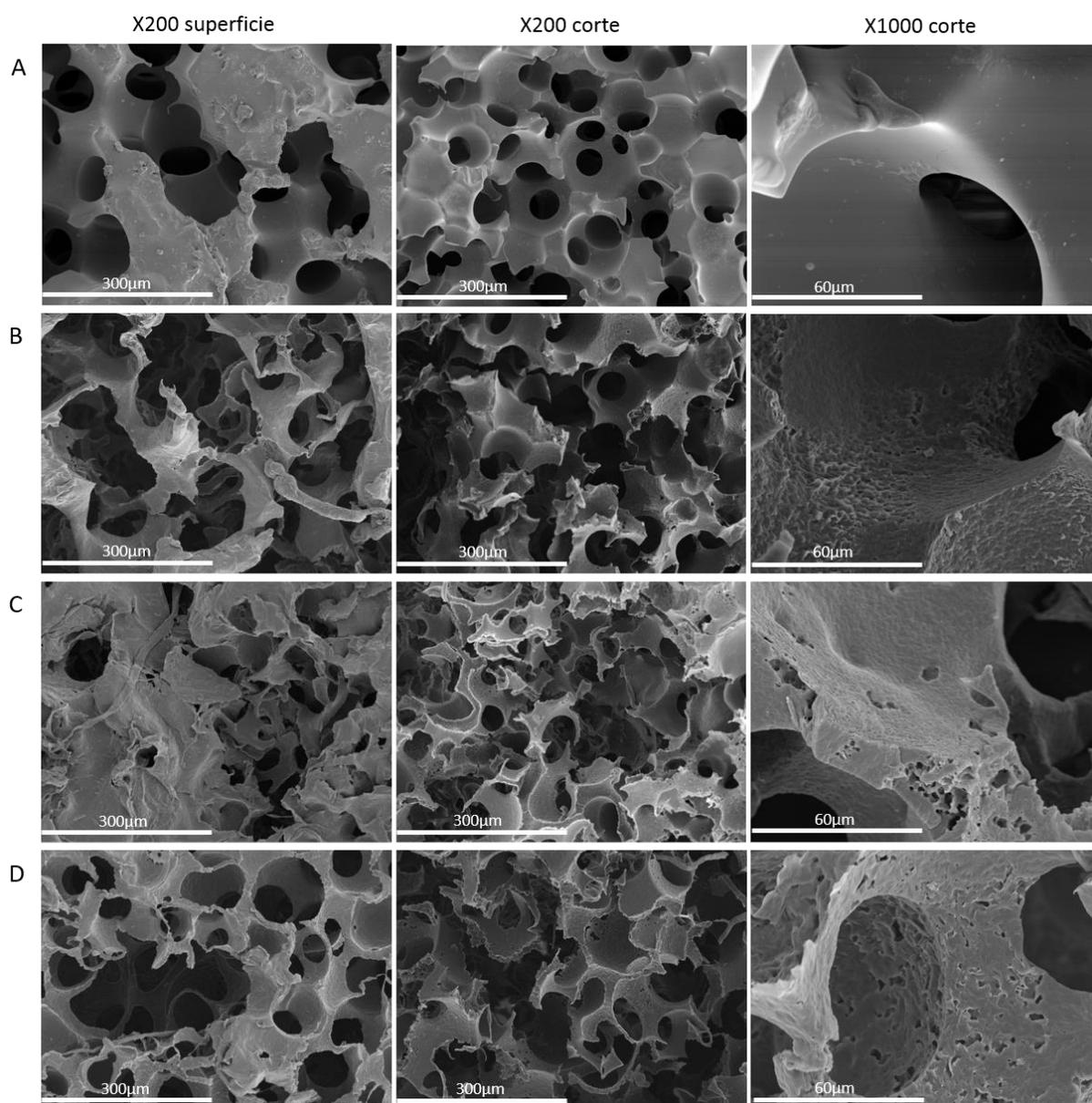
#### 4.3.1. Morfología y porosidad

De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 4), se afirma que el grado de porosidad es mayor para las composiciones de PEA:PCL que para los *scaffolds* puros (PEA, PCL), pero se acercan bastante al nivel de porosidad de PCL. En cambio, el menor grado de porosidad lo muestra el *scaffold* de PEA, probablemente porque al no contener PCL puede colapsar más durante el secado tras la eliminación del porógeno, por lo que se concluye que la presencia de PCL favorece la porosidad del material (mantiene la estructura original de la plantilla porogénica).

Estas conclusiones fueron confirmadas mediante análisis estadístico, por el cual se demostró la homogeneidad de las muestras de PEA:PCL (71:29), PEA:PCL (67:33) y PCL y las diferencias estadísticamente significativas entre PEA y los demás materiales.

**Tabla 4.** Porosidad de los scaffolds de PEA:PCL.

	POROSIDAD	DESVIACIÓN
PEA	0,621	±0.028
PEA:PCL(71:29)	0,890	±0.006
PEA:PCL(67:33)	0,872	±0.008
PCL	0,870	±0.007



**Figura 14.** Imágenes tomadas con el microscopio electrónico de barrido de superficie a X200, corte longitudinal a X200 y de la pared interna a X1000 de los scaffolds de A. PEA, B. PEA:PCL(71:29), C: PEA:PCL(67:33), D. PCL.

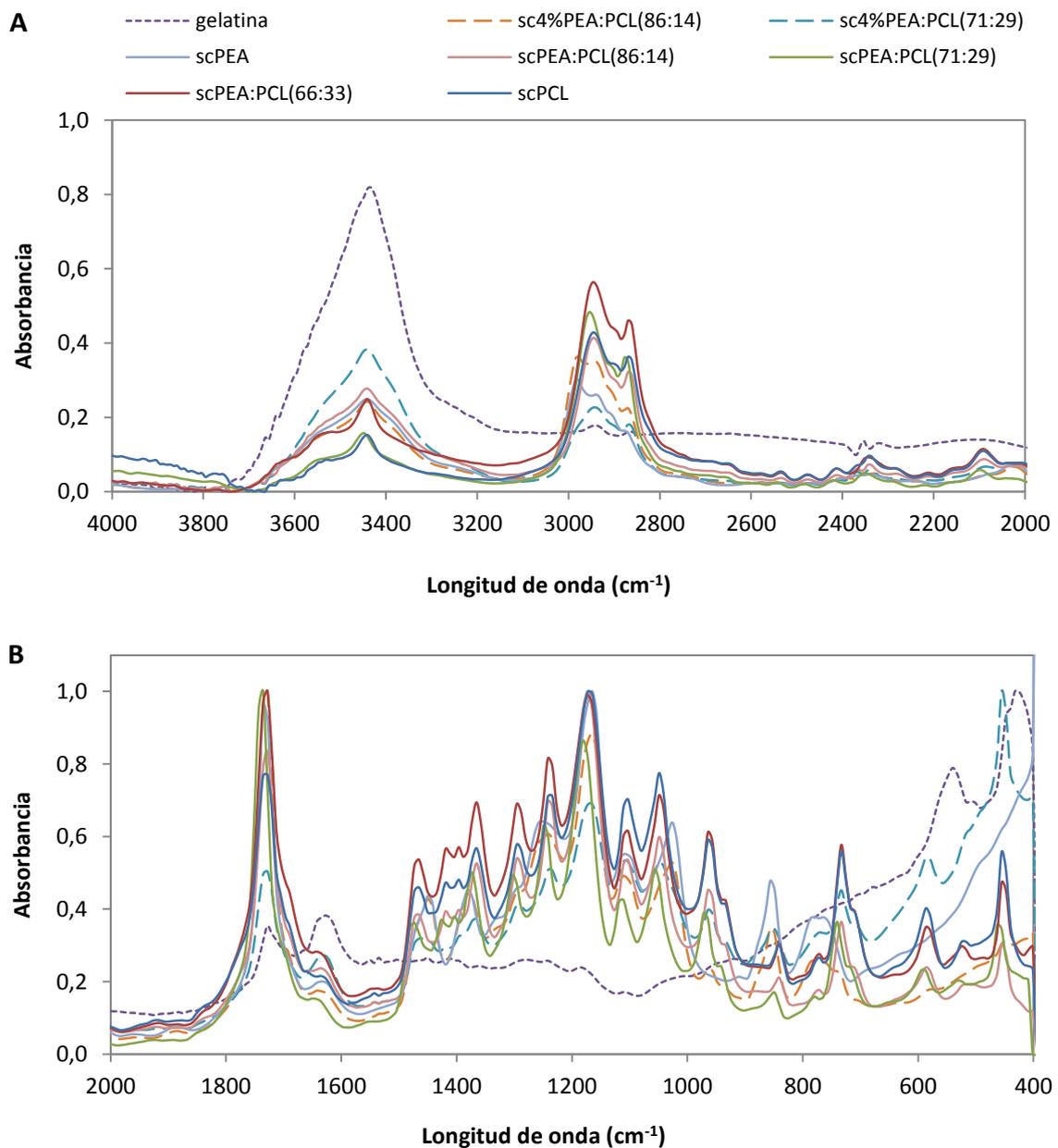
Un mayor grado de porosidad en las muestras que contienen PCL fue observado también mediante las fotografías de microscopía electrónica de barrido (Figura 14). Se comprueba que sus poros están mejor interconectados, mientras las trabéculas son más finas y menos compactas. Dicha estructura más compacta de PEA se debe a su poca viscosidad que al polimerizar permite recubrir bien la plantilla mientras que otras composiciones requieren un tratamiento adicional con bomba de vacío para poder penetrar en el molde. Por otro lado, pese a las medidas adoptadas, PEA tiende a contraerse mientras la PCL, por no sufrir tal contracción y ser más rígida, impide al colapso del material.

El tamaño de poros se mantiene para todos los materiales en el rango entre 70-130  $\mu\text{m}$  aunque en las muestras con PCL predominan los valores alrededor de 120  $\mu\text{m}$  mientras para PEA se encuentran entre 70-90  $\mu\text{m}$ , como era de esperar según lo comentado anteriormente. Al comparar con el tamaño de micropartículas que sirvieron de plantilla (entre 100-250  $\mu\text{m}$ ) se aprecia una disminución de poros supuestamente debida al procesado posterior. Tanto los lavados con agua y etanol como el secado podrían haber causado un encogimiento del polímero. No obstante, la porosidad obtenida presenta una gran ventaja ya que facilita el movimiento y adhesión celular dentro de un *scaffold*.

Además, las imágenes a X1000 revelaron las irregularidades y microporosidades cubriendo las superficies de las paredes internas de los *scaffolds* que contenían PCL. Por el contrario, el polímero de PEA forma una estructura lisa y regular. Se cree que dichas irregularidades serán otra conveniencia que beneficiará el crecimiento y adhesión celular.

#### 4.3.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Dado que el protocolo de fabricación de los *scaffolds* incluía el empleo de gelatina como un nuevo componente que ha de ser eliminado, fue necesario comprobar si su presencia afectaba y en qué nivel el proceso de síntesis del material. Se realizó un estudio comparativo entre todos los tipos de *scaffolds* (PEA reticulado con 2% de EGDMA) y el espectro de las micropartículas de gelatina y además, el resultado fue comparado con los resultados de los films.



**Figura 15.** Espectro FT-IR de los *scaffolds* de PEA:PCL en el rango: A. 3800-2000 $cm^{-1}$ , B. 2000-400 $cm^{-1}$ .

En primer lugar, se observa que los espectros de absorción de IR representados en la Figura 15 para *scaffolds* demuestran un comportamiento similar al de los films de las mismas composiciones. En el rango de 3100-2750  $\text{cm}^{-1}$  aparecen las absorbancias del grupo alifático  $-\text{CH}_2$ . También se observa un pico del enlace éster  $\text{C}=\text{O}$  entre 1800 y 1650  $\text{cm}^{-1}$  que revela la tendencia creciente conforme disminuye la cantidad de PCL y aumenta la de PEA, puesto que en este último, el grupo  $\text{C}=\text{O}$  es mucho más abundante (en carbonos alternos de la cadena principal, en lugar de cada seis). Consecuentemente, se aprecia unas absorbancias acumuladas en la región de 1300-1000  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden al enlace éster  $\text{C}-\text{O}$  y son comunes para todos los materiales. No se puede observar ninguna tendencia ya que se solapan con el rango de las vibraciones características del enlace  $\text{C}-\text{N}$  de amina terciaria proveniente del iniciador DMT.

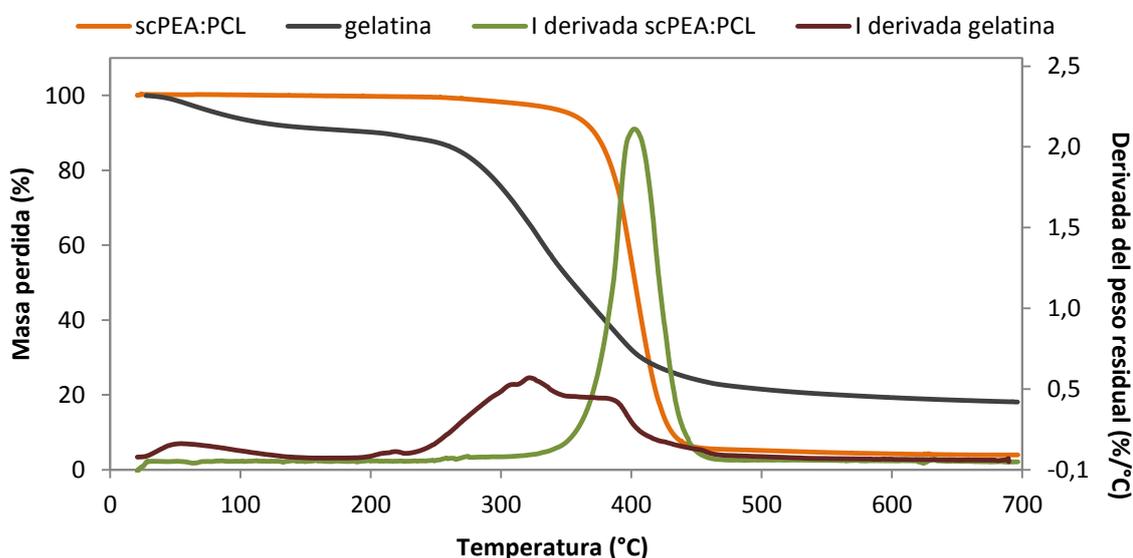
En cada material se diferencia un rango de absorción específico de gelatina entre 3700-3200 $\text{cm}^{-1}$ , y 600-400 $\text{cm}^{-1}$  en algún caso. lo que podría indicar la presencia de los residuos de ella en los *scaffolds* a pesar del proceso de su eliminación. Teniendo en cuenta que el tamaño de micropartículas variaba en un rango establecido y por tanto la estructura de la plantilla no fue homogénea es muy posible que hubiera partículas aisladas de las demás que al polimerizar el material se quedaron atrapadas en el polímero sin poder ser eliminadas. En ese caso, habría que mejorar el método de obtención de las plantillas porogénicas para que estuvieran más interconectadas. Sin embargo, las bandas de absorción asociadas a la gelatina en los materiales resultan despreciables respecto a la gelatina pura, indicando en cualquier caso baja presencia de restos de gelatina.

Adicionalmente, la comparación fue complementada por los *scaffolds* de las composiciones PEA:PCL(86:14) y PEA:PCL(71:29) con mayor grado de reticulación (4% EGDMA) para evitar en mayor medida el colapso de la red de PEA, para estudiar si habían diferencias significativas con los materiales menos reticulados. Sin embargo, no se observó ningún cambio en el tipo de los grupos funcionales presentes, ni tampoco una tendencia clara de aumento de absorción a ninguna longitud de onda.

### 4.3.3. Análisis termogravimétrico

Este método sirvió como un punto de control con uno de los *scaffolds* elegido aleatoriamente y la plantilla de gelatina, con el fin de determinar las diferencias en la degradación térmica de ambos y la influencia de gelatina sobre el material. Los resultados fueron referidos al análisis de TGA de los films PEA/PCL realizado con el mismo protocolo (Lozano Picazo et al., 2014), en los cuales la pérdida de peso ocurría entre 300-500°C con un máximo alrededor de 400°C.

En consecuencia, en la Figura 16 se observa que para la semi-IPN la máxima pérdida de masa ocurre en el mismo rango de temperaturas que en la muestra 2D de referencia. Por lo contrario, la gelatina degrada a temperaturas entre 200-450°C con la máxima elevación de la derivada a 330°C.



**Figura 16.** Representación de masas perdidas y sus primeras derivadas de un *scaffold* PEA:PCL y micropartículas de gelatina en el rango de 0-700°C.

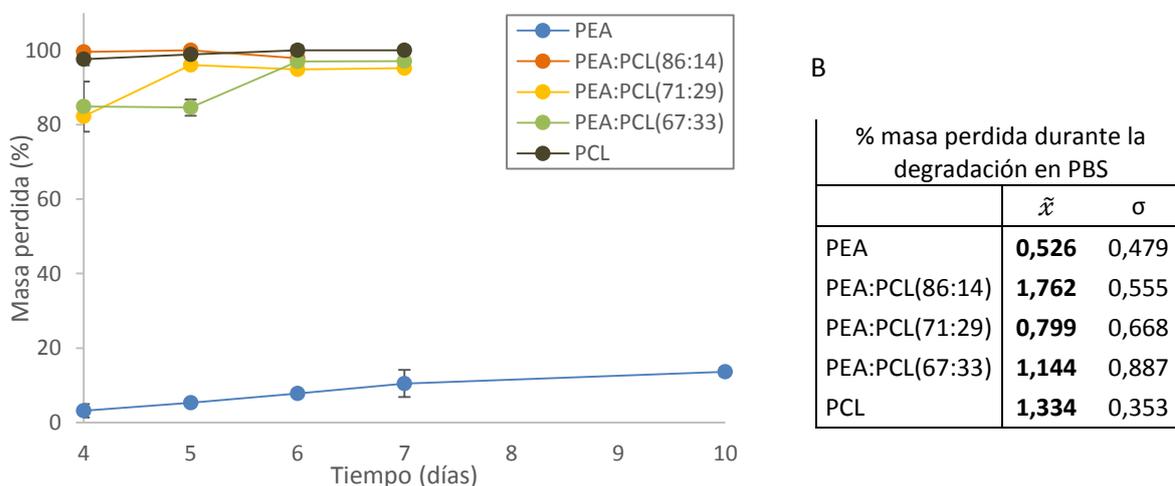
Además, en caso del *scaffold* se aprecia una degradación completa y de forma brusca mientras para la muestra de gelatina este proceso es continuo durante todo el tiempo del ensayo y acaba con una masa residual de 18% de la masa inicial, por tanto no se degrada del todo.

Asimismo, se comprobó que el material no reaccionaba con la gelatina durante la polimerización, pues el *scaffold* seguía el comportamiento de los films. No se detectan los restos de gelatina, por lo cual se afirma que el método de lavado es eficaz para eliminarla, y reafirma lo que se observa en los espectros FTIR de que son más bien trazas residuales.

Por último, al ver las similitudes entre el *scaffold* y todas las concentraciones de los films, los resultados se consideran suficientes como para asumir que el comportamiento térmico de los demás *scaffolds* permanecerá sin cambios significativos con respecto a los films correspondientes.

#### 4.3.4. Degradación acelerada

Mediante la degradación acelerada se pretendió analizar la descomposición completa de los *scaffolds* con PEA reticulado con 2% EGDMA en corto periodo de tiempo. Tras 6 días de degradación en medio básico al 5M NaOH se obtiene una completa degradación de PCL y casi completa descomposición de todas las composiciones PEA:PCL(86:14), PEA:PCL(71:29) y PEA:PCL(67:33). El PEA puro no se degradó, como era de esperar. Las muestras de PCL y semi-IPNs llegaron a degradarse enteramente a partir del día 7 cuando la masa perdida era el 100% de su masa inicial. Sabiendo que los *scaffolds* estaban compuestos por una red entrecruzada de PEA que no degrada y las cadenas de PCL teóricamente estaban enredados en la red pero no formaban parte de ella, al finalizar la degradación se esperaba obtener una matriz de PEA. Sin embargo, se observa que la reticulación de PEA en los materiales no resultó en una percolación completa en todo el material sino en pedazos de red inconexos.



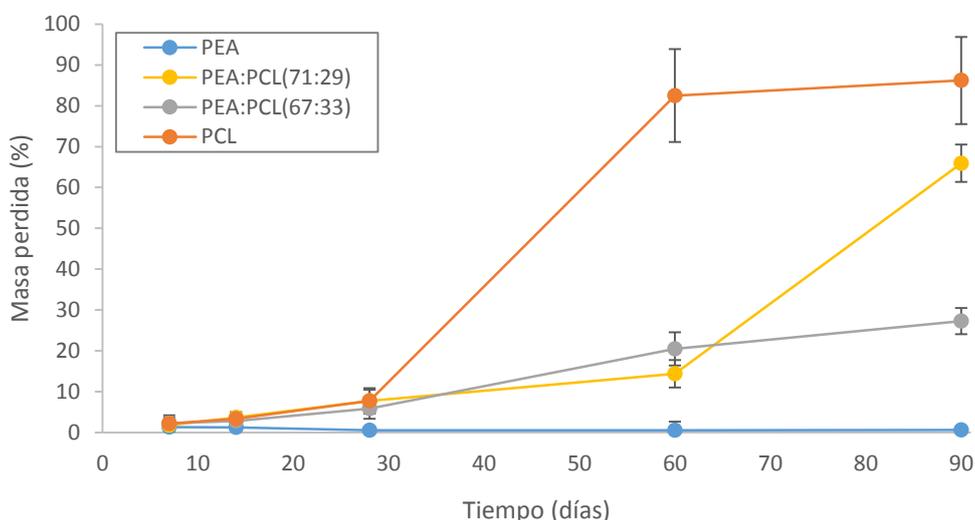
**Figura 17.** A. Masa perdida de los *scaffolds* PEA:PCL durante 4, 5, 6, 7, 10 días de degradación en 5M NaOH, B. Los valores porcentuales de masa perdida media de los *scaffolds* degradados en PBS durante 7 días como muestras de control en medio menos agresivo que el básico, con sus respectivas desviaciones estándar.

Como se aprecia en la Figura 17, el retraso en descomposición de los materiales fue causado por la red de PEA que al no estar homogénea en todo el material y sostenida entre las cadenas de PCL, al final se quedó partida en fragmentos y cadenas sueltas en el medio degradado. Este resultado indica que el grado de reticulación de PEA no fue suficiente para sintetizar una red continua en todo el *scaffold*. Adicionalmente una pérdida de masa en el *scaffold* de PEA de hasta 14% de su valor inicial a los 10 días muestra claramente la presencia de cadenas de PEA que al quedarse no reticuladas tras la polimerización fueron solubilizadas, disminuyendo el peso del material. El comportamiento similar a una escala mucho menor se observa en los *scaffolds* incubados en PBS (mucho menos agresivo) con una mayor pérdida de masa en caso de PCL y todas las composiciones y menor pero apreciable en *scaffold* de PEA.

#### 4.3.5. Degradación lenta

Un proceso de degradación a tiempo moderado refleja en mayor detalle los cambios morfológicos y estructurales del material polimérico que ocurren durante la descomposición biológica tras su implante. Como resultado de este proceso el material modifica sus propiedades mecánicas conforme se van variando las proporciones entre la fase cristalina y amorfa de los polímeros, disminuyen los pesos moleculares de cadenas sometidas a rupturas de enlaces continuas y por último conforme se reduzca su masa total.

La degradación lenta que se efectuó para los materiales de PEA, PEA:PCL(71:29), PEA:PCL(67:33) y PCL (con PEA reticulado con 2% EGDMA) durante 90 días en 0,05M NaOH mostró unas pérdidas de masa entre 27% para el *scaffold* de PEA:PCL(67:33) y 65% para PEA:PCL(71:29), habiendo perdido la muestra control de PCL un 90% de su peso inicial (Figura 18).



**Figura 18.** Masa perdida de los scaffolds PEA:PCL durante 7, 14, 28, 60, 90 días de degradación en una disolución acuosa 0,05M NaOH.

En el caso del PEA, este cambio de masa osciló alrededor de 1%, siendo mayor que el degradado en PBS que por el contrario no demostró ningún efecto sobre las muestras. Esta ausencia de pérdida de masa se debe a un largo periodo de tiempo que requiere la PCL para degradarse in vivo, por lo que no era de esperar que se efectuaría alguna degradación tras 90 días de incubación en PBS (Meseguer-Dueñas, Más-Estellés, Castilla-Cortázar, Escobar Ivirico, & Vidaurre, 2011). Transcurridos 28 días de incubación, durante los 30 días siguientes el material de PCL experimenta una pérdida de masa muy brusca de más de 70% de su peso inicial. Por el contrario, a lo largo de los primeros 60 días se observa una degradación moderada en los *scaffolds* de PEA:PCL(71:29) y PEA:PCL(67:33) que van degradando gradualmente. Al estar vinculadas a la red de PEA, las cadenas de PCL que degradan por erosión desde la superficie hacia el interior de la matriz tardan en soltarse del material. Por otro lado, la polimerización redox, debido al menor contenido de PEA y alta viscosidad de la

disolución monomérica resulta ser no uniforme y el *scaffold* lleva poca matriz de PEA, lo que se observa en el caso de PEA:PCL(71:29). Aquí, el aumento de masa perdida entre 60 y 90 días fue provocado por una descomposición del material en zonas de mayor acumulación de PCL respecto a la red de PEA, dando lugar a una degradación más rápida.

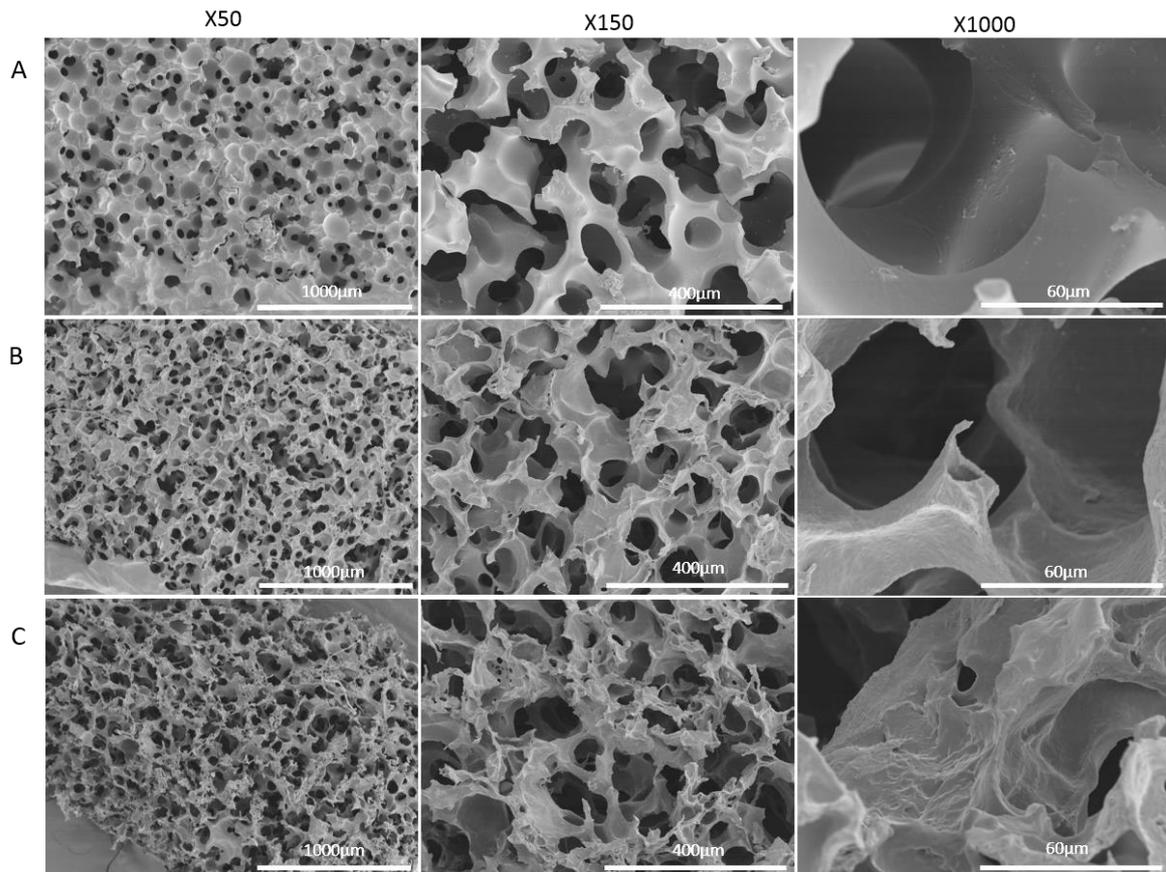
#### 4.3.6. Extracción de PCL después de la degradación lenta

Al cabo de 90 días de degradación en 0,05M NaOH, se determinaron de nuevo las cantidades de PEA y PCL experimentales mediante la extracción total forzada de PCL, y compararon con las teóricas, lo que permitió establecer la composición real de los *scaffolds* de PEA, PEA:PCL(71:29), PEA:PCL(67:33) y PCL y confirmar las hipótesis presentadas anteriormente a partir de los resultados de DSC. Tal y como era de esperar, los resultados mostrados en la Tabla 5 indican unos valores nominales de PEA menores de los supuestos. En el caso del *scaffold* de PEA:PCL(71:29) la diferencia es de 7%, mientras el *scaffold* de PEA:PCL(67:33) demuestra una variación drástica con la concentración de hasta un 93% de PCL.

**Tabla 5.** Fracciones másicas de PEA y PCL teóricas para la serie de *scaffolds* comparados con los valores reales calculados a base de extracción completa de PCL.

Nomenclatura PEA:PCL	$\omega_{PEA}$	$\omega_{PCL}$	Nomenclatura PEA:PCL	$\omega_{PEA}$	$\omega_{PCL}$
<i>Valor teórico</i>			<i>Valor tras la extracción</i>		
100:0	1,00	0,00	100:0	0,99	0,00
71:29	0,71	0,29	22:78	0,22	0,78
67:33	0,67	0,33	7:93	0,07	0,93
0:100	0,00	1,00	0:100	0,00	1,00

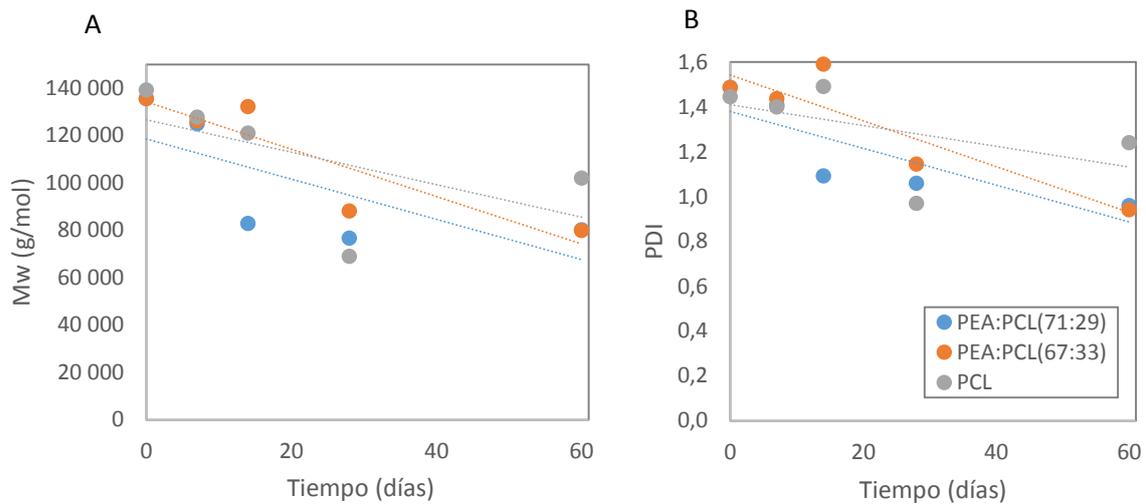
Por ello se deduce que para la síntesis de una matriz tridimensional resulta necesaria mayor concentración del polímero reticulador, ya que no solamente la viscosidad sino que también la morfología del porógeno dificultan el entrecruzamiento de cadenas de PEA. En consecuencia, para aumentar la eficiencia de reticulación de PEA es de mayor importancia establecer una buena proporción con respecto a la PCL en la mezcla reactiva. Además de eso, siempre están presentes las cadenas de PEA no reticuladas que a lo largo de la degradación de la PCL se disuelven causando la pérdida de masa del material y por tanto cambio en su composición nominal. Además, la misma acetona del lavado puede provocar unas pequeñas variaciones en la masa de PEA por disolución de las mismas.



**Figura 19.** Fotografías de SEM de las muestras: A. PEA, B. PEA:PCL(71:29), C. PEA:PCL(67:33) después de la extracción de PCL.

No obstante, según se demuestra en las fotografías de microscopía electrónica de barrido tomadas con las muestras después de extraer PCL con acetona, las partes inconexas de *scaffolds* que contienen la red de PEA presentan un esqueleto uniforme y bien interconectado. Las superficies de trabéculas de los *scaffolds* de PEA:PCL(71:29) y PEA:PCL(67:33) aparecen irregulares y rotas como consecuencia de la eliminación de la PCL. Asimismo, los poros quedan más grandes y abiertos con las microporosidades que permanecen formando parte de las paredes internas de los poros. Aquí se confirma la distribución no uniforme de PEA dentro de los *scaffolds* reticulados con 2% EGDMA. Sin embargo, queda también claro que al lograr sintetizarse en una red entre las moléculas de PCL, el PEA demuestra capacidad de formar una matriz homogénea que es el objetivo de este trabajo.

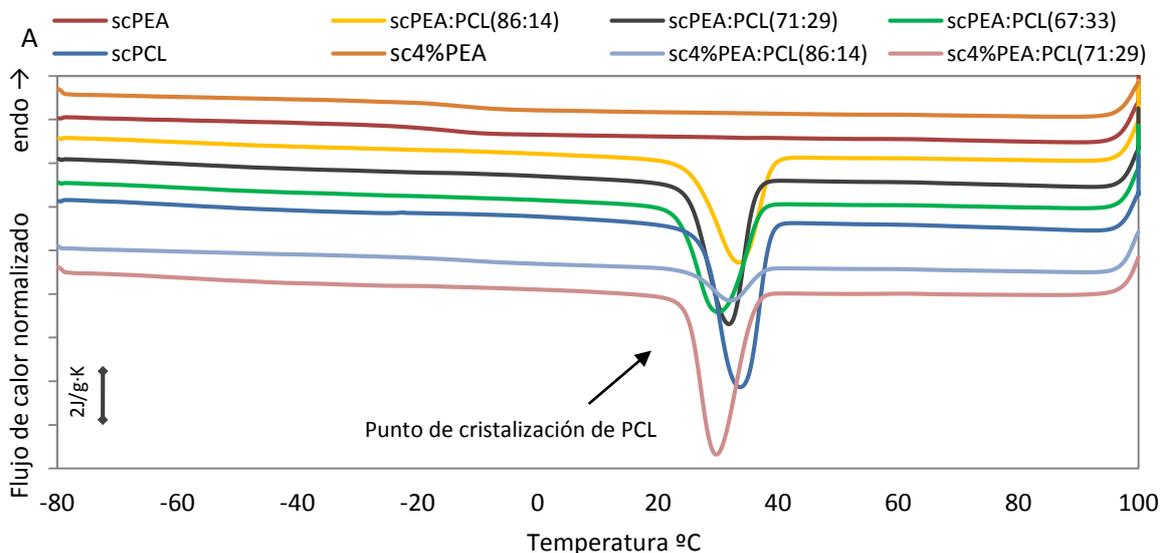
En cuanto a los residuos de PCL extraídos de las muestras después de degradación lenta y sometidos al análisis por cromatografía de exclusión, estos presentan una disminución sucesiva de los pesos moleculares conforme más degradada estaba la muestra. Tras un mes de degradación, los valores de índice de polidispersidad (PDI) se estabilizan en el rango 1-1.3, por lo que se puede decir que el polímero se vuelve monodisperso siendo los pesos moleculares entre 70000-80000 g/mol lo que permite la filtración del polímero vía renal (Atzet, Curtin, Trinh, Bryant, & Ratner, 2008).

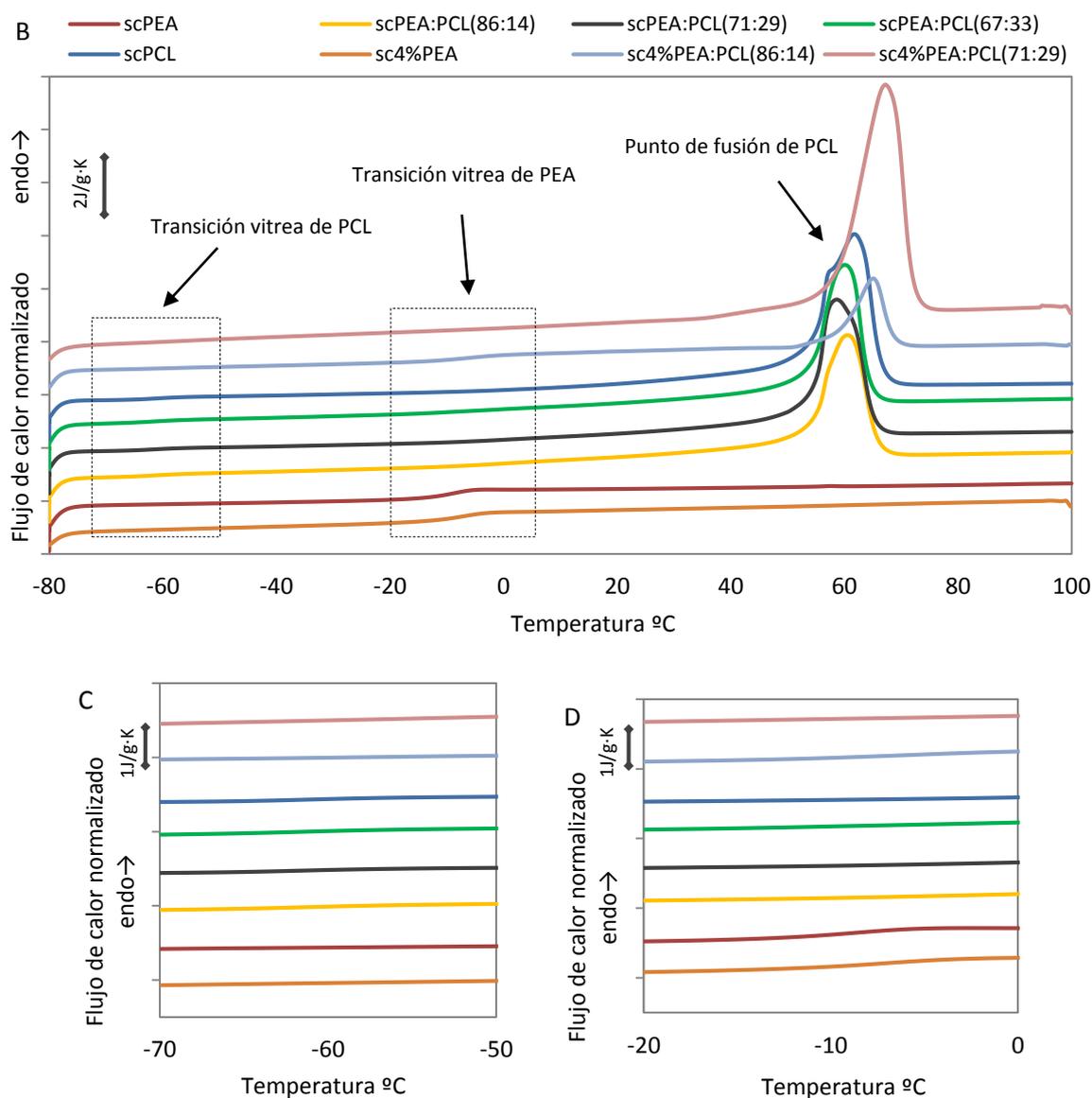


**Figura 20.** Distribución de pesos moleculares de PCL (A) e índice de polidispersidad (B) tras la extracción del polímero remanente en las muestras sometidas a degradación durante 7, 14, 28 y 60 días en 0,05M NaOH.

#### 4.3.7. Calorimetría diferencial de barrido

Puesto que se observaron variaciones entre las composiciones teóricas y experimentales tras la extracción en el caso de los *scaffolds*, se realizó un análisis comparativo por calorimetría diferencial de barrido de distintas muestras con PEA reticulado a 2% EGDMA (igual que se hicieron los cálculos con los films y compararon con las composiciones nominales) con los valores obtenidos mediante la extracción de PCL. Además, se determinaron las fases cristalinas y amorfas de los polímeros degradados y sin degradar para evaluar cambios ocurrientes a lo largo del proceso de degradación. También se pudo evaluar las diferencias de los *scaffolds* respecto a los films causados como se mencionó anteriormente por una distinta metodología de fabricación entre unos y otros.





**Figura 21.** Representación de los termogramas DSC de scaffolds expresado en unidades de capacidad calorífica específica en función de la temperatura durante: A. enfriamiento, B. 2º calentamiento, C. TgPCL, D. TgPEA. Los espectros fueron desplazados verticalmente para una mejor visualización.

Para facilitar la representación y comparación de datos, en los gráficos de este apartado se incluyeron también los resultados pertenecientes a los scaffolds PEA:PCL con un mayor grado de reticulación (4% EGDMA) cuyo análisis se realizó en un apartado adicional (4.2.9).

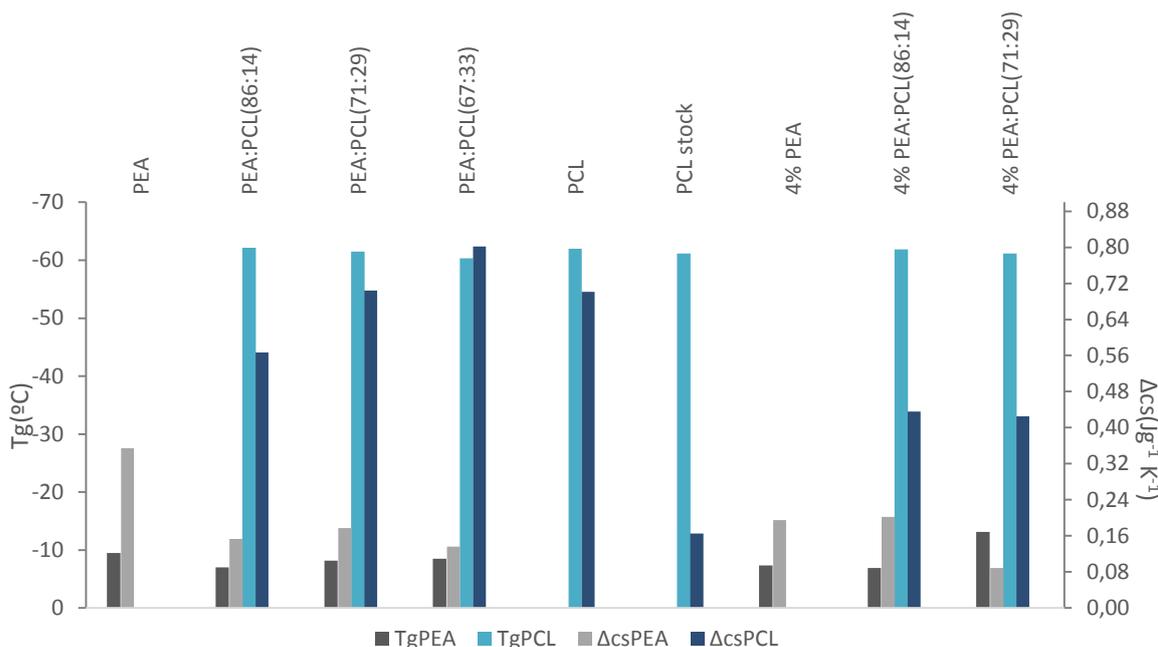
Al contrario que los films, se observa que los picos exotérmicos de cristalización y endotérmicos de fusión de PCL no se desplazan sino que se mantienen en el mismo rango de temperaturas (Figura 21). Cuanto más PCL en la muestra, más cristalino es el material y mayores son los valores de entalpía. También y mucho

más en el caso de los *scaffolds*, las transiciones vítreas son muy poco apreciables en las gráficas por lo que los datos fueron representados en forma de tabla (Tabla 6). En base de los valores extrapolados de las gráficas, se procederá al análisis de los resultados.

Siguiendo los valores de la Tabla 6, para los *scaffolds* no degradados se observa un desplazamiento de las transiciones vítreas de PEA hacia temperaturas más altas con una diferencia de hasta 5°C (PEA:PCL(86:14) respecto a las transiciones vítreas de los respectivos films. En cambio, los  $T_{gPCL}$  de todas las composiciones bajan 1°C, tomando valores muy cercanos a la PCL pura que permanece alrededor de -61°C, igual para los films que para los *scaffolds*. La misma tendencia a parecerse al *scaffold* de PCL puro se ve reflejada en las entalpías, y los valores de  $T_{mPCL}$  y  $T_{cPCL}$  de todos los materiales, y tiene que ver siempre con una mayor que la supuesta cantidad real de PCL presente en los materiales. Mientras que las temperaturas de fusión son similares a la PCL tanto en los films como en los *scaffolds*, se constata que las temperaturas de cristalización de la PCL en los *scaffolds* se acercan a los valores obtenidos en *scaffolds* de PCL puro. Por el contrario, en los films estas temperaturas eran menores para todas las combinaciones de PEA:PCL. Consecuentemente, las entalpías de fusión y cristalización en los *scaffolds* con ambos polímeros siguen la misma tendencia; en cambio, estas entalpías en los films presentan niveles mucho menores.

**Tabla 6.** Resultados de transiciones térmicas del segundo calentamiento: temperatura de vítrea ( $T_g$ ), de fusión ( $T_m$ ), calores específicos ( $\Delta c_s$ ), entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) y transiciones del enfriamiento: temperatura de cristalización ( $T_c$ ) y entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ ) de los films de composiciones PEA:PCL sin degradar y con diferentes grados de reticulación (los datos de los respectivos materiales después de degradación fueron incluidos en el anexo).

Material	$T_{gPEA}$ (°C)	$\Delta c_{sPEA}$ (Jg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$T_{gPCL}$ (°C)	$\Delta c_{sPCL}$ (Jg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (Jg <sup>-1</sup> )	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (Jg <sup>-1</sup> )
PEA	-9,47	0,354	-	-	-	-	-	-
PEA:PCL(86:14)	-6,99	0,153	-62,15	0,567	60,37	-38,75	33,36	41,62
PEA:PCL(71:29)	-8,18	0,177	-61,47	0,704	58,32	-48,72	32,31	47,27
PEA:PCL(67:33)	-8,50	0,136	-60,33	0,802	59,72	-43,42	30,64	43,84
PCL	-	-	-61,97	0,701	61,76	-52,87	33,59	56,66
PCL stock	-	-	-61,18	0,165	56,71	-57,79	26,66	56,86
4% PEA	-7,35	0,195	-	-	-	-	-	-
4% PEA:PCL(86:14)	-6,87	0,202	-61,86	0,436	59,07	-11,39	32,07	11,66
4% PEA:PCL(71:29)	-13,13	0,089	-61,16	0,425	59,57	-26,09	31,57	25,41



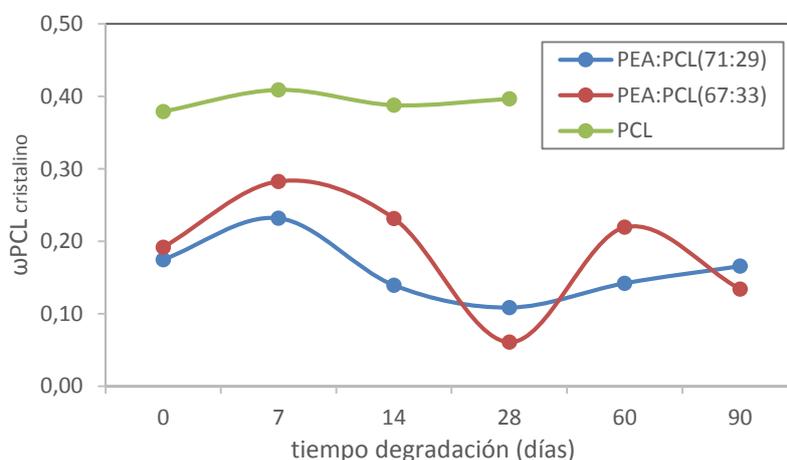
**Figura 22.** Comparación de las temperaturas de transición vítrea (eje izdo.) de PEA y PCL en los scaffolds PEA:PCL y sus respectivos calores específicos (eje drcho).

Además de eso, como se observa en la Figura 22, las temperaturas de transiciones vítreas tanto de PEA que PCL no varían entre los materiales de distintas composiciones, por lo que no se constata ninguna influencia de un polímero sobre el otro, ya que no reaccionan entre ellos. Sin embargo, lo que se confirma en estos resultados es que según se incrementa la proporción de PCL en la muestra, aumenta también el calor específico de PCL y disminuye  $\Delta c_{sPEA}$ , como era de esperar.

Adicionalmente, mediante el análisis calorimétrico se realizó una comparación de las fases cristalinas y amorfas de los *scaffolds* parcialmente degradados. Como se muestra en la Tabla 7 y Figura 23, transcurridos los días de degradación en 0,05M NaOH y en PBS a medida que va degradando PCL, la masa cristalina respecto a la masa total en principio disminuye y luego aumenta. Con el tiempo, en todas las muestras, menos en caso de PEA:PCL(67:33) por la desviación de los datos, se observa una gradual disminución de parte amorfa de PCL. Esta propensión se explica por la degradación previa de la parte amorfa de PCL respecto a la parte cristalina. Mientras la parte amorfa de PCL va decreciendo, aumenta la proporción de parte cristalina respecto a la masa total. Obviamente, al empezar a degradar la parte cristalina, está disminuye en proporción a la masa total del *scaffold*. La misma tendencia creciente de cristalinidad se observa al cabo de 90 días de incubación en PBS. Estos resultados representados en la Figura 24 también muestran una dependencia más o menos lineal de la cantidad total de PCL de los materiales y sus respectivas fases cristalinas.

**Tabla 7.** Representación en fracción másica de las cantidades nominales de PEA (siempre amorfo), PCL amorfo y PCL cristalino en los scaffolds sin degradar, después de 28 y 90 días de degradación en 0,05M NaOH y 90 días en PBS.

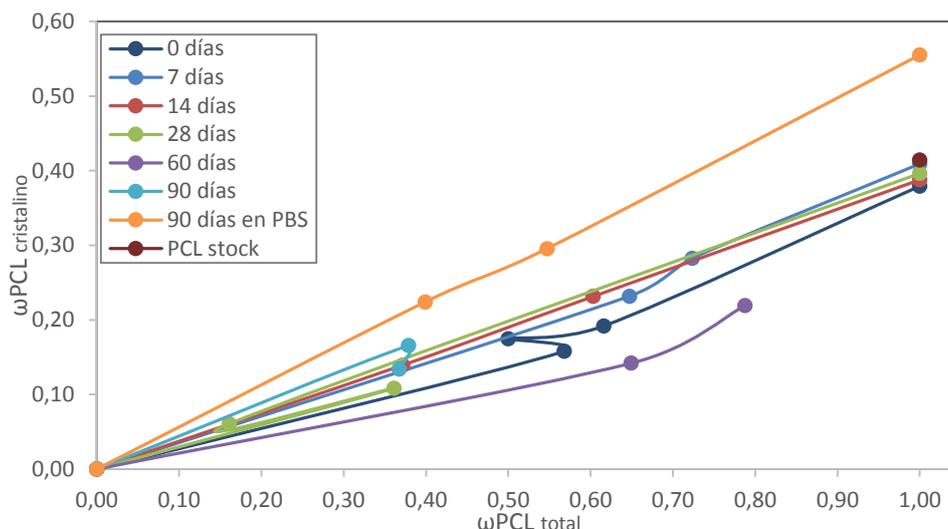
	PEA	PEA:PCL (86:14)	PEA:PCL (71:29)	PEA:PCL (67:33)	PCL	PCL stock
Sin degradar						
$\omega_{PEA}$ amorfo	1,000	0,432	0,500	0,384	0,000	0,000
$\omega_{PCL}$ total	0,000	0,568	0,500	0,616	1,000	1,000
$\omega_{PCL}$ cristalino	0,000	0,158	0,175	0,192	0,379	0,414
$\omega_{PCL}$ amorfo	0,000	0,410	0,325	0,424	0,621	0,586
Degradación 28 días (0,05M NaOH)						
$\omega_{PEA}$ amorfo	1,000	-	0,639	0,839	0,000	-
$\omega_{PCL}$ total	0,000	-	0,361	0,161	1,000	-
$\omega_{PCL}$ cristalino	0,000	-	0,108	0,061	0,396	-
$\omega_{PCL}$ amorfo	0,000	-	0,252	0,100	0,604	-
Tras 90 días de degradación (0,05M NaOH)						
$\omega_{PEA}$ amorfo	1,000	-	0,621	0,633	0,000	-
$\omega_{PCL}$ total	0,000	-	0,379	0,367	0,000	-
$\omega_{PCL}$ cristalino	0,000	-	0,166	0,134	0,000	-
$\omega_{PCL}$ amorfo	0,000	-	0,213	0,233	0,000	-
Tras 90 días de degradación (PBS)						
$\omega_{PEA}$ amorfo	1,000	-	0,601	0,453	0,000	-
$\omega_{PCL}$ total	0,000	-	0,399	0,547	1,000	-
$\omega_{PCL}$ cristalino	0,000	-	0,224	0,295	0,555	-
$\omega_{PCL}$ amorfo	0,000	-	0,175	0,252	0,445	-



**Figura 23.** Fracción de PCL cristalina en los scaffolds de PEA:PCL(71:29), PEA:PCL(67:33) y PCL tras distintos periodos de degradación en 0,05M NaOH.

De acuerdo con los resultados de extracción de PCL, el ensayo de DSC con los materiales no degradados -salvo con el scaffold PEA:PCL(71:29) que dio valores anómalos- indica una mayor concentración de PCL respecto a la masa total de PEA en las muestras. Las proporciones obtenidas por calorimetría resultan ser más equilibradas que en el caso de la extracción con acetona y el pesado de las

muestras. Tanto el primer como el segundo método son estimaciones aproximadas que conllevan un rango de error puesto que la extrapolación de datos calorimétricos era manual y el método de extracción no estaba libre de pérdidas del material estudiado. Sin embargo, en ambos casos se aprecia la misma tendencia que sumada a las demás observaciones lleva a la conclusión de que los materiales tienen un menor grado de polimerización del esperado, y que sus propiedades variarán a lo largo del proceso de degradación puesto que las proporciones entre las fases cristalina y amorfa de PCL varían entre sí.

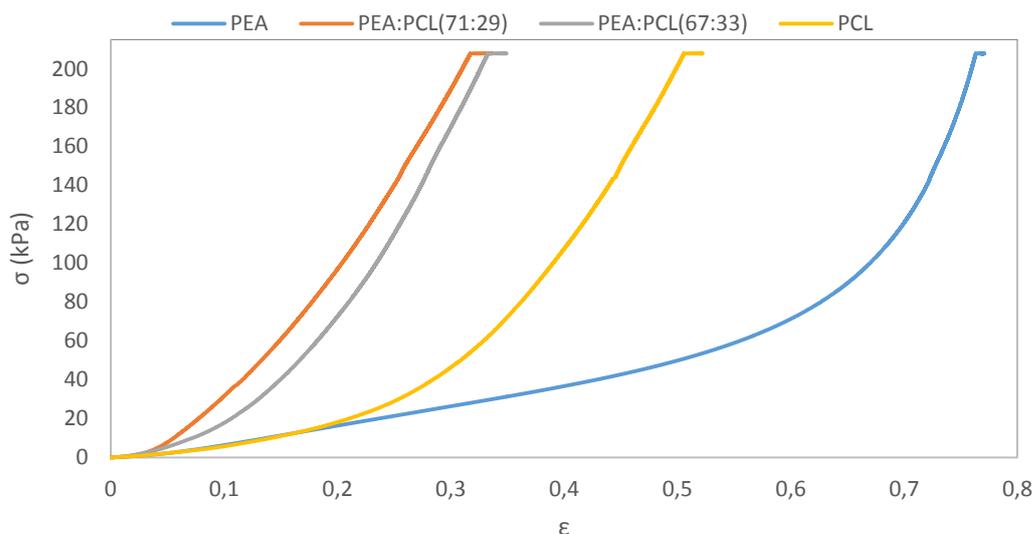


**Figura 24.** Representación de la fracción de PCL cristalina respecto a la fracción másica total de PCL para cada tiempo de degradación en 0,05M NaOH de la serie de scaffolds PEA:PCL.

#### 4.3.8. Ensayo de compresión

Entre las características esenciales respecto al uso y aplicación del material se encuentran las propiedades mecánicas. Éstas, a lo largo del tiempo, determinarán la integridad mecánica de dicho material a todo el tipo de esfuerzos a los que estará expuesto durante el proceso regenerativo. Según las características del material analizadas en los apartados anteriores, tendrá también una influencia su estado cristalino en proporción a la fase amorfa, que a su vez dependerá del nivel de degradación del *scaffold*.

Se considera que las condiciones establecidas para el ensayo de compresión no fueron suficientes para lograr un punto de deformación plástica. Por tanto, en las curvas tensión-deformación se observa dos etapas de deformación elástica que ocurrieron mientras se comprimían los poros del material y cuando ya estaba compacto y colapsado, similar al estado de un film. Para esta segunda zona se calculó el módulo elástico final aparente en el rango de 160-200 kPa como la pendiente de la curva. Del mismo modo se obtuvo el módulo inicial. Además, se obtuvo la deformación final que sufrió el material como el valor último de abscisas.



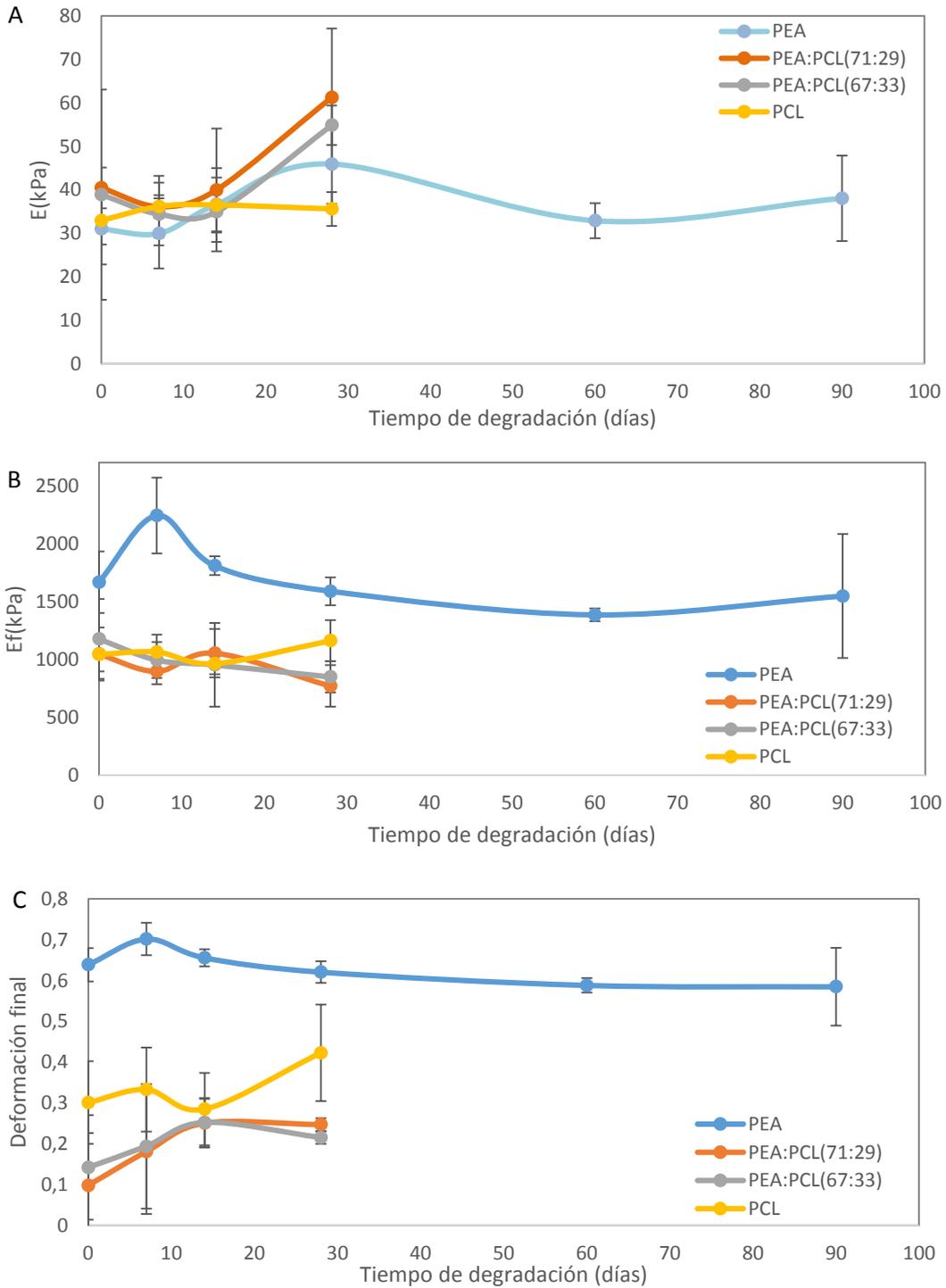
**Figura 25.** Diagrama tensión-deformación de los scaffolds PEA, PEA:PCL(71:29), PEA:PCL(67:33) y PCL sin degradar sometidos a compresión.

**Tabla 8.** Módulos de elasticidad inicial y final aparentes, y deformación última, con las respectivas cantidades de PCL.

$\omega_{PCLnom}$	$\omega_{PCLreal}$	E (kPa)	$E_f$ (kPa)	$\epsilon_f$
0	0	$31,01 \pm 8,16$	$1666,37 \pm 265,94$	$0,64 \pm 0,04$
29	78	$40,46 \pm 4,68$	$1045,51 \pm 229,14$	$0,10 \pm 0,16$
33	93	$31,99 \pm 5,86$	$1175,95 \pm 345,01$	$0,14 \pm 0,13$
100	100	$33,08 \pm 5,52$	$1043,40 \pm 146,25$	$0,30 \pm 0,10$

Por tanto, de acuerdo con el análisis mecánico por compresión, el comportamiento de los *scaffolds* compuestos por ambos polímeros varía respecto a los homopolímeros. Como se aprecia en la Figura 25 y la Tabla 8, el módulo elástico aparente (calculado según la ley de Hooke para el rango 0,01-0,02 de deformación) presenta muchas desviaciones y por tanto no muestra ningunas variaciones significativas. Esto se debe a la directamente a la porosidad de los materiales, más grande para los que llevan más PCL. En consecuencia a pesar de la rigidez de PCL los módulos se igualan lo que también fue observado en los módulos obtenidos con los films a tracción (Lozano Picazo et al., 2014). Por otro lado, si consideramos comparar los valores de módulos elásticos entre los films y los *scaffolds* se supone que es el módulo final de los *scaffolds* el que corresponde al material con poros colapsados, similar a un film. En este caso, los módulos resultan ser mucho menores y con una tendencia descendente al aumentar la cantidad de PEA en ellos. La deformación última de la PCL es la mayor, por ser el *scaffold* más poroso. En cuanto al proceso de degradación, los módulos de los materiales no varían notablemente a lo largo del tiempo ya que para cuando hay diferencias las muestras se han desintegrado. Mientras el PEA es un polímero muy elástico y blando (una goma), PCL proporciona una mayor rigidez y dureza del material. Esta característica del PCL puro puede resultar debilitada si este polímero con alta viscosidad, a pesar de las medidas adicionales, no consiguió

penetrar bien la plantilla porogénica durante elaboración del *scaffold*, resultando en un *scaffold* de trabéculas finas y débil. Vistas las morfologías en las fotografías del SEM donde se observó mayor integridad de las semi-IPNs mientras el *scaffold* de PCL estaba más roto y menos compacto, esta hipótesis queda confirmada.



**Figura 26.** Variaciones de módulo elástico aparente, módulo elástico final y deformación final de los scaffolds tras distintos periodos de degradación.

Se constata que durante la degradación, los niveles del módulo elástico aparente oscilan siendo siempre muy similares en todos los materiales mientras que en la última medida que se pudo tomar, a los 28 días de degradación, para las mezclas de PEA:PCL vuelven a ser mayores que para PEA y PCL puros (Figura 26 A), aunque con barras de error considerables.

En la segunda fase de compresión, tal como muestra la Figura 26 B y C, los módulos elásticos para los *scaffolds* degradados son ligeramente menores que del *scaffold* de PCL, por la pérdida gradual de este componente.

#### 4.3.9. Análisis comparativo de los *scaffolds* con PEA reticulado al 4%

A lo largo del desarrollo de la investigación con los *scaffolds* de PEA:PCL reticulados con 2% EGDMA, se realizó el estudio sobre los *scaffolds* con mayor grado de reticulación a la vez manteniendo las mismas proporciones que se intentaba obtener inicialmente. De este modo se pretendía fabricar un *scaffold* cuyo mayor contenido constituiría una matriz de PEA más entrecruzada y menos propensa al colapso, asegurando así un soporte completo para un nuevo tejido mientras vaya liberando las cadenas de PCL vinculadas a la red.

En primer lugar, se consideró que las densidades y por tanto también la porosidad de los *scaffolds* respectivos no experimentaría mayor cambio puesto que ambos polímeros demuestran unas densidades similares. En segundo lugar, y como era de suponer, no se evidenciaron ningunas alteraciones en la composición química de ellos respecto a los *scaffolds* con 2% EGDMA. Ambos tipos de *scaffolds* se caracterizaban por los mismos enlaces y grupos funcionales. Seguidamente y con mayor interés, mediante la calorimetría diferencial de barrido se compararon (Tabla 9) las concentraciones nominales de cada polímero con las teóricas. El resultado (obtenido esta vez para el enfriamiento) fue muy diverso pues mientras para el *scaffold* PEA:PCL(86:14) se consiguió una mayor proporción de red de PEA, en el caso de PEA:PCL(71:29) se obtuvo aún una alta fracción de PCL.

**Tabla 9.** Comparativa de las fases cristalinas y amorfas de PCL y PEA entre los *scaffolds* entrecruzados con 2% y 4% de EGDMA.

	PEA	PEA:PCL (86:14)	PEA:PCL (71:29)	PCL	PCL stock
Con 2% EGDMA					
<b>WPEAamorfo</b>	1,000	0,432	0,500	0,000	0,000
<b>WPCLtotal</b>	0,000	0,568	0,500	1,000	1,000
<b>WPCLcristalino</b>	0,000	0,158	0,175	0,379	0,414
<b>WPCLamorfo</b>	0,000	0,410	0,325	0,621	0,586
Con 4% EGDMA					
<b>WPEAamorfo</b>	1,000	0,938	0,150	0,000	0,000
<b>WPCLtotal</b>	0,000	0,062	0,850	1,000	1,000
<b>WPCLcristalino</b>	0,000	0,005	0,444	0,379	0,414
<b>WPCLamorfo</b>	0,000	0,057	0,406	0,621	0,586

Además de esto, la parte cristalina de PCL en el PEA:PCL(86:14) resultó ser muy escasa, mientras en PEA:PCL(71:29), con mayor proporción de PCL que la anterior, sobrepasó la cantidad de PCL amorfa. Para ambas composiciones se notaron entalpías menores de las observados en *scaffolds* con 2% EGDMA supuestamente debidas a la menor cantidad de PCL cristalina en los materiales.

Al resultar los resultados de DSC para los *scaffold* de 4% EGDMA - PEA:PCL(71:29) variables en función de la cantidad de EA en la mezcla reactiva, se considera estos cálculos para esta serie de muestras como concluyentes, pero no han podido repetirse en el marco de este trabajo. No obstante, la tendencia observada en la curva Figura 21 en el caso de PEA:PCL(86:14) con una transición T<sub>g</sub>PEA bien visible y menor pico de fusión de PCL indica un mayor grado de entrecruzamiento y por tanto mejor formación de la matriz PEA.

#### 4.4. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

##### 4.3.1. Selección de materiales para la caracterización biológica

Los experimentos de caracterización biológica fueron diseñados para hacer un estudio comparativo de los *scaffolds* de PEA:PCL(86:14), PEA:PCL(71:29), PEA:PCL(67:33) y los homopolímeros PCL y PEA de dos diferentes grados de reticulación. Se analizaron las composiciones, propiedades mecánicas, propiedades físico-químicas y estructuras internas de cada uno. Se confirmó que las muestras polimerizadas con menos concentración de entrecruzador (2% EGDMA) formaban la red de PEA de forma no homogénea. La supuesta causa de ello podía ser alta viscosidad de PCL y el hecho de polimerizar sobre un andamiaje porogénico tridimensional que dificultaban significativamente la formación y reticulación de cadenas de PEA. El aumento en proporción del reticulador permitía obtener una red polimérica más uniforme; sin embargo, por la misma razón podría presentar también mayor toxicidad. No obstante, esta toxicidad por parte de EGDMA no causaría un cambio significativo en la viabilidad celular ya que la proporción del reticulador respecto al monómero EA permaneció relativamente baja. En cambio, mantener una red polimérica semi-interpenetrada con mayor grado de entrecruzamiento del polímero no degradable al cabo del periodo de degradación en el cuerpo, permitiría tener un soporte polimérico más estable para el tejido regenerado.

Cabe decir que para los materiales fabricados con 4% EGDMA no se completaron todos los ensayos que sí se realizaron sobre los *scaffolds* entrecruzados con 2% EGDMA. Aquí, en primer lugar sería importante denotar el carácter innovador de esta investigación y considerablemente escasa información sobre los materiales tridimensionales híbridos de PEA:PCL. Por tanto, el protocolo de composición y fabricación de los materiales fue establecido en base a la caracterización particular de cada polímero y pruebas experimentales de polimerización con ambos. En consecuencia, a lo largo del desarrollo de este trabajo se

implementaron las modificaciones que fueron necesarias para poder cumplir el objetivo propuesto en el inicio. A la hora de proceder a los experimentos *in vitro*, se consideraron dichos cambios en la fabricación como no perjudiciales ni significativos ya que alteraron la composición del material de la mínima forma posible. Es importante reconocer la necesidad de someter el material a más pruebas que proporcionarán una información detallada sobre los materiales, ya que nos encontramos en la fase inicial de elaboración de un nuevo biomaterial tanto en cuanto a su composición como su estructura. Asimismo, se cree indispensable conseguir suficientes datos sobre su comportamiento físico-químico, respuesta biológica en diferentes condiciones ambientales o evolución temporal en un largo proceso de degradación. Dicho esto y tomando en consideración los pros y los contras de la elección, se decidió realizar los ensayos biológicos sobre los materiales reticulados con 4% EGDMA.

#### 4.3.2. Estudio de citotoxicidad por contacto indirecto

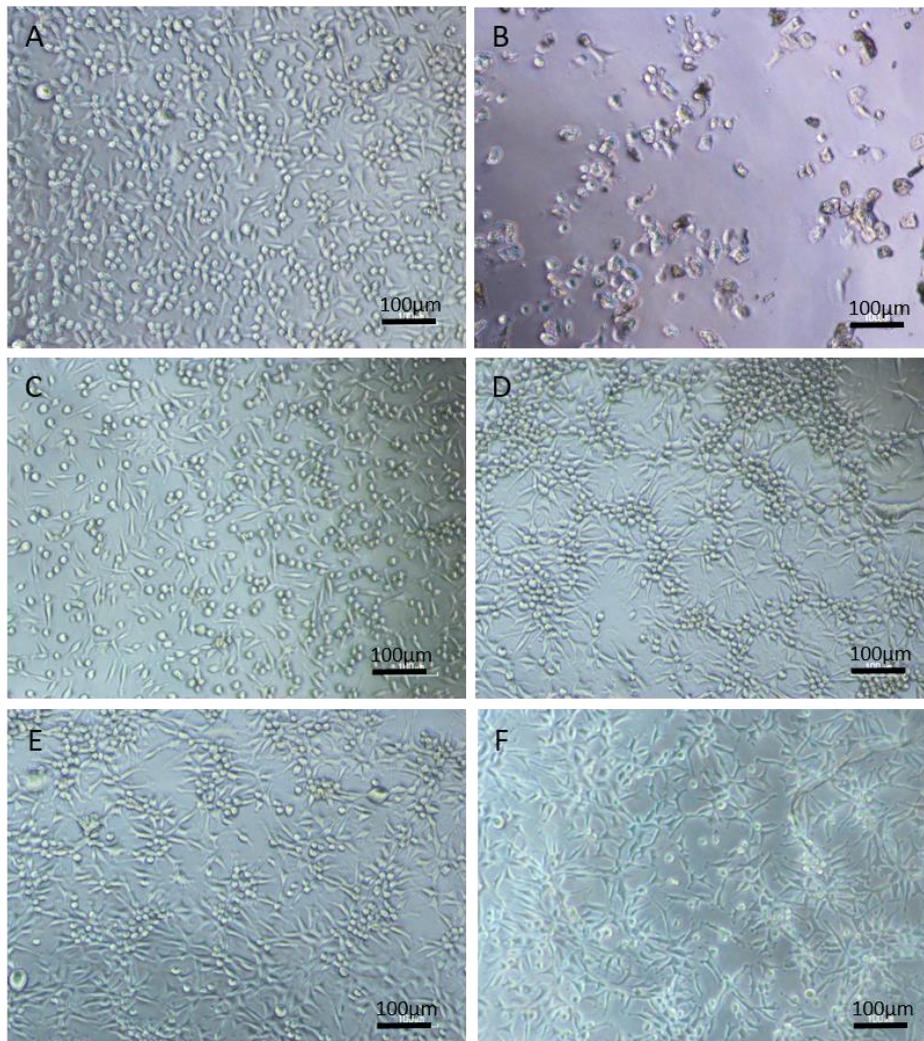
En primera etapa, tras 72 horas de cultivo sobre los materiales en las fotos tomadas con un microscopio óptico se observó que los fibroblastos proliferaron correctamente y para cada tipo de composición tenían una morfología similar al control positivo. Así pues, estaban aglomerados, extendidos y adheridos al fondo del frasco de cultivos. Sin embargo a lo largo del estudio de citotoxicidad por contacto indirecto, los niveles de absorbancia no sobrepasaban el valor 0,5 y por tanto resultaron bajos para cada tipo de material examinado incluyendo las muestras de control positivo. Tal y como se esperaba este valor es más alto para el control positivo (PE) sin embargo, no destacaba considerablemente de las medidas de PEA, PEA:PCL(86:14) y PEA:PCL(71:29). Para la PCL, los rangos de absorbancia se mantenían muy similares al látex A aunque el PCL es un material conocido por su buena biocompatibilidad, lo que cuestiona los resultados obtenidos para el *scaffold* de PCL que en este caso fue elaborado mediante la técnica de solvent-casting. Por esta razón se cree que la baja absorción de MTT por las células cultivadas con extracto de PCL puede haber sido afectada por trazas de dioxano usado en el proceso de fabricación. A pesar de varios lavados con etanol y agua destilada y su posterior evaporación y secado en estado hermético, el solvente podría haber quedado atrapado dentro del material a causa de su alta porosidad.

En consecuencia de los resultados del ensayo de viabilidad con fibroblastos L929 que indicaron la citotoxicidad de las muestras de PEA y PCL y habiendo observado también los cambios drásticos de viabilidad en las composiciones PEA:PCL (86:14) y PEA:PCL(71:29) durante los días de la prueba se consideró necesario repetir el ensayo.

Teniendo en cuenta todos los factores del intento anterior era imprescindible asegurar una ausencia completa de dioxano en las muestras. Por tanto en la etapa del secado de material después de lavado posterior a la polimerización se los mantuvo tres días desecándose a vacío a temperatura 40°C. Luego permanecieron en estado hermético hasta volver a repetir el mismo ensayo.

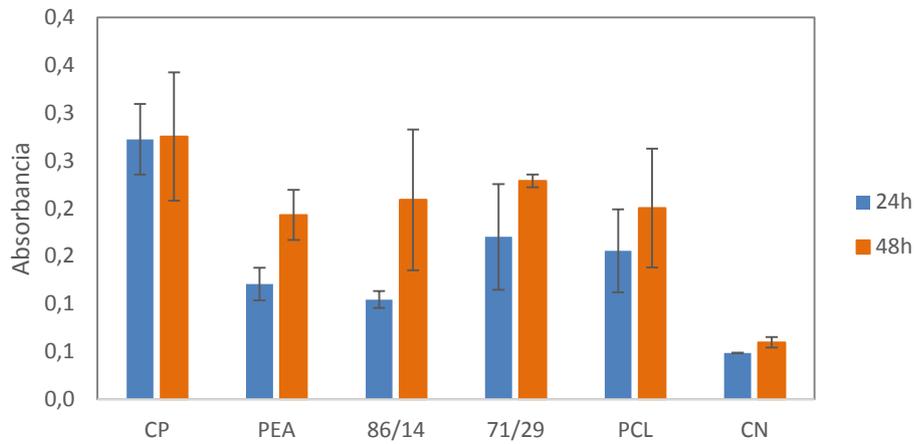
Ya que la otra posible razón de una elevada citotoxicidad de los materiales podía venir de la presencia de los restos del etanol al protocolo de esterilización se introdujo los siguientes cambios: las muestras se esterilizaron 2 veces en etanol 70 por 1 hora y luego se procedió con lavados de agua de 5 min a gradientes muy bajos con un tiempo total de lavados de 1,5 h. Por consiguiente, se aplicaron dos lavados de 5 min con agua MiliQ estéril y el secado de 5min a temperatura ambiente. Las etapas posteriores a la esterilización fueron realizadas de acuerdo con el protocolo utilizado en el primer ensayo para el tiempo de 1 día y 2 días.

Al examinar las fotografías de microscopio de campo claro se observa nuevamente una morfología alargada de las células y una buena proliferación en todos los materiales menos en el látex (control negativo). Aunque en este caso las células están más redondeadas que en el ensayo anterior, se aprecia su mayor crecimiento a pesar de la misma concentración de siembra.

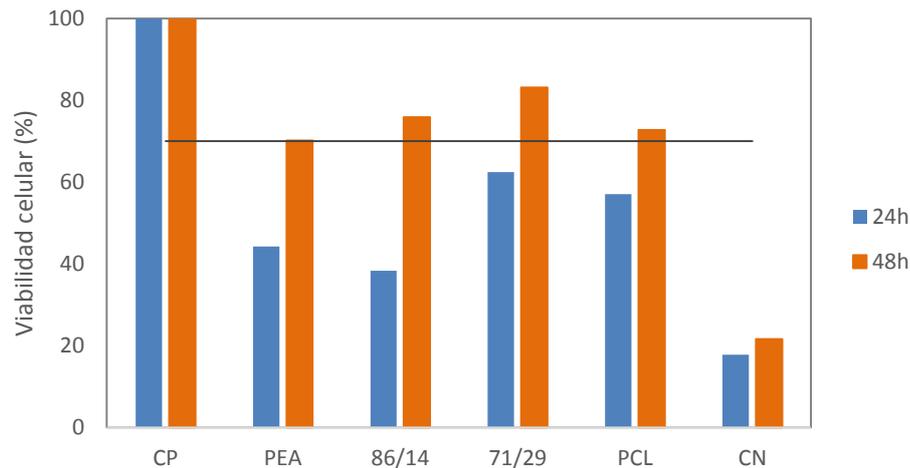


**Figura 27.** Fotografías tomadas con un microscopio de campo claro de cultivos de fibroblastos L929 después de 72h de incubación en el extracto de: A. polietileno (control positivo), B. látex (control negativo), C. PEA, D. PEA:PCL(86:14), E. PEA:PCL(71:29), F.PCL.

Como muestra la Figura 28, después de la eliminación del dioxano a temperatura a las 48 horas de cultivo la absorbancia aumentó en todas las muestras. Asimismo, el comportamiento de todos los materiales se acerca a la muestra de control positivo. En consecuencia, los resultados de la Figura 29, según la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009 que establece el umbral de 70% por encima del cual la muestra no es tóxica, demuestran la no citotoxicidad de todos los materiales. Los mejores valores fueron obtenidos para las composiciones de PEA:PCL(86:14) y PEA:PCL(71:29), por lo cual se puede afirmar que la red formada por ambos favorece la proliferación celular y ninguna de las muestras ensayadas presentaban citotoxicidad.



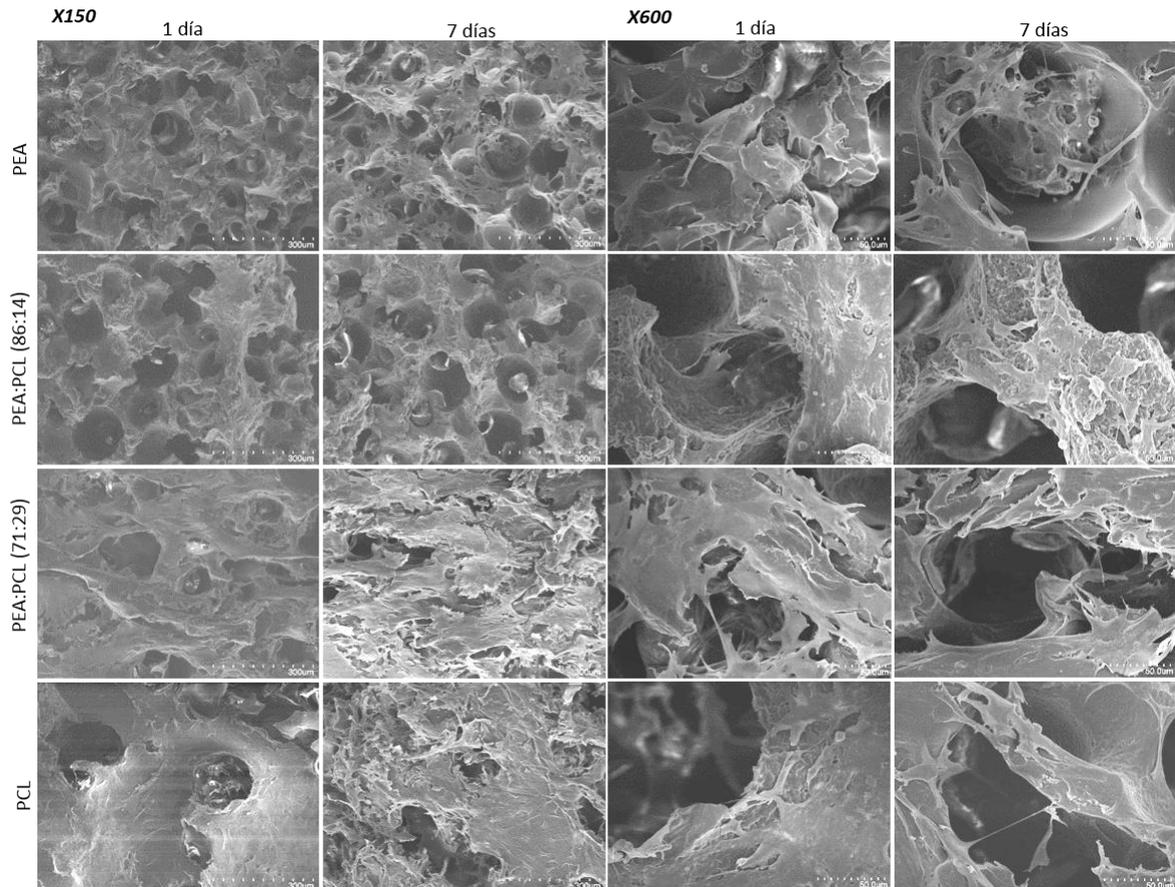
**Figura 28.** Absorbancia medida a 570 nm al cabo de 24h, 48h, 72h de ensayo de citotoxicidad repetido con fibroblastos L929 cultivados en extractos de PEA, PEA:PCL(86:14), PEA:PCL(71:29), PCL, control positivo (PE) y control negativo (látex).



**Figura 29.** Citotoxicidad calculada respecto al control positivo (PE) para las muestras PEA, PEA:PCL(86:14), PEA:PCL(71:29), PCL y control negativo (látex) a base del ensayo indirecto con fibroblastos L929 – ensayo repetido.

### 4.3.3. Estudio de morfología celular de ADSCs

El estudio de viabilidad por contacto directo desarrollado para las células adiposas de oveja (ADSCs) se hizo simultáneamente y sobre los mismos materiales que el primer ensayo indirecto de viabilidad celular descrito en el apartado anterior. Su objetivo principal fue la identificación, la evaluación de morfología y distribución de las células cultivadas sobre los *scaffolds* de PEA:PCL de manera cualitativa empleando las imágenes de microscopía de barrido.



**Figura 30.** Morfología celular representada por fotografías del microscopio de barrido (SEM) a x150 y x600 aumentos, tras 1 y 7 días de cultivo.

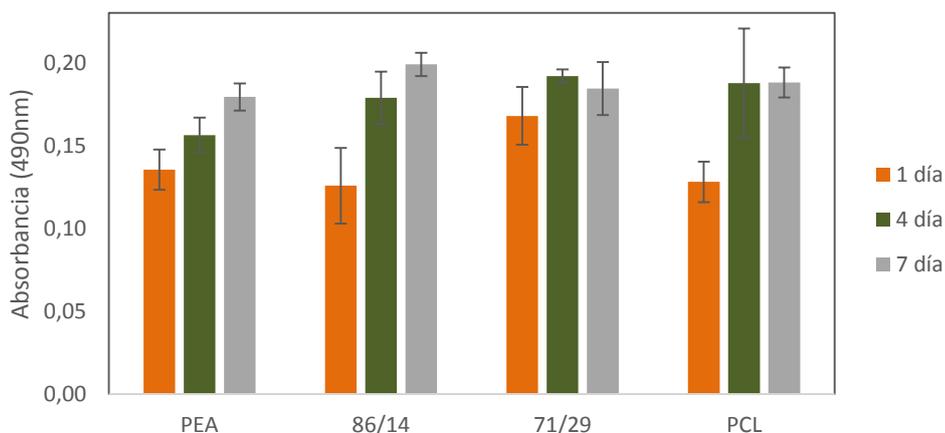
Las siguientes imágenes (Figura 30) demuestran diferencias en la morfología de las células ADSCs tras 7 días de su incubación. A lo largo del tiempo las células proliferaron y tapizaron la superficie de los materiales. Por tanto, se observa que adoptaron una forma alargada y extendida, acumulándose mayoritariamente unas encima de otras de manera que, como en el caso del *scaffold* de PCL, recubrieron los poros taponándolos por fuera. Este comportamiento fue provocado por una estructura de superficie del material más compacta en algunas zonas ya que no fue lijada lo suficientemente en la etapa posterior de la polimerización. Para estudios posteriores, se deberá pues lijar los materiales tras la polimerización con mayor intensidad, para dejar libre el paso a las células que se siembren sobre la superficie y puedan invadir el *scaffold* en su volumen. Sin embargo, tanto en las muestras de PCL como en las de PEA y ambas composiciones de PEA:PCL se

aprecia que las células ADSCs se adherían a las paredes internas de los poros. Dicha adhesión fue facilitada por la presencia de microporosidades observados en los materiales que contenían PCL. Dentro de los poros se aprecian las uniones y filamentos siendo la primera etapa por la que se caracteriza el proceso regenerativo. Por tanto, en los nuevos *scaffolds* formados por PEA y PCL se observó una excelente adhesión de las ADSCs.

Finalmente en cada material se observa que algunas células ADSCs resultan rotas y adquieren una forma irregular y más encogida que las ADSCs adheridas. Esto se debe probablemente a la técnica de desecado con HMDS utilizada para el acondicionamiento de las muestras con materiales que no puedan ser calentados a más de 56°C porque funden. El desecado habrá sido aún demasiado brusco y causó su quebradura. No obstante, vemos que las composiciones PEA:PCL(86:14) y PEA:PCL(71:29) facilitan la adhesión y proliferación celular de manera que al cabo de un tiempo determinado es posible obtener un andamiaje cubierto por las células capaces de formar una unidad estructural mayor como por puede ser un tejido.

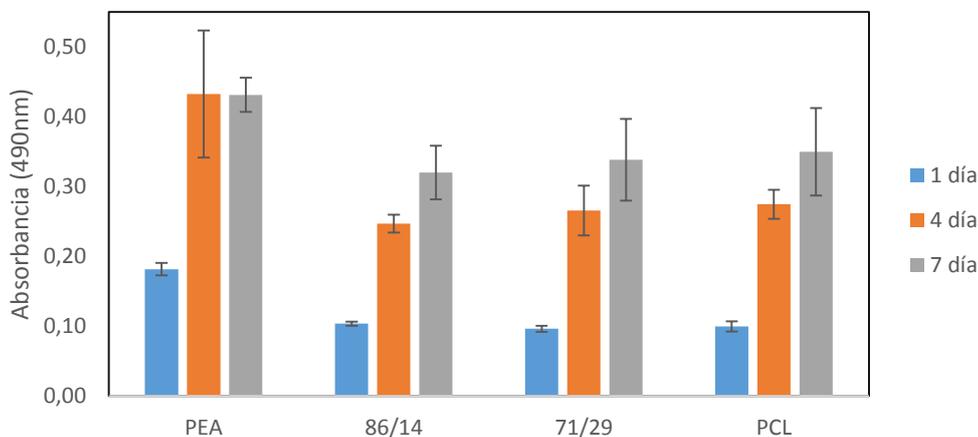
#### 4.3.4. Estudio de viabilidad celular por contacto directo

Tras estudiar la viabilidad celular con las células ADSCs en los *scaffolds* al cabo de 7 días se observa un incremento del valor inicial de absorbancia (Figura 31). Mientras que entre el primer y cuarto día el ratio de proliferación aumenta visiblemente en todas las muestras y sobre todo en PCL, después de los siguientes tres días este aumento es menor en caso de PEA y PEA:PCL(86:14). Sin embargo, disminuye para PEA:PCL(71:29) y para el *scaffold* de PCL permanece igual. Además de eso, para los cultivos de 7 días se aprecia los valores de absorbancia muy similares en todos los materiales.



**Figura 31.** Viabilidad celular de ADSCs en ensayo por contacto directo, medida con los *scaffolds* de PEA, PEA:PCL(86:14), PEA:PCL(71:29) y PCL con la tinción MTS.

Dichos resultados indican que la composición PEA:PCL(86:14) y los materiales de homopolímeros no promueven la proliferación de estas células de manera significativa. No obstante, a causa de obtener unos valores bajos de absorbancia fue necesario confirmar esta observación mediante un ensayo similar pero con el colorante MTT (Figura 32).

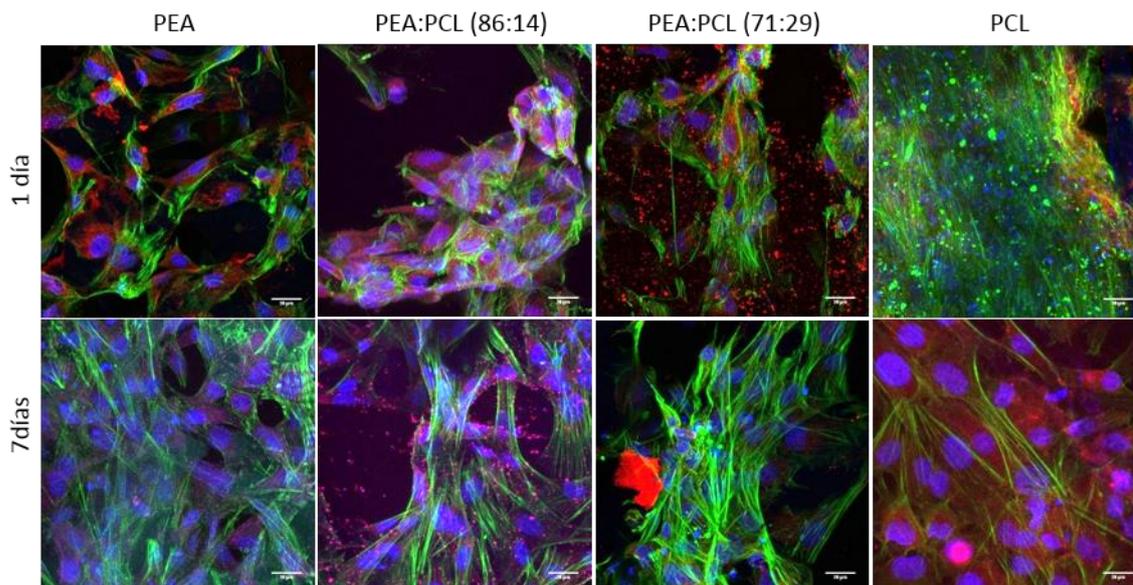


**Figura 32.** Viabilidad celular de ADSCs por contacto directo medida con los scaffolds de PEA, PEA:PCL(86:14), PEA:PCL(71:29) y PCL con la tinción MTT.

Se observa unas tendencias iguales que para el ensayo anterior con MTS. También en este caso se destaca una mayor proliferación de las células con *scaffold* de PEA mientras en los demás materiales el crecimiento celular empieza con un retraso. Todo esto se debe a la morfología de ambos polímeros que tienen mejor adhesión en el inicio (PEA) sin embargo en cuanto un material con PCL supere el tiempo de acomodación celular necesario, resulta ser promovedor de proliferación de células adiposas.

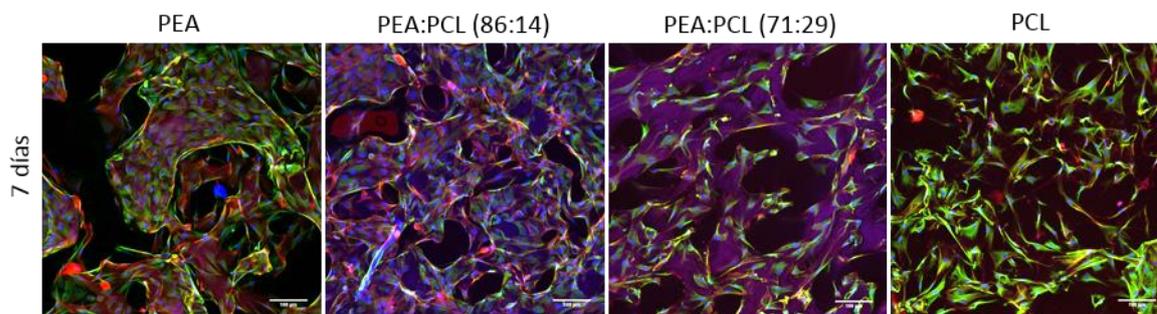
#### 4.3.5. Ensayos de inmunohistoquímica

La Figura 33 presenta la distribución de los núcleos celulares (DAPI) y sus citoesqueletos (Faloïdina y Troponina I) dentro de los *scaffolds* tras pasar 1 día y 7 días en cultivo. Se observa que las células se organizan alrededor de los poros adhiriéndose a las paredes de los materiales. Los núcleos adquieren una forma ovalada de diámetro aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , rodeando los poros formados en las diferentes estructuras tridimensionales. Para la muestra de PCL de un día de cultivo, los núcleos de las células fijadas resultan débilmente marcados. Por el contrario, en el primer plano se distinguen bien unos puntos pequeños que corresponden a debris de células muertas en el primer ensayo de eliminación de dioxano en el momento de fijación. Además, los citoesqueletos celulares aparecen cubriendo los poros alrededor. Debido a las propiedades fluorescentes tanto del poli(etil acrilato) como de la  $\epsilon$ -policaprolactona, en el fondo de las imágenes se aprecian los contornos de los *scaffolds* teñidos por los marcadores que, sin embargo, se pueden diferenciar fácilmente de lo que son citoesqueletos celulares.



**Figura 33.** Fotografías de fluorescencia obtenidas por microscopía confocal de células adiposas ADSCs marcadas con DAPI, faloidina (en azul, núcleos celulares, en verde citoesqueletos) y Troponina I (en rojo, se une a la actina) a 40X.

El análisis de la morfología de ADSCs revela diferencias entre los cultivos sobre el material de PCL y los demás *scaffolds*. En el caso de PEA puro y las dos composiciones de PEA:PCL vemos las estructuras más extendidas y desplegadas que forman unas redes celulares bien conectadas. Respecto al material de PCL, se ve que la ausencia de PEA provoca un crecimiento de células más alargadas y compactas con menores superficies de unión entre ellas.



**Figura 34.** Fotografías de fluorescencia obtenidas por microscopía confocal de células adiposas ADSCs marcadas con DAPI, faloidina (en azul, núcleos celulares, en rojo citoesqueletos) y Vimentina (en verde) a 10X. (Los materiales con el lavado adicional para eliminar el dioxano presentan, en comparación con la figura anterior, Figura 33, una mejor proliferación celular).

En el segundo ensayo realizado para eliminar las trazas de dioxano, las células marcadas con vimentina, faloidina y DAPI presentan la misma morfología y comportamiento del caso anterior. Sin embargo, esta vez debido a la mejor proliferación se observó un mayor acumulo de células que, al adherirse al interior de los materiales tanto homopolímeros como mezclas de PEA:PCL(86:14) y PEA:PCL(71:29), formaron una red compacta del tejido adiposo sobre ellos.

## 5. CONCLUSIONES

En primer lugar se confirma que es factible fabricar *scaffolds* semi-biodegradables a base de una matriz de poli(etil acrilato) (PEA) entrecruzado, semi-IPN con poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) como componente degradable. Se comprobó que el aumento de PCL en la mezcla a polimerizar causa su mayor viscosidad y en consecuencia menor eficiencia en la formación de la red de PEA entrecruzada con EGDMA dentro de la plantilla porogénica de gelatina. Por tanto, se considera determinante en primer lugar una relación óptima de proporciones entre PEA y PCL, y en segundo lugar, una concentración mayor del agente entrecruzante EGDMA. Tal y como se esperaba, la matriz de PEA queda rellena –interpenetrada– por cadenas de PCL que completan los espacios libres del esqueleto de PEA. Estas, durante la degradación por erosión van rompiéndose en cadenas de bajo peso molecular dejando el soporte de poli(etil acrilato) como esqueleto bioestable.

También se confirmaron una mayor rigidez y resistencia mecánica de los materiales compuestos por ambos polímeros, y por otro lado una buena integridad como *scaffolds*, debido a las propiedades mecánicas del PCL y menor viscosidad de las mezclas de PCL con el monómero EA que les permite penetrar mejor en la plantilla porogénica. Tras comprobar que poseen una estructura de fases con una fase cristalina y otra amorfa de PCL entre las que predomina la fase amorfa de PEA, es posible mediante la variación de proporciones fásicas obtener un material de una determinada característica según la aplicación asignada.

Además, no se observó ninguna influencia de la gelatina empleada como porógeno sobre la composición química de los materiales poliméricos. Tampoco existen diferencias en los grupos funcionales formados por la polimerización de los materiales en las distintas proporciones de sus componentes.

Finalmente, los *scaffolds* obtenidos resultan ser no citotóxicos y biocompatibles, presentando una buena respuesta celular, promoviendo la proliferación y adhesión de fibroblastos y células adiposas sobre cada material.

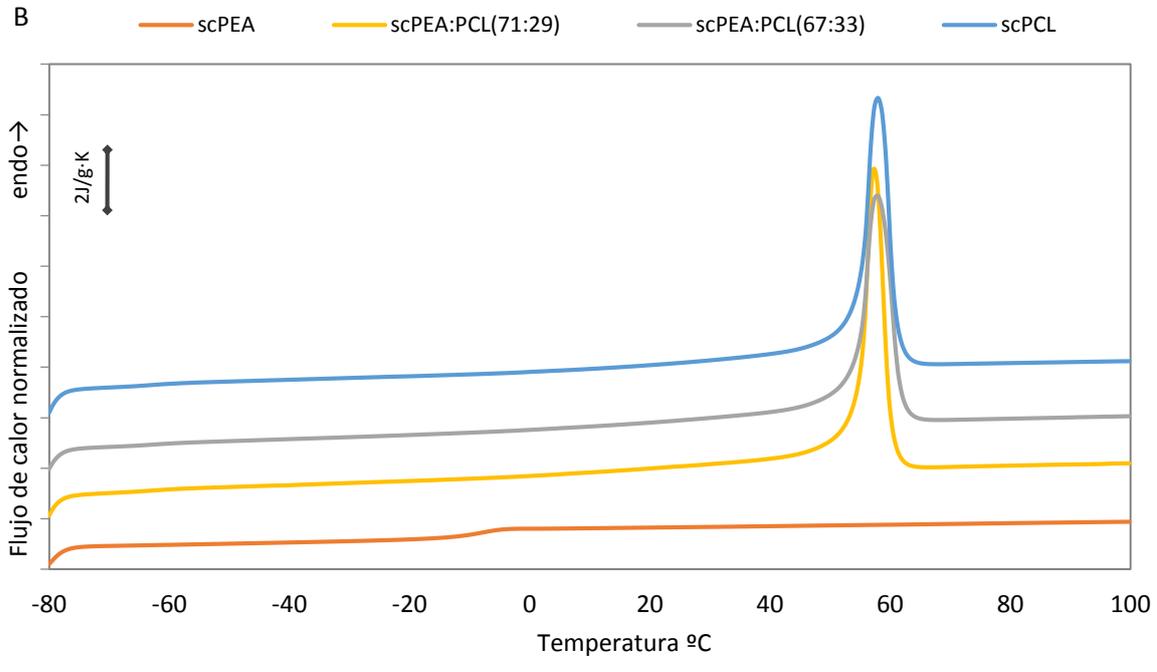
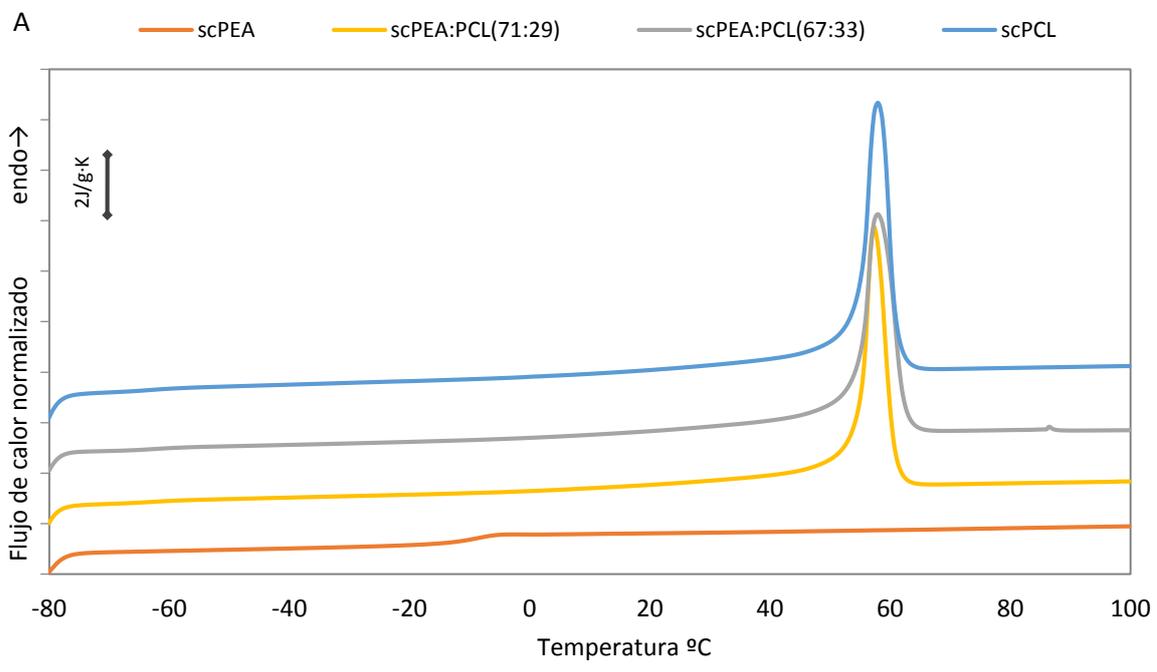
## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

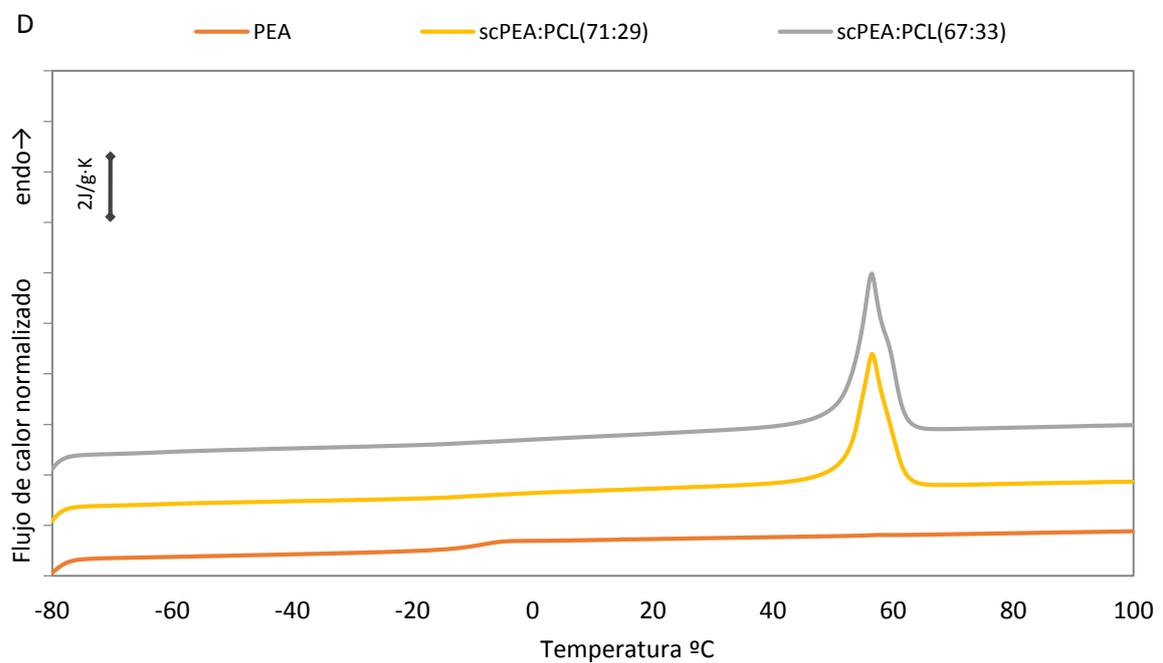
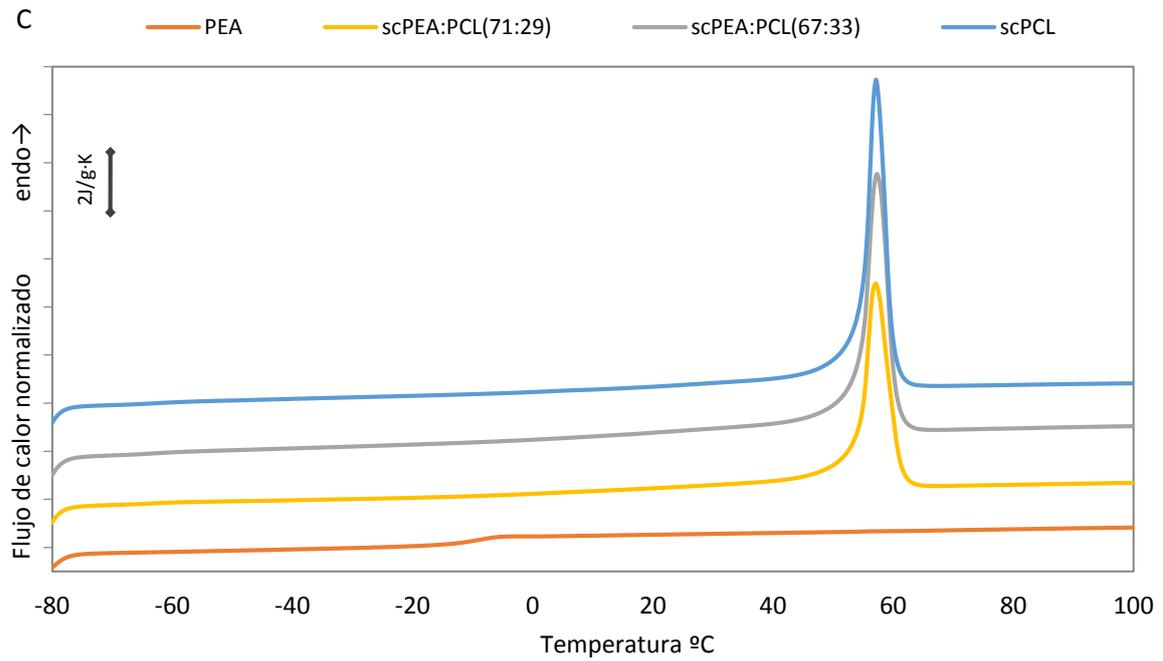
Esta fase del desarrollo de un biomaterial capaz de funcionar como un implante en un cuerpo humano es tal sólo el inicio de una compleja investigación necesaria para poderlo introducir como nuevo producto en el mercado. Principalmente, es necesario establecer una proporción de cada componente conforme su aplicación posterior que, entre otras, podría ser una regeneración del tejido ventricular que sufre las consecuencias de un infarto del miocardio, o una hernia en la pared abdominal. Además, sería importante estudiar con detalle el comportamiento del *scaffold* en condiciones *in vitro* e *in vivo* a lo largo del proceso de degradación en cuanto a su estructura, morfología y la fluidez de sustitución del polímero por la matriz extracelular formada por las células que colonicen el material. En consecuencia, sería imprescindible realizar los estudios con una línea celular adecuada para la aplicación futura, ya que dependiendo del lugar de implante puede haber variaciones en la respuesta biológica entre las diversas células. Por otro lado, sería interesante verificar las vías de supresión del polímero del cuerpo y analizar los posibles riesgos de su retención inesperada durante unos largos periodos temporales.

## APÉNDICE

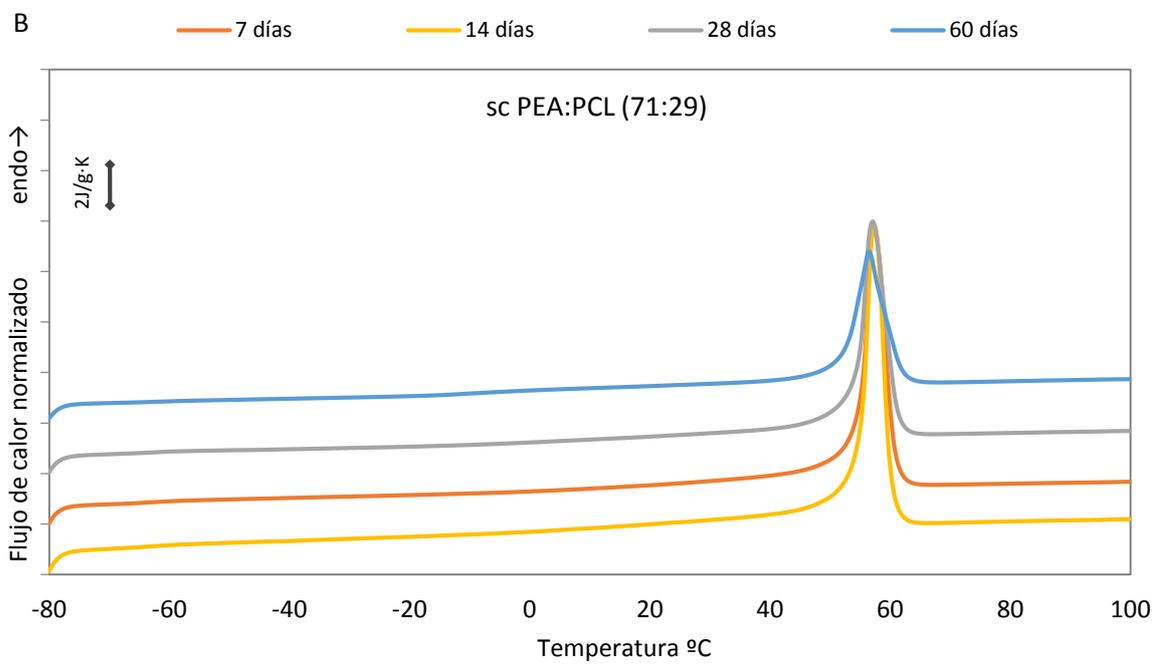
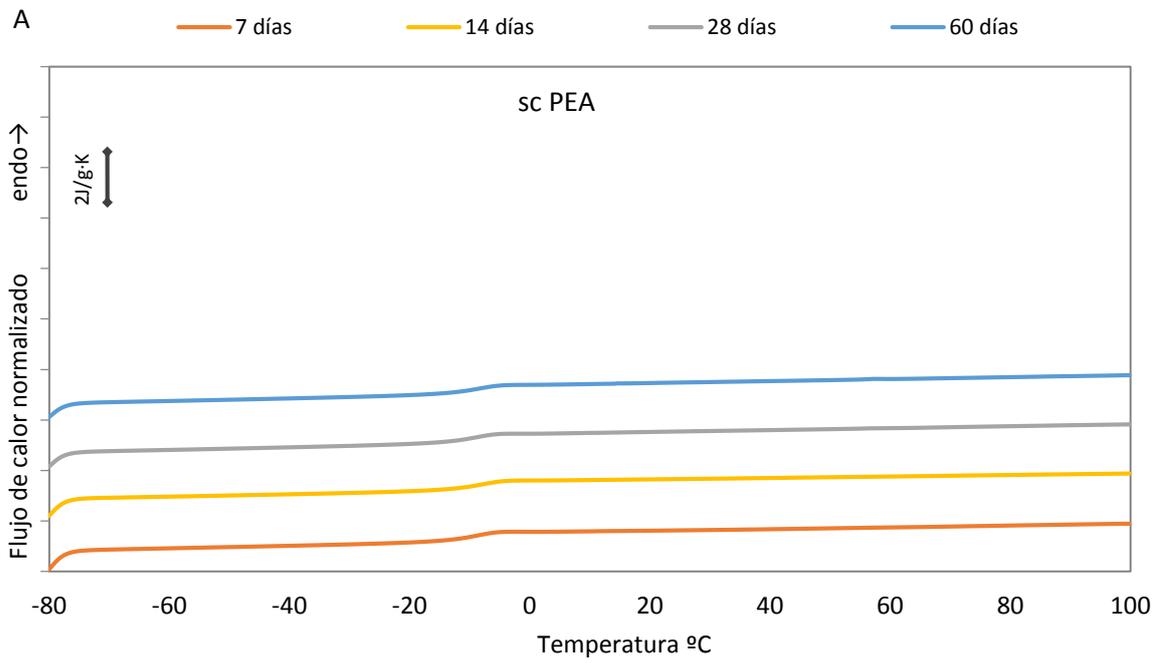
**Tabla 10.** Resultados de transiciones térmicas del segundo calentamiento: temperatura de vítrea ( $T_g$ ), de fusión ( $T_m$ ), calores específicos ( $\Delta c_s$ ), entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) y transiciones del enfriamiento: temperatura de cristalización ( $T_c$ ) y entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ ) de los scaffold de composiciones PEA:PCL tras degradar, con PEA reticulado con 2% de EGDMA.

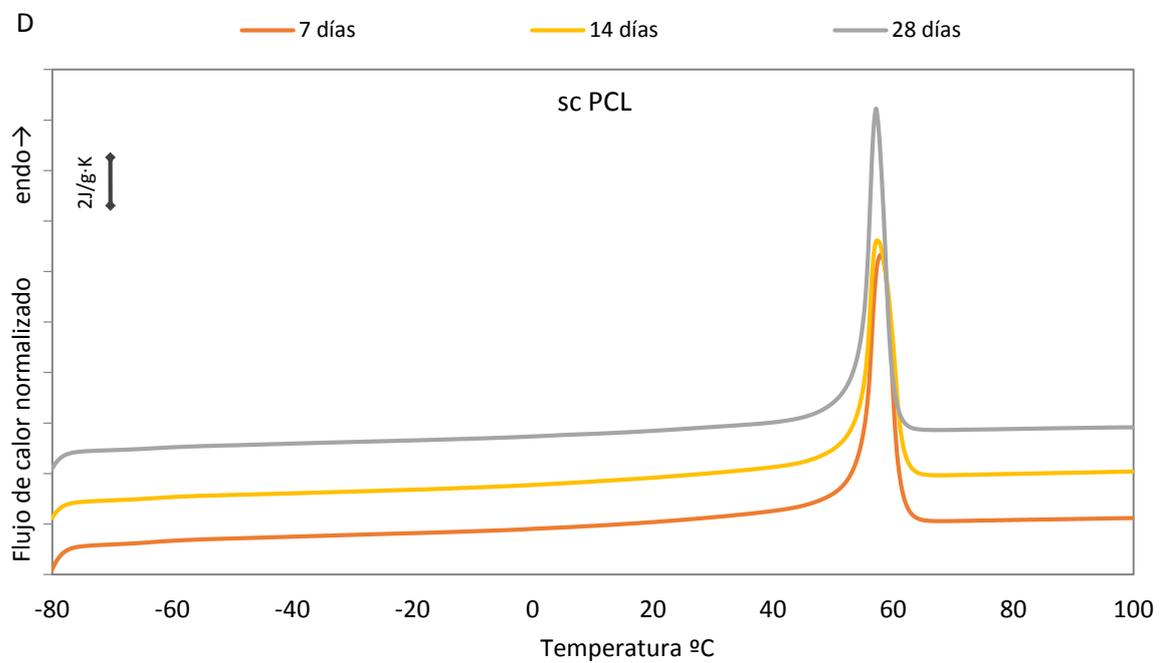
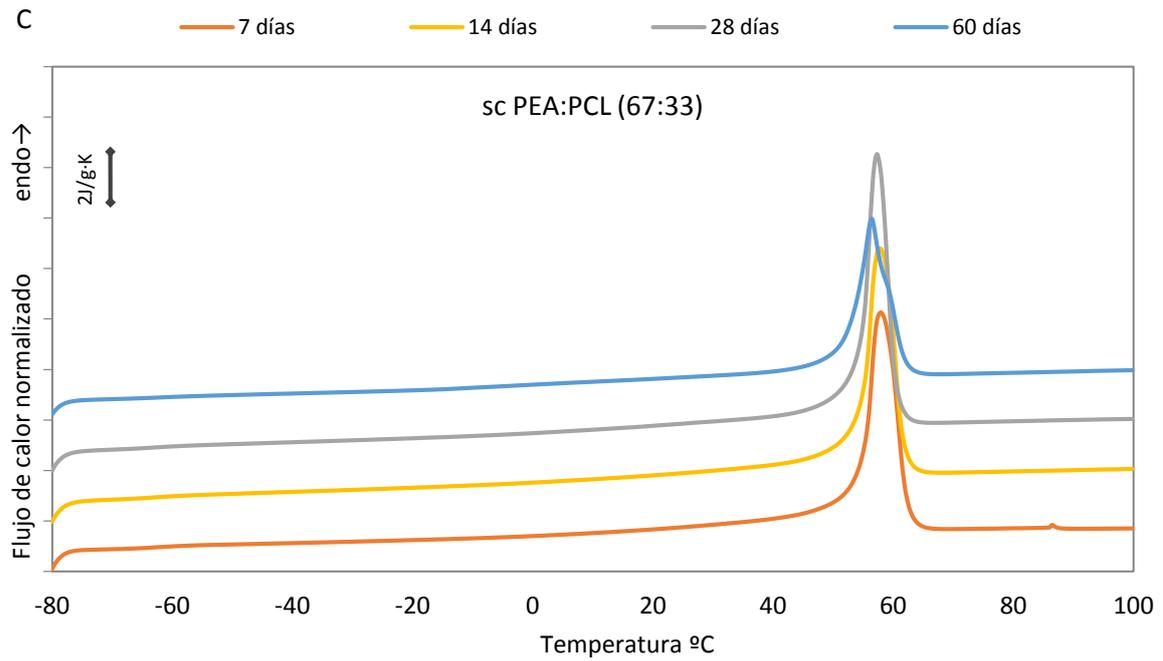
Material	$T_{gPEA}$ (°C)	$\Delta c_{sPEA}$ (Jg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$T_{gPCL}$ (°C)	$\Delta c_{sPCL}$ (Jg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (Jg <sup>-1</sup> )	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (Jg <sup>-1</sup> )
<i>7 días</i>								
PEA	-7,87	0,22	-	-	-	-	-	-
PEA:PCL(71:29)	-7,05	0,08	-62,10	0,06	57,26	-49,93	33,92	47,93
PEA:PCL(67:33)	-6,87	0,06	-60,53	0,08	57,90	-54,48	32,40	55,87
PCL	-	-	-61,10	0,06	57,85	-57,06	32,68	56,79
<i>14 días</i>								
PEA	-7,49	0,23	-	-	-	-	-	-
PEA:PCL(71:29)	-6,36	0,14	-59,39	0,07	57,24	-52,28	33,73	52,75
PEA:PCL(67:33)	-7,14	0,09	-58,19	0,08	57,71	-53,52	32,53	53,49
PCL	-	-	-62,75	0,09	57,22	-54,10	33,39	53,93
<i>28 días</i>								
PEA	-8,45	0,21	-	-	-	-	-	-
PEA:PCL(71:29)	-7,47	0,13	-59,93	0,05	57,08	-41,93	33,24	42,39
PEA:PCL(67:33)	-7,44	0,17	-63,02	0,05	57,21	-52,65	32,71	53,63
PCL	-	-	-63,21	0,07	57,09	-55,31	36,92	52,33
<i>60 días</i>								
PEA	-8,98	0,21	-	-	-	-	-	-
PEA:PCL(71:29)	-10,92	0,07	-61,45	0,04	56,31	-30,50	30,96	30,64
PEA:PCL(67:33)	-12,49	0,05	-61,21	0,05	56,31	-38,83	30,97	37,97
PCL	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>90 días</i>								
PEA	-8,48	0,18	-	-	-	-	-	-
PEA:PCL(71:29)	-2,92	0,11	-57,28	0,06	66,55	-61,01	32,37	39,19
PEA:PCL(67:33)	-8,96	0,11	-62,80	0,01	67,03	-50,85	30,69	31,34
PCL	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>90 días en PBS</i>								
PEA	-7,80	0,22	-	-	-	-	-	-
PEA:PCL(71:29)	-5,16	0,13	-61,69	0,06	67,71	-78,28	33,37	50,97
PEA:PCL(67:33)	7,69	0,10	-	-	67,67	-75,32	32,65	48,59
PCL	-	-	-58,52	0,08	67,35	-77,40	35,68	50,28





**Figura 35.** Comparativa de scaffolds de diferentes composiciones tras: A. 7 días, B. 14 días, C. 28 días, D. 60 días de degradación en NaOH.





**Figura 36.** Comparativa tras varios periodos de degradación en NaOH entre los scaffolds de: A. PEA, B. PEA:PCL(71:29), C. PEA:PCL(67:33), D. PCL.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, S., Doherty, P., & Williams, D. (1993). Mechanisms of polymer degradation in implantable devices. 2. Poly(DLactic acid). *J Biomed Mater Res*, 27(11), 1409–18.
- Annabi, N. (2012). Porous Biomaterials. In *Integrated Biomaterials for Biomedical Technology* (pp. 440(35–66)). John Wiley & Sons, Inc.,.
- Annabi, N., Nichol, J. W., Ph, D., Zhong, X., & Ji, C. (2010). Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering, 16(4), 371–83. doi:10.1089/ten.TEB.2009.0639
- Atzet, S., Curtin, S., Trinh, P., Bryant, S., & Ratner, B. (2008). Degradable Poly ( 2-hydroxyethyl methacrylate ) - co -polycaprolactone Hydrogels for Tissue Engineering Scaffolds. *Biomacromolecules*, 9(12), 3370–3377. doi:10.1021/bm800686h
- Baddour, J. a, Sousounis, K., & Tsonis, P. a. (2012). Organ repair and regeneration: an overview. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 96(1), 1–29. doi:10.1002/bdrc.21006
- Bahamonde, O., Garci, D. M., Salmero, M., Navarro, X., & Go, J. L. (2007). Influence of the substrate ' s hydrophilicity on the in vitro Schwann cells viability. *Journal of Biomedical Materials Research*, 83(2), 463–70. doi:10.1002/jbm.a.31297
- Bessonov, N., Levin, M., Morozova, N., Reinberg, N., Tosenberger, A., & Volpert, V. (2015). On a model of pattern regeneration based on cell memory. *PloS one*, 10(2), e0118091. doi:10.1371/journal.pone.0118091
- Bliley, J. M., & Marra, K. G. (2014). Polymeric Biomaterials as Tissue Scaffolds. In *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* (pp. 932(149–161)). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-397157-9.00013-8
- Charles W., P. J., Mikos, A. G., & McIntire, L. V. (1998). Prospectus of Tissue Engineering. In *Frontiers in Tissue Engineering* (pp. 700(3–11)).
- Cole, M. A., Jankousky, K. C., & Bowman, C. N. (2013). Redox Initiation of Bulk Thiol-Ene Polymerizations. *Polym Chem*, 4(4), 1167–1175. doi:10.1039/C2PY20843A.Redox
- Del Real, A., Wallander, D., Maciel, A., Cedillo, G., & Loza, H. (2015). Graft copolymerization of ethyl acrylate onto tamarind kernel powder, and evaluation of its biodegradability. *Carbohydrate polymers*, 117, 11–8. doi:10.1016/j.carbpol.2014.09.044
- Doshi, J., & Reneker, D. H. (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*, 35(2-3), 151–160. doi:10.1016/0304-3886(95)00041-8
- Draghi, L., Resta, S., Pirozzolo, M. G., & Tanzi, M. C. (2005). Microspheres leaching for scaffold porosity, 16(12), 1093–1097.

- Furth, M. E., Atala, A., Innovations, W. F., & Carolina, N. (2014). Tissue Engineering : Future Perspectives. In *Principles of Tissue Engineering* (Fourth Edi., pp. 83–123). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00006-9
- Gong, Y., Ma, Z., Zhou, Q., & Li, J. U. N. (2008). Poly ( lactic acid ) scaffold fabricated by gelatin particle leaching has good biocompatibility for chondrogenesis, *19*(2), 207–221. doi:10.1163/156856208783432453
- Gómez, M. P., Arredondo, E., Páez, G., & Manyalich, M. (2012). International Registry in Organ Donation and Transplantation 2010. *Transplantation proceedings*, *44*(6), 1592–7. doi:10.1016/j.transproceed.2012.04.005
- Gómez, M. P., Pérez, B., & Manyalich, M. (2014). International Registry in Organ Donation and Transplantation--2013. *Transplantation proceedings*, *46*(4), 1044–8. doi:10.1016/j.transproceed.2013.11.138
- Grandi, C., Di Liddo, R., Paganin, P., Lora, S., Dalzoppo, D., Feltrin, G., ... Parnigotto, P. P. (2011). Porous alginate/poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds: preparation, characterization and in vitro biological activity. *International journal of molecular medicine*, *27*(3), 455–67. doi:10.3892/ijmm.2010.593
- Griffon, D. J., Sedighi, M. R., Schaeffer, D. V., Eurell, J. A., & Johnson, A. L. (2006). Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomaterialia*.
- Grossterlinden, L., Janssen, A., Schmitz, N., Priemel, M., Pogoda, P., Amling, M., ... Linhart, W. (2006). Deleterious tissue reaction to an alkylene bis(dilactoyl)-methacrylate bone adhesive in long-term follow up after screw augmentation in an ovine model. *Biomaterials*, *27*(18), 3379–86. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.051
- Ingber, D. E., Madri, J. A., & Folkman, J. (1987). Endothelial growth factors and extracellular matrix regulate DNA synthesis through modulation of cell and nuclear expansion. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, *23*(5), 387–394.
- Jensen, S. J. (2011). *Ethics of Organ Transplantation* (pp. 369(95–113)). Washington DC: Catholic University of America Press.
- Jirtle, R. L., & Biles, C. (1980). Morphologic and Histochemical Analysis of Hepatocytes Transplanted Into Syngeneic Hosts, *101*(1), 115–26.
- Liang, H., Chang, W., Lin, K., & Sung, H. (2002). Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration : In vitro and in vivo studies. *J Biomed Mater Res A*, *65*(2), 271–82. doi:10.1002/jbm.a.10476
- Lichun, L., & Mikos, A. G. (1996). The Importance of New Processing Techniques in Tissue Engineering. *MRS Bulletin*, *21*(11), 28–32.
- Lozano Picazo, P., Pérez Garnes, M., Martínez Ramos, C., Vallés-Lluch, a, & Monleón Pradas, M. (2014). New Semi-Biodegradable Materials from Semi-Interpenetrated Networks of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) and Poly(ethyl acrylate). *Macromolecular bioscience*, 1–12. doi:10.1002/mabi.201400331

- Mandal, B. B., & Kundu, S. C. (2009). Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials*, *30*(15), 2956–65. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.006
- Meek, M. F., & Coert, J. H. (2002). Clinical use of nerve conduits in peripheral-nerve repair: Review of the literature. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, *18*(2), 97–109.
- Meseguer-Dueñas, J. M., Más-Estellés, J., Castilla-Cortázar, I., Escobar Ivirico, J. L., & Vidaurre, a. (2011). Alkaline degradation study of linear and network poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Journal of materials science. Materials in medicine*, *22*(1), 11–8. doi:10.1007/s10856-010-4182-6
- Mikos, A. G., Wald, H. L., Sarakinos, G., Leite, S. M., & Langer, R. (1992). Biodegradable cell transplantation devices for tissue regeneration. *MRS Proceedings*, *252*, 353.
- Mooney, D. J., Cima, L., & Langer, R. (1992). Principles of tissue engineering and reconstruction using polymer-cell constructs. *MRS Proceedings*, *252*, 345. doi:10.1557/PROC-252-345
- Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, *32*(8-9), 762–798. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017
- Nerem, R. M., & Schutte, S. C. (2014). The Challenge of Imitating Nature. In *Principles of Tissue Engineering* (Fourth Edi., pp. 9–24). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00002-1
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, *14*(3), 88–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- Odian, G. (2004). *Principles of polymerization* (p. 832). Hoboken: Wiley-Interscience.
- Oh, S. H., Park, I. K., Kim, J. M., & Lee, J. H. (2007). In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*, *28*(9), 1664–71. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.024
- Pérez Olmedilla, M., Garcia-Giralt, N., Pradas, M. M., Ruiz, P. B., Gómez Ribelles, J. L., Palou, E. C., & García, J. C. M. (2006). Response of human chondrocytes to a non-uniform distribution of hydrophilic domains on poly (ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymers. *Biomaterials*, *27*(7), 1003–12. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.030
- Pérez-Köhler, B., Sotomayor, S., Rodríguez, M., Gegúndez, M. I., Pascual, G., & Bellón, J. M. (2015). Bacterial adhesion to biological versus polymer prosthetic materials used in abdominal wall defect repair: do these meshes show any differences in vitro? *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery*. doi:10.1007/s10029-015-1378-1
- Pitt, C. G., Chasalow, F. I., Hibionada, Y. M., Klimas, D. M., Park, T., & Carolina, N. (1981). Aliphatic Polyesters . I . The Degradation of Poly (  $\epsilon$ - caprolactone ) In Vivo, *26*, 3779–3787.

- Saltzman, W. M. (2004). *Tissue Engineering: Engineering Principles for the Design of Replacement Organs and Tissues* (p. 544). Cary, NC, USA: Oxford University Press, Incorporated.
- Sanz, A., Boni, R. C., Ghirardini, A., Nanni Costa, A., & Manyalich, M. (2005). IRODaT: Comparison of worldwide growth rates from 2000 to 2004, (3), 151–154.
- Saraç, A. S., Yavuz, Ö., & Sezer, E. (1999). Electrochemically induced redox polymerization of acrylamide. *Journal of Applied Polymer Science*, 72(7), 861–869.
- Seidi, A., & Ramalingam, M. (2012). Protocols for Biomaterial Scaffold Fabrication. In *Integrated Biomaterials in Tissue Engineering* (pp. 1–24). John Wiley & Sons, Inc., doi:10.1002/9781118371183.ch1
- Shi, D. (2005). *Introduction to Biomaterials* (pp. 270(139–206)). Word Scientific & Imperial College Press.
- Sigma-Aldrich. (n.d.). Retrieved from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440752?lang=es&region=ES>
- Tabarrok, A. (2009). Life-Saving Incentives: Consequences, Costs and Solutions to the Organ Shortage. *Library of economics and liberty*. Retrieved from <http://www.econlib.org/library/Columns/y2009/TabarrokLifesaving.html>
- Taylor, M. S., Daniels, A. U., Andriano, K. P., & Heller, J. (2004). Six bioabsorbable polymers: In vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *Journal of Applied Biomaterials*, 5(2), 151–7.
- Tognana, E., Padera, R. F., Chen, F., Vunjak-Novakovic, G., & Freed, L. E. (2005). Development and remodeling of engineered cartilage-explant composites in vitro and in vivo. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, 13(10), 896–905. doi:10.1016/j.joca.2005.05.003
- Trachtenberg, J. E., Kasper, F. K., Mikos, A. G., & Cam, C. A. D. (2014). *Polymer Scaffold Fabrication. Principles of Tissue Engineering* (Fourth Edi., pp. 423–440). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00022-7
- Vazquez, B., Roman, J. S., Deb, S., & Bonfield, W. (1998). Application of long chain amine activator in conventional acrylic bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research*, 43(2), 131–9.
- Venugopal, J. R., Prabhakaran, M. P., Mukherjee, S., Ravichandran, R., Dan, K., & Ramakrishna, S. (2012). Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. *J R Soc Interface*, 79(66), 1–19. doi:10.1098/rsif.2011.0301
- Vert, M., Mauduit, J., & Li, S. (1994). Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity. *Biomaterials*, 15(15), 1209–1213. doi:10.1016/0142-9612(94)90271-2
- Wagner, H. L. (1985). The Mark-Houwink-Sakurada Equation for the Viscosity of Atactic Polystyrene. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 01/1985(14), 1101–1106.

- Wei, G., & Ma, P. X. (2006). Macroporous and nanofibrous polymer scaffolds and polymer / bone-like apatite composite scaffolds generated by sugar spheres, *78*(2), 306–15. doi:10.1002/jbm.a
- Wei, G., & Ma, P. X. (2008). Nanostructured Biomaterials for Regeneration. *Advanced Functional Materials*, *18*(22), 3566–3582.
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, *29*(20), 2941–53. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023
- Woodruff, M. A. ., & Hutmacher, D. W. . (2010). The return of a forgotten polymer : Polycaprolactone in the 21st century . *Progress in Polymer Science*, *35*(10), 1217–1256.
- Yang, S., Leong, K.-F., Du, Z., & Chua, C.-K. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering*, *7*(6), 679–89.
- Yuan, L., Hamidi, N., Smith, S., Clemons, F., Hamidi, A., & Tang, C. (2015). Molecular characterization of biodegradable natural resin acid-substituted polycaprolactone. *European Polymer Journal*, *62*, 43–50. doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.10.023