

# Resumen

La ingeniería tisular tiene como finalidad desarrollar sustitutos biológicos funcionales que reemplacen o restauren los tejidos dañados. Se trata de preparar andamiajes tridimensionales (scaffolds) que sean capaces de albergar células y factores de señalización que favorezcan la regeneración del tejido dañado. Conviene que los materiales sean biodegradables para que vayan desapareciendo a medida que se forma el nuevo tejido. Es por ello que existe un especial interés en el desarrollo de scaffolds que, proporcionando un entorno favorable a las células, tengan una tasa de degradación que se adapte a velocidad de regeneración del tejido. Los scaffolds deben ser porosos y poseer una morfología del poro adaptada a la aplicación para la que son diseñados. Deben ser capaces de albergar gran cantidad de agua (hidrogeles) al tiempo que presentan una interacción célula/biomaterial adecuada (en general los materiales hidrófobos presentan mayor adhesión celular).

El objetivo de esta tesis es el de crear estructuras porosas tridimensionales basadas en quitosano con velocidades de degradación altas. Se han preparado hidrogeles de redes de copolímeros en bloque entrecruzando el quitosano (CHT) o el carboximetil quitosano (CmCHT) con un polímero hidrófobo de bajo peso molecular como la poli( $\epsilon$ -caprolactona), (PCL) o bien con un polímero hidrófilo como es el poli(etilenglicol), (PEG). La hipótesis de trabajo fue que la degradación del polímero que actúa como entrecruzador debe dejar grandes cadenas del polímero (quitosano protonado o carboximetil quitosano) que son solubles en agua.

El quitosano es un polímero de origen natural que presenta buenas propiedades como biomaterial, (es biocompatible, biodegradable y sus propiedades mecánicas se asemejan a las de los tejidos biológicos). Se ha utilizado en muchas aplicaciones dentro de la ingeniería de tejidos proporcionando un buen entorno para las células, y su mecanismo de biodegradación da subproductos que son metabolizadas por el organismo sin presentar citotoxicidad. A pesar de las buenas propiedades del quitosano, el polímero presenta tiempos de biodegradación bastante lentos en medio enzimático conteniendo lisozima y aún más lentos en condiciones hidrolíticas.

Las propiedades físico-químicas del quitosano dependen en gran medida del grado de desacetilación, DD. Con el fin de analizar dichas propiedades se ha llevado a cabo la síntesis de quitosano con DD variando entre 85% y el 45%. Se ha comprobado que la absorción de agua aumenta rápidamente a medida que el grado de desacetilación disminuye. Esto parece contradecir el hecho de que la absorción de agua de la quitina (DD bajo) es mucho menor que la de quitosano. Para entender dicho comportamiento se ha analizado la dependencia del grado de hinchado de la red con los parámetros que determina la teoría de Flory Rehner: parámetro de interacción agua-polímero, las propiedades elásticas de la red y la densidad de entrecruzamiento en función del contenido en agua de la muestra. Se comprobó que la inestabilidad de los cristales durante el proceso de hinchamiento aumenta al disminuir el grado de desacetilación. De esta forma, se explicó el aumento del contenido en agua para valores bajos de DD por la disminución de cristalinidad y, por tanto, de densidad de entrecruzamiento de la red.

La estabilidad térmica del quitosano en función de DD ha sido analizada por TGA. Se ha medido la degradación térmica del polímero en función de la temperatura para varias velocidades de calentamiento. Se han aplicado diferentes métodos para obtener la energía de activación. Aunque parece que la energía de activación aumenta cuando DD disminuye, no hay una tendencia clara. Se ha comprobado que se trata de un sistema complejo en el que la energía de activación depende del grado de conversión.

Se ha propuesto un modelo con dos etapas de degradación asociadas a las unidades acetiladas y desacetiladas de la cadena polimérica.

Como técnica de preparación de membranas porosas se ha elegido el electrohilado, ya que permite obtener membranas delgadas y manipulables con tamaños de fibra del orden de micras. Las membranas obtenidas han sido tratadas con etanol y entrecruzadas con glutaraldehído. Se ha analizado la influencia de los procesos de electrohilado y entrecruzamiento en la estabilidad térmica del quitosano. Un método no-isoconversional, el modelo de Kissinger, se ha utilizado para calcular la energía de activación de la degradación térmica del polímero,  $E_a$ , sometido a cada uno de los procesos. Se ha comprobado que los valores de  $E_a$  aumentan después de cada proceso con respecto a la del quitosano de partida.

Se han sintetizado hidrogeles de quitosano, y carboximetil quitosano entrecruzados covalentemente con cadenas cortas de poli( $\epsilon$ -caprolactona), y poli(etilenglicol). Ha sido necesario funcionalizar la PCL con grupos terminales aldehído para que se pueda producir la reacción de entrecruzamiento químico. La formación de las redes se ha confirmado mediante ensayos de solubilidad con buenos solventes para cada polímero. En todos los casos se han obtenido hidrogeles que absorben gran cantidad de agua con valores que oscilan entre 90 y 5000%. El análisis de la estabilidad térmica mediante TGA ha revelado las interacciones entre los componentes de la red; además se ha utilizado para determinar la proporción de cada polímero en la red. Los ensayos de calorimetría junto con el análisis de cristalinidad de las redes por DRX revelan que las redes formadas por componentes hidrofílico-hidrofóbico, (CHT-PCL y CmCHT-PCL) presentan separación de fases (más evidente en el caso de CHT-PCL). Sin embargo, no se observa separación de fases en las redes formadas por dos componentes hidrofílico (CmCHT-PEG). Los estudios de las cinéticas de biodegradación tanto hidrolítica como enzimática revelan la obtención de tres sistemas que se pueden clasificar como hidrogeles estables, para los hidrogeles formados por CmCHT-PEG, hidrogeles semidegradables para el sistema CHT-PCL y finalmente hidrogeles degradables con cinéticas de degradación del orden de días, para el sistema CmCHT-PCL.

Se han preparado estructuras porosas mediante el hinchado en agua y la posterior congelación y liofilización. Se ha comprobado que la morfología de los poros depende de la composición. Los tamaños de poro y su interconexión son adecuados para albergar células.

Finalmente se ha llevado a cabo estudios biológicos de los hidrogeles porosos de CmCHT-PCL. Se utilizaron fibroblastos para analizar la citotoxicidad y optimizar el proceso de siembra. Posteriormente se realizaron cultivos con células mesenquimales del tejido adiposo de cerdo (MSCs). Los resultados han revelado que dichas redes pueden ser utilizadas como sistemas de liberación de células en el organismo con tiempos de degradación del orden de una semana.