



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE MASTER EN INGENIERÍA BIOMEDICA

DISEÑO DE NUEVOS BIOMATERIALES POR COMBINACIÓN DE FIBROÍNA Y ÁCIDO HIALURÓNICO

AUTOR: FERNANDO GISBERT ROCA

TUTOR: DR. MANUEL MONLEÓN PRADAS

COTUTORA: DRA. CRISTINA MARTÍNEZ RAMOS

Curso Académico: 2016-17

Agradecimientos

“Quiero aprovechar la ocasión para agradecer el apoyo de mi tutor Manuel Monleón Pradas y de mi cotutora Cristina Martínez Ramos, así como la ayuda prestada por todo el equipo del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) de la Universidad Politécnica de Valencia.”

“A mi familia”

El presente trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad de España “Biohíbridos para la promoción del crecimiento axonal y la regeneración en el sistema nervioso central y periférico” (Proyecto MINECO; MAT2015-66666-C3-1-R) y “Neurocables modulares: multiplicando conexiones neurales” (Proyecto EXPLORA, MINECO; DPI2015-72863-EXP).

Resumen

Las lesiones y enfermedades que afectan al sistema nervioso, tanto central (SNC) como periférico (SNP), poseen incidencias y prevalencias muy elevadas, afectando a millones de personas en todo el mundo. Además, el hecho de que la regeneración autónoma del sistema nervioso sea bastante limitada, especialmente en el SNC, hace que la pérdida de funciones tanto motoras como sensitivas asociada a estas afecciones persista de por vida.

Con el objetivo de mejorar las limitadas terapias actuales de reparación y regeneración en este campo se ha desarrollado la ingeniería tisular del sistema nervioso, la cual trata de encontrar estrategias de reparación alternativas mediante la combinación de la terapia celular, moléculas bioactivas y andamiajes basados en biomateriales.

El presente Trabajo Fin de Máster se enmarca dentro de este campo, más concretamente en la producción de conductos de guía nerviosa (NGCs) capaces de favorecer la regeneración de tractos axonales tanto del SNC como del SNP. Estas estructuras se han producido mediante la combinación de ácido hialurónico (HA) y fibroína de seda (SF) con el objetivo de lograr mejorar sus propiedades tanto de manipulabilidad como de adhesión y proliferación celular a la vez que se mantienen las buenas propiedades morfológicas de los NGCs basados únicamente en HA.

Los resultados obtenidos muestran que la incorporación de la SF al proceso de producción ha sido satisfactoria, obteniendo NGCs con una estructura tubular adecuada que presentan una superficie interna lisa que favorece la adhesión celular y unas paredes con la porosidad adecuada para permitir la difusión de nutrientes y oxígeno. Asimismo se observó una mejora tanto de las propiedades mecánicas del material, la cual ayudará a su manipulación en futuras etapas *in vitro* e *in vivo*, como de las propiedades de adhesión y proliferación celular, la cual permitirá mejorar la biofuncionalización del interior del conducto con células de soporte gliales.

Palabras clave: Regeneración del sistema nervioso, ingeniería tisular, conducto de guía nerviosa, biomateriales, ácido hialurónico, fibroína de seda.

Resum

Les lesions i malalties que afecten el sistema nerviós, tant central (SNC) com perifèric (SNP), posseeixen incidències i prevalences molt elevades, afectant a milions de persones a tot el món. A més, el fet de que la regeneració autònoma del sistema nerviós sigui força limitada, especialment en el SNC, fa que la pèrdua de funcions tant motores com sensibles associada a aquestes afeccions persisteixi de per vida.

Amb l'objectiu de millorar les limitades teràpies actuals de reparació i regeneració en aquest camp s'ha desenvolupat l'enginyeria tissular del sistema nerviós, la qual tracta de trobar estratègies de reparació alternatives mitjançant la combinació de la teràpia cel·lular, molècules bioactives i bastides basats en biomaterials .

El present Treball Fi de Màster s'emmarca dins d'aquest camp, més concretament en la producció de conductes de guia nerviosa (NGCs) capaços d'afavorir la regeneració de tractes axonals tant del SNC com del SNP. Aquestes estructures s'han produït mitjançant la combinació d'àcid hialurònic (HA) i fibroïna de seda (SF) amb l'objectiu d'aconseguir millorar les seves propietats tant de manipulabilitat com d'adhesió i proliferació cel·lular al mateix temps que es mantenen les bones propietats morfològiques dels NGCs basats únicament en HA.

Els resultats obtinguts mostren que la incorporació de la SF al procés de producció ha estat satisfactòria, obtenint NGCs amb una estructura tubular adequada que presenten una superfície interna llisa que afavoreix l'adhesió cel·lular i unes parets amb la porositat adequada per permetre la difusió de nutrients i oxigen. Així mateix es va observar una millora tant de les propietats mecàniques del material, la qual ajudarà a la seva manipulació en futures etapes *in vitro* i *in vivo*, com de les propietats d'adhesió i proliferació cel·lular, la qual permetrà millorar la biofuncionalització de l'interior del conducte amb cèl·lules de suport glials.

Paraules clau: Regeneració del sistema nerviós, Enginyeria tissular, Conducte de guia nerviosa, Biomaterials, Àcid hialurònic, Fibroïna de seda.

Abstract

Injuries and diseases affecting the nervous system, both central (CNS) and peripheral (PNS), have very high incidence and prevalence, affecting millions of people around the world. Moreover, the fact that autonomous regeneration of the nervous system is rather limited, especially in the CNS, causes the loss of both motor and sensory functions associated with these conditions to persist for life.

In order to improve the limited current repair and regeneration therapies in this field, tissue engineering of the nervous system has been developed, which seeks to find alternative repair strategies by combining cell therapy, bioactive molecules and scaffolds based on biomaterials .

This Master Thesis is included in this field, more specifically in the production of nerve guidance conduits (NGCs) capable of promoting the regeneration of axonal tracts in both the CNS and the PNS. These structures have been produced by the combination of hyaluronic acid (HA) and silk fibroin (SF) with the aim of improving their properties of both manipulability and cell adhesion and proliferation while maintaining the good morphological properties of NGCs based solely on HA.

The results show that the incorporation of SF into the production process has been satisfactory, obtaining NGCs with a suitable tubular structure that present a smooth internal surface that favors the cell adhesion and walls with the adequate porosity to allow the diffusion of nutrients and oxygen. It was also observed an improvement in the mechanical properties of the material, which will help to its manipulation in future *in vitro* and *in vivo* stages, as well as an improvement in the cell adhesion and proliferation characteristics, which will help to improve the biofunctionalization of the inner conduit with glial support cells.

Key words: Nervous system regeneration, Tissue engineering, Nerve guidance conduit, Biomaterials, Hyaluronic acid, Silk fibroin.

Abreviaciones

Adim.	Adimensional
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (de <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (de <i>bovine serum albumin</i>)
CNTF	Factor neurotrófico ciliar (de <i>ciliary neurotrophic factor</i>)
CNTP	Condiciones normales de temperatura y presión (25°C, 100 kPa)
CBIT	Centro de biomateriales e ingeniería tisular de la Universidad politécnica de Valencia
DMA	Analizador mecánico dinámico (de <i>dynamic mechanical analyzer</i>)
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (de <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DPBS	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (de <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>)
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (de <i>differential scanning calorimetry</i>)
DVS	Divinil sulfona (de <i>divinyl sulfone</i>)
ECM	Matriz extracelular (de <i>extracellular matrix</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético (de <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FBS	Suero fetal bovino (de <i>fetal bovine serum</i>)
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (de <i>food and drug administration</i>)
FESEM	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (de <i>field emission scanning electron microscopy</i>)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (de <i>fibroblast growth factor</i>)
Gly	Glicina
HA	Ácido hialurónico (de <i>hyaluronic acid</i>)
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (de <i>insulin-like growth factor 1</i>)
M _w	Peso molecular (de <i>molecular weight</i>)
NaOH	Hidróxido sódico
NGC	Conducto de guía nerviosa (de <i>nerve guidance conduit</i>)
NGF	Factor de crecimiento nervioso (de <i>nerve growth factor</i>)

OECs	Células envolventes del bulbo olfatorio (de <i>olfactory ensheathing cells</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (de <i>phosphate buffered saline</i>)
PCL	Policaprolactona (de <i>polycaprolactone</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (de <i>platelet derived growth factor</i>)
PFA	Paraformaldehído (de <i>paraformaldehyde</i>)
PGA	Ácido poliglicólico (de <i>polyglycolic acid</i>)
PHB	Polihidroxibutirato (de <i>polyhydroxybutyrate</i>)
PLA	Ácido poliláctico (de <i>polylactic acid</i>)
PLLA	Ácido poli-L-láctico (de <i>poly-L-lactic acid</i>)
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico (de <i>polylactic-co-glycolic acid</i>)
PNI	Lesión de nervio periférico (de <i>peripheral nerve injury</i>)
POSS	Silsesquioxano oligomérico poliédrico (de <i>polyhedral oligomeric silsesquioxane</i>)
P/S	Penicilina/Estreptomicina (de <i>Penicillin/Streptomycin</i>)
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVA	Polivinil alcohol (de <i>polyvinyl alcohol</i>)
rSCs	Células de Schwann de rata (de <i>rat Schwann cells</i>)
SCI	Lesión de médula espinal (de <i>spinal cord injury</i>)
SD	Desviación típica o estándar (de <i>standard deviation</i>)
SEM	Microscopio electrónico de barrido
Ser	Serina
SF	Fibroína de seda (de <i>silk fibroin</i>)
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
T/E	Tripsina/EDTA (de <i>trypsin/EDTA</i>)
TFM	Trabajo final de máster
TGA	Análisis termogravimétrico (de <i>thermogravimetric analysis</i>)

Índice

Índice	vii
Figuras	x
Tablas	xiii
Ecuaciones	xiv
1. Motivación	1
2. Introducción	2
2.1. Problemática de la regeneración nerviosa	2
2.1.1. Regeneración en el sistema nervioso central (SNC)	4
2.1.2. Regeneración en el sistema nervioso periférico (SNP)	5
2.2. Población objetivo	6
2.3. Ingeniería tisular en el sistema nervioso	8
2.3.1. Terapia celular	9
2.3.2. Moléculas bioactivas	10
2.3.2.1. Factores de crecimiento	11
2.3.2.2. Fármacos	11
2.3.2.3. Sistemas de liberación controlada	11
2.3.3. Andamiajes o <i>scaffolds</i>	12
2.3.3.1. Conductos de guía nerviosa (NGCs)	12
2.3.3.1.1. Propiedades de un NGC ideal	14
2.3.3.1.2. Biomateriales empleados para la fabricación de NGCs	17
2.3.3.1.3. NGCs comerciales aprobados por la FDA	22
2.4. Propiedades de los biomateriales empleados y justificación de su elección	25
2.4.1. Ácido hialurónico (HA)	25
2.4.1.1. Características y propiedades generales	25
2.4.1.2. Modificaciones	27
2.4.1.3. Aplicaciones	28
2.4.1.4. Justificación de la elección	29
2.4.2. Fibroína de seda (SF)	29
2.4.2.1. Características y propiedades generales	29
2.4.2.2. Aplicaciones	33
2.4.2.3. Justificación de la elección	33
3. Hipótesis y objetivos	35
4. Materiales y métodos	36
4.1. Preparación de los biomateriales	36
4.1.1. HA	36
4.1.1.1. Fracción másica de los distintos componentes	37
4.1.1.1.1. Muestras no lavadas previamente	37
4.1.1.1.2. Muestras lavadas previamente	39
4.1.2. HA combinado con SF	40
4.1.2.1. Fracción másica de los distintos componentes	41
4.1.2.1.1. Muestras no lavadas previamente	41

4.1.2.1.2. Muestras lavadas previamente	42
4.1.3. Otros biomateriales	43
4.1.4. Elaboración de las membranas	44
4.1.4.1. Elección del tipo de molde	45
4.1.5. Elaboración de los NGCs	46
4.2. Caracterización de las propiedades físico-químicas	47
4.2.1. Estudio mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)	47
4.2.1.1. Morfología superficial	47
4.2.1.2. Análisis elemental	48
4.2.2. Estabilidad frente a ciclos de hinchado y secado	48
4.2.3. Cambio de dimensiones en hinchado	49
4.2.4. Densidad y porosidad	50
4.2.5. Análisis termogravimétrico (TGA)	51
4.2.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	53
4.3. Caracterización de las propiedades mecánicas	54
4.3.1. Reómetro	55
4.4. Estudio de adhesión y proliferación celular	57
4.4.1. Cultivo de células de Schwann	57
4.4.2. Inmunotinción	58
4.4.3. Procesamiento de las imágenes	58
4.5. Análisis estadístico	59
5. Resultados y discusión de los mismos	60
5.2. Membranas	60
5.2.1. Caracterización de las propiedades físico-químicas	60
5.2.1.1. Estudio mediante FESEM	60
5.2.1.1.1. Morfología superficial	60
5.2.1.1.2. Análisis elemental	61
5.2.1.2. Estabilidad frente a ciclos de hinchado y secado	64
5.2.1.3. TGA	66
5.2.1.3.1. Análisis comparativo de los distintos materiales	66
5.2.1.3.2. Comparación entre el comportamiento experimental y el teórico de los materiales creados por combinación de HA y de SF	73
5.2.1.4. DSC	76
5.2.2. Caracterización de las propiedades mecánicas	78
5.2.2.1. Reómetro	78
5.2.3. Estudio de adhesión y proliferación celular	81
5.2.3.1. Día 1	81
5.2.3.2. Día 5	83
5.2.3.3. Comparación del área ocupada por el citoesqueleto	85
5.2.3.4. Estudios previos de adhesión celular en HA y en SF	89
5.3. NGCs	92
5.3.1. Caracterización de las propiedades físico-químicas	92
5.3.1.1. Estudio mediante FESEM	92
5.3.1.1.1. Morfología superficial	92
5.3.1.1.2. Análisis elemental	96
5.3.1.2. Cambio de dimensiones en hinchado	99
5.3.1.3. Densidad y porosidad	100
6. Presupuesto	102

7. Conclusiones	107
8. Trabajo futuro	109
9. Referencias	111

Figuras

Figura 1. Representación del SNC y del SNP (Brett Szymik, 2011).	2
Figura 2. Representación de las diferentes partes de una neurona (núcleo, cuerpo celular, dendritas y axones), así como del proceso de sinapsis con otra neurona a través de la liberación de neurotransmisores (Urry et al., 2013).	3
Figura 3. Células gliales del SNC (a) y del SNP (b) (OpenStax-CNX, 2016).	4
Figura 4. Representación del proceso de regeneración neuronal en el SNC (Houschyar et al., 2016).	5
Figura 5. Representación del proceso de regeneración axonal en el SNP (Houschyar et al., 2016).	6
Figura 6. Causas más frecuentes de lesión medular en España entre los años 2003 y 2013 (Fundación Step by Step, 2013).	7
Figura 7. Incidencia anual de casos de lesión medular en diversos países del mundo en el año 2013 (World Health Organization, 2013).	8
Figura 8. Esquema indicando los tres pilares fundamentales de la ingeniería tisular en el sistema nervioso (producción propia).	9
Figura 9. Ejemplo de diferentes sistemas para la liberación controlada de moléculas bioactivas (Daly et al., 2012).	12
Figura 10. Representación de un conducto venoso empleado para puentear la laceración traumática de un nervio (Houschyar et al., 2016).	13
Figura 11. Entubación de un nervio dañado y secuencia de eventos regeneradores que llevan al crecimiento de un nuevo cable nervioso por el interior de un NGC (Daly et al., 2012).	14
Figura 12. Ejemplo de diversas estructuras empleadas para mejorar el guiado axonal (Daly et al., 2012).	16
Figura 13. Diagrama de las propiedades de un NGC ideal (de Ruiter et al., 2009).	16
Figura 14. De izquierda a derecha: NeuraGen®, Neurotube® y Neurolac® (Lohmeyer, Siemers, Machens, & Mailander, 2009).	24
Figura 15. Estructura química del HA (DEPOSITPHOTOS, n.d.).	25
Figura 16. Estructura química del HA mostrando su naturaleza polianiónica, así como los extremos reductor y no reductor (Perez Garnes, 2015).	26
Figura 17. Reacción de entrecruzamiento entre HA y DVS (Perez Garnes, 2015).	28
Figura 18. Imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM) mostrando los dos componentes de la seda: la fibroína formando el centro y la sericina alrededor (J. Lancashire, 2011).	29
Figura 19. Estructura primaria de la SF de Bombyx mori (J. Lancashire, 2011).	30
Figura 20. Ilustración de la fase cristalina β -sheet embebida en la matriz amorfa en la SF. Los círculos azules representan las moléculas de agua (Cheng et al., 2014).	31
Figura 21. Proceso de preparación del HA disuelto en medio básico y entrecruzado con DVS: HA sosa (producción propia)	37
Figura 22. Proceso de preparación del HA en combinación con SF: HA + 15% SF y HA + 30% SF (producción propia)	40
Figura 23. Proceso de elaboración de las membranas (producción propia)	44
Figura 24. Representación de los dos tipos de moldes estudiados: molde con caras planas macizas (izquierda) y molde con caras planas agujereadas con agujeros pasantes de 1 mm de diámetro (derecha).	45
Figura 25. Fotografía de un disco representativo de cada uno de los casos estudiados: Discos de 8 mm de HA sosa y de HA + 30% SF fabricados con molde sin agujeros y con agujeros. En color rojo se marca el perímetro de los discos.	46
Figura 26. Proceso de elaboración de los NGCs (producción propia)	47
Figura 27. Representación de un kit de densidad y porosidad como el utilizado (OHAUS, n.d.)	50
Figura 28. Procedimiento de calentamiento seguido en el análisis termogravimétrico (TGA) (producción propia)	52
Figura 29. Emplazamiento de una muestra en el réómetro (Nota: la geometría de la muestra mostrada en la fotografía es diferente a la empleada)	56

Figura 30. Imágenes de morfología superficial obtenidas mediante FESEM de dos muestras de membranas de HA sosa (A y B) y otras dos muestras de membranas de HA + 30% SF (C y D).	60
Figura 31. Fracción másica de nitrógeno obtenida con el análisis elemental de la superficie de membranas de HA sosa y de HA + 30% SF mediante FESEM.	62
Figura 32. Coeficientes N/Na (A), N/O (B) y N/S (C) obtenidos con el análisis elemental de la superficie de membranas de HA sosa y de HA + 30% SF mediante FESEM.	64
Figura 33. Pérdida de masa experimentada por muestras de HA sosa y de HA + 30% SF tras ser hinchadas en agua. Se expresa como la masa tras el hinchado y posterior desecado de la muestra (m) dividida entre la masa inicial de la misma en estado seco (m_0).	64
Figura 34. Incremento en el diámetro de los discos de HA sosa y de HA + 30% SF al ser hinchados en agua. Se expresa como la relación entre el diámetro de los discos tras su hinchado en agua (D) y su diámetro inicial en estado seco (D_0) para cada uno de los materiales estudiados.	65
Figura 35. Incremento en el diámetro de los discos de HA sosa y de HA + 30% SF al ser hinchados en agua. Se expresa como la relación entre el diámetro de los discos tras su hinchado en agua (D) y su diámetro inicial en estado seco (D_0) para cada uno de los dos procesos de hinchado en agua realizados.	65
Figura 36. Termogramas de masa restante (A) y primera derivada de la masa respecto del tiempo (B) para los materiales HA puro, HA agua y HA sosa.	66
Figura 37. Evaluación temporal de la degradación de soluciones diluidas de HA en términos de peso molecular (M_w) en función del pH (Maleki et al., 2008).	67
Figura 38. Mecanismo de escisión de un enlace glicosídico en medio básico (Rowell & Green, 1972).	68
Figura 39. Ilustración de la degradación inducida por el pH de soluciones de HA diluidas y semidiluidas. (Maleki et al., 2008).	68
Figura 40. Termogramas de masa restante (A) y primera derivada de la masa respecto del tiempo (B) para los materiales SF pura, SF agua y SF sosa.	69
Figura 41. Hidrólisis alcalina de un enlace peptídico en medio básico, representada por la adición de NaOH. Adaptado de (Wisniowski, 2013).	70
Figura 42. Modelo de degradación de la SF en medio básico junto con ebullición (mb =minutos hirviendo) (Wray et al., 2011).	71
Figura 43. Análisis densitométrico de la SF en medio básico junto con ebullición (mb =minutos hirviendo) (Wray et al., 2011).	71
Figura 44. Termogramas de masa restante (A) y primera derivada de la masa respecto del tiempo (B) para los materiales HA sosa, HA + 15% SF, HA + 30% SF y SF sosa.	72
Figura 45. Comparación de la curva experimental de TGA de HA + 15% SF con las curvas teóricas obtenidas con la fracción másica de SF teórica (ω_{SF} teórica) y con la que minimiza el error cuadrático entre la curva teórica y la experimental (ω_{SF} experimental). Asimismo también se muestran las curvas de TGA experimentales de HA sosa y de SF sosa, las cuales se han empleado para el cálculo de la curva teórica de HA + 15% SF.	74
Figura 46. Comparación de la curva experimental de TGA de HA + 30% SF con las curvas teóricas obtenidas con la fracción másica de SF teórica (ω_{SF} teórica) y con la que minimiza el error cuadrático entre la curva teórica y la experimental (ω_{SF} experimental). Asimismo también se muestran las curvas de TGA experimentales de HA sosa y de SF sosa, las cuales se han empleado para el cálculo de la curva teórica de HA + 30% SF.	75
Figura 47. Flujo de calor normalizado obtenido con DSC correspondiente a la etapa de enfriamiento (cooling) para los diferentes materiales estudiados.	77
Figura 48. Flujo de calor normalizado obtenido con DSC correspondiente a la etapa de calentamiento (heating) para los diferentes materiales estudiados.	77
Figura 49. Módulo de almacenamiento en función del par de oscilación obtenido con discos de HA sosa y de HA + 30% SF.	78
Figura 50. Módulo de pérdidas en función del par de oscilación obtenido con discos de HA sosa y de HA + 30% SF.	79
Figura 51. Valores del módulo de almacenamiento y del módulo de pérdidas para un valor bajo ($30 \mu N \cdot m$) y otro alto ($100 \mu N \cdot m$) de par de oscilación para los dos materiales estudiados.	80

<i>Figura 52. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 1 día en membranas de HA sosa preacondicionadas con PBS para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.</i>	82
<i>Figura 53. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 1 día en membranas de HA sosa preacondicionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.</i>	82
<i>Figura 54. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 1 día en membranas de HA + 30% SF preacondicionadas con PBS para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.</i>	83
<i>Figura 55. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 1 día en membranas de HA + 30% SF preacondicionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.</i>	83
<i>Figura 56. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 5 días en membranas de HA sosa preacondicionadas con PBS para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.</i>	84
<i>Figura 57. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 5 días en membranas de HA sosa preacondicionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.</i>	84
<i>Figura 58. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 5 días en membranas de HA + 30% SF preacondicionadas con PBS para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.</i>	85
<i>Figura 59. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 5 días en membranas de HA + 30% SF preacondicionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.</i>	85
<i>Figura 60. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 1 día en membrana de HA sosa preacondicionada con PBS (A), membrana de HA sosa preacondicionada con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S (B), membrana de HA + 30% SF preacondicionada con PBS (C) y membrana de HA + 30% SF preacondicionada con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S (D). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.</i>	86
<i>Figura 61. Área total de los citoesqueletos de las rSCs tras 1 día de cultivo obtenida a partir de las imágenes de microscopía confocal gracias a la tinción del citoesqueleto de las células con falacidina 488. Este parámetro se obtuvo para los cuatro casos estudiados: membranas de HA sosa preacondicionadas con PBS, membranas de HA sosa preacondicionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S, membranas de HA + 30% SF preacondicionadas con PBS y membranas de HA + 30% SF preacondicionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S.</i>	87
<i>Figura 62. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 5 días en membrana de HA sosa preacondicionada con PBS (A), membrana de HA sosa preacondicionada con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S (B), membrana de HA + 30% SF preacondicionada con PBS (C) y membrana de HA + 30% SF preacondicionada con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S (D). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.</i>	88
<i>Figura 63. Área total de los citoesqueletos de las rSCs tras 1 día de cultivo obtenida a partir de las imágenes de microscopía confocal gracias a la tinción del citoesqueleto de las células con falacidina 488. Este parámetro se obtuvo para los cuatro casos estudiados: membranas de HA sosa preacondicionadas con PBS, membranas de HA sosa preacondicionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S, membranas de HA + 30% SF preacondicionadas con PBS y membranas de HA + 30% SF preacondicionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S.</i>	89
<i>Figura 64. Secuencias de aminoácidos de la SF de Bombyx mori (Minoura et al., 1995).</i>	91
<i>Figura 65. Curvas de crecimiento celular de células fibroblásticas (L-929) en membranas recubiertas con SF de Bombyx mori en su forma natural (DSF) y sin la región C-terminal (CSF) (Minoura et al., 1995).</i>	91

Figura 66. NGC de HA sosa: Corte longitudinal	93
Figura 67. NGC de HA sosa: Corte longitudinal, detalle de la superficie interna y de la pared.	94
Figura 68. NGC de HA sosa: Corte transversal	94
Figura 69. NGC de HA + 30% SF: corte longitudinal	95
Figura 70. NGC de HA + 30% SF: corte transversal	96
Figura 71. Fracción másica de nitrógeno obtenida con el análisis elemental de la superficie de NGCs de HA sosa y de HA + 30% SF mediante FESEM.	97
Figura 72. Coeficientes N/Na (A), N/O (B) y N/S (C) obtenidos con el análisis elemental de la superficie de NGCs de HA sosa y de HA + 30% SF mediante FESEM.	98
Figura 73. Cambio en las dimensiones en una muestra representativa de un NGC de HA sosa tras su hinchado en agua desionizada. A: Imagen longitudinal en estado seco, B: Imagen transversal en estado seco, C: Imagen longitudinal en estado hinchado, D: Imagen transversal en estado hinchado	99
Figura 74. Cambio en las dimensiones en una muestra representativa de un NGC de HA + 30 SF tras su hinchado en agua desionizada. A: Imagen longitudinal en estado seco, B: Imagen transversal en estado seco, C: Imagen longitudinal en estado hinchado, D: Imagen transversal en estado hinchado	99
Figura 75. Cambio en las dimensiones de los NGCs tras su hinchado en agua desionizada durante 24 horas. A: Longitud del conducto en estado hinchado (L) dividida entre la longitud del conducto en estado seco (L ₀). B: Diámetro del lumen en estado hinchado (D) dividido entre el diámetro del lumen en estado seco (D ₀). C: Área de la sección transversal en estado hinchado (A) dividida entre el área de la sección transversal en estado seco (A ₀).	100
Figura 76. Valores de densidad y volumen específico de NGCs fabricados tanto con HA sosa como con HA + 30% SF.	101
Figura 77. Valores de porosidad de NGCs fabricados tanto con HA sosa como con HA + 30% SF.	101
Figura 78. Representación de las estructuras biohíbridas a desarrollar en un futuro para favorecer la extensión axonal (producción propia)	109
Figura 79. Campos de aplicación de los NGCs desarrollados (producción propia). Imágenes: (Jozwiak, Liu, Yang, & Gates, 2014; Keirstead et al., 2005; Yonekawa, n.d.).	110

Tablas

Tabla 1. Algunos materiales evaluados in vivo para la regeneración de nervios periféricos mediante NGCs (Nectow, Marra, & Kaplan, 2012).	17
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los biomateriales de origen natural (Dalamagkas et al., 2015; Kehoe et al., 2012).	18
Tabla 3. Ventajas y desventajas de los biomateriales de origen sintético (Dalamagkas et al., 2015).	20
Tabla 4. NGCs aprobados por la FDA (Kehoe et al., 2012)	22
Tabla 5. Composición de la SF de Bombyx mori mostrando el porcentaje de cada aminoácido encontrado en ella (J. Lancashire, 2011).	31
Tabla 6. Propiedades mecánicas de la SF de Bombyx mori, comparándose con las del colágeno y las del PLA. (Vepari & Kaplan, 2007).	32
Tabla 7. Parámetros aplicados en los ensayos de reometría rotacional	55
Tabla 8. Fracción másica de nitrógeno obtenida de forma teórica y experimental mediante análisis elemental en muestras de membranas de HA sosa y de HA + 30% SF.	63
Tabla 9. Resultados de los experimentos de cultivo celular mostrando el ratio de adhesión celular inicial (A) y el ratio de crecimiento (G) de células fibroblásticas (L-929) en membranas recubiertas con SF de Bombyx mori en su forma natural (DSF) y sin la región C-terminal (CSF). Los ratios se definieron como $A = S17C17 \cdot 100$ y $G = S50C50 \cdot 100$, donde S_t y C_t son el número de células adheridas en la muestra de test y en el material de control, respectivamente, con un tiempo de incubación t . Se indica la media \pm SD para cuatro conjuntos de experimentos (Minoura et al., 1995).	92
Tabla 10. Fracción másica de nitrógeno obtenida de forma teórica y experimental mediante análisis elemental en muestras de NGCs de HA sosa y de HA + 30% SF.	97

Tabla 11. Dimensiones de los NGCs de HA sosa y HA + 30% SF en estado seco e hinchado. _____	100
Tabla 12. Capítulo 1 del presupuesto: costes de personal _____	102
Tabla 13. Capítulo 2 del presupuesto: costes de materiales _____	104
Tabla 14. Capítulo 3 del presupuesto: costes de equipos y servicios _____	105
Tabla 15. Capítulo 4 del presupuesto: costes de informática _____	106
Tabla 16. Resumen del presupuesto _____	106

Ecuaciones

Ecuación 1 _____	38
Ecuación 2 _____	38
Ecuación 3 _____	38
Ecuación 4 _____	39
Ecuación 5 _____	39
Ecuación 6 _____	39
Ecuación 7 _____	41
Ecuación 8 _____	41
Ecuación 9 _____	41
Ecuación 10 _____	41
Ecuación 11 _____	42
Ecuación 12 _____	42
Ecuación 13 _____	42
Ecuación 14 _____	42
Ecuación 15 _____	42
Ecuación 16 _____	42
Ecuación 17 _____	43
Ecuación 18 _____	43
Ecuación 19 _____	43
Ecuación 20 _____	43
Ecuación 21 _____	50
Ecuación 22 _____	51
Ecuación 23 _____	51
Ecuación 24 _____	51
Ecuación 25 _____	54
Ecuación 26 _____	55
Ecuación 27 _____	56
Ecuación 28 _____	56
Ecuación 29 _____	56
Ecuación 30 _____	61
Ecuación 31 _____	61
Ecuación 32 _____	62
Ecuación 33 _____	62
Ecuación 34 _____	63
Ecuación 35 _____	63
Ecuación 36 _____	73
Ecuación 37 _____	97
Ecuación 38 _____	98

1. Motivación

Los tratamientos actuales para la reparación y regeneración de las lesiones producidas en tractos axonales del sistema nervioso presentan multitud de limitaciones. Esto es así por el hecho de que el proceso de regeneración que se produce de forma autónoma es bastante limitado, especialmente en el caso del SNC, donde las terapias actuales se limitan a prevenir daños secundarios y no son capaces de tratar el daño primario. Todo esto hace que se produzca la pérdida permanente de funciones tanto motoras como sensoriales que afectan de forma muy grave a la calidad de vida de los afectados. A esto se suma además el gran impacto económico que tiene el tratamiento de estos pacientes, tanto sobre los sistemas proveedores de salud como sobre sus familiares.

La principal motivación del presente Trabajo Fin de Máster (TFM), enmarcado dentro del campo de la ingeniería tisular del sistema nervioso, es lograr la producción de conductos de guía nerviosa (NGCs). Estos, una vez implantados en el nervio dañado, serán capaces de favorecer la regeneración de los tractos axonales, logrando así la recuperación de las funciones motoras y sensitivas perdidas, tanto en el SNP como en el SNC. En estudios previos llevados a cabo en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) de la Universidad Politécnica de Valencia (Vilariño Feltrer, 2015) se obtuvieron NGCs basados en ácido hialurónico (HA) con unas propiedades adecuadas para ser estables en medio fisiológico y permitir el crecimiento de neuronas en su interior. Esto se logró gracias a que el conducto interno presentaba una superficie lisa que favorecía la adhesión celular a la vez que las paredes del conducto tenían una porosidad suficiente como para ser permeables a nutrientes y oxígeno, pero sin llegar a permitir la entrada o salida de células.

No obstante, estos NGCs basados únicamente en HA presentan dos desventajas principales. En primer lugar son estructuras muy frágiles con unas propiedades mecánicas bastante pobres, lo que dificulta en exceso su implantación *in vivo* ya que muchos conductos se fracturan durante el proceso de sutura. En segundo lugar se presenta el problema de que la alta hidrofiliabilidad del HA provoca que la adhesión celular sobre su superficie sea muy baja, lo cual no es óptimo para la posterior biofuncionalización del conducto con células de soporte gliales.

Con el objetivo de mejorar estas dos desventajas de los NGCs basados en HA se ha procedido en este TFM a la incorporación de la fibroína de seda (SF) en el proceso de producción de estos andamiajes o *scaffolds*. Se ha elegido este material dado que aúna unas excelentes propiedades mecánicas con unas buenas propiedades de adhesión celular gracias a la presencia de residuos de arginina que son capaces de ser reconocidos por moléculas de adhesión celular como las integrinas. Cabe destacar que existen métodos capaces de rigidizar más el material que la incorporación de la SF, como podría ser la incorporación de micropartículas. No obstante, tampoco es adecuado que el material sea excesivamente rígido, ya que debe ser capaz de adaptarse al nervio donde va a ser injertado, pudiendo deformarse del mismo modo que lo hace la estructura biológica adyacente. Además debe ser lo suficientemente flexible y blando como para no comprimir a los axones regenerados y no producir una inflamación de los tejidos.

Finalmente es interesante destacar que tanto el HA como la SF son materiales aprobados en la actualidad por la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para su utilización en aplicaciones biomédicas en humanos, lo cual hace que el presente proyecto sea altamente trasladable para su aplicación médica en relativamente poco tiempo.

2. Introducción

2.1. Problemática de la regeneración nerviosa

La pérdida de comunicación dentro del sistema nervioso puede deberse a traumatismos, accidentes, enfermedades degenerativas, o incluso ser debida a otras causas como problemas de nacimiento. Dentro del estudio de la regeneración del sistema nervioso en el ser humano existen dos situaciones completamente diferenciadas según la lesión se produzca en el sistema nervioso central (SNC) o en el sistema nervioso periférico (SNP). Por un lado, el SNC está formado principalmente por el encéfalo y la médula espinal y tiene la función tanto de percibir y procesar la información que le llega de los órganos receptores (órganos de los sentidos) como de transmitir una respuesta a los órganos efectores (músculos y glándulas exocrinas). Por otro lado, el SNP está constituido por las neuronas y nervios que forman los canales de transmisión de esta información, de modo que conectan al SNC con los órganos receptores mediante las neuronas sensoriales y con los órganos efectores mediante las neuronas motoras (Tian, Prabhakaran, & Ramakrishna, 2015). Así, los nervios periféricos son los encargados de enviar la información tanto sensorial (de entrada) como motora (de salida) al SNC. En la figura 1 se representan los componentes del SNC y del SNP.

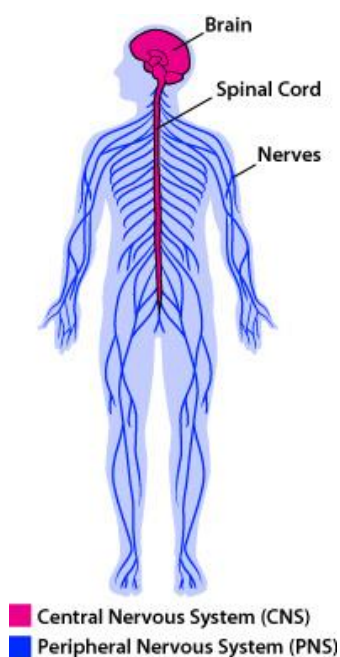


Figura 1. Representación del SNC y del SNP (Brett Szymik, 2011).

El tipo de célula más importante tanto del SNC como del SNP es la neurona, la cual es la encargada de transmitir la información nerviosa en forma de potenciales de acción. Está formada principalmente por un cuerpo o soma celular y una larga prolongación llamada axón que conecta a la neurona con otras neuronas u otros tipos celulares mediante una conexión sináptica (figura 2).

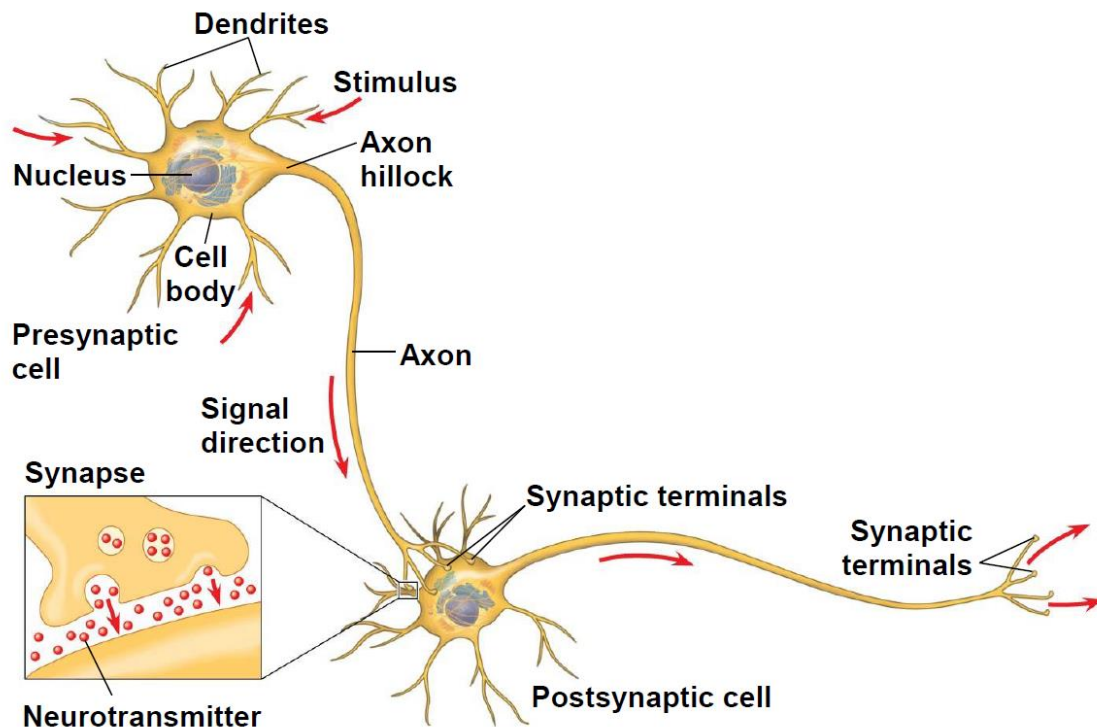


Figura 2. Representación de las diferentes partes de una neurona (núcleo, cuerpo celular, dendritas y axones), así como del proceso de sinapsis con otra neurona a través de la liberación de neurotransmisores (Urry et al., 2013).

Además se encuentran otro tipo de células, llamadas células gliales, las cuales envuelven y dan soporte a las neuronas manteniendo su entorno. En el SNC la glía está formada por astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias y células microgliales (figura 3.a), con las siguientes funciones (OpenStax-CNX, 2016):

- Los oligodendrocitos forman la vaina de mielina alrededor de los axones.
- Los astrocitos proporcionan nutrientes a las neuronas, mantienen su medio extracelular y proporcionan soporte estructural.
- Las células ependimarias producen líquido cefalorraquídeo que amortigua a las neuronas.
- La microglía expulsa a patógenos y células muertas.

Por otro lado, en el SNP la glía la forman las células de Schwann y las células satélite (figura 3.b), las cuales desempeñan las siguientes funciones (OpenStax-CNX, 2016):

- Las células de Schwann proporcionan a los axones de las neuronas un recubrimiento con una vaina aislante de mielina.
- Las células satélite proporcionan nutrientes y soporte estructural a las neuronas.

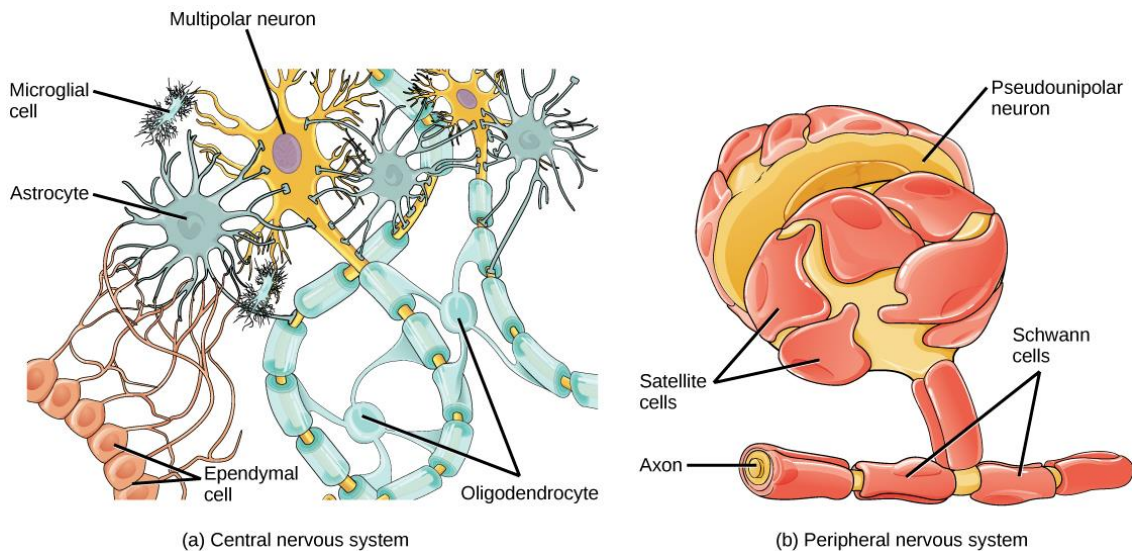


Figura 3. Células gliales del SNC (a) y del SNP (b) (OpenStax-CNX, 2016).

A continuación se exponen las características y la problemática específica de la regeneración nerviosa en el SNC y en el SNP.

2.1.1. Regeneración en el sistema nervioso central (SNC)

La principal característica del SNC en humanos adultos es que los axones no se regeneran de forma espontánea tras sufrir una rotura o seccionamiento. Esto es lo que hace que, cuando se produce un daño que conlleva la desconexión axonal, el déficit funcional persiste de por vida, como es el caso de la lesión medular, el daño cerebral traumático o el infarto cerebral, entre otros (Huebner & Strittmatter, 2009). La principal causa de que no se produzca esta regeneración axonal espontánea es que, tras la lesión, las pocas neuronas supervivientes que tratan de llevar a cabo la regeneración se encuentran con una cicatriz glial impenetrable compuesta principalmente por mielina y desechos celulares, así como astrocitos, oligodendrocitos y microglía, ya que la debris celular no se retira de forma efectiva (Houshyar et al., 2016). Esto hace que las neuronas regeneradoras se vean bloqueadas y no sean capaces de alcanzar su objetivo sináptico, como se muestra en la figura 4.

A este hecho se suma que el ambiente en el SNC es inhibitorio del crecimiento axonal, habiéndose identificado numerosas moléculas que limitan la regeneración nerviosa como, por ejemplo, la liberación de proteoglicanos por parte de los astrocitos tras haberse producido la lesión, los cuales tienen un efecto inhibitorio de la regeneración axonal. (Huebner & Strittmatter, 2009). Finalmente, también influye el hecho de que tras producirse el daño en el SNC la neurona dañada no produce la expresión de genes que ayuden al crecimiento axonal, cosa que sí ocurre en el SNP.

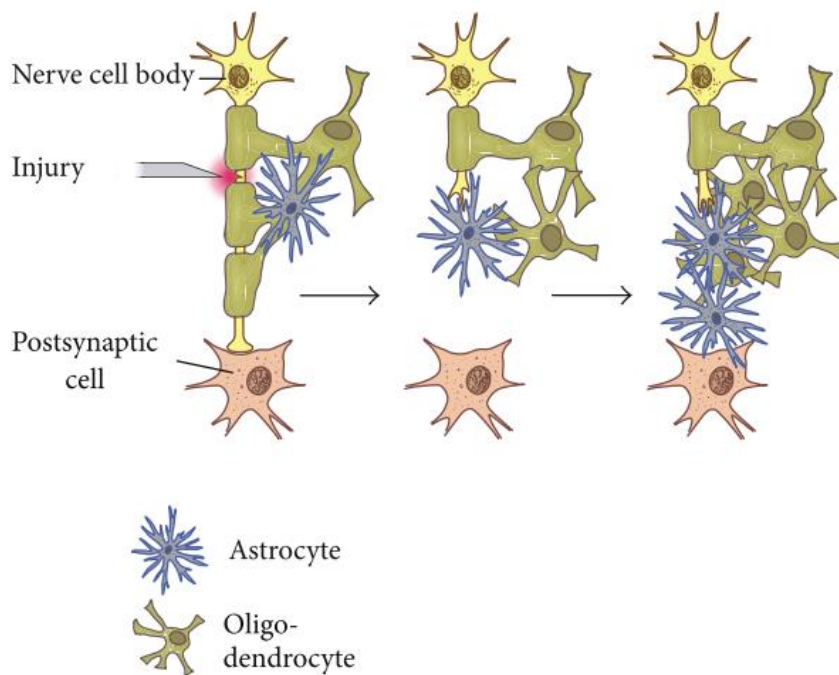


Figura 4. Representación del proceso de regeneración neuronal en el SNC (Houschyar et al., 2016).

Las terapias actuales para la reparación y regeneración del SNC (sobre todo centradas en la lesión medular y el daño cerebral traumático) son muy limitadas, centrándose los tratamientos actuales en prevenir la extensión de daños secundarios asociados al daño primario (Tian et al., 2015). Esto se debe en gran medida a que todavía no se ha encontrado una manera eficaz de atravesar la barrera que se crea por el ambiente inhibitorio en la brecha entre ambas terminaciones nerviosas (Tian et al., 2015). Por tanto, todavía no existen aplicaciones clínicas efectivas para tratar el daño primario y recuperar las funciones perdidas al dañarse el SNC.

No obstante, sí se ha probado que axones dañados del SNC pueden regenerar al sustituir su entorno inhibitorio del crecimiento axonal por uno que sea favorecedor del crecimiento axonal (Jin & Yamashita, 2016).

2.1.2. Regeneración en el sistema nervioso periférico (SNP)

Al contrario que en el SNC, en el SNP sí se produce la regeneración axonal en humanos adultos de forma espontánea, recuperándose las conexiones sinápticas con el objetivo original a distancias de unos pocos centímetros (Huebner & Strittmatter, 2009). Al producirse la sección del nervio, la parte distal sufre una degeneración denominada Walleriana como consecuencia de una actividad proteasa y de la separación de los recursos metabólicos de los cuerpos celulares (Houschyar et al., 2016). No obstante, el extremo proximal sufre un daño mínimo (Hall, 2005) que es seguido de un crecimiento del mismo gracias a un proceso en el cual las células fagocíticas como macrófagos y células de Schwann retiran la mielina y los desechos axonales y producen citoquinas como la interleuquina-6 que mejoran el crecimiento axonal, creándose un cono de crecimiento como se muestra en la figura 5 (Dubový, Klusáková, & Hradilová

Svíženská, 2014). A esto se suma la capacidad de las neuronas dañadas del SNP de producir la expresión de genes relacionados con el crecimiento axonal.

Por tanto, todo este entorno de ayuda al crecimiento axonal hace posible que la regeneración comience en el extremo proximal hasta reinervar su objetivo a razón de aproximadamente 1 mm/día, con la consiguiente recuperación de la función (Burnett & Zager, 2004).

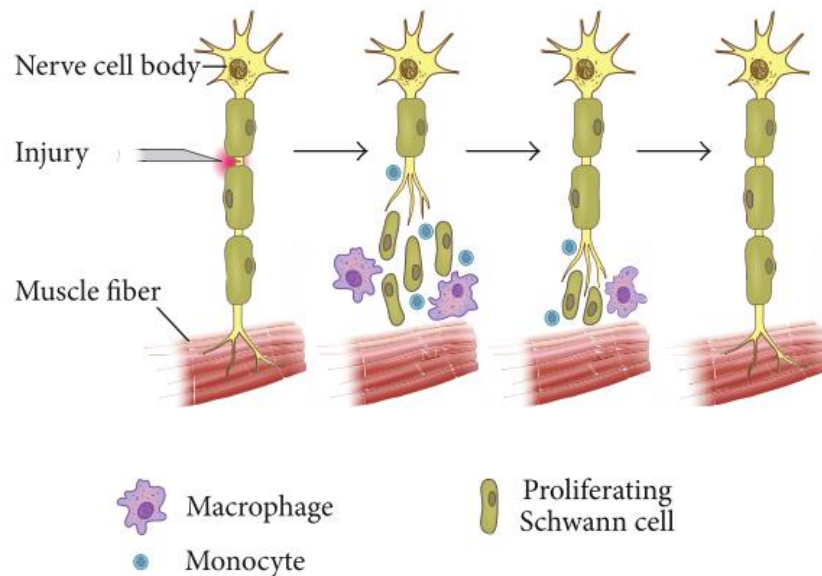


Figura 5. Representación del proceso de regeneración axonal en el SNP (Houschyar et al., 2016).

Esta regeneración axonal exitosa en el SNP se produce en casos de lesiones por aplastamiento, en las cuales se mantiene la integridad del nervio. No obstante, esta regeneración axonal no siempre puede producirse de forma espontánea, ya que existen niveles de lesión del nervio que requieren de una intervención quirúrgica para la recuperación de su función debido a que los axones pueden dirigirse erróneamente y fallar en la reinervación del objetivo. Este es el caso de lesiones en que el tubo endoneurial está dañado o cuando se produce una pérdida de continuidad en el nervio, apareciendo una brecha o *gap* (Houschyar et al., 2016).

2.2. Población objetivo

El presente proyecto va dirigido a la población afectada por lesiones en nervios, tanto agudas como crónicas. Esto incluye tanto lesiones de nervio periférico (PNI) como lesiones de médula espinal (SCI).

- **Lesiones de nervio periférico (PNI)**

La lesión de un nervio periférico puede interrumpir las señales de comunicación entre el cerebro y una parte del cuerpo. De no tratarse puede resultar en dolor y en una pérdida permanente de

la función, estimándose en unos 20 millones de personas las que sufren de algún tipo de neuropatía periférica solamente en Estados Unidos (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, n.d.). Si se agrupan por su causa, se pueden distinguir cinco grupos diferentes de lesiones en nervios periféricos (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, n.d.):

- **Compresión:** El nervio es comprimido por los tejidos que lo rodean, lo que aumenta la presión y puede producir quemazón y dolor.
- **Transección:** Sección completa y transversal del nervio por un evento traumático.
- **Estiramiento:** El nervio se ha estirado hasta el punto de producirse una lesión.
- **Enfermedad:** Lesiones producidas por enfermedades degenerativas o tumores.
- **Quemaduras:** El nervio se daña por quemaduras debidas a fuego o químicos cáusticos.

Las lesiones de nervio periférico son un serio problema de salud para la sociedad actual. Afecta al 2.8% de los pacientes afectados por traumatismos, muchos de los cuales adquieren una discapacidad de por vida. Aproximadamente 360.000 personas al año sufren síndromes paralíticos de extremidades superiores debidos a lesiones de nervios periféricos solo en Estados Unidos, resultando en más de 8 millones y medio de días con actividades restringidas y casi 5 millones de días en cama o con incapacidad cada año (Belkas, Shoichet, & Midha, 2004).

- **Lesiones de médula espinal (SCI)**

En esta clasificación se comprenden todas las lesiones que afectan a la médula espinal. Este daño en la médula espinal puede ser traumático (debido a caídas, accidentes de tráfico, accidentes laborales, lesiones deportivas o violencia) o no traumático (debido a patologías como enfermedades infecciosas, tumores, enfermedades musculoesqueléticas o incluso problemas congénitos como la espina bífida) (World Health Organization, 2013). En la figura 6 se muestran las causas más frecuentes de lesión medular en España.

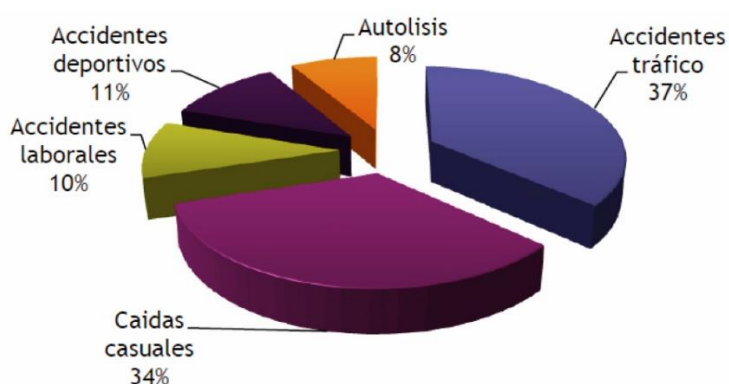


Figura 6. Causas más frecuentes de lesión medular en España entre los años 2003 y 2013 (Fundación Step by Step, 2013).

Solamente en España sufren una lesión medular traumática más de 1.000 personas cada año, elevándose esta cifra a unos 11.000 casos nuevos cada año en toda Europa. En el año 2013 se contabilizaron un total de 40.000 personas afectadas en España y 330.000 en Europa (Fundación Step by Step, 2013). A nivel mundial la incidencia anual varía entre unos países y otros, situándose entre 13 y 53 casos de lesión medular por cada millón de habitantes en 2013 (figura 7) (World Health Organization, 2013). En cuanto a la prevalencia mundial de la SCI, ésta se situaba entre 236 y 1009 casos por cada millón de habitantes en 2011 según el país estudiado (Singh, Tetreault, Kalsi-Ryan, Nouri, & Fehlings, 2014).

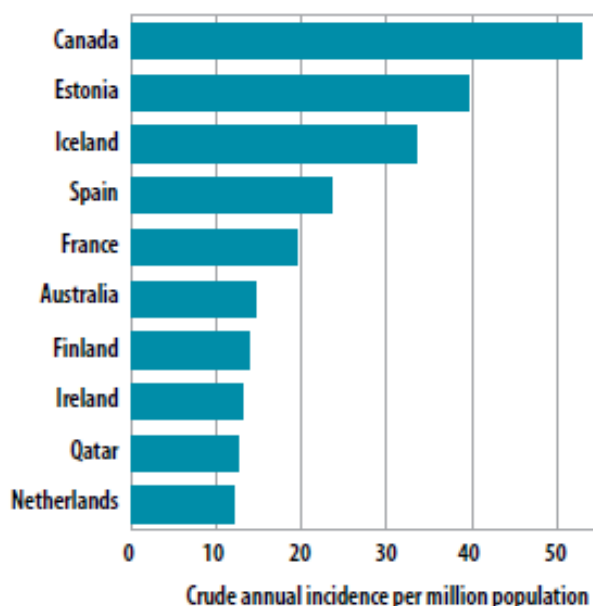


Figura 7. Incidencia anual de casos de lesión medular en diversos países del mundo en el año 2013 (World Health Organization, 2013).

A esto cabe añadir el gran impacto económico de la SCI en los sistemas proveedores de salud. En 2013 se estimó en Canadá que el gasto asociado a un paciente parapléjico durante toda su vida era de 1,47 millones de dólares, mientras que para un paciente tetrapléjico se situaba en 3,03 millones de dólares (Krueger, Noonan, Trenaman, Joshi, & Rivers, 2013).

2.3. Ingeniería tisular en el sistema nervioso

Los tratamientos quirúrgicos de las lesiones nerviosas no capaces de regenerarse de forma espontánea que se emplean en la actualidad son la reconexión quirúrgica del nervio con microsuturas epineurales cuando la distancia a salvar es pequeña (menor a 5 mm) y las transferencias nerviosas o autoinjertos cuando las distancias son mayores a 5 mm. En este último caso se procede a seccionar otro nervio motor considerado menos importante con el fin de unirlo a la parte distal del nervio dañado para lograr así su regeneración (Houschyar et al., 2016; Tian et al., 2015). No obstante, las transferencias nerviosas presentan diversas desventajas como la morbilidad del sitio donante, la disponibilidad insuficiente de nervio donante y la necesidad de procedimientos extraoperatorios (Mackinnon & Hudson, 1992). Otras

consecuencias indeseables de estos procedimientos son el entumecimiento, la pérdida de la función sensorial, el dolor crónico o incluso una discapacidad permanente (Tian et al., 2015). De hecho estas actuaciones presentan una tasa de éxito con una recuperación funcional satisfactoria que solamente llega al 50% de los casos (Bradley, 2004). Esta situación ha propiciado que se estén estudiando otras estrategias de reparación alternativas enmarcadas dentro del campo de la ingeniería tisular, las cuales se indican en la figura 8 (Houschyar et al., 2016; Tian et al., 2015).

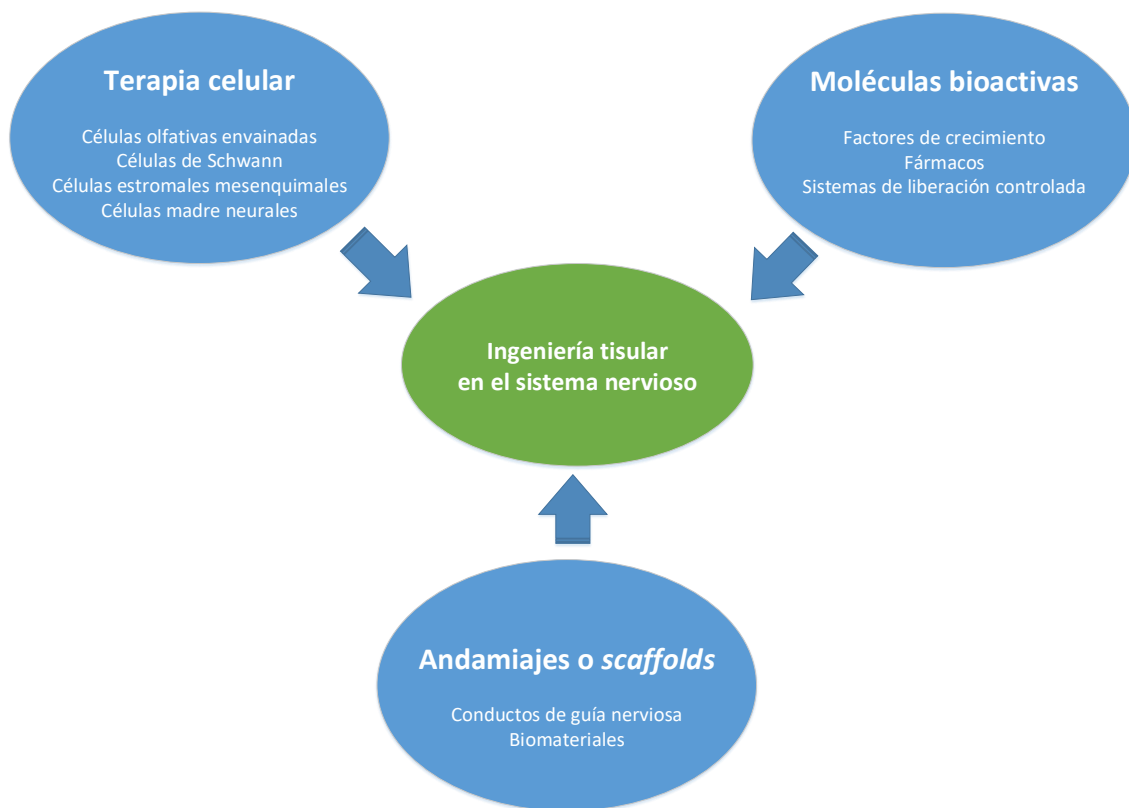


Figura 8. Esquema indicando los tres pilares fundamentales de la ingeniería tisular en el sistema nervioso (producción propia).

La ingeniería tisular es un campo del conocimiento cuyo objetivo es el desarrollo de estructuras biológicas funcionales que sustituyan, reparen o regeneren tejidos u órganos dañados. Como se indica en la figura 8, se fundamenta en la combinación de tres pilares fundamentales: la terapia celular, los andamiajes o *scaffolds* y las moléculas biológicamente activas con el fin de recuperar la integridad y funcionalidad del tejido dañado (Fernández Burguera, 2015; U.S. Department of Health and Human Services, 2016).

2.3.1. Terapia celular

Una de las posibles estrategias para la regeneración neural es la introducción de células en el tejido dañado o terapia celular, en especial cuando se ha producido la pérdida de un gran número de células. Para ello se han estudiado especialmente las células envoltantes del bulbo

olfatorio (OECs), las cuales guían el crecimiento de los axones olfativos desde las neuronas de la mucosa olfatoria de la cavidad nasal hasta el bulbo olfatorio para conectar tanto el SNP como el SNC. Las OECs expresan moléculas de adhesión que ayudan a la unión de células neurales y secretan proteínas de la matriz extracelular (como la laminina y la fibronectina) y factores neurotróficos (como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)) para facilitar la regeneración neural y el crecimiento axonal. Por estas propiedades, su trasplante a los sitios dañados ha sido ampliamente investigado por sus potenciales aplicaciones terapéuticas para la reparación neural en lesiones tanto del SNC como del SNP, incluyendo lesiones medulares, accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Chou et al., 2014).

También se ha estudiado el trasplante de células de Schwann como terapia en caso de daño medular, ya que estas células son capaces de migrar desde la periferia hasta el sitio dañado donde participan en procesos de reparación endógenos, habiéndose demostrado que reducen la pérdida de tejido, promueven la regeneración axonal y facilitan la mielinización de los axones para mejorar la función sensoriomotora (Kanno, Pearse, Ozawa, Itoi, & Bunge, 2015; Oudega & Xu, 2006).

No obstante, debe tenerse en cuenta que debido a la muerte celular extensa, el desarrollo de un medio inhibitor del crecimiento y la formación de cicatrices gliales al producirse un daño medular no es posible alcanzar una recuperación funcional con una sola estrategia terapéutica y que, por tanto, es necesario combinar diferentes acciones como pueden ser el trasplante combinado de células de Schwann con factores de crecimiento o la suspensión de las células en matrices bioactivas (Kanno et al., 2015; Oudega & Xu, 2006). Asimismo también se ha estudiado el cotrasplante de células de Schwann con otro tipo de células como OECs, células estromales mesenquimales de médula ósea y células madre neurales (L. Chen et al., 2014; Kanno et al., 2015).

Finalmente, también se ha estudiado la combinación de la terapia celular con el uso de biomateriales con el objetivo de puentear el área de la lesión con un andamiaje o *scaffold* que cree un ambiente estimulador del crecimiento y proporcione un guiado para el restablecimiento de las conexiones axonales dañadas. Así, estos *scaffolds* permiten la inserción de células para la terapia celular en combinación con factores neurotróficos u otras sustancias bioactivas para lograr así su acción conjunta y sinérgica en el tratamiento (Kubinová & Syková, 2012; Tsintou, Dalamagkas, & Seifalian, 2015).

2.3.2. Moléculas bioactivas

Otra estrategia que suele emplearse en combinación con la terapia celular es la inserción de moléculas bioactivas como factores de crecimiento o fármacos. Estas moléculas suelen ser incluidas en los biomateriales que contienen a las células con diversos objetivos, como pueden ser mejorar el crecimiento y proliferación celular, aumentar la tasa de supervivencia celular gracias a una mayor resistencia a las infecciones o reducir las reacciones inflamatorias. Todo ello con el objetivo de crear un medio que favorezca el crecimiento axonal.

2.3.2.1. Factores de crecimiento

Diversos estudios se han centrado en demostrar la eficacia del uso de varios factores de crecimiento para promover la regeneración nerviosa periférica (Gu, Ding, Yang, & Liu, 2011). Gracias a ellos se ha mejorado el conocimiento de los componentes neurotróficos que son liberados por las terminaciones nerviosas en diferentes intervalos de tiempo durante su regeneración para acelerar el crecimiento axonal (Houschyar et al., 2016). Los principales factores de crecimiento que se han estudiado son el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), los cuales son secretados por la células de Schwann (Allen, Watson, Shoemark, Barua, & Patel, 2013). También se han estudiado los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) liberados por las terminaciones nerviosas dañadas y que participan en el crecimiento celular y la regeneración (Baird, 1994).

2.3.2.2. Fármacos

Asimismo también se ha estudiado el uso de fármacos con el objetivo de mejorar y acelerar la regeneración axonal. Por ejemplo, se ha demostrado que el fármaco antiinflamatorio ibuprofeno promueve la regeneración del axón corticoespinal después de una lesión de la médula espinal (Fu, Hue, & Li, 2007) gracias a que reduce la señal Rho ligando-inducida que media en la inhibición de la regeneración axonal (Wang et al., 2009). Así, se ha visto que la administración de ibuprofeno mejora la recuperación funcional en ratas con un trauma clínicamente relevante de la médula espinal gracias a que protege al tejido y estimula el brote axonal (Wang et al., 2009). Otro fármaco que ha sido recientemente estudiado para la regeneración neuronal es la quercetina, el cual regula la expresión de genes envueltos en la regeneración y el soporte trófico. La quercetina es capaz de activar el crecimiento neuronal y mejorar tanto la remielinización axonal como la velocidad de conducción nerviosa motora, promoviendo y acelerando la recuperación funcional tras una lesión por aplastamiento del nervio ciático en ratones (M.-M. Chen et al., 2017).

2.3.2.3. Sistemas de liberación controlada

Con el objetivo de que la liberación de estos factores de crecimiento y/o fármacos se realice de forma controlada en el tiempo y respetando las concentraciones deseadas se han diseñado diversos sistemas de liberación controlada. Como se puede observar en la figura 9, estos sistemas pueden consistir en (Daly, Yao, Zeugolis, Windebank, & Pandit, 2012):

- Microesferas (pequeñas esferas de tamaño micrométrico) cargadas con los factores de crecimiento o con los fármacos.
- Suspensión de las moléculas bioactivas dentro de una solución o de la matriz de biomateriales como hidrogeles o esponjas.
- Liberación a través de sistemas basados en difusión, como la liberación controlada mediante reticulación o el revestimiento con polímeros de degradación lenta.
- Sistemas de liberación basados en afinidad.

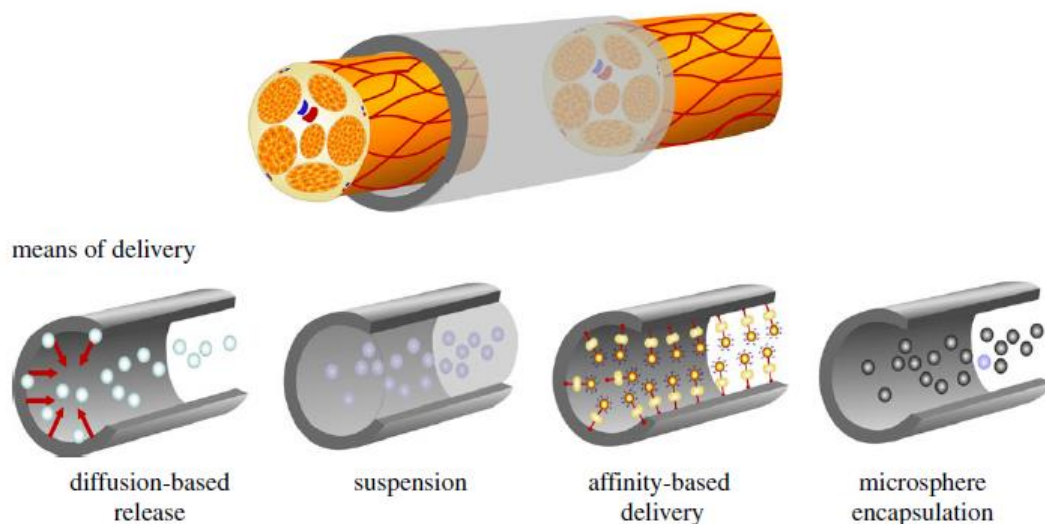


Figura 9. Ejemplo de diferentes sistemas para la liberación controlada de moléculas bioactivas (Daly et al., 2012).

Un ejemplo de sistema de liberación controlada de fármacos sería la incorporación de ibuprofeno en fibras del copolímero poli (trimetileno carbonato-co-ε-caprolactona) (P(TMC-CL)) con el objetivo de mejorar la regeneración axonal en el contexto de una lesión medular, limitando la respuesta inflamatoria (Pires et al., 2016). Otro ejemplo en el que se liberen factores de crecimiento de forma controlada sería el uso de microesferas de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) cargadas con NGF, las cuales se emplean inmersas en una biomatriz de gel (Giudetti, del Valle Macia, Navarro Acebes, & Micera, 2014) o la incorporación de FGF en microesferas de gelatina biodegradables para mejorar y acelerar la regeneración axonal (Ikeda et al., 2014).

2.3.3. Andamiajes o *scaffolds*

Dentro de la ingeniería tisular del el sistema nervioso existen diversos tipos de andamiajes o *scaffolds* para proveer soporte estructural para la adhesión celular y lograr el consiguiente desarrollo del tejido nervioso (Chan & Leong, 2008). Por ejemplo, se han desarrollado *scaffolds* tridimensionales porosos empleados en lesiones cerebrales o membranas destinadas a cubrir superficies dañadas. No obstante, este proyecto se va a centrar en un tipo concreto de *scaffolds* que son los conductos de guía nerviosa (NGCs), los cuales son un tipo concreto de *scaffold* con forma de tubo hueco que permite conectar los dos extremos de un nervio dañado guiando la regeneración axonal entre ambos lados de la lesión (Muheremu & Ao, 2015).

2.3.3.1. Conductos de guía nerviosa (NGCs)

Diversos estudios han demostrado que los nervios del SNP pueden regenerar y cubrir una pequeña brecha o *gap* gracias al uso de diversos tipos de conductos como venas, pseudovainas o tubos bioabsorbibles, de forma que el nervio es capaz de crecer por su interior (Ray et al., 2011). Los injertos de venas como el mostrado en la figura 10 se han empleado para cubrir *gaps*

en nervios sensitivos distales menores a 3 cm (M. Y. Lin, Manzano, & Gupta, 2013). No obstante, los mayores esfuerzos de investigación se están llevando a cabo con conductos nerviosos sintéticos, eliminando así la morbilidad asociada al sitio donante en comparación con los autoinjertos. Actualmente se han logrado cubrir gaps con conductos nerviosos sintéticos de hasta 3 cm en nervios de pequeño diámetro y de hasta 0,5 cm en nervios de gran diámetro (de Ruiter, Malessy, Yaszemski, Windebank, & Spinner, 2009).

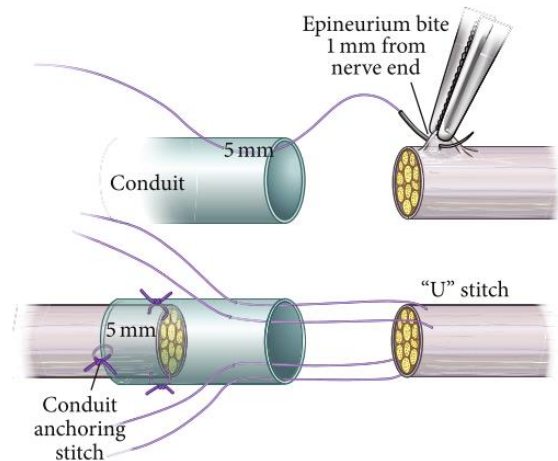


Figura 10. Representación de un conducto venoso empleado para puentear la laceración traumática de un nervio (Houschyar et al., 2016).

Una vez que los dos extremos del nervio dañado son suturados a cada uno de los lados del tubo, comienza un proceso de regeneración que comprende 5 fases principales (figura 11) (Daly et al., 2012; Kehoe, Zhang, & Boyd, 2012):

- **Fase fluida:** En primer lugar las terminaciones de los nervios exudan hacia el interior del conducto un fluido rico en proteínas que contiene sustancias promotoras del crecimiento como factores neurotróficos y moléculas de la matriz extracelular.
- **Fase de matriz:** Durante la primera semana se forma una matriz de fibrina que proporciona soporte para la migración de células de Schwann, fibroblastos y macrófagos.
- **Fase celular:** Durante la segunda semana se produce la migración de células perineurales, endoteliales y de Schwann. A continuación las células se alinean y proliferan a lo largo de la matriz de fibrina. Es importante destacar la importancia de la presencia de las células de Schwann ya que tienen la habilidad de soportar su propia supervivencia gracias a circuitos autocrinos y bloquean la apoptosis, por lo que aumentan el potencial de crecimiento axonal.
- **Fase axonal:** Entre la segunda y la cuarta semana aparece la fase axonal en que se produce el alargamiento de los cables axonales hasta conectar ambos extremos de la lesión.
- **Fase de mielinización:** Finalmente, entre las semanas 6 a 16, las células de Schwann cambian su fenotipo proliferativo por un fenotipo más maduro. Estas células de Schwann maduras envuelven a los axones regenerados para formar la vaina de mielina, creándose así axones mielinizados maduros.

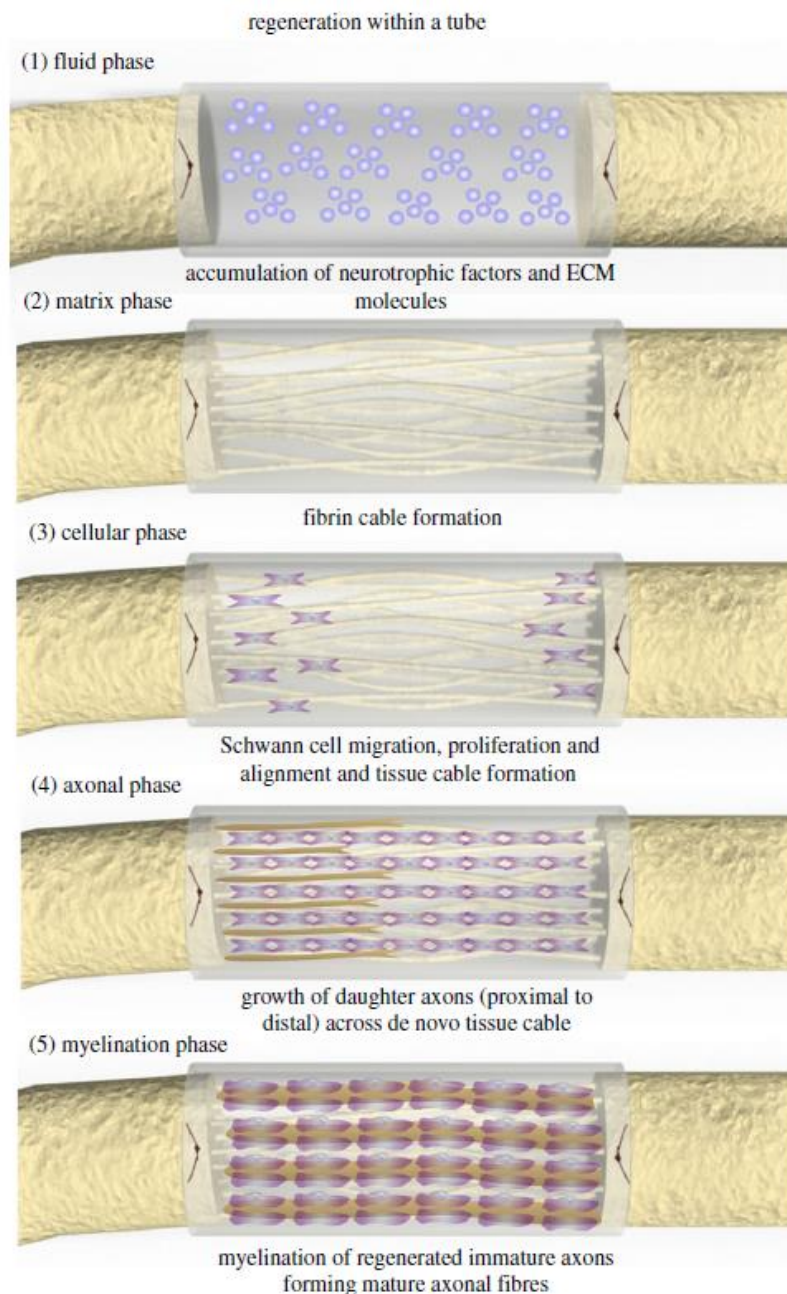


Figura 11. Entubación de un nervio dañado y secuencia de eventos regeneradores que llevan al crecimiento de un nuevo cable nervioso por el interior de un NGC (Daly et al., 2012).

2.3.3.1.1. Propiedades de un NGC ideal

El principal objetivo de los NGCs es aumentar el número y la longitud de los axones regenerados, así como incrementar su velocidad de crecimiento. Para ello los NGCs deben proporcionar un soporte mecánico y dirigir el brote axonal de un extremo a otro de la lesión evitando el crecimiento de tejido fibroso en el sitio de la lesión y reteniendo los factores neurotróficos secretados por los extremos nerviosos dañados (Kehoe et al., 2012). Para lograr estos objetivos y requisitos, un NGC ideal debe cumplir las siguientes propiedades (Houschyar et al., 2016; Kehoe et al., 2012):

- Ser biocompatible de forma que no provoque una respuesta inflamatoria.
- Ser biodegradable.
- Presentar una baja antigenicidad.
- Ser resistente a infecciones.
- Prevenir el crecimiento de tejido fibroso en el sitio de la lesión y retener los factores neurotróficos secretados por los extremos nerviosos dañados.
- Presentar una permeabilidad que permita la difusión de oxígeno y nutrientes desde el fluido intersticial hasta el tejido nervioso superviviente a través de poros presentes en la paredes del conducto. Por tanto, el tamaño de poro debe ser lo suficientemente grande como para permitir este intercambio de oxígeno y nutrientes pero también lo suficientemente pequeño como para prevenir la infiltración de células inflamatorias dentro del conducto y minimizar la salida de factores de crecimiento fuera del conducto a través de la difusión de los mismos. Para ello, el tamaño de poro debe estar comprendido entre 5 y 30 μm , aunque los tamaños preferibles son entre 10 y 20 μm .
- Poseer unas propiedades mecánicas suficientes para permitir su manipulación durante su inserción quirúrgica, ofreciendo una resistencia al desgarro producido por las suturas quirúrgicas o la inflamación tisular pero siendo lo suficientemente flexibles y blandos como para no comprimir a los axones que se están regenerando y limitar la inflamación tisular.
- Mantener una arquitectura mecánicamente estable durante el proceso de regeneración.
- Proporcionar un soporte mecánico a los axones, presentando canales intraluminales y un sustrato orientado para guiar el crecimiento axonal (Hall, 2005; Zhu, Masood, O'Brien, & Zhang, 2015). De este modo el conducto proporciona una estructura tubular tridimensional que extiende el cono de crecimiento del axón evitando una mala dirección del mismo.
- Cumplir con los requisitos técnicos para su posterior producción, esterilización, almacenamiento a largo plazo y manipulación quirúrgica.

Existen diversas estrategias para favorecer el guiado axonal por el interior del conducto (figura 12). Por ejemplo, se puede proporcionar un guiado intraluminal de los axones mediante fibras situadas en el interior del conducto. Así se consigue proporcionar un soporte estructural mayor y una guía topográfica tanto para los axones que se regeneran como para las células que migran, como por ejemplo las células de Schwann. Otra posibilidad es el uso de conductos multicanal para controlar la dispersión axonal o el uso de diseños que optimicen el intercambio de nutrientes o introduzcan estímulos externos. Estas estrategias pueden aplicarse de forma individual o combinada, pero se recomienda incluir una biofuncionalización de la superficie para mejorar la adhesión, migración, alineamiento y proliferación celular (Daly et al., 2012).

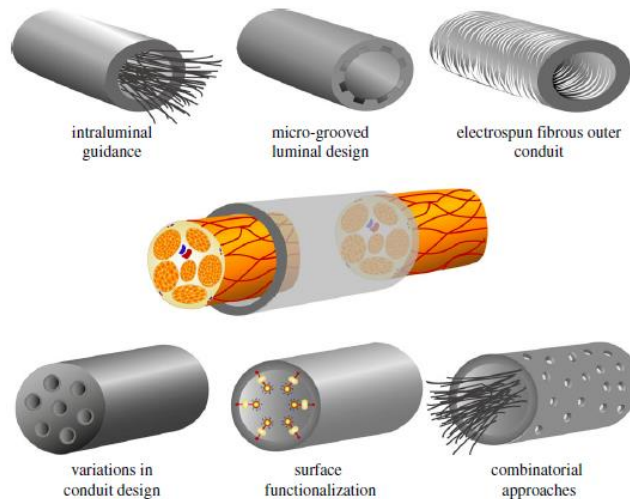


Figura 12. Ejemplo de diversas estructuras empleadas para mejorar el guiado axonal (Daly et al., 2012).

Finalmente, es destacable que existe la posibilidad de mejorar estas propiedades de los NGCs si los combinamos con las otras técnicas desarrolladas anteriormente, como se muestra en la figura 13. Así, el uso de nuevos materiales biológicamente estables permite, por ejemplo, sembrar el interior del lumen del conducto o sus paredes con microesferas o células de soporte. Así se pueden obtener sistemas capaces de liberar de forma controlada y mantenida en el tiempo sustancias y factores bioactivos, como pueden ser factores de crecimiento y/o fármacos, logrando tanto mejorar como acelerar la regeneración neuronal (Houschyar et al., 2016). Un ejemplo de esto sería la siembra de células de Schwann en el conducto con el objetivo de aumentar la producción de NGF (Hadlock et al., 1999).

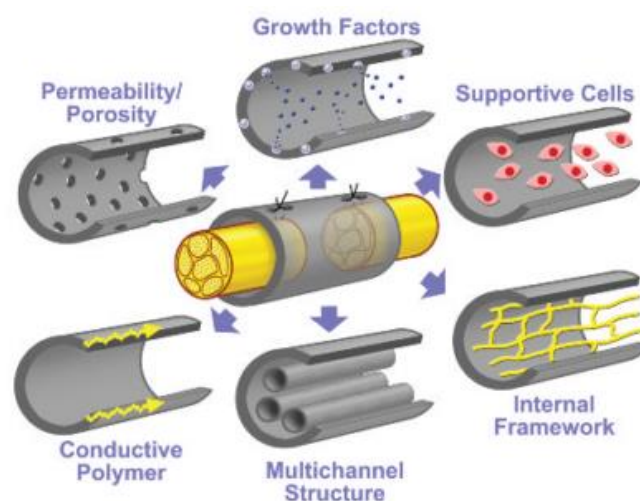


Figura 13. Diagrama de las propiedades de un NGC ideal (de Ruiter et al., 2009).

En conclusión, el objetivo de la inclusión de todos estos elementos en el interior del lumen del conducto es mejorar el microambiente existente en el interior del conducto para así lograr que

se promocióne el crecimiento axonal y aumenten las probabilidades de que se produzca la deseada recuperación funcional.

2.3.3.1.2. Biomateriales empleados para la fabricación de NGCs

La elección del biomaterial con el que fabricar el NGC es una decisión crucial, ya que además de cubrir el *gap* existente entre los dos extremos del nervio dañado debe contribuir a crear un entorno lo más parecido posible al original. Con ello se busca que el NGC favorezca la regeneración neuronal logrando así una mayor recuperación funcional del nervio dañado. De entre las propiedades que deben tener estos biomateriales podemos destacar las siguientes (Dalamagkas, Tsintou, & Seifalian, 2015), las cuales se relacionan con las propiedades que debe tener un NGC ideal nombradas anteriormente:

- Biocompatibilidad.
- Biodegradabilidad.
- Propiedades mecánicas adaptables y que permitan una manipulación del material lo más fácil posible.
- Producir una reacción inflamatoria en el entorno lo más baja posible.
- Poseer una estructura porosa que permita el intercambio de nutrientes y oxígeno.
- Permitir la formación de tejido en su superficie, proporcionando un entorno apropiado para la formación de tejido nuevo.
- Poder ser sembrado con células o moléculas bioactivas como factores de crecimiento o fármacos.

En la tabla 1 se muestran algunos de los biomateriales con los cuales se han desarrollado NGCs evaluados *in vivo* para la regeneración de nervios periféricos.

<i>Materials</i>	<i>Fabrication methods</i>	<i>Animal, nerve</i>	<i>Defect size (in mm)</i>
Biopolymers			
Agarose	Polysulfone conduit, agarose hydrogel with LN-1/NGF gradient	Rat, sciatic	20
Chitosan	Chitosan conduit with internally aligned PGA filaments	Dog, sciatic	30
Collagen	NeuraGen conduits	Human, brachial plexus	≤20
Fibrin	Collagen conduit with longitudinal collagen filaments	Dog, peroneal	30
Gelatin	Silicone conduit with GDNF released from fibrin matrix	Rat, sciatic	13
Keratin	Genipin-crosslinked gelatin conduit	Rat, sciatic	10
Silk	Silicone conduit with keratin hydrogel	Mouse, tibial	4
	Silk fibroin conduit with longitudinal silk fibers	Rat, sciatic	10
	Silk fibroin conduit	Rat, sciatic	8
Synthetic materials			
PCL	PCL conduit with GDNF microspheres	Rat, sciatic	15
Poly(hydroxybutyrate)	PHB conduit, alginate hydrogel with glial growth factor	Rabbit, common peroneal	20, 40
Poly(D,L-lactide)	Porous conduit with surface microgrooves	Rat, sciatic	10
PLGA	PLGA/Pluronic F127 conduit	Rat, sciatic	10
Polyurethane	Polyurethane-collagen conduit	Rat, peroneal	7

Tabla 1. Algunos materiales evaluados *in vivo* para la regeneración de nervios periféricos mediante NGCs (Nectow, Marra, & Kaplan, 2012).

Se pueden clasificar los biomateriales empleados para la construcción de NGCs en dos grandes grupos: materiales de origen natural y materiales de origen sintético.

a) Biomateriales de origen natural

En primer lugar se pueden destacar las ventajas y desventajas de los materiales de origen natural (tabla 2) (Dalamagkas et al., 2015; Kehoe et al., 2012):

Biomateriales de origen natural	
Ventajas	Desventajas
Disponibilidad de grandes cantidades a un precio razonable por su fuente <i>in vivo</i>	Impurezas y variabilidad entre especímenes debido a las fuentes <i>in vivo</i>
Proporcionan sitios de unión celular y moléculas de adhesión	La capacidad de ajuste de las propiedades mecánicas es pobre
Adecuados para el trasplante celular	
Compatibles con el tejido circundante	
Alta biocompatibilidad	
Baja toxicidad	
Buena migración de células de soporte	

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los biomateriales de origen natural (Dalamagkas et al., 2015; Kehoe et al., 2012).

De entre los biomateriales de origen natural empleados para la ingeniería tisular del sistema nervioso se pueden destacar los siguientes:

Nota: los biomateriales de origen natural empleados en este proyecto, ácido hialurónico (HA) y fibroína de seda (SF), se explican en detalle en el apartado 3.4., por lo que no se incluyen en este apartado.

- **Colágeno**

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano y un componente importante de la matriz extracelular, pudiéndose encontrar en los nervios periféricos y teniendo un amplio uso como material biológico. Tras purificarse, el colágeno es débilmente antigénico, por lo que induce una respuesta inmune muy baja. Esta antigenicidad puede reducirse aún más por medio de la eliminación enzimática de las regiones telopeptídicas no helicoidales de la molécula o mediante reticulación o *cross-linking* (Dalamagkas et al., 2015; Kehoe et al., 2012).

Sus propiedades adhesivas para diferentes tipos celulares permiten una mayor supervivencia y proliferación celular (Kehoe et al., 2012). Además, posee diferentes dominios de unión que posibilitan la creación de pistas topográficas que guíen a los axones para volver a crecer, así como la incorporación de sistemas de liberación controlada de fármacos o células (Dalamagkas et al., 2015).

Otro aspecto importante es su microgeometría suave y su permeabilidad transmural, las cuales facilitan los procesos de difusión a través de las matrices de colágeno. Además su peso molecular facilita la difusión de nutrientes y otras moléculas a la vez que se evita la entrada de células en la estructura del conducto (Kehoe et al., 2012).

En cuanto a sus inconvenientes, su alto coste, la rigidez de los conductos de colágeno, la falta de flexibilidad y la incapacidad para mejorar la regeneración nerviosa hacen que el colágeno no sea muy popular entre los cirujanos (Dalamagkas et al., 2015).

- **Gelatina**

La gelatina, que es esencialmente colágeno desnaturalizado, tiene multitud de usos en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. Dentro del campo de la ingeniería tisular se ha empleado como material biodegradable la gelatina entrecruzada con genipina, un agente entrecruzador de origen natural y baja toxicidad que se obtiene del extracto del fruto de la gardenia. Este material se ha empleado para vendajes de heridas, sustitutos óseos y matrices extracelulares. Dentro del campo de los NGCs también se han desarrollado y estudiado conductos de gelatina entrecruzada con genipina, mostrándose biocompatibles y eficaces para la regeneración nerviosa periférica de *gaps* de 1 cm en nervio ciático de rata (Y.-S. Chen et al., 2005).

- **Fibrina**

La fibrina es una proteína implicada en la coagulación normal de la sangre. Gracias a que los componentes de los *scaffolds* basados en fibrina son fáciles de manejar, propiedades como la tasa de degradación son fácilmente ajustables. La administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ya ha aprobado el uso de fibrina como sellante para detener hemorragias en el SNC. Además, algunos conductos fabricados con fibrina han demostrado promover la regeneración axonal y la recuperación funcional en *gaps* pequeños. No obstante, para cubrir *gaps* mayores se necesitan técnicas combinatorias para lograr la regeneración (Dalamagkas et al., 2015).

- **Queratina**

La queratina es una proteína fibrosa que es el componente principal de las capas más externas de la epidermis en los animales vertebrados. La queratina es un biomaterial que ha demostrado ser altamente biocompatible y ser capaz de promover la adhesión, proliferación y migración de células de Schwann. En cuanto a su uso en NGCs, se han desarrollado conductos fabricados con queratina derivada de pelo humano para el tratamiento de lesiones en el SNP, resultando en una mejora en la recuperación de funciones motoras en ratones y confirmando una regeneración neuromuscular mejorada en los nervios tratados. También se encontró que la queratina promovía la regeneración funcional en un modelo de animal grande (Apel et al., 2008).

- **Quitosano**

El quitosano es un polisacárido natural que se ha empleado ampliamente para la entrega de genes, el cultivo celular y la ingeniería tisular. Además, el quitosano produce efectos antiinflamatorios y tiene propiedades antioxidativas.

En cuanto a su uso como NGC, diversos estudios han demostrado que el quitosano puede actuar como un biomaterial favorable para promover la regeneración nerviosa, el cual se caracteriza por una citotoxicidad mínima y una alta biodegradabilidad. Conductos de quitosano se han empleado para guiar y facilitar la regeneración axonal en *gaps* de 1 cm de longitud en nervio ciático de rata (Hsueh et al., 2014).

b) Biomateriales de origen sintético

Las ventajas y desventajas más relevantes de los biomateriales de origen sintético son las nombradas en la tabla 3 (Dalamagkas et al., 2015):

Biomateriales de origen sintético	
Ventajas	Desventajas
Propiedades mecánicas más ajustables con ligeros cambios en la técnica de fabricación	Falta de sitios de unión celular
Alta reproducibilidad	Posibles problemas de biocompatibilidad
Disponibilidad a demanda	El trasplante de células y la implantación en el tejido huésped puede no ser fácilmente factible
Producción a escala industrial	

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los biomateriales de origen sintético (Dalamagkas et al., 2015).

De entre los biomateriales de origen sintético empleados para la ingeniería tisular del sistema nervioso se pueden destacar los siguientes:

- **Ácido poliglicólico (PGA)**

El PGA es un polímero comúnmente usado para la creación de NGCs con unas excelentes propiedades mecánicas, con un módulo de Young que puede alcanzar los 12 GPa. Además se ha probado que el PGA aumenta la viabilidad y regeneración celular a pesar de su naturaleza sintética. De hecho, el primer conducto nervioso sintético que fue aprobado por la FDA en 1999 se fabricó con PGA y ahora se considera la primera opción de los cirujanos entre los conductos nerviosos sintéticos (Dalamagkas et al., 2015).

No obstante, una limitación clave del PGA es que sus componentes de degradación producen un microambiente ácido transitorio y una potencial necrosis tisular, algo que podría limitar la cantidad de PGA que se puede usar en los conductos (Dalamagkas et al., 2015).

- **Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)**

El PLGA es un copolímero sintético de ácido láctico y ácido glicólico que también se ha empleado para la construcción de NGCs. Por ejemplo, se han fabricado NGCs porosos con permeabilidad e hidrofiliidad selectivas empleando PLGA y Plurónico F127, los cuales se han implantado en lesiones de nervio ciático de rata con un *gap* de 1 cm. Estos conductos han mostrado una permeabilidad efectiva hacia los nutrientes, una prevención de la invasión de tejido fibroso cicatricial y una buena resistencia mecánica, manteniendo una estructura de soporte estable para la regeneración nerviosa (S. H. Oh et al., 2008). Asimismo, otra de las principales ventajas del PLGA es que presenta una baja respuesta inflamatoria (Dalamagkas et al., 2015).

- **Policaprolactona (PCL)**

La PCL es un poliéster soluble que se está empleando para la fabricación de NGCs por su sencillo método de fabricación y su bajo coste de procesado. Además, sus componentes de degradación no producen una reacción inflamatoria como ocurría con el PGA. Sin embargo, este biomaterial presenta algunas desventajas, como su incapacidad para ser completamente reabsorbido (Dalamagkas et al., 2015).

- **Polihidroxitirato (PHB)**

El PHB es un polímero poliéster que ha sido empleado en suturas y apósitos mostrando una buena biocompatibilidad. También se han desarrollado implantes de envoltura de PHB que mostraron resultados muy prometedores en comparación con la sutura epineural. En cuanto a los NGCs, la empresa *Axongen Pharmaceuticals* ha desarrollado un conducto de PHB que tiene características neuroprotectoras y ayuda a los axones a regenerarse. Actualmente el conducto está en espera de aprobación para alcanzar la práctica clínica (Dalamagkas et al., 2015).

Una de las principales desventajas del PHB es que es muy hidrolíticamente estable, por lo que tarda entre 24 y 30 meses en ser reabsorbido, lo cual es un gran inconveniente para aplicaciones en las que se necesita que el plazo de reabsorción del material sea corto (Dalamagkas et al., 2015).

- **Silsesquioxano oligomérico poliédrico (POSS)**

Las moléculas de POSS pueden ser consideradas como partículas de sílice lo más pequeñas posible. Sin embargo, a diferencia de la sílice o las arcillas modificadas, cada molécula POSS contiene funcionalidades reactivas adecuadas para la polimerización. El POSS se ha combinado con PCL para la fabricación de NGCs para la regeneración de nervios periféricos con resultados prometedores, esperándose actualmente a la realización de estudios clínicos *in vivo* para corroborar su verdadero potencial en la clínica (Dalamagkas et al., 2015).

- **Ácido poliláctico (PLA)**

El PLA es un poliéster alifático que puede ser obtenido de fuentes naturales como el almidón, el maíz o el arroz. Se trata de un material biocompatible, biodegradable, bioabsorbible, no tóxico y que permite adaptar sus propiedades mecánicas. Por todo ello se ha empleado en multitud de aplicaciones de ingeniería tisular y de liberación controlada de fármacos. Además se trata de un polímero aprobado por la FDA para aplicaciones clínicas en humanos (Makadia & Siegel, 2011).

No obstante, el PLA también presenta algunas desventajas como su falta de grupos funcionales, lo que limita la adhesión celular. Además tiene una tasa de degradación muy lenta, conllevando una resorción total in vivo que tarda entre 2 y 5 años para el PLA de alto peso molecular. A esto se debe añadir que los productos de degradación del PLA pueden afectar al crecimiento celular y a la regeneración tisular, aunque diversos estudios indican que no causan una respuesta inflamatoria ya que son eliminados por el organismo a través de los caminos metabólicos usuales (Araque-Monrós et al., 2013; Xiao, Wang, Yang, & Gauthier, 2006).

2.3.3.1.3. NGCs comerciales aprobados por la FDA

En la actualidad existen diversos NGCs aprobados por la FDA, los cuales han sido fabricados con materiales tanto naturales como sintéticos (tabla 4). A continuación se desarrollan algunos de los más relevantes (Kehoe et al., 2012):

510K approval	FDA clearance date	Product name	Material	Degradation	Diameter	Length
K983007	22nd March, 1999/1995	Neurotube [®]	Polyglycolic acid (PGA)	3 months	2.3–8 mm	2–4 cm
K011168	22nd June, 2001	NeuraGen [®]	Type I collagen	36–48 months	1.5–7 mm	2–3 cm
K012814	21st Sept, 2001	Neuroflex [™]	Type I collagen	4–8 months	2–6 mm	2.5 cm
K012814	21st Sept, 2001	NeuroMatrix [™]	Type I collagen	4–8 months	2–6 mm	2.5 cm
K031069	15th May, 2003	AxoGuard [™] Nerve Connector	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	3 months	1.5–7 mm	10 mm
K032115/K050573	10th October, 2003/4th May, 2005	Neurolac [®]	Poly(DL-lactide-ε-caprolactone); PCL	16 months	1.5–10 mm	3 cm
K100382	5th August, 2010	SaluTunnel [™] Nerve Protector [™]	Polyvinyl Alcohol (PVA)	Non-absorbable	2–10 mm	6.35 cm

Tabla 4. NGCs aprobados por la FDA (Kehoe et al., 2012)

- **Neurotube[®]**

Fabricado en PGA, Neurotube[®] presenta como principales ventajas una excelente degradabilidad, unas buenas propiedades mecánicas iniciales y unos altos niveles de viabilidad celular. Sus principales desventajas son su alta tasa de degradación así como su pérdida de propiedades mecánicas a corto plazo. Otras posibles limitaciones estarían relacionadas con los productos de degradación ácida y su baja solubilidad (Kehoe et al., 2012).

En cuanto a sus resultados clínicos, en ensayos clínicos aleatorizados se ha obtenido que Neurotube® tiene una eficacia comparable al *gold standard* en defectos de hasta 2 cm. Además, existen datos preclínicos para este dispositivo que muestran su capacidad de reparar eficazmente defectos con un *gap* de hasta 3 cm. A esto cabe añadir que Neurotube® tiene la mayor cantidad de datos clínicos sobre seguridad y eficacia disponibles para los cirujanos en comparación con el resto de NGCs aprobados por la FDA (Kehoe et al., 2012).

- **NeuraGen®**

Al estar fabricado con colágeno tipo I, NeuraGen® presenta las principales ventajas relacionadas con este material. En primer lugar cabe destacar su adhesividad para diferentes tipos celulares, lo cual permite su supervivencia y proliferación a largo plazo. Además presenta una excelente biocompatibilidad y se ha demostrado que soporta y guía la regeneración tisular *in vivo*. La principal desventaja de este dispositivo reside en que son necesarios 48 meses para su biodegradación completa, lo que puede llevar a una compresión del nervio regenerado (Kehoe et al., 2012).

En cuanto a sus estudios clínicos, NeuraGen® tiene una eficacia comparable al *gold standard* en defectos de hasta 2 cm, habiéndose publicado regularmente sobre su seguridad y eficacia clínica. Además, en estudios preclínicos el dispositivo ha mostrado ser eficaz en defectos con un *gap* de hasta 4 cm de longitud, cosa que no ha logrado ningún otro dispositivo aprobado por la FDA (Kehoe et al., 2012).

- **Neurolac®**

Fabricado en PCL, Neurolac® presenta como principal ventaja que es el único NGC transparente aprobado por la FDA, característica que puede ser de ayuda para el cirujano durante su inserción quirúrgica. No obstante, presenta diversas desventajas como su alta rigidez, la cual produce la rotura frecuente de la aguja de sutura durante la intervención quirúrgica. Esto obliga al cirujano a emplear una aguja de sutura más larga que produce más daño al tejido. Además su inflexibilidad puede producir que las terminaciones nerviosas se salgan del interior del lumen del NGC durante el periodo de regeneración. Otras desventajas importantes de Neurolac® son la aparición de reacciones a cuerpo extraño graves, el bloqueo del lumen por un hinchado excesivo o el colapso temprano que lleva a la formación de un neuroma (Kehoe et al., 2012; Meek & Coert, 2008).

En cuanto a su actuación clínica, Neurolac® ha demostrado tener una eficacia comparable al *gold standard* en lesiones de hasta 2 cm. No obstante los estudios preclínicos no han podido superar esta distancia de regeneración (Kehoe et al., 2012).

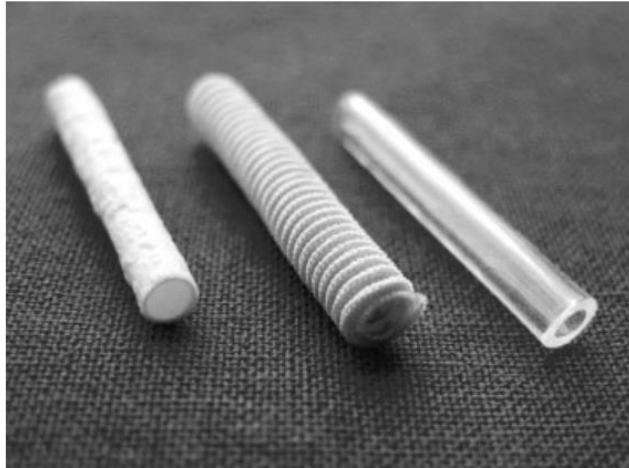


Figura 14. De izquierda a derecha: NeuraGen®, Neurotube® y Neurolac® (Lohmeyer, Siemers, Machens, & Mailander, 2009).

- **SaluTunnel™ Nerve Protector™**

SaluTunnel™ presenta la principal ventaja de que combina el agua en una proporción similar a la de los tejidos humanos, incluyendo polivinil alcohol (PVA) para obtener una estructura mecánicamente estable y fácilmente esterilizable. En cuanto a sus desventajas, éstas están relacionadas con su naturaleza no reabsorbible, la cual lleva a problemas relacionados con la compresión del nervio y con tensión en las líneas de sutura tras haber ocurrido la regeneración nerviosa. A esto cabe añadir que no se han publicado estudios clínicos que hayan examinado la eficacia de este material de manera controlada, aleatorizada y prospectiva (Kehoe et al., 2012).

En conclusión, en la actualidad existen diversos dispositivos de guía nerviosa aprobados por la FDA ya utilizados en la práctica clínica. No obstante, todavía existen muchos aspectos en los que estos dispositivos pueden ser mejorados para lograr aumentar la distancia de los *gaps* a reparar, la cual se limita en la actualidad a 3 o 4 cm como máximo en nervios de pequeño diámetro. Por ejemplo, todavía existe mucho margen de mejora en los biomateriales empleados o en las técnicas intraluminales para obtener un microentorno en el interior del conducto que favorezca la regeneración axonal a distancias largas (mayores a 3 cm).

la síntesis de HA la cadena se extiende mediante la adición de monosacáridos en el extremo reductor (Perez Garnes, 2015).

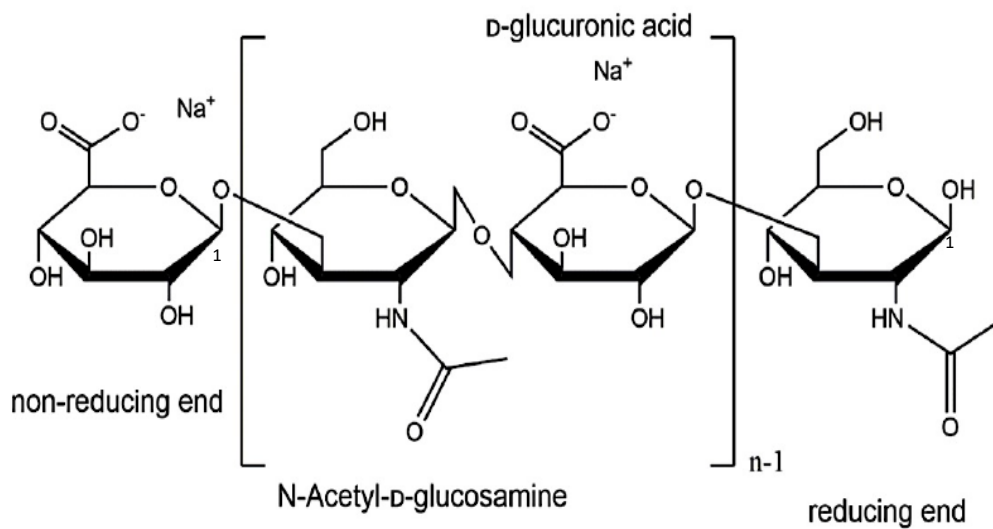


Figura 16. Estructura química del HA mostrando su naturaleza polianiónica, así como los extremos reductor y no reductor (Perez Garnes, 2015).

En cuanto a su peso molecular, este puede variar enormemente, ya que el HA puede formar desde pequeños oligosacáridos hasta macromoléculas con un alto peso molecular de entre 10^5 y 10^7 Da (Vilariño Feltrer, 2015).

En relación a las funciones del HA en la naturaleza, una de sus funciones principales es la modificación de las propiedades elastoméricas de la ECM. No obstante, también se ha descubierto que el HA cumple otras funciones biológicas fundamentales en función de su peso molecular. Esto es así gracias a que donde se sitúa el HA también se encuentran enzimas de la familia hialuronidasa que escinden las cadenas de HA en función de las necesidades del organismo (Di Ferrante, 1956). Por tanto, el HA puede considerarse como un polímero biodegradable que se degrada y sintetiza continuamente en la ECM de los tejidos.

De este modo, el HA no solamente se presenta con pesos moleculares del orden de MDa, sino que también existen moléculas más pequeñas con menores pesos moleculares que cumplen diversas funciones (Vilariño Feltrer, 2015). Por ejemplo, al HA con un peso molecular del orden de 60 kDa se le atribuyen propiedades antiadherentes para las células (Brecht, Mayer, Schlosser, & Prehm, 1986) que mantienen a los astrocitos en un estado quiescente no reactivo e inhiben la formación de la cicatriz glial (Khaing et al., 2011; C.-M. Lin et al., 2009).

Otro aspecto muy importante del HA es su capacidad para retener agua. Cuando el HA entra en contacto con el agua se producen interacciones de enlace de hidrógeno entre las cadenas del HA (Scott, 1989), resultando en una restricción de la libertad rotacional y en un impedimento para que las proteínas y otras moléculas globulares difundan a través de la matriz del HA (Cowman & Matsuoka, 2005). Por tanto, la formación de estos puentes de hidrógeno cuando el HA está en contacto con el agua es lo que produce que el agua quede retenida en el material, lo cual confiere al HA su alta hidrofiliidad.

Finalmente cabe destacar que el HA presenta una excelente biocompatibilidad y unas propiedades biológicas únicas (Collins & Birkinshaw, 2013), ya que regula la respuesta inmune e inflamatoria, la diferenciación celular, la vascularización, la formación de tejido cicatricial y la adhesión celular a proteínas de la ECM (Rodríguez-Pérez, Lloret Compañ, Monleón Pradas, & Martínez-Ramos, 2016). Además, el HA también modula el comportamiento de las células gliales e inmunitarias (Vilariño Feltrer, 2015).

2.4.1.2. Modificaciones

En cuanto a las desventajas del HA, las más importantes son sus malas propiedades mecánicas, su alta solubilidad y su rápida tasa de degradación en un entorno fisiológico. A esto cabe añadir que al implantar HA de origen no autólogo (normalmente de origen bacteriano) se suele producir una reacción a cuerpo extraño que genera un aumento de la concentración local de la enzima hialuronidasa. Esto produce que el HA se degrade y que los fragmentos difundan a otras regiones cercanas de tejido o al flujo sanguíneo, de modo que el tiempo de residencia del HA es de solamente unos pocos días tras su incorporación. Por todo ello es frecuente que se realice una modificación parcial de algunos grupos funcionales del HA para ajustar sus propiedades fisicoquímicas o incluso estimular determinadas respuestas celulares (Vilariño Feltrer, 2015).

Las posibles modificaciones del HA se engloban en 5 grupos (Vilariño Feltrer, 2015):

- Entrecruzamientos químicos directos
- Entrecruzamiento químicos indirectos
- Entrecruzamientos físicos
- Funcionalizaciones metabólicas
- Injertos

Estas modificaciones persiguen la formación de hidrogeles de HA que sean más estables y con unas mejores propiedades mecánicas, de modo que puedan manipularse con mayor facilidad. Asimismo también buscan un aumento de la biocompatibilidad entre el HA y el tejido, incrementando así el tiempo de residencia del HA (Vilariño Feltrer, 2015).

En este TFM se ha optado por un entrecruzamiento químico directo del HA con el agente entrecruzante divinil sulfona (DVS) (figura 17). Esta reacción consiste en una eterificación por adición de Michael, de modo que se necesita un medio alcalino para desprotonar los grupos hidroxilos del HA y proporcionar así una fuente de OH⁻ (Perez Garnes, 2015; Vilariño Feltrer, 2015). Así pues, este procedimiento se basa en que, en condiciones alcalinas (pH>12) y a temperatura ambiente, el agente entrecruzante (DVS) reacciona con el HA generándose una reticulación bis-etilsulfona entre los grupos hidroxilo de las cadenas de HA. De este modo se forman enlaces covalentes entre varias cadenas diferentes del HA en pocos minutos.

Cabe destacar que a pesar de la alta toxicidad del DVS, se ha mostrado que los hidrogeles HA-DVS no generan productos de degradación tóxicos y su uso en aplicaciones biomédicas está aprobado por la FDA (E. J. Oh et al., 2008; Perez Garnes, 2015).

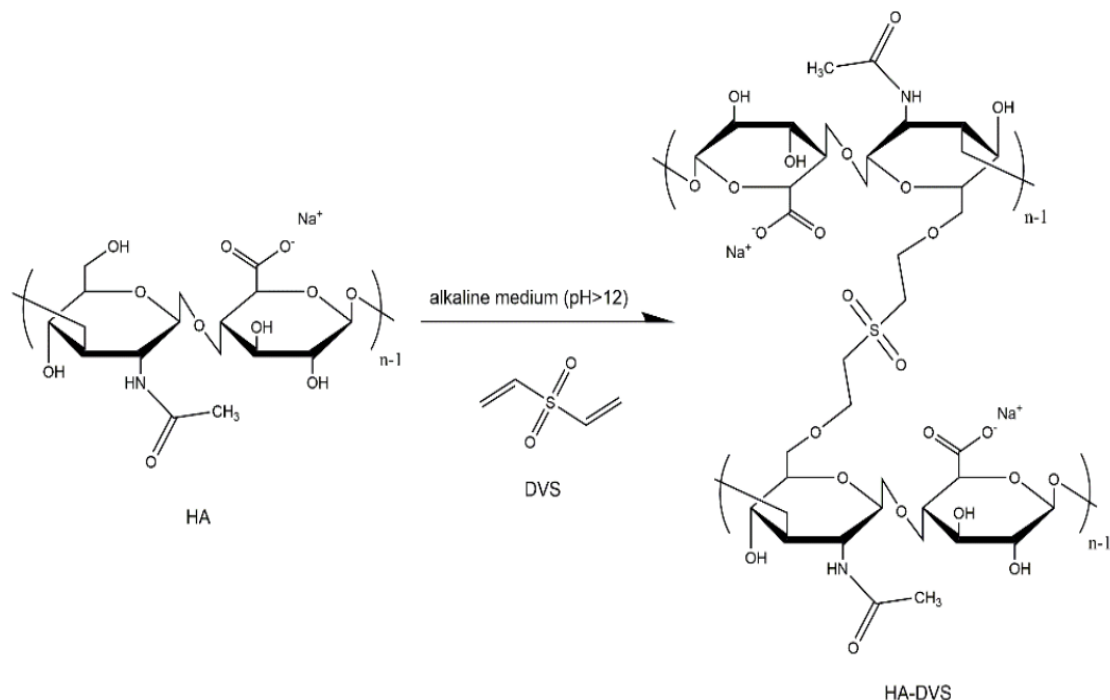


Figura 17. Reacción de entrecruzamiento entre HA y DVS (Perez Garnes, 2015).

2.4.1.3. Aplicaciones

Debido a sus excelentes propiedades biológicas, sus funciones en el metabolismo de las células y en la regeneración de tejidos y su alta hidrofiliidad, el HA purificado con origen bacteriano o animal ya se emplea en diversas aplicaciones tanto médicas como cosméticas. Un ejemplo sería la cirugía oftálmica para trasplante de córnea, donde se reduce la cantidad de trauma en el ojo del paciente gracias a que el HA forma un cojín amortiguador entre los instrumentos y los tejidos (Maltese et al., 2006). Otro ejemplo es la cirugía plástica, donde se utiliza como relleno subcutáneo inyectable para arrugas y cicatrices (Jones, 2011).

Otra aplicación terapéutica de geles o soluciones de HA es la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos, donde su función es proteger las superficies de los tejidos de la sequedad y de los agentes ambientales (Jiang, Liang, & Noble, 2007). Por ejemplo, se emplea para aumentar la velocidad de curación de quemaduras de baja gravedad (Oksala et al., 1995) o para que las membranas de los tejidos no se adhieran tras una intervención quirúrgica (Reijnen, Bleichrodt, & van Goor, 2003).

En cuanto a la utilización del HA como material de fabricación de NGCs, su aplicación hasta el momento ha sido únicamente a nivel de investigación, habiéndose estudiado por primera vez en 2015 dentro del centro de investigación de acogida (CBIT). En este grupo se logró obtener un conducto tubular de HA estable en medio fisiológico y permeable a nutrientes y proteínas que era capaz de retener en su interior células de la glía como células de Schwann. Además, estas células eran capaces de proliferar en el interior del conducto formando una estructura celular tubular similar a las estructuras fasciculares que se encuentran en los nervios (Vilariño Feltrer, 2015). A partir de estos resultados se procedió al estudio de la combinación de tubos de HA con otros materiales como micropartículas (Gréant, 2016), polietil acrilato (Rodríguez-Pérez et al.,

2016) o nanotubos de carbono (Arnal-Pastor et al., 2016). En la actualidad se están realizando ensayos *in vivo* en ratas con resultados esperanzadores.

2.4.1.4. Justificación de la elección

De la gran cantidad de biomateriales disponibles, se ha escogido el HA para desarrollar la estructura tubular de este proyecto ya que es uno de los biomateriales favoritos para la regeneración asistida del sistema nervioso. El hecho de que se trate de un glicosaminoglicano natural y uno de los principales componentes de la matriz extracelular (Lam, Truong, & Segura, 2014; Lei, Gojgini, Lam, & Segura, 2011) hace que sea el material más favorable a la hora de implantar *scaffolds* de HA para la regeneración del sistema nervioso. Principalmente esto se debe a que inicialmente el polímero tendrá un elevado peso molecular, con lo que producirá en el ambiente un efecto antiinflamatorio e inmunosupresor que será favorable para la buena adaptación del *scaffold* al entorno. Además, conforme pase el tiempo y vaya degradándose el biomaterial se pasará a tener un efecto favorable para la proliferación celular y la angiogénesis gracias a las excelentes propiedades biológicas del HA. A esto se añade que se trata de un componente aprobado por la FDA para su utilización clínica, lo que hace que sea fácilmente trasladable para su futuro uso en humanos.

2.4.2. Fibroína de seda (SF)

2.4.2.1. Características y propiedades generales

La seda es una proteína natural que puede ser obtenida de los capullos de varios tipos de orugas o gusanos de seda. En este proyecto se emplea la seda obtenida a partir de los capullos de la polilla de seda china *Bombyx mori* criada en cautividad. La seda emitida por el gusano de seda se compone de dos proteínas principales, la fibroína y la sericina. La fibroína forma el centro estructural de la seda, mientras que la sericina es un material pegajoso que rodea a la fibroína, como se muestra en la figura 18 (J. Lancashire, 2011).

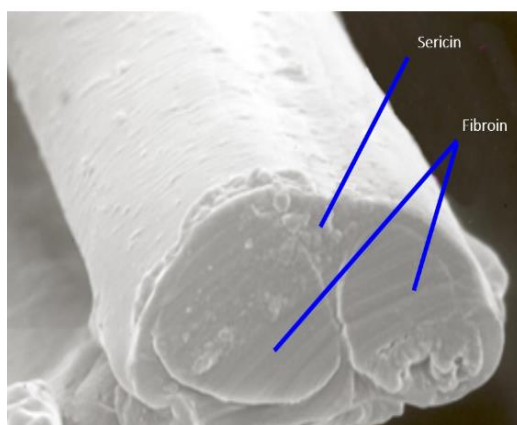


Figura 18. Imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM) mostrando los dos componentes de la seda: la fibroína formando el centro y la sericina alrededor (J. Lancashire, 2011).

La masa total de la seda está compuesta por un 20 a 30% de sericina y un 70 a 80% de fibroína de seda (SF). La SF es la proteína responsable de la biocompatibilidad y la bioactividad. No obstante, la sericina ha mostrado ser causa de respuestas inflamatorias e inmunológicas indeseables. Por ello, la seda se somete a un proceso de desgomado o *degumming* que consiste en hervir los capullos de seda en una solución alcalina con el objetivo obtener fibroína de seda pura (sin restos de sericina) que pueda ser usada como biomaterial (Tang et al., 2009; Vepari & Kaplan, 2007; Wray et al., 2011).

Diversas pruebas con SF desgomada (sin sericina) han revelado que solamente ocurren respuestas inflamatorias muy leves *in vivo* con este material, y estas respuestas son mucho menores que las observadas con otros biomateriales de uso común como el colágeno o el PLA (Murphy & Kaplan, 2009). Por tanto, la SF ha demostrado ser un biomaterial con una alta biocompatibilidad en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, evitándose las respuestas inmunológicas no deseadas causadas por la sericina (Vepari & Kaplan, 2007).

En cuanto a su composición química, la SF de *Bombyx mori* está compuesta en su mayor parte por la estructura repetitiva mostrada en la figura 19, formada por los aminoácidos glicina (Gly), alanina (Ala) y serina (Ser) en una relación molar aproximada de 3:2:1, respectivamente (J. Lancashire, 2011).

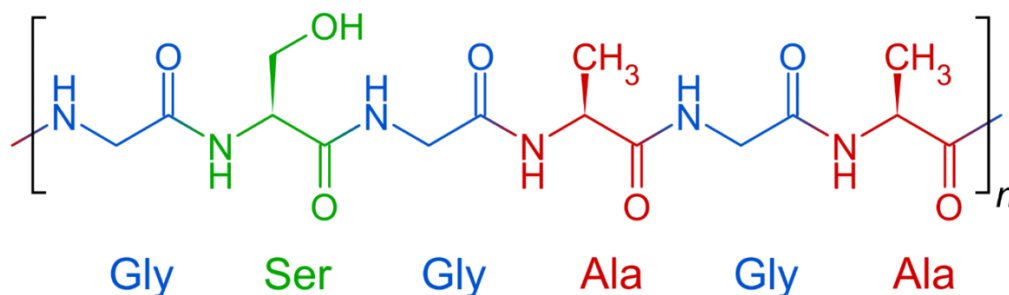


Figura 19. Estructura primaria de la SF de *Bombyx mori* (J. Lancashire, 2011).

En cuanto a su composición en aminoácidos, la SF de *Bombyx mori* contiene una mayor proporción de los tres aminoácidos que forma su estructura de repetición (figura 19), con un 45% de glicina, 29% de alanina y 12% de serina. El 13% restante está formado por tirosina, valina, ácido aspártico, arginina, ácido glutámico, isoleucina, leucina, fenilalanina y treonina (ver tabla 5) (J. Lancashire, 2011).

symbol	Amino acid	Fibroin
G	(glycine)	45
A	(alanine)	29
S	(serine)	12
Y	(tyrosine)	5
V	(valine)	2
D	(aspartic acid)	1
R	(arginine)	1
E	(glutamic acid)	1
I	(isoleucine)	1
L	(leucine)	1
F	(phenylalanine)	1
T	(threonine)	1
C	(cystine): half	0
H	(histidine)	0
K	(lysine)	0
M	(methionine)	0
P	(proline)	0
W	(tryptophan)	0

Tabla 5. Composición de la SF de *Bombyx mori* mostrando el porcentaje de cada aminoácido encontrado en ella (J. Lancashire, 2011).

La alta proporción de glicina, el cual es el aminoácido más pequeño, es la que permite el empaquetamiento apretado de la SF, obteniéndose fibras fuertes resistentes a la rotura. La gran resistencia a la tracción de la SF proviene de la gran cantidad de enlaces de hidrógeno que presenta, los cuales no se rompen fácilmente ya que la fuerza se reparte entre todos ellos (J. Lancashire, 2011).

Como se muestra en la figura 20, la SF se compone de cristales denominados láminas β o β -*sheets* y dominios amorfos, de modo que los dominios de cristalito son hidrófobos y están embebidos en regiones amorfas hidrófilas. Así, las características mecánicas de la SF proceden predominantemente de las interacciones tanto entre como dentro de ambas estructuras.

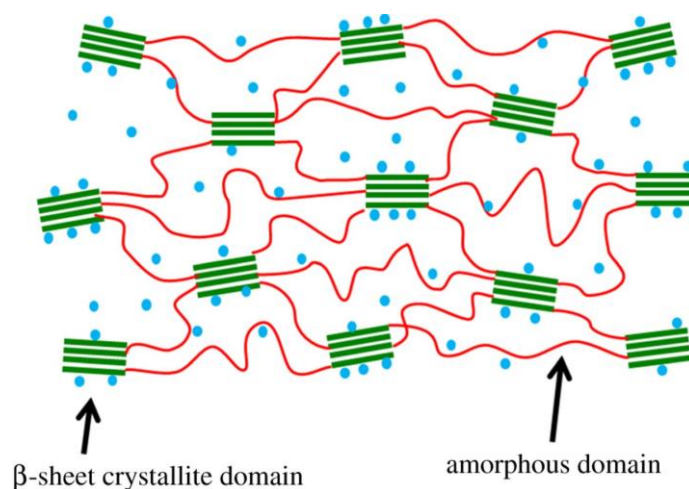


Figura 20. Ilustración de la fase cristalina β -*sheet* embebida en la matriz amorfa en la SF. Los círculos azules representan las moléculas de agua (Cheng et al., 2014).

Los componentes estructurales principales de los dominios de cristalito son cadenas polipeptídicas (formadas principalmente por los aminoácidos glicina y alanina), de forma que las cadenas adyacentes se mantienen unidas por fuertes puentes de hidrógeno en una disposición antiparalela para formar las láminas β (Cheng et al., 2014). Estas láminas β son altamente cristalinas y esencialmente reticulan la proteína a través de fuertes puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, así como fuertes interacciones de van der Waals entre láminas β apiladas, dando al material sus propiedades mecánicas robustas (Murphy & Kaplan, 2009). Por su parte, los dominios amorfos y desordenados forman una matriz blanda y húmeda que rodea a las láminas β (Cheng et al., 2014).

Un aspecto a tener en cuenta es la interacción del agua con la SF, ya que la presencia de agua como solvente reduce el número y la fuerza de los enlaces de hidrógeno entre cadenas de los dominios cristalinos, lo cual debilita la resistencia del material (Cheng et al., 2014). No obstante, se ha demostrado que las fibras de SF presentan una degradación *in vivo* lenta, reteniendo más del 50% de sus propiedades mecánicas después de dos meses de implantación (Tang et al., 2009; Vepari & Kaplan, 2007). Esto se debe a que los dominios cristalinos hidrófobos de láminas β previenen la penetración de agua y proteasas, dando como resultado una biodegradación lenta *in vivo* (Murphy & Kaplan, 2009).

Gracias a esta estructura de la SF, esta proteína es considerada como una de las fibras naturales más fuertes, presentando unas propiedades mecánicas superiores a las de otros biomateriales como el colágeno o el PLA (ver tabla 6) (Vepari & Kaplan, 2007).

Source of Biomaterial	Modulus (GPa)	UTS (MPa)	Strain (%) at break
<i>B. mori</i> silk (with sericin)	5–12	500	19
<i>B. mori</i> silk (without sericin)	15–17	610–690	4–16
<i>B. mori</i> silk	10	740	20
<i>N. clavipes</i> silk	11–13	875–972	17–18
Collagen	0.0018–0.046	0.9–7.4	24–68
Crosslinked collagen	0.4–0.8	47–72	12–16
Polylactic acid	1.2–3.0	28–50	2–6

Tabla 6. Propiedades mecánicas de la SF de *Bombyx mori*, comparándose con las del colágeno y las del PLA. (Vepari & Kaplan, 2007).

Otro aspecto interesante es que la extensión de la estructura cristalina de láminas β puede ser controlada mediante métodos físicos o químicos, dando lugar a materiales con una cristalinidad y tasa de degradación controladas (Murphy & Kaplan, 2009). Esto permite adaptar la tasa de degradación de la SF a la aplicación concreta en que vaya a ser utilizada (Lu et al., 2011).

También es importante destacar la fácil esterilización de la SF, ya que los *scaffolds* de SF pueden calentarse en autoclave hasta 120°C sin que cambie ni la morfología ni la estructura de las láminas β . Además también se pueden esterilizar empleando óxido de etileno, radiación y o etanol al 70% (Vepari & Kaplan, 2007).

Por último, es interesante indicar que la SF puede debilitarse si se expone a demasiada luz solar y que es un mal conductor de la electricidad, por lo que es susceptible a la adherencia estática (J. Lancashire, 2011).

2.4.2.2. Aplicaciones

Las sedas han sido investigadas como biomateriales debido al uso exitoso de fibras de seda de *Bombyx mori* como material de sutura durante siglos (Vepari & Kaplan, 2007). La SF posee unas propiedades mecánicas, químicas y biológicas superiores a las de la mayoría de polímeros naturales o sintéticos, presentando una combinación única de excelentes propiedades mecánicas, biocompatibilidad y biodegradabilidad en medio fisiológico, así como una fácil manipulación, esterilización y funcionalización de su superficie (Cheng et al., 2014; Tang et al., 2009).

Esto ha propiciado su amplia utilización en aplicaciones biomédicas, especialmente para la cicatrización de heridas y la ingeniería de tejido óseo, cartílagos, tendones y ligamentos (Cheng et al., 2014; Tang et al., 2009; Vepari & Kaplan, 2007). Por ejemplo, en aplicaciones relacionadas con la cicatrización de heridas los materiales a base de SF han demostrado mejorar la adhesión de queratinocitos y fibroblastos *in vitro*, al tiempo que inducen una menor inflamación en comparación con otros productos empleados comercialmente (Karahaliloglu, Ercan, Denkbaz, & Webster, 2015).

La SF se ha propuesto para diversas aplicaciones de ingeniería tisular en una amplia variedad de formas, incluyendo membranas, esponjas, hidrogeles y andamios o *scaffolds* tridimensionales (Karahaliloglu et al., 2015; Murphy & Kaplan, 2009). Más recientemente, la aplicación de la SF como biomaterial para la regeneración de nervios periféricos ha crecido hasta convertirse en un nuevo campo de investigación. Se ha demostrado que la SF es biocompatible con ganglios de la raíz dorsal y células de Schwann sin mostrarse efectos citotóxicos significativos bajo condiciones *in vitro*. Además se han implantado NGCs basados en SF en lesiones de nervio ciático de rata con un *gap* de 1 cm de longitud con un resultado positivo de regeneración (Tang et al., 2009).

Además de su aplicación en el SNP, también se ha investigado la aplicación de la SF en la regeneración del SNC. Se ha concluido que la SF tiene una buena biocompatibilidad con neuronas del hipocampo, apoyando su supervivencia y crecimiento sin mostrarse ningún efecto citotóxico significativo sobre su fenotipo o funciones celulares. Esto apoya el posible uso potencial de la SF en la fabricación de NGCs para tratar lesiones o enfermedades del SNC (Tang et al., 2009).

2.4.2.3. Justificación de la elección

La incorporación de la SF al proceso de fabricación de NGCs basados en HA tiene como objetivo principal la mejora de las propiedades de adhesión celular en el interior de las paredes del conducto tubular, ya que los *scaffolds* de HA presentan una adhesión celular muy limitada basada únicamente en la rugosidad del material por su alta hidrofiliidad. Así, mediante la adición de SF se pretende obtener un microentorno en el interior del NGC que mejore la

adhesión y crecimiento de células gliales como las células de Schwann, lo cual creará un microentorno más favorable para el crecimiento axonal.

En segundo lugar, con la incorporación de la SF al HA también se pretende obtener una mejora de las propiedades mecánicas de los NGCs gracias a que la SF presenta unas propiedades mecánicas muy superiores a las del HA. Con este refuerzo del material se busca facilitar el proceso de sutura del NGC durante su implantación quirúrgica, ya que los NGC fabricados únicamente con HA presentan problemas de rotura durante su implantación por su elevada fragilidad. No obstante, debe considerarse en este punto que existen otros métodos que pueden aumentar todavía más las propiedades mecánicas del material, como puede ser la adición de micropartículas (Gréant, 2016). No obstante, estos métodos no permiten obtener una mejora de las propiedades de adhesión celular del NGC y también presentan otros tipos de problemas, como una excesiva rigidez del conducto que puede producir la compresión de los axones que se están regenerando y un aumento de la inflamación tisular.

Además, como ocurría con el HA, la SF también está actualmente aprobada por la FDA, lo que hace que el NGC desarrollado siga siendo fácilmente trasladable para su posible uso clínico en humanos en un futuro.

3. Hipótesis y objetivos

Este Trabajo Fin de Máster (TFM) tiene como objetivo el desarrollo de conductos de guía nerviosa (NGCs) para la regeneración nerviosa tanto del sistema nervioso central (SNC) como del sistema nervioso periférico (SNP). Estos NGCs están basados en una combinación de ácido hialurónico (HA) y fibroína de seda (SF) con el objetivo de mejorar, tanto la adhesión celular en el interior del conducto, como las propiedades mecánicas del mismo en comparación con los NGCs basados únicamente en HA. Este material creado por la combinación de HA y SF será caracterizado desde los puntos de vista morfológico, fisicoquímico, mecánico y biológico mediante estudios *in vitro*, con el objetivo de evaluar su potencial utilización clínica como NGCs en un futuro.

Las hipótesis de este TFM son:

- **Hipótesis 1:** La SF puede incorporarse en el proceso de producción de NGCs basados en HA, resultando en la fabricación de NGCs en los que se combine el HA con la SF.
- **Hipótesis 2:** El nuevo biomaterial basado en la combinación de HA y SF permitirá:
 - Mejorar la adhesión celular en las paredes internas del NGC gracias a la interacción entre proteínas transmembranales de adhesión celular (integrinas) y los residuos de arginina de la SF. Con ello se conseguirá mejorar la adhesión de células gliales como las células de Schwann en el interior del conducto, resultando en un microentorno más adecuado para la regeneración y crecimiento axonal.
 - Mejorar las propiedades mecánicas de los NGC basados en HA gracias a las mayores propiedades mecánicas de la SF en comparación con el HA. Con ello se conseguirá mejorar la manipulación de los NGCs en etapas tanto *in vitro* como *in vivo*, aumentando por tanto las posibilidades de obtener una implantación clínica exitosa en un futuro.

Los objetivos concretos de este TFM son:

- **Objetivo 1:** Incorporar la SF al proceso de fabricación de membranas basadas en HA.
- **Objetivo 2:** Caracterizar las propiedades físico-químicas de las membranas basadas en HA sin y con incorporación de SF.
- **Objetivo 3:** Caracterizar las propiedades mecánicas de las membranas basadas en HA sin y con incorporación de SF.
- **Objetivo 4:** Caracterizar las propiedades biológicas en términos de adhesión y proliferación celular *in vitro* de las membranas basadas en HA sin y con incorporación de SF.
- **Objetivo 5:** Producir NGCs basados en la combinación de HA y SF.

4. Materiales y métodos

Este TFM tiene como objetivo principal la mejora de los NGCs basados en HA mediante la incorporación de la SF a su proceso de fabricación. En primer lugar se procedió a la fabricación de membranas de alrededor de 1 mm de espesor basadas únicamente en HA, por un lado, y basadas en HA combinado con SF, por otro. Esto se realizó mediante la inyección del material en un molde con forma plana. Estas membranas se emplearon para caracterizar y comparar sus propiedades físico-químicas, mecánicas y de adhesión y proliferación celular *in vitro*. La investigación se realizó mediante el uso de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), equipamiento de ensayos mecánicos (reómetro), análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y ensayos adicionales para la medida de la estabilidad frente a ciclos de hinchado y secado. Los ensayos de adhesión y proliferación celular se realizaron mediante cultivos celulares de células de Schwann de rata (rSCs) *in vitro*.

En segundo lugar, una vez realizados los ensayos con las membranas, se procedió a la fabricación de NGCs basados tanto en HA como en HA combinado con SF, siguiendo la metodología anterior de elaboración del biomaterial. Para la obtención de tubos huecos se procedió a la inyección del material en un molde acanalado con fibras de PCL en el interior de cada canal (tubógenos) para obtener así el lumen del conducto. Los NGCs obtenidos se caracterizaron morfológicamente mediante FESEM y se analizaron tanto sus dimensiones en estado seco e hinchado en agua como su densidad y porosidad.

4.1. Preparación de los biomateriales

4.1.1. HA

La preparación del biomaterial basado únicamente en HA disuelto en medio básico (de ahora en adelante denominado **HA sosa**) se basó en el procedimiento descrito en la figura 21, el cual está basado en el procedimiento previamente descrito en Vilariño Feltrer, 2015.

En primer lugar se procedió a la preparación de una solución acuosa de hidróxido sódico (NaOH; 131687, Panreac) 0,2M mediante adición de pequeñas esferas o *pellets* de NaOH en agua ultrapura (Mili-Q®), removiendo la solución hasta lograr la disolución completa de los *pellets*.

A continuación se elaboró una disolución de HA derivado de *streptococcus equi* (HA; 53747, Sigma-Aldrich) al 5% en masa (*wt/wt*) en la solución acuosa de NaOH 0,2M preparada con anterioridad. Esta disolución de HA en medio básico permaneció en vaivén (60 revoluciones/minuto) durante 24 horas en condiciones normales de temperatura y presión (CNTP, 25°C, 100 kPa) con el objetivo de limitar el efecto de hidrólisis de los enlaces glicosídicos que tiene el NaOH sobre el HA. Aun así, en estudios previos se observó que este proceso de hidrólisis reduce el peso molecular de las cadenas de HA de los 1.5-1.8 MDa que tiene en origen hasta aproximadamente los 0,5 MDa (Vilariño Feltrer, 2015).

Se debe tener en cuenta que esta disolución del HA en NaOH es necesaria para poder realizar la posterior reacción de entrecruzamiento con DVS, la cual requiere de un pH mayor a 12 para

producirse (Perez Garnes, 2015). Además, también es necesaria para que la disolución sea lo suficientemente fluida (poco viscosa) como para poder ser inyectada en los moldes que darán la forma de membranas o NGCs.

A continuación se procedió a la homogenización de la disolución mediante agitación en un agitador magnético en CNTP durante 20 minutos. Finalmente se mezcló la disolución con el entrecruzador divinil sulfona (DVS; V3700, Sigma-Aldrich) en una proporción molar de 9:10 respecto del HA (9 moles de DVS por cada 10 unidades monoméricas de HA). Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 10 segundos para lograr el correcto mezclado de la misma y empezar así el proceso de entrecruzamiento.

Llegados a este punto se procedió a la inyección del material mediante pipeteado en el molde correspondiente según se deseara obtener membranas o NGCs. Por tanto, el proceso continúa según lo indicado en el apartado 4.1.4. en el caso de la preparación de membranas, o según lo indicado en el apartado 4.1.5. en el caso de la preparación de NGCs.

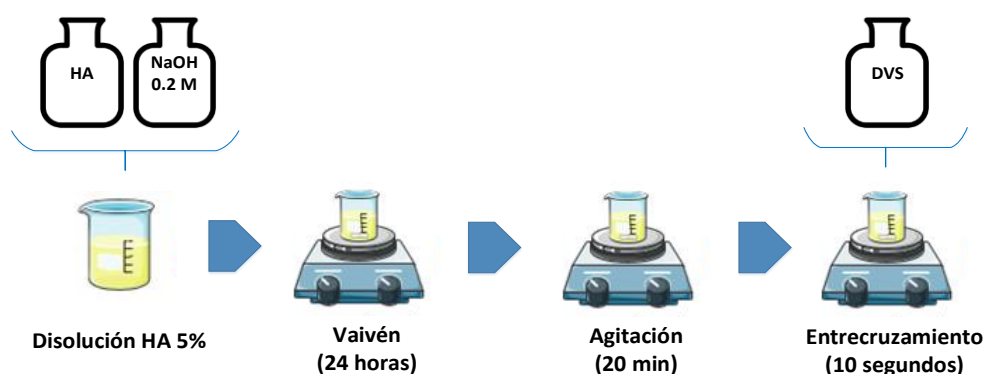


Figura 21. Proceso de preparación del HA disuelto en medio básico y entrecruzado con DVS: *HA sosa* (producción propia)

4.1.1.1. Fracción másica de los distintos componentes

4.1.1.1.1. Muestras no lavadas previamente

En este apartado se obtienen las fracciones másicas de los distintos componentes (HA, NaOH y DVS) de los que se compone una muestra de *HA sosa* que no haya sufrido un proceso de hinchado en agua. Para ello se calcula la masa existente para cada uno de los componentes suponiendo el uso de 1 g de disolución de HA 5% en NaOH 0,2M, siguiendo las proporciones descritas en el apartado 4.1.1.:

- HA

En 1 g de disolución de HA 5% en NaOH hay presentes 50 mg de HA. No obstante, dado que el HA está disuelto en NaOH, se debe considerar que cada molécula de HA va a sufrir la sustitución de un átomo de H por un átomo de Na (figura 16). Dado que la masa molar del *HA puro* es de 379 g/mol, de cada 379 g se perderá 1 g de H. Así se obtiene que de los 50 mg de HA introducidos se perderán 0,13 mg de H. Dado que la masa molar del hidrógeno es de 1 g/mol, esto representa

la pérdida de $0,13 \cdot 10^{-3}$ moles de H. Ya que la cantidad de moles de H perdidos será igual a la cantidad de moles de Na ganados y que la masa molar del Na es de 23 g/mol, se obtiene que en total se han ganado 2,99 mg de Na. Esto hace que la masa total de HA tras haberse producido la sustitución de un átomo de H por otro de Na en cada una de las moléculas sea de 52.86 mg de HA.

- **NaOH**

En 1 g de disolución de HA 5% en NaOH hay presentes 950 mg de NaOH 0,2M. Dado que esta disolución presenta un contenido en NaOH del 0,8%, en total se encuentran 7,6 mg de NaOH.

- **DVS**

Para realizar el entrecruzamiento de 1 g de disolución de HA 5% en NaOH son necesarios 11,23 μl de DVS. Dado que la densidad del DVS es de $1,177 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$, se obtiene que se han añadido 13,22 mg de DVS.

Una vez conocida la masa presente de cada uno de los componentes se puede calcular la fracción másica (ω) de cada uno de ellos.

Nota: Se ha considerado que en cada molécula de HA se ha producido la sustitución de un átomo de H por uno de Na perteneciente al NaOH, por eso la suma de todas las fracciones másicas es superior al 100%.

Nota: No se tiene en cuenta el contenido en agua que pueda quedar retenido en el material.

Ecuación 1

$$\omega_{HA} = \frac{m_{HA}}{m} = \frac{m_{HA}}{m_{HA} + m_{NaOH} + m_{DVS}} = \frac{52,86 \text{ mg}}{50 \text{ mg} + 7,6 \text{ mg} + 13,22 \text{ mg}} = 74,64\%$$

Ecuación 2

$$\omega_{NaOH} = \frac{m_{NaOH}}{m} = \frac{m_{NaOH}}{m_{HA} + m_{NaOH} + m_{DVS}} = \frac{7,6 \text{ mg}}{50 \text{ mg} + 7,6 \text{ mg} + 13,22 \text{ mg}} = 10,73\%$$

Ecuación 3

$$\omega_{DVS} = \frac{m_{DVS}}{m} = \frac{m_{DVS}}{m_{HA} + m_{NaOH} + m_{DVS}} = \frac{13,22 \text{ mg}}{50 \text{ mg} + 7,6 \text{ mg} + 13,22 \text{ mg}} = 18,67\%$$

4.1.1.1.2. Muestras lavadas previamente

En el caso de que la muestra haya sufrido un proceso de hinchado en agua, se deberá tener en cuenta que esto producirá un lavado del material que retirará los reactivos no reaccionados y los restos de NaOH, lo cual alterará ligeramente las proporciones del material.

Para obtener las fracciones másicas de los componentes en este caso se debe considerar que, excepto los átomos de Na que hayan quedado unidos al HA, el resto de contenido de NaOH desaparecerá al lavar, así como los átomos de H que hayan sido sustituidos. Asimismo también debe considerarse que solamente permanecerá el contenido de DVS entrecruzado, desapareciendo todo el DVS que no lo esté. Dado que la relación molar entre HA y DVS es de 2 a 1 (por cada 2 moles de HA quedará 1 mol de DVS) y suponiendo que la eficiencia de la reacción es del 100% por introducirse el DVS en exceso, se puede obtener la masa de DVS que se entrecruzarará del siguiente modo:

Ecuación 4

$$\begin{aligned} m_{DVS} &= M_{DVS} \cdot n_{DVS} = M_{DVS} \cdot \frac{n_{HA}}{2} = M_{DVS} \cdot \frac{m_{HA}}{2} = \\ &= 118 \frac{g}{mol} \cdot \frac{52,86 \cdot 10^{-3} g}{2 \cdot 401 \frac{g}{mol}} = 7,78 \text{ mg DVS} \end{aligned}$$

Una vez conocida la masa de DVS que ha entrecruzado ya se puede calcular la fracción másica de los dos componentes de estas muestras (HA y DVS).

Ecuación 5

$$\omega_{HA} = \frac{m_{HA}}{m} = \frac{m_{HA}}{m_{HA} + m_{DVS}} = \frac{52,86 \text{ mg}}{52,86 + 7,78 \text{ mg}} = \mathbf{87,17\%}$$

Ecuación 6

$$\omega_{DVS} = \frac{m_{DVS}}{m} = \frac{m_{DVS}}{m_{HA} + m_{DVS}} = \frac{7,78 \text{ mg}}{52,86 + 7,78 \text{ mg}} = \mathbf{12,83\%}$$

Nota: No se tiene en cuenta el contenido en agua que pueda quedar retenido en el material.

4.1.2. HA combinado con SF

El procedimiento para la elaboración de los biomateriales basados en la combinación de HA con SF se muestra en la figura 22. Este procedimiento es análogo el explicado en el apartado 4.1.1. con la excepción de que, tras haber tenido la disolución de HA 5% en NaOH 0,2M en vaivén durante 24 horas, se procedió a la mezcla de esta disolución con fibroína de seda obtenida de *Bombyx mori* (SF; Profesor Gustavo Guinea, Universidad Politécnica de Madrid). En este punto se prepararon mezclas con dos concentraciones diferentes de SF: por un lado con una concentración de SF del 1.5% masa/volumen (de ahora en adelante denominada **HA + 15% SF**) y, por otro lado, una concentración de SF del 3% masa/volumen (de ahora en adelante denominada **HA + 30% SF**). A continuación el proceso continúa igual que en 4.1.1., realizando una homogenización de la disolución mediante agitación durante 20 minutos y el entrecruzamiento con DVS.

Llegados a este punto se procedió a la inyección del material mediante pipeteado en el molde correspondiente según se deseara obtener membranas o NGCs. Por tanto, el proceso continúa según lo explicado en el apartado 4.1.4. en el caso de la preparación de membranas, y según lo explicado en el apartado 4.1.5. en el caso de la preparación de NGCs.

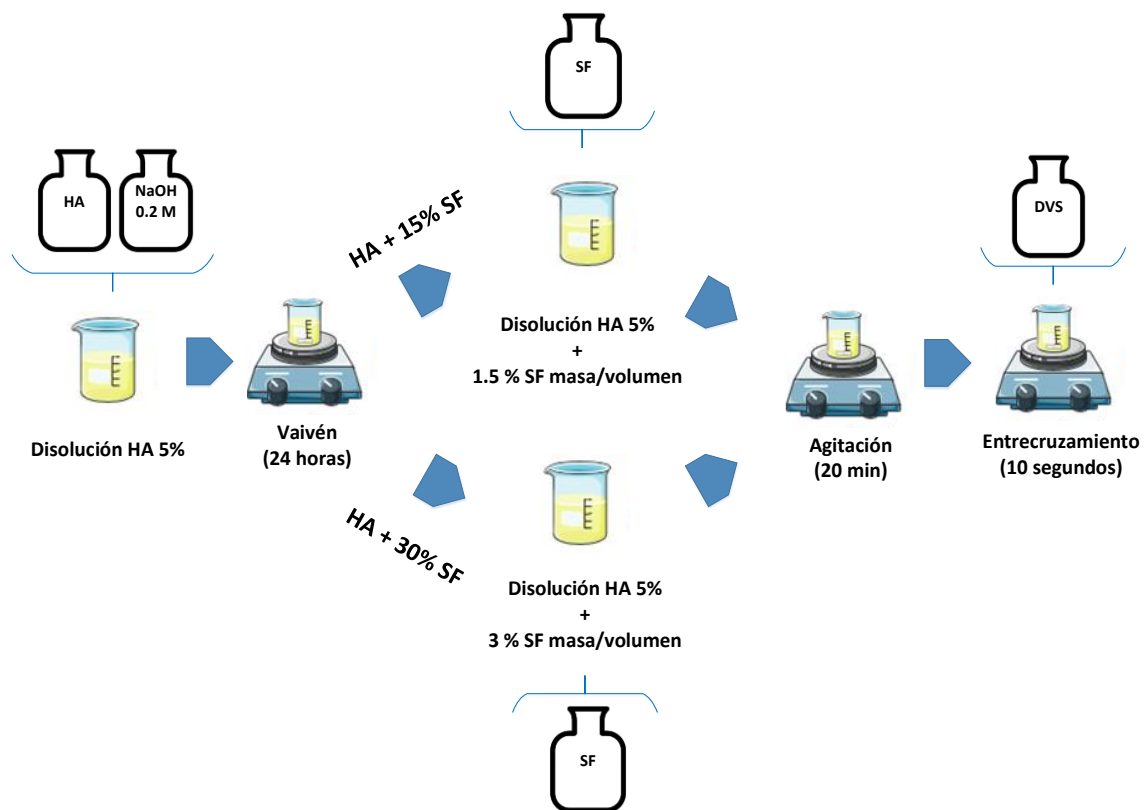


Figura 22. Proceso de preparación del HA en combinación con SF: HA + 15% SF y HA + 30% SF (producción propia)

4.1.2.1. Fracción másica de los distintos componentes

4.1.2.1.1. Muestras no lavadas previamente

Dado que la cantidad de SF solamente se añade a las cantidades de HA, NaOH y DVS calculadas en el apartado 4.1.1.1.1., solamente es necesario conocer la masa de SF añadida. De acuerdo a las proporciones indicadas en el apartado 4.1.2. del 1.5% masa/volumen para las muestras de HA + 15% SF y del 3% masa/volumen para las muestras de HA + 30% SF, en 1 g de disolución de HA 5% en NaOH 0,2M que corresponde a un volumen de 1 ml se añaden 15 mg y 30 mg de SF, respectivamente. Una vez conocido esto ya se pueden calcular las fracciones másicas de HA, NaOH, DVS y SF del material.

Nota: Se ha considerado que en cada molécula de HA se ha producido la sustitución de un átomo de H por uno de Na perteneciente al NaOH, por eso la suma de todas las fracciones másicas es superior al 100%.

Nota: No se tiene en cuenta el contenido en agua que pueda quedar retenido en el material.

❖ HA + 15% SF

Ecuación 7

$$\omega_{HA} = \frac{m_{HA}}{m} = \frac{m_{HA}}{m_{HA} + m_{NaOH} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{52,86 \text{ mg}}{50 \text{ mg} + 7,6 \text{ mg} + 13,22 \text{ mg} + 15 \text{ mg}} = 61,59\%$$

Ecuación 8

$$\omega_{NaOH} = \frac{m_{NaOH}}{m} = \frac{m_{NaOH}}{m_{HA} + m_{NaOH} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{7,6 \text{ mg}}{50 \text{ mg} + 7,6 \text{ mg} + 13,22 \text{ mg} + 15 \text{ mg}} = 8,86\%$$

Ecuación 9

$$\omega_{DVS} = \frac{m_{DVS}}{m} = \frac{m_{DVS}}{m_{HA} + m_{NaOH} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{13,22 \text{ mg}}{50 \text{ mg} + 7,6 \text{ mg} + 13,22 \text{ mg} + 15 \text{ mg}} = 15,40\%$$

Ecuación 10

$$\omega_{SF} = \frac{m_{SF}}{m} = \frac{m_{SF}}{m_{HA} + m_{NaOH} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{15 \text{ mg}}{50 \text{ mg} + 7,6 \text{ mg} + 13,22 \text{ mg} + 15 \text{ mg}} = 17,48\%$$

❖ HA + 30% SF

Ecuación 11

$$\omega_{HA} = \frac{m_{HA}}{m} = \frac{m_{HA}}{m_{HA} + m_{NaOH} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{52,86 \text{ mg}}{50 \text{ mg} + 7,6 \text{ mg} + 13,22 \text{ mg} + 30 \text{ mg}} = 52,43\%$$

Ecuación 12

$$\omega_{NaOH} = \frac{m_{NaOH}}{m} = \frac{m_{NaOH}}{m_{HA} + m_{NaOH} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{7,6 \text{ mg}}{50 \text{ mg} + 7,6 \text{ mg} + 13,22 \text{ mg} + 30 \text{ mg}} = 7,54\%$$

Ecuación 13

$$\omega_{DVS} = \frac{m_{DVS}}{m} = \frac{m_{DVS}}{m_{HA} + m_{NaOH} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{13,22 \text{ mg}}{50 \text{ mg} + 7,6 \text{ mg} + 13,22 \text{ mg} + 30 \text{ mg}} = 13,11\%$$

Ecuación 14

$$\omega_{SF} = \frac{m_{SF}}{m} = \frac{m_{SF}}{m_{HA} + m_{NaOH} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{30 \text{ mg}}{50 \text{ mg} + 7,6 \text{ mg} + 13,22 \text{ mg} + 30 \text{ mg}} = 29,76\%$$

4.1.2.1.2. Muestras lavadas previamente

Como en el caso anterior de HA sosa, en el caso de que la muestra haya sufrido un proceso de hinchado en agua se producirá una pérdida de los reactivos no reaccionados, así como de los restos de NaOH, lo cual alterará ligeramente las proporciones anteriores. Dado que la cantidad de SF solamente se añade a las cantidades de HA y DVS calculadas en el apartado 4.1.1.1.2., solamente es necesario conocer la masa de SF añadida, la cual es la misma que para las muestras no lavadas previamente.

Nota: No se tiene en cuenta el contenido en agua que pueda quedar retenido en el material.

❖ HA + 15% SF

Ecuación 15

$$\omega_{HA} = \frac{m_{HA}}{m} = \frac{m_{HA}}{m_{HA} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{52,86 \text{ mg}}{52,86 \text{ mg} + 7,78 \text{ mg} + 15 \text{ mg}} = 69,88\%$$

Ecuación 16

$$\omega_{DVS} = \frac{m_{DVS}}{m} = \frac{m_{DVS}}{m_{HA} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{7,78 \text{ mg}}{52,86 \text{ mg} + 7,78 \text{ mg} + 15 \text{ mg}} = 10,29\%$$

Ecuación 17

$$\omega_{SF} = \frac{m_{SF}}{m} = \frac{m_{SF}}{m_{HA} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{15 \text{ mg}}{52,86 \text{ mg} + 7,78 \text{ mg} + 15 \text{ mg}} = \mathbf{19,83 \%}$$

❖ **HA + 30% SF**

Ecuación 18

$$\omega_{HA} = \frac{m_{HA}}{m} = \frac{m_{HA}}{m_{HA} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{52,86 \text{ mg}}{52,86 \text{ mg} + 7,78 \text{ mg} + 30 \text{ mg}} = \mathbf{58,32\%}$$

Ecuación 19

$$\omega_{DVS} = \frac{m_{DVS}}{m} = \frac{m_{DVS}}{m_{HA} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{7,78 \text{ mg}}{52,86 \text{ mg} + 7,78 \text{ mg} + 30 \text{ mg}} = \mathbf{8,58\%}$$

Ecuación 20

$$\omega_{SF} = \frac{m_{SF}}{m} = \frac{m_{SF}}{m_{HA} + m_{DVS} + m_{SF}} = \frac{30 \text{ mg}}{52,86 \text{ mg} + 7,78 \text{ mg} + 30 \text{ mg}} = \mathbf{33,10\%}$$

4.1.3. Otros biomateriales

Con el objetivo de estudiar el efecto de la disolución del HA y de la SF en medio básico (NaOH) sobre sus propiedades térmicas, en los ensayos de análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) se estudiaron, además de los materiales previamente descritos (*HA sosa*, *HA + 15% SF* y *HA + 30% SF*), los siguientes materiales:

- **HA puro:** HA sin procesar de ningún modo.
- **HA agua:** Disolución de HA al 5% en masa (wt/wt) en agua desionizada. Esta disolución se mantuvo en vaivén (60 revoluciones/minuto) durante 24 horas en CNTP. Dado que para realizar el entrecruzamiento del HA con DVS es necesario tener un medio básico (pH > 12), este material no se entrecruzó con DVS. Por ello, tras las 24 horas en vaivén se procedió a su vertido mediante pipeteado en una placa de politetrafluoroetileno (PTFE) para darle forma de membrana. Seguidamente fue congelada y liofilizada con los mismos parámetros que el resto del membranas, según se describe en 4.1.4.
- **SF pura:** SF sin procesar de ningún modo.
- **SF agua:** Disolución de SF al 3% masa/volumen en agua desionizada. Esta disolución se homogeneizó mediante agitación en un agitador magnético en CNTP durante 20 minutos para posteriormente ser vertida mediante pipeteado en una placa de PTFE para darle forma de membrana. Seguidamente fue congelada y liofilizada con los mismos parámetros que el resto del membranas, según se describe en 4.1.4.

- **SF sosa:** Disolución de SF al 3% masa/volumen en NaOH 0,2M. Esta disolución se homogeneizó mediante agitación en un agitador magnético en CNTP durante 20 minutos para posteriormente ser vertida y repartida mediante pipeteado en una placa de PTFE para darle forma de membrana. Seguidamente fue congelada y liofilizada con los mismos parámetros que el resto del membranas, según se describe en 4.1.4.

4.1.4. Elaboración de las membranas

Como se muestra en la figura 23, para la obtención de membranas tanto de HA como de HA combinado con SF se procedió a la inyección del material mediante pipeteado en el interior de un molde de politetrafluoroetileno (PTFE) formado por dos caras planas situadas a ambos lados de una placa intermedia con forma de U. Así, al juntar ambas caras con la placa intermedia es posible introducir el material en su interior, el cual adoptará la misma forma que el espacio que queda libre gracias a la placa intermedia, es decir, una forma de membrana o *film*. Cabe destacar que en las dos caras planas externas del molde se realizaron agujeros pasantes de 1 mm de diámetro con el fin de permitir la salida del agua contenida en el interior del material durante su liofilización.

Tras la inyección del material en el molde este se dejó 1 hora en CNTP dentro de campana de flujo laminar para dejar tiempo hasta el entrecruzamiento completo del material (gelificación). Posteriormente se procedió a la congelación del material dejándolo en primer lugar durante 4 horas a una temperatura de -20°C y posteriormente durante 24 horas a una temperatura de -80°C para poder llevar a cabo la liofilización posterior del material. Una vez congelado el material se introdujo en liofilizadora (LyoQuest-85, Telstar Life Science) durante 24 horas a una temperatura de -80°C y una presión menor de 300 Pa. Finalmente, tras todo este proceso las diferentes partes del molde fueron separadas para proceder a la extracción de la membrana.

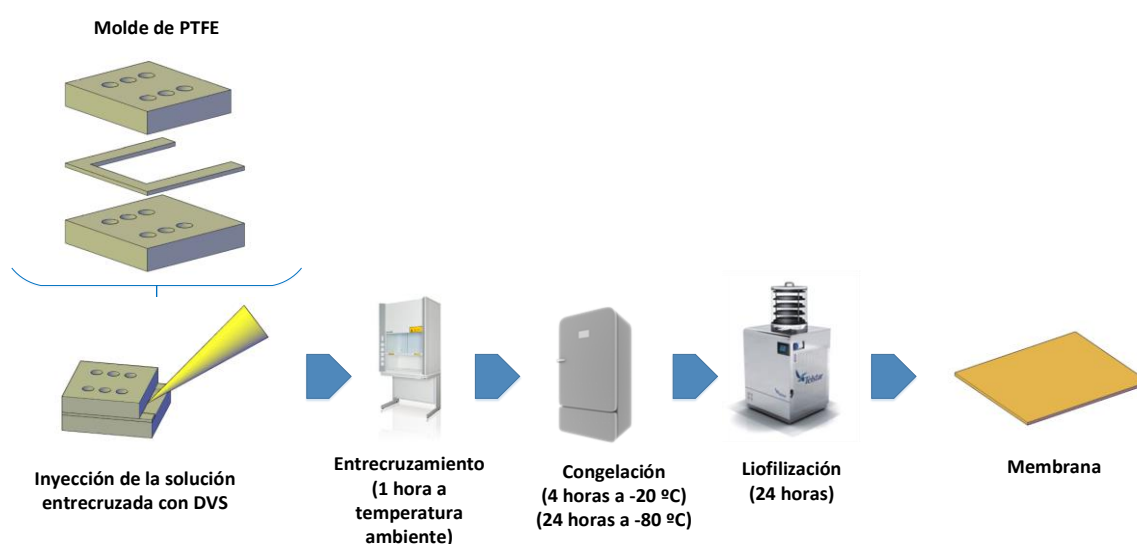


Figura 23. Proceso de elaboración de las membranas (producción propia)

4.1.4.1. Elección del tipo de molde

En cuanto al tipo de molde a emplear para la producción de las membranas, se estudiaron dos diseños diferentes: uno en que las caras planas eran macizas y otro en que estas se encontraban perforadas con 6 agujeros pasantes de 1 mm de diámetro para facilitar la salida del agua durante el proceso de liofilización del material (figura 24).

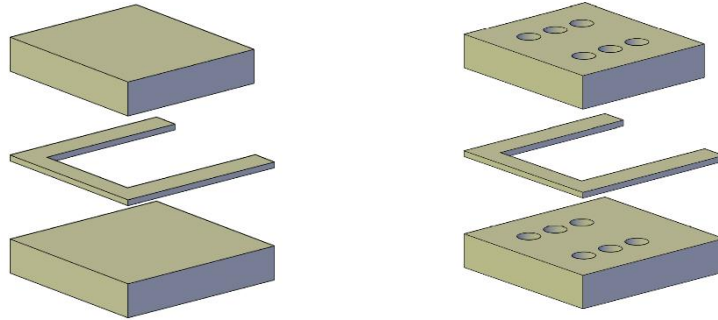


Figura 24. Representación de los dos tipos de moldes estudiados: molde con caras planas macizas (izquierda) y molde con caras planas agujereadas con agujeros pasantes de 1 mm de diámetro (derecha).

Para estudiar cuál era el tipo de molde más apropiado para la elaboración de las membranas se procedió a la fabricación de tres membranas de *HA sosa* y otras tres de *HA + 30% SF* con cada uno de los moldes, con el fin de observar las diferencias entre ambas. Las membranas fueron troqueladas en discos de 8 mm de diámetro e hinchadas durante 24 horas en agua desionizada, obteniendo los siguientes resultados cualitativos:

- **Discos de *HA sosa* elaborados con el molde sin agujeros:** Presentaron un nivel de hinchado ligeramente superior (mayor diámetro de los discos tras el hinchado en agua), pero presentando una superficie más irregular y con burbujas de aire retenidas en su interior. Además eran discos más frágiles, ya que se rompían con facilidad al cogerlos con pinzas.
- **Discos de *HA sosa* elaborados con el molde con agujeros:** Presentaron un nivel de hinchado ligeramente inferior (menor diámetro de los discos tras el hinchado en agua), pero su superficie era más lisa. En cuanto a su estructura, esta era más compacta, sin burbujas de aire retenidas en su interior. Además presentaban una menor fragilidad, pudiendo ser cogidos con pinzas sin llegar a romperse.
- **Discos de *HA + 30% SF* elaborados con el molde sin agujeros:** Presentaron una superficie más rugosa, perdiendo su circularidad tras el hinchado debido a un repliegue de los bordes. Además se rompían con facilidad al cogerlos con pinzas.
- **Discos de *HA + 30% SF* elaborados con el molde con agujeros:** Presentaron una superficie más lisa y una mayor circularidad tras el hinchado. Además podían ser cogidos con pinzas sin que llegaran a romperse.

En la figura 25 se muestra un disco representativo de cada uno de los casos estudiados.

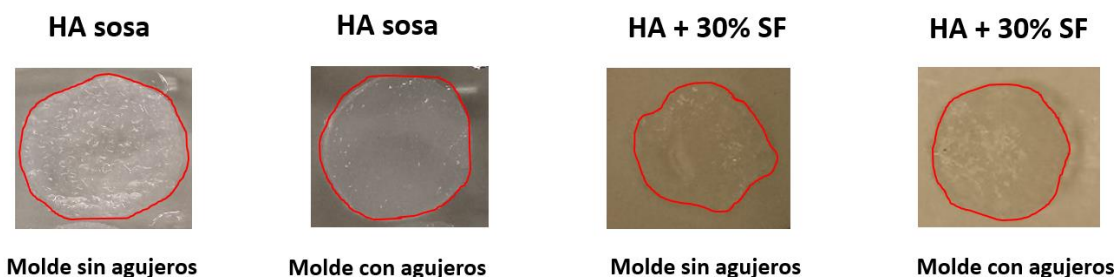


Figura 25. Fotografía de un disco representativo de cada uno de los casos estudiados: Discos de 8 mm de *HA sosa* y de *HA + 30% SF* fabricados con molde sin agujeros y con agujeros. En color rojo se marca el perímetro de los discos.

En conclusión, dado que los discos fabricados con el molde con agujeros presentaron una menor fragilidad, un menor contenido en burbujas de aire retenidas en su interior y una superficie más lisa, se optó por la utilización del molde con agujeros para la fabricación de las membranas de los distintos materiales.

4.1.5. Elaboración de los NGCs

Como se muestra en la figura 26, para la obtención de NGCs tanto de HA como de HA combinado con SF se procedió a la inyección del material mediante pipeteado en el interior de un molde de politetrafluoroetileno (PTFE) formado por canales alargados con un perfil cuadrado de 2 mm de lado. Para la formación del lumen se introdujo en el centro de cada canal una fibra de policaprolactona (PCL; Polysciences) de 1 mm de diámetro para adaptar el conducto a un modelo de lesión de nervio ciático de rata, cuyo diámetro se encuentra comprendido entre 1 y 1,5 mm (Isaacs, Mallu, Wo, & Little, 2014). No obstante, cabe indicar que estas dimensiones podrían ser modificadas en un futuro para adaptarse a otros modelos de lesión.

Las fibras de PCL se obtuvieron a partir de la extrusión de pequeñas esferas o *pellets* de este polímero. Esto se realizó mediante el uso de una miniextrusora (HAAKE MiniLab II, Thermo Scientific) en la que fueron introducidos los *pellets* y calentados hasta una temperatura superior a la de fusión del PCL (80°C). Una vez fundido el material se procedió a su extrusión a través de una boquilla con un diámetro adecuado para la obtención de fibras de entre 950 y 1050 μm de diámetro. Este material extruido fue recogido suavemente mediante un cilindro giratorio a su salida por la boquilla y enfriado hasta su solidificación de forma que se obtuvieron largas fibras sólidas de PCL con el diámetro deseado.

A ambos extremos de la fibra se insertó una envoltura con cinta de PTFE en forma de anillo con un grosor ligeramente superior a 2 mm para lograr así que, al presionar los extremos de la fibra sobre el interior del canal, esta quedara tensada y fijada en el centro del canal a la misma distancia aproximada de todas las paredes. Cabe destacar en este punto que dado que el molde está realizado con PTFE, el cual es un material hidrófobo, fue necesario ejercer una cierta presión durante el inyectado con la micropipeta para lograr así la entrada del material en todos los espacios del canal y, por tanto, conseguir obtener tubos sin deformaciones.

Tras la inyección del material en el molde este se dejó 10 minutos en CNTP dentro de campana de flujo laminar para dejar tiempo hasta el entrecruzamiento completo del mismo (gelificación). Cabe indicar que este tiempo es menor que para el caso de las membranas ya que se observó que la gelificación ocurría en un menor tiempo por ser canales con una menor cantidad de material. Posteriormente se procedió a su congelación y liofilización con los mismos parámetros empleados para las membranas. Por último se procedió a la separación de los conductos de dentro de los canales y a la extracción de las fibras de PCL de su interior (tubógenos), formándose así el lumen del conducto.

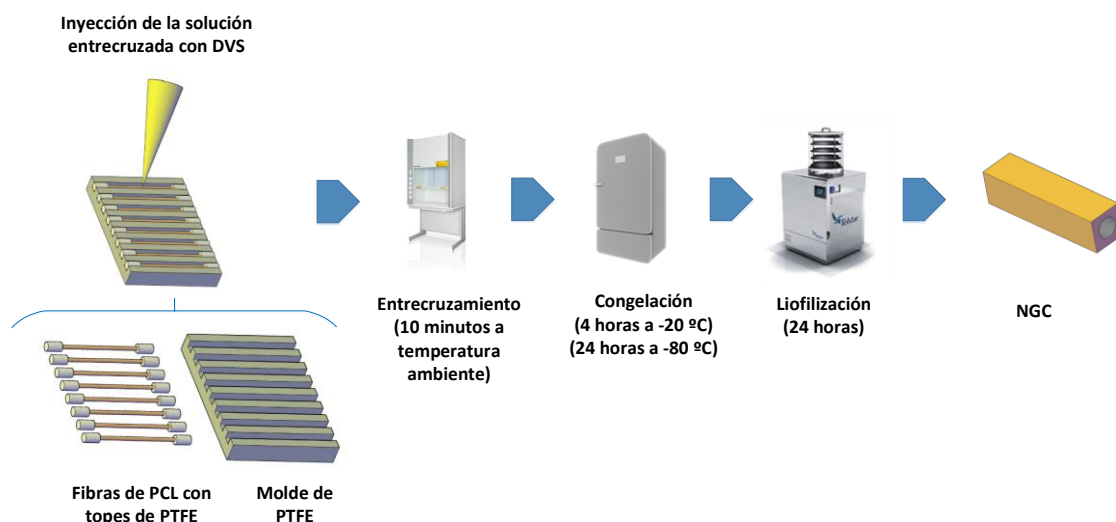


Figura 26. Proceso de elaboración de los NGCs (producción propia)

4.2. Caracterización de las propiedades físico-químicas

4.2.1. Estudio mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

4.2.1.1. Morfología superficial

Para la caracterización de la morfología superficial tanto de membranas como de NGCs se hizo uso de un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM; ULTRA 55, ZEISS Oxford Instruments). Este dispositivo actúa igual que un microscopio electrónico de barrido (SEM) convencional, en el sentido de que realiza un barrido de la superficie de la muestra con un haz de electrones, pero con la diferencia de que permite obtener mayores resoluciones.

Dado que el FESEM trabaja bajo condiciones de vacío para permitir la dispersión de los electrones, se realizó un desecado de las muestras liofilizadas en condiciones de vacío durante las 24 horas previas al ensayo para eliminar la máxima cantidad de agua posible de la muestra y así evitar interferencias durante el ensayo debidas a agua evaporada.

La preparación de las muestras consistió en primer lugar en su situación sobre una cinta de carbono sobre la que las muestras se quedaban fijadas. Esto se realizó sobre un soporte metálico circular perteneciente al equipo del FESEM. A continuación se procedió a la creación de un puente de carbono entre la muestra y la cinta de carbono y al recubrimiento de las muestras con una delgada capa de platino. Las muestras se observaron empleando un voltaje de 1 kV. En el caso de los NGCs se procedió a su corte de forma longitudinal y transversal para observar así el interior del lumen del conducto y la morfología de sus paredes.

El estudio se realizó con tres muestras diferentes ($n=3$) de *HA sosa* y de *HA + 30% SF* en forma tanto de membrana como de NGC.

4.2.1.2. Análisis elemental

Además de para la caracterización morfológica de las muestras, el FESEM se empleó para la realización de un análisis elemental de su superficie con el objetivo de corroborar la presencia de SF mediante el estudio del contenido en nitrógeno de las muestras. El análisis elemental se realizó de forma conjunta al estudio de morfología superficial ya que la preparación de las muestras era la misma, tanto para membranas como para NGCs. Este estudio proporcionó la fracción másica (ω) de nitrógeno, oxígeno, sodio y azufre en cada área de material seleccionada. El voltaje empleado fue de 1 kV.

El estudio se realizó con tres muestras diferentes ($n=3$) de *HA sosa* y de *HA + 30% SF*, en forma tanto de membrana como de NGC, de modo que los resultados se obtuvieron mediante el cálculo de la media de las tres muestras y su correspondiente desviación típica (SD).

4.2.2. Estabilidad frente a ciclos de hinchado y secado

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar la estabilidad en el tiempo del material frente a ciclos de hinchado y secado. Dado que ni la forma de la muestra ni la presencia de lumen es crucial para este experimento, se emplearon membranas liofilizadas troqueladas en forma de discos de 8 mm de diámetro (D_0) tanto de *HA sosa* como de *HA + 30% SF*. Así se estudió tanto la cantidad de masa no reticulada en los discos de ambos materiales a partir de la pérdida de masa como la capacidad de absorber agua a partir del aumento del diámetro de los discos.

Tras realizar el troquelado de las membranas liofilizadas en forma de discos de 8 mm de diámetro se procedió a la introducción de las muestras en desecador durante 6 horas, con vacío continuo y con una temperatura de 50°C para lograr evaporar la mayor cantidad de agua posible del material. A continuación se extrajeron los discos del desecador y se pesaron empleando una balanza (AX205, Mettler-Toledo Inc., sensibilidad de 0,01 mg), dando lugar a la medida m_0 . Tras ello se procedió al hinchado de los discos en agua desionizada durante 24 horas para así alcanzar el máximo nivel de hinchado. La medición de su diámetro dio lugar a la medida D_1 .

A continuación se realizó el proceso una segunda vez. En primer lugar las muestras se secaron al aire durante 6 horas para a continuación proceder a su introducción en desecador durante 6 horas, con vacío continuo y con una temperatura de 50°C para eliminar la mayor cantidad de agua posible. Después se extrajeron los discos del desecador y se pesaron, dando lugar a la

medida m . Finalmente los discos volvieron a hincharse en agua desionizada durante 24 horas para alcanzar el máximo nivel de hinchado. La medición de su diámetro dio lugar a la medida D_2 .

Para estudiar la pérdida de masa se empleó el parámetro $\frac{m}{m_0}$, mientras que para estudiar la capacidad de absorber agua se empleó el parámetro $\frac{D_i}{D_0}$ tanto para el primer hinchado ($i = 1$) como para el segundo hinchado ($i = 2$).

El procedimiento se repitió para 4 discos diferentes ($n=4$) de *HA sosa* y *HA + 30% SF*, de modo que los resultados se obtuvieron a partir del cálculo de la media de los datos obtenidos y de su correspondiente SD.

4.2.3. Cambio de dimensiones en hinchado

Con el objetivo de estudiar las características de hinchado de los NGCs, se procedió a analizar las dimensiones antes y después de la absorción de agua desionizada. Para ello se prepararon NGCs tanto de *HA sosa* como de *HA + 30% SF* con dos longitudes diferentes: muestras de aproximadamente 4 mm de longitud para estudiar el cambio en la longitud y muestras de 1 mm de longitud aproximadamente para estudiar los cambios en el diámetro del lumen y en el área de la sección transversal.

Las muestras se examinaron y fotografiaron mediante una lupa binocular (MZ APO, Leica Microsystems). En primer lugar se estudiaron las muestras en seco, adquiriendo imágenes de las muestras de 4 mm de longitud en dirección longitudinal para realizar la medición de la longitud del NGC y de las muestras de 1 mm de longitud en dirección transversal para realizar la medición del diámetro del lumen y de los lados de la sección cuadrada. Una vez se adquirieron las imágenes de las muestras en seco se procedió a su hinchado en agua desionizada durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se repitió el proceso seguido anteriormente para las muestras en seco, tomando imágenes longitudinales de las muestras de 4 mm de longitud y transversales de las muestras de 1 mm de longitud.

La medición de las dimensiones se realizó mediante el software de procesamiento de imagen ImageJ/FIJI (Schindelin et al., 2012). Las dimensiones (longitud, diámetro del lumen y lados de la sección cuadrada) en estado seco e hinchado se calcularon para 4 muestras diferentes de cada uno de los materiales estudiados. En este punto se calculó la variación de las dimensiones de los NGCs tras su hinchado en agua desionizada mediante los siguientes parámetros:

- **L/L₀**: Longitud en estado de hinchado (L) dividida entre la longitud en estado seco (L⁰).
- **D/D₀**: Diámetro del lumen en estado de hinchado (D) dividido entre el diámetro del lumen en estado seco (D₀).
- **A/A₀**: Área de la sección transversal en estado de hinchado (A) dividida entre el área de la sección transversal en estado seco (A₀). El área de la sección transversal se calculó multiplicando la longitud de dos de los lados del NGC (sin sustraer el área del lumen).

Los resultados se calcularon como la media \pm SD de estos tres parámetros para las 4 muestras estudiadas ($n=4$).

4.2.4. Densidad y porosidad

En lo relativo al estudio de la densidad y la porosidad, la morfología de la muestra estudiada es una característica determinante. Por ello, se emplearon muestras de NGCs en este estudio en lugar de membranas.

Para la realización del estudio de densidad y porosidad se empleó una balanza (AX205, Mettler-Toledo Inc., sensibilidad de 0,01 mg) equipada con un kit de medida de densidad. En la figura 27 se representa la instalación del kit de densidad y porosidad en la balanza.

En primer lugar se procedió a la colocación de la muestra sobre el plato superior del kit para realizar la medida de la masa del NGC en aire (m_a). A continuación se realizó la inmersión de la muestra en n-octano (n-octano; 412236, Sigma-Aldrich) mediante su introducción en un *ependorf* relleno con n-octano y su colocación bajo vacío durante 30 minutos con el objetivo de sustituir el aire del interior de los poros por n-octano. Tras la eliminación del n-octano del interior del lumen del conducto con ayuda de un papel absorbente se procedió a su colocación en el plato superior del kit para realizar así la medición de la masa del NGC con n-octano en los poros (m_p). Finalmente se relleno el recipiente del kit con n-octano y se colocó el NGC con n-octano en los poros en el plato inferior del kit, de modo que la muestra se hundía por gravedad y quedaba completamente sumergida en el n-octano y en contacto con la plataforma de medida. En este punto se procedió a la medición de la masa del NGC sumergido en n-octano (m_i).

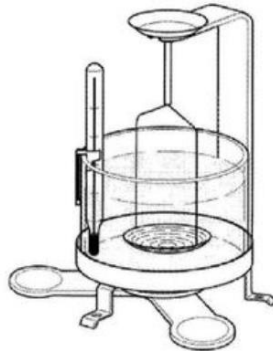


Figura 27. Representación de un kit de densidad y porosidad como el utilizado (OHAUS, n.d.)

Por el principio de Arquímedes, la densidad (ρ) de un cuerpo sumergido en n-octano se obtiene como:

Ecuación 21

$$\rho_{\text{cuerpo}} = \frac{m_{\text{cuerpo}}}{m_{\text{empuje}}} \cdot \rho_{\text{n-octano}}$$

Dado que se ha procedido a la medición de la masa de la muestra en el aire (m_a) y sumergida en n-octano con n-octano en los poros (m_i), la diferencia entre ambas masas se deberá a la masa de empuje (m_{empuje}) ejercida por el n-octano, obteniéndose la densidad como:

Ecuación 22

$$\rho_{muestra} = \frac{m_a}{m_a - m_i} \cdot \rho_{n-octano}$$

Siendo $\rho_{n-octano} = 0,703 \frac{g}{cm^3}$

A partir de la densidad se obtuvo el volumen específico (ϑ) como:

Ecuación 23

$$\vartheta_{muestra} = \frac{1}{\rho_{muestra}}$$

A continuación se calculó la porosidad (π) de los NGCs como:

Ecuación 24

$$\begin{aligned} \pi_{muestra} &= \frac{V_{poros}}{V_{total}} = \frac{V_{poros}}{V_{poros} + V_{material\ sin\ poros}} = \frac{\frac{m_{poros}}{\rho_{n-octano}}}{\frac{m_{poros}}{\rho_{n-octano}} + \frac{m_a}{\rho_{muestra}}} \\ &= \frac{\frac{m_p - m_a}{\rho_{n-octano}}}{\frac{m_p - m_a}{\rho_{n-octano}} + \frac{m_a}{\rho_{muestra}}} \end{aligned}$$

Este procedimiento se realizó para 4 muestras (n=4) de *HA sosa* y de *HA + 30% SF* con el objetivo de estudiar si la adición de la SF a los NGCs basados en HA produce cambios en la densidad o en la porosidad de los mismos. Para realizar la comparación entre NGCs se ha empleado el valor medio de las 4 réplicas para cada material con su SD correspondiente.

4.2.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

Con el objetivo de estudiar la degradación térmica de los materiales así como su composición se empleó un analizador termogravimétrico (TGA; TGA/SDTA 851 Mettler-Toledo operado mediante el programa *informático* STARexx). Para poder estudiar el efecto de la degradación en medio básico sobre la estabilidad térmica del HA se estudiaron muestras tanto de *HA sosa* y de *HA agua* en forma de membrana como de *HA puro*. Asimismo, para estudiar el mismo efecto sobre la SF se estudiaron muestras tanto de *SF sosa* y de *SF agua* en forma de membrana como de *SF pura*. Finalmente también se estudiaron muestras con combinación de HA y SF (*HA + 15% SF* y *HA + 30% SF*).

Como puede observarse en la figura 28, el procedimiento de calentamiento consistió en:

- Etapa de estabilización en que la muestra se mantuvo a una temperatura de 30°C durante 2 minutos.

- Rampa de calentamiento desde 30°C hasta 120°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min.
- Pre calentamiento consistente en mantener una temperatura de 120°C durante 30 minutos para así eliminar todo el contenido en agua. Esta etapa de pre calentamiento fue necesaria ya que se observó en estudios preliminares de TGA que un proceso de desecado de las muestras a vacío no era suficiente para eliminar el contenido en agua de las muestras, quedando en estas un contenido en agua que representaba alrededor del 15% de la masa total. En estos estudios preliminares se observó que todos los materiales comenzaban a degradar a temperaturas superiores a los 120°C, por lo que esta etapa de calentamiento no supone ningún tipo de degradación del material.
- Rampa de calentamiento desde 120°C hasta 720°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

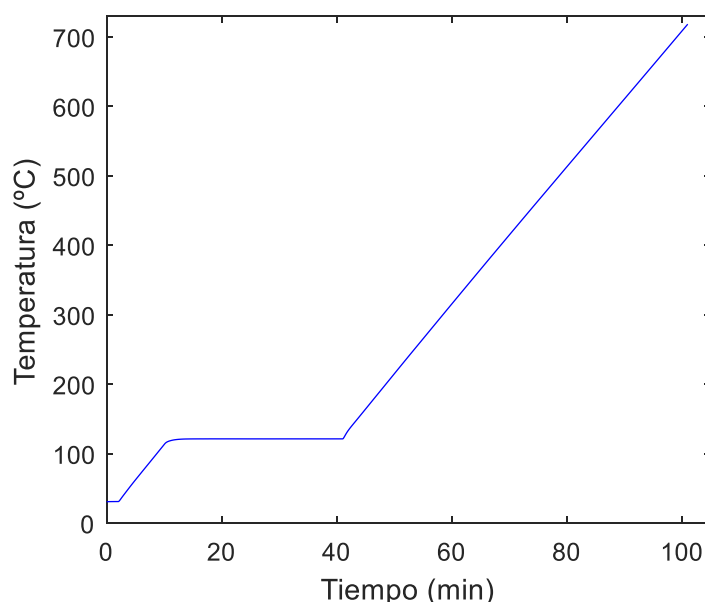


Figura 28. Procedimiento de calentamiento seguido en el análisis termogravimétrico (TGA) (producción propia)

Nota: El procedimiento se realizó bajo un flujo positivo de nitrógeno (N_2) de 20 ml/min.

Para la realización del ensayo de TGA se realizó en primer lugar una curva en blanco empleando un crisol de platino vacío siguiendo el procedimiento de calentamiento descrito anteriormente. Este blanco se restó automáticamente por el software en las medidas siguientes. A continuación se realizó el pesaje de los crisoles de platino que se iban a utilizar (vacíos) mediante la balanza interna del TGA. Posteriormente se introdujeron las muestras (con una masa de entre 2 y 4 mg) en los crisoles de platino pesados previamente y se realizó un nuevo pesaje de los crisoles con la muestra en su interior mediante la balanza interna del TGA. Finalmente se ejecutó el procedimiento de calentamiento descrito anteriormente sobre cada uno de los crisoles.

Así se obtuvieron curvas en las que se observa la pérdida de masa de la muestra en función de la temperatura. Para la realización de estas curvas se consideró como el 100% de masa la masa

existente al superarse por primera vez los 124°C, es decir, el punto final de la meseta de precalentamiento (aproximadamente el minuto 41). Este experimento se repitió para tres muestras diferentes (n=3) de cada uno de los materiales indicados anteriormente. Asimismo también se obtuvieron curvas representando la primera derivada de la masa respecto del tiempo, las cuales muestran la velocidad con la que se produce la pérdida de la masa. Los resultados se obtuvieron de realizar la media de los valores obtenidos para las tres muestras, indicando cada 30°C la SD correspondiente a estos tres valores.

4.2.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Con el objetivo de estudiar la interacción entre el HA y la SF se realizó una calorimetría diferencial de barrido (DSC 8000, PerkinElmer). Este experimento consiste en la medición de la cantidad de energía absorbida o liberada por una muestra cuando esta es calentada o enfriada en comparación con una referencia interna. Esto proporciona información sobre transiciones tanto exotérmicas como endotérmicas en función de la temperatura, lo que ayuda en la caracterización del material. Así, es posible detectar la existencia de alguna transición vítrea, medir temperaturas de fusión y cristalización así como medir capacidades caloríficas. Con el objetivo de estudiar la posible influencia de la degradación en medio básico sobre las propiedades térmicas del HA se estudiaron muestras tanto de *HA sosa* y de *HA agua* en forma de membrana como de *HA puro*. Asimismo, para estudiar el mismo efecto sobre la SF se estudiaron muestras tanto de *SF sosa* y de *SF agua* en forma de membrana como de *SF pura*. Finalmente también se estudiaron muestras con combinación de HA y SF (*HA + 15% SF* y *HA + 30% SF*).

El programa de temperaturas seguido fue el siguiente:

- Calentamiento desde 100°C hasta 120°C con una velocidad de calentamiento de 20°C/min.
- Etapa de precalentamiento con el objetivo de eliminar el agua retenida en el material. Esta etapa consistió en mantener la temperatura de 120°C durante 30 minutos.
- Etapa de enfriamiento o *cooling*. Enfriamiento desde 120°C hasta 30°C con una velocidad de enfriamiento de 20°C/min.
- Estabilización mediante mantenimiento de la temperatura de 30°C durante 2 minutos.
- Etapa de calentamiento o *heating*: Calentamiento desde 30°C hasta 150°C con una velocidad de calentamiento de 20°C/min. **Nota:** De acuerdo a los resultados que se obtuvieron del TGA, los materiales comenzaban su degradación en torno a los 200°C, por lo que se podría haber aumentado la temperatura final de la etapa de calentamiento hasta valores cercanos a esa temperatura. No obstante, para no correr el riesgo de que se produjera la liberación del material dentro del DSC, se decidió no superar los 150°C.

Para la realización del ensayo de DSC se realizó en primer lugar un blanco con una cápsula agujereada vacía que proporcionó la línea base tanto de *cooling* como de *heating*. A continuación se procedió al pesaje de la muestra (con una masa de entre 2 y 4 mg) empleando una balanza (AX205, Mettler-Toledo Inc., sensibilidad de 0,01 mg) y a su introducción en una cápsula de aluminio de 30µl agujereada. Esta cápsula agujereada con la muestra en su interior

se introdujo en el equipo junto con una cápsula vacía agujereada que ejercía de referencia. En este punto se procedió a la ejecución del programa de temperaturas indicado anteriormente.

Una vez realizado el ensayo se procedió a la sustracción de las líneas base tanto de *cooling* como de *heating* a sus procesos correspondientes mediante el programa informático del equipo. Finalmente se realizó una normalización de los datos obtenidos por la masa y por el coeficiente de enfriamiento/calentamiento (20°C/min) para poder realizar la comparación entre muestras. El equipo proporciona datos de flujos de calor o *heat flow* (HF) en mW. Con el objetivo de obtener un HF normalizado $\left(\frac{dq}{dT}\right)$ en $\frac{J}{g \cdot K}$ se realizó la conversión de unidades descrita en la ecuación 25.

Ecuación 25

$$\frac{dq}{dT} \left[\frac{J}{g \cdot K} \right] = HF [mW] \cdot \frac{1 W}{1000 mW} \cdot \frac{1 \frac{J}{s}}{1 W} \cdot \frac{1}{masa [mg]} \cdot \frac{1000 mg}{1 g} \cdot \frac{1 min}{20 K} \cdot \frac{60 s}{1 min} = HF [mW] \cdot \frac{3}{masa [mg]}$$

Cabe destacar que, dado que la pendiente de las curvas que proporciona el equipo es arbitraria, se realizó un rotación y una traslación de las curvas para que estas tuvieran aproximadamente la misma pendiente y se situaran de forma paralela y no superpuestas.

Este proceso se realizó para tres muestras diferentes (n=3) de cada uno de los materiales indicados previamente. En las curvas obtenidas no se observó ningún tipo de transición, ni endotérmica ni exotérmica. Al suceder esto y ser arbitraria la pendiente de las curvas carecía de sentido realizar una media de las curvas de un mismo material, por lo que en los resultados se muestra solamente una de las tres curvas de cada uno de los materiales. En caso de que hubiera existido alguna transición habría tenido sentido haber realizado, por ejemplo, la media de las áreas correspondientes a la transición para las muestras de un mismo material, pero no fue el caso en estos experimentos.

4.3. Caracterización de las propiedades mecánicas

Dado que el objetivo de este punto era la comparación de las propiedades mecánicas de los materiales estudiados (*HA sosa* frente a *HA + 30% SF*), se emplearon membranas en lugar de NGCs. Estos ensayos se realizaron con el material en estado de hinchado en agua desionizada durante las 24 horas previas a la realización del ensayo.

La prueba principal realizada fue con el reómetro, ya que es el instrumento que mejor permite la caracterización mecánica de hidrogeles en estado de hinchado. Además se realizaron otros intentos de caracterizar las características mecánicas de los hidrogeles mediante ensayos de tensión-deformación tanto en microtest (Microtest SCM3000 95, Microtest S.A.) como en analizador mecánico dinámico (DMA 8000, PerkinElmer) pero la gran fragilidad de las muestras en estado de hinchado no permitió una correcta sujeción de las mismas y, por tanto, los ensayos no pudieron llevarse a cabo. También cabe destacar que no se realizaron ensayos de compresión ya que el fin del material una vez implantado es estar sometido a esfuerzos de tracción, no de compresión. A esto se añade que al tratarse de hidrogeles, en un ensayo de compresión se mediría la fuerza que está ejerciendo el agua retenida más que la que ejerce el propio material.

4.3.1. Reómetro

La caracterización mecánica de los materiales se realizó empleando un reómetro (Discovery Hybrid Rheometer DHR, TA Instruments), con el objetivo de obtener las características del material al someterse a un esfuerzo de cizalladura y así estudiar el efecto de añadir la SF sobre el módulo de cizalladura (G) del material. En la figura 29 se muestra la disposición del reómetro para la realización del ensayo.

El primer paso para la realización del ensayo fue la colocación de papel de lija en la superficie de los dos discos del reómetro (ver figura 29) con el objetivo de que estos tuvieran un mejor agarre sobre la muestra durante el ensayo. Esto fue necesario ya que en las primeras pruebas se observó que existía un deslizamiento del disco superior al rotar sobre la muestra durante la realización del ensayo, lo cual daba lugar a errores en la medición. A continuación se procedió a la calibración completa del equipo y a la inserción de los parámetros del ensayo en el programa informático del mismo, los cuales se muestran en la tabla 7.

Parámetros reometría rotacional	
Ensayo	Amplitud de oscilación
Temperatura	25°C
Frecuencia de oscilación	1 Hz
Par de oscilación	10 – 100 $\mu\text{N} \cdot \text{m}$
Puntos por década	10

Tabla 7. Parámetros aplicados en los ensayos de reometría rotacional

Mediante estos parámetros el equipo es capaz de calcular G a través del esfuerzo de cizalladura (τ) aplicado por la rotación del disco superior y de la deformación de cizalladura (γ), mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 26

$$G = \frac{\tau}{\gamma}$$

Más concretamente el equipo calcula la parte real del módulo de cizalladura (G'), la cual se denomina módulo de almacenamiento y hace referencia a la componente elástica del material, y la parte imaginaria del módulo de cizalladura (G''), la cual se denomina módulo de pérdidas y hace referencia a la componente viscosa del material.

A continuación se realizó la colocación de la muestra a estudiar (membrana circular de 20 mm de diámetro) centrada en el disco inferior del equipo. Seguidamente se aproximó el disco superior hacia el disco inferior hasta producirse el contacto con la superficie de la muestra. Con el objetivo de asegurar un buen agarre de ambos discos con la muestra, el disco superior se aproximó una distancia adicional hacia el disco inferior correspondiente al 10% del espesor de la membrana, comprimiendo de esta forma la muestra ligeramente.

Una vez colocada y sujeta la muestra se realizó el ensayo, en el cual el disco superior del equipo rota sobre su eje longitudinal y ejerce sobre el material una fuerza de cizalladura.



Figura 29. Emplazamiento de una muestra en el reómetro (Nota: la geometría de la muestra mostrada en la fotografía es diferente a la empleada)

Cabe indicar que el diámetro de las muestras utilizadas era de 20 mm, mientras que el diámetro de los discos del reómetro es de 25 mm. Dado que el área de la muestra (A') era menor al área de los discos (A) fue necesario aplicar la corrección por área que se indica en la ecuación 27 para calcular el módulo de cizalladura.

Ecuación 27

$$G_{real} = G_{medido} \cdot \frac{A}{A'} = G_{medido} \cdot 1,5625$$

Un aspecto interesante de este ensayo es que, conociendo el módulo de cizalladura (G) y el coeficiente de Poisson (ν), es posible calcular el módulo de tracción (E) mediante la ecuación 28.

Ecuación 28

$$E = G \cdot \left(1 + \frac{2}{\nu}\right)$$

Además, en el caso de elastómeros como los hidrogeles estudiados que sean homogéneos e isótropos a nivel macroscópico puede asumirse que $\nu \approx 0,5$, por lo que E puede calcularse mediante la relación directa aproximada que se indica en la ecuación 29.

Ecuación 29

$$E \cong 3 \cdot G$$

Este estudio se repitió para tres muestras diferentes ($n=3$) de membranas de *HA sosa* y de *HA + 30% SF*. Los valores indicados en los resultados se obtuvieron de realizar una media de los tres resultados para cada tipo de material y del cálculo de su correspondiente SD, realizando así las gráficas que muestran la evolución de G' y G'' en función del par de oscilación (M).

4.4. Estudio de adhesión y proliferación celular

4.4.1. Cultivo de células de Schwann

El cultivo de células de Schwann de rata (rSCs; P10301, Innoprot) se realizó en muestras de 8 mm de diámetro de membranas de *HA sosa* y *HA + 30% SF*. Los pasos seguidos para realizar el cultivo y los materiales empleados se indican a continuación.

- **Esterilización y acondicionamiento de las membranas**

En primer lugar se realizó la esterilización de las membranas mediante su inmersión en etanol al 70% (ET00021000, Scharlab) durante 2 horas, en etanol al 50% durante 10 minutos y en etanol al 30% durante otros 10 minutos, todo ello realizado en el interior de una cabina de flujo laminar. A continuación se eliminaron los restos de etanol en las membranas mediante la realización de 3 lavados de 10 minutos con agua ultrapura (Mili-Q®).

A continuación se aplicaron dos tipos de acondicionamiento a las membranas con el objetivo de evaluar su efecto sobre el resultado de adhesión y proliferación celular. La mitad de membranas recibieron el acondicionamiento 1 (sin proteínas) y la otra mitad recibieron el acondicionamiento 2 (con proteínas).

- **Acondicionamiento 1 (PBS):** Inmersión de las membranas en tampón fosfato salino (PBS; 10010015, Thermo Scientific) e introducción en incubador (Forma 310 Direct Heat CO₂, Thermo Fisher Scientific) a 37°C durante 24 horas en una atmósfera húmeda conteniendo un 5% de CO₂.
- **Acondicionamiento 2 (medio de cultivo):** Inmersión de las membranas en medio de cultivo (Medio de Eagle modificado por Dulbecco con un alto nivel de glucosa (4.5 g/L) (DMEM; 21331020, Fisher), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS; 10270-106/A3381E, Fisher) y un 1% de penicilina/estreptomicina (P/S; 15140122, Fisher)) e introducción en incubador a 37°C durante 24 horas en una atmósfera húmeda conteniendo un 5% de CO₂.

- **Siembra y cultivo celular**

Tras la descongelación y expansión de las rSCs en un frasco de cultivo celular se procedió al lavado del mismo con PBS para eliminar las células muertas. A continuación se añadió una solución de tripsina/EDTA (T/E; 25200-072, Invitrogen) con el objetivo de romper las interacciones célula-matriz y célula-célula para así despegar las células del fondo del frasco de cultivo y entre ellas. Tras su introducción en incubador durante 3 minutos a 37°C se procedió a bloquear el efecto de la T/E mediante la adición del doble de volumen del medio de cultivo empleado para el acondicionamiento 2.

En este punto se procedió a la recolección del medio de cultivo con las células y a su centrifugación a 1080 rpm durante 5 minutos. Tras descartar el sobrenadante se resuspendió el *pellet* en medio de cultivo de células de Schwann (P60123, Innoprot). En este momento se recolectó una alícuota para realizar el recuento celular empleando una cámara Neubauer.

Una vez realizado el recuento celular se procedió a la siembra de la superficie de las membranas, las cuales estaban dispuestas en placas de 48 pocillos, con las rSCs en fase 5 con una densidad de siembra (D) de 10.000 células por membrana. A continuación se añadió de nuevo medio de cultivo de células de Schwann.

Finalmente se procedió a la introducción del cultivo en incubador a 37°C con una atmósfera húmeda conteniendo un 5% de CO₂ durante 1 y 5 días, renovando el medio de cultivo de células de Schwann cada 48 horas.

4.4.2. Inmunotinción

Sobre las rSCs cultivadas en las membranas de *HA sosa* y de *HA + 30% SF* se realizaron tinciones inmunocitoquímicas para realizar el marcaje de proteínas específicas y observar así la disposición celular. El procedimiento indicado a continuación se repitió tras 1 y 5 días de cultivo.

En primer lugar se procedió a la eliminación del medio de células de Schwann de los pocillos para, a continuación, realizar el lavado de las membranas con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS; P60305, Innoprot). Tras ello se fijaron las células con paraformaldehído al 4% (PFA; 47608, Sigma-Aldrich) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras el fijado de las células se realizaron 3 lavados de 10 minutos con DPBS para la eliminación de los restos de PFA.

A continuación se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas y a la permeabilización de la membrana celular mediante el uso de un tampón de bloqueo compuesto por DPBS con albúmina de suero bovino (BSA; A7906, Sigma-Aldrich) al 3% (35% en 0,85% NaCl, 71387, Sigma-Aldrich) y Tween20 al 0,1% (P1379, Sigma-Aldrich) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se procedió a la tinción de las células con falacidina 488 (B607, Invitrogen) a una dilución 1/200 durante 1 hora para la tinción de los filamentos de actina del citoesqueleto (color verde) y con DAPI (D9564, Sigma-Aldrich) a una dilución 1/5000 durante 10 minutos para lograr la tinción de los núcleos (color azul). La toma de imágenes se realizó con microscopio confocal (LEICA TCS SP5, Leica microsystems).

4.4.3. Procesamiento de las imágenes

Para realizar el cálculo del área total del citoesqueleto de las células (en μm^2) de las imágenes obtenidas por microscopía confocal gracias a la tinción con falacidina 488 se empleó el software de procesamiento de imagen ImageJ/FIJI (Schindelin et al., 2012). Se estudiaron 4 muestras diferentes (n=4) de membranas de *HA sosa* y de *HA + 30% SF* a las que se les había aplicado el preacondicionamiento 1 (PBS) y otras 4 muestras (n=4) de membranas de *HA sosa* y de *HA + 30% SF* a las que se les había aplicado el preacondicionamiento 2 (medio de cultivo). Los resultados se presentan en un diagrama de barras en el que se representa la media y la SD de

los cuatro datos para cada uno de los cuatro casos (membranas de *HA sosa* preacondicionadas con PBS, membranas de *HA sosa* preacondicionadas con medio de cultivo, membranas de *HA + 30% SF* preacondicionadas con PBS y membranas de *HA + 30% SF* preacondicionadas con medio de cultivo).

4.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados se expresan como la media \pm SD. En cuanto al análisis estadístico de los resultados, este se ha realizado mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney basado en la comparación de rangos empleando el programa informático *GraphPad Prism 6*. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con un asterisco (*), indicando un p-valor menor a 0,05.

Se ha escogido la realización de un test no paramétrico debido a que el número de muestras diferentes ensayadas en los experimentos es bajo (entre 3 y 4), lo cual hace que no se pueda aplicar un test de normalidad como, por ejemplo, el test de normalidad general D'Agostino-Pearson. Este hecho, sumado a que en la mayoría de casos los valores tanto de curtosis como de asimetría de los datos no se encontraban comprendidos en el rango [-2,2], hizo que no pudiera asumirse una distribución normal o Gaussiana de los datos. Por ello se optó por realizar un test no paramétrico que no requiriese esta asunción, como es el caso del test Mann-Whitney.

5. Resultados y discusión de los mismos

5.2. Membranas

5.2.1. Caracterización de las propiedades físico-químicas

5.2.1.1. Estudio mediante FESEM

5.2.1.1.1. Morfología superficial

Al visualizar las diferentes muestras de membranas de *HA sosa* y de *HA + 30% SF* se observó de forma cualitativa que las muestras con SF presentaban poros de mayor tamaño, así como una superficie más lisa, en comparación con las muestras sin SF. En la figura 30 se muestran imágenes de morfología superficial representativas de dos muestras diferentes de cada uno de los materiales. No obstante, cabe destacar que el tamaño de poro encontrado en las membranas no es representativo del que se encuentre posteriormente en los NGCs.

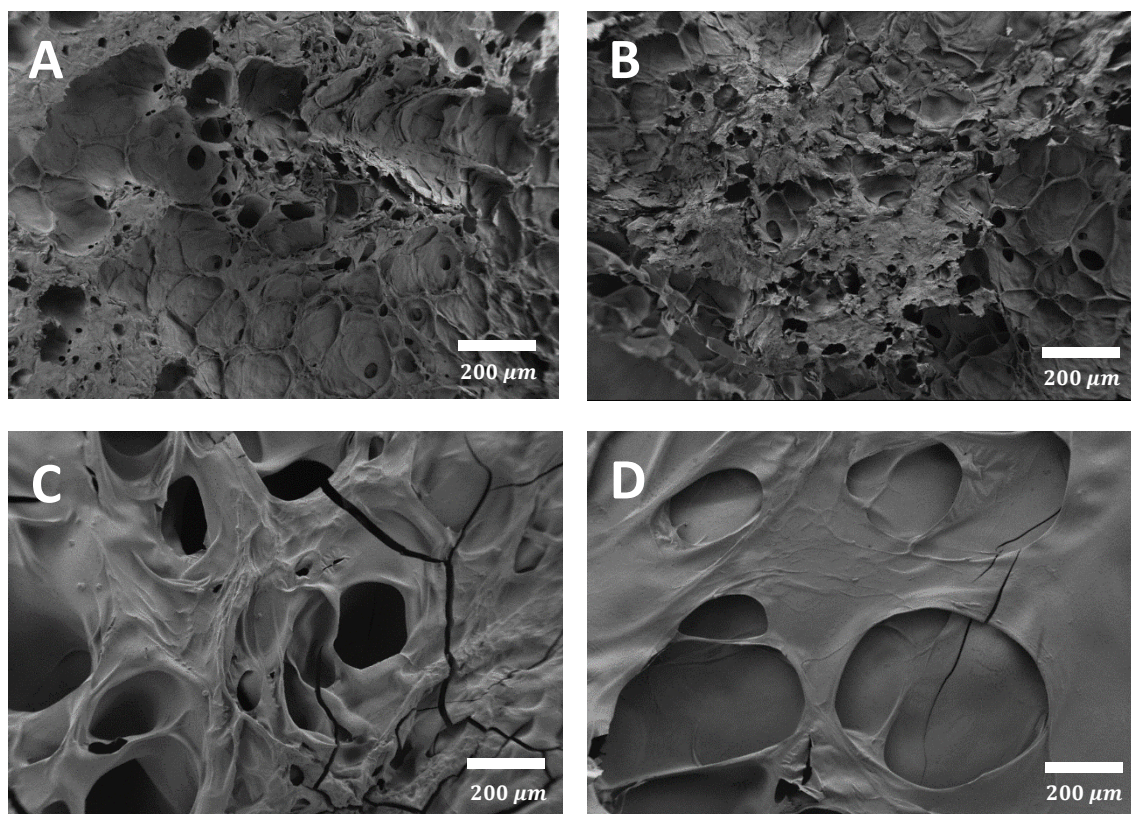


Figura 30. Imágenes de morfología superficial obtenidas mediante FESEM de dos muestras de membranas de *HA sosa* (A y B) y otras dos muestras de membranas de *HA + 30% SF* (C y D).

5.2.1.1.2. Análisis elemental

Dada la diferente composición química del HA y de la SF, se sabe que la SF presenta un mayor contenido en nitrógeno (N) que el HA. De forma teórica se puede obtener la diferente fracción másica de N (ω_N) en las muestras de membranas de *HA sosa* y de *HA + 30% SF* de la siguiente manera:

- **Membrana de HA sosa**

En base a la estructura química del HA ($C_{14}H_{21}NO_{11}$)_n se obtiene que su masa molar es de 379 g/mol. No obstante, dado que el HA se encuentra disuelto en NaOH, un átomo de hidrógeno del grupo carboxílico de la D-N-acetilglucosamina será sustituido por un átomo de sodio (ver figura 16) dando lugar a la estructura química ($C_{14}H_{20}NNaO_{11}$)_n. Por tanto, dado que en la disolución hay presentes más átomos de Na de los que puede absorber el HA, su masa molar tras ser disuelto en NaOH será de 401 g/mol ($M_{HA} = 401 Da$).

Dado que esta composición química presenta un único átomo de N, por cada mol de HA habrá 1 mol de N ($\frac{n_N}{n_{HA}} = 1$). En base a esto, y sabiendo que la masa molar del N es de 14 g/mol ($M_N = 14 Da$), se puede obtener la fracción másica de N en HA como:

Ecuación 30

$$\frac{m_{N,HA}}{m_{HA}} = \frac{n_N \cdot M_N}{n_{HA} \cdot M_{HA}} = \frac{14}{401} = 0,0349$$

Para poder obtener la fracción másica de N en el material, es necesario conocer la fracción másica de HA. Dado que se emplearon muestras de *HA sosa* no lavadas previamente (apartado 4.1.1.1.1.), la fracción másica de HA (ω_{HA}) es del 74,64%.

Nota: No se tiene en cuenta la presencia de agua retenida en el material ya que ésta es evaporada por completo en el FESEM.

Una vez conocida la fracción másica de HA se puede obtener la fracción másica de N en el material como:

Ecuación 31

$$\omega_{N,HA\ sosa} = \frac{m_N}{m} = \frac{m_{N,HA}}{m} = \frac{\frac{m_{N,HA}}{m_{HA}}}{\frac{m}{m_{HA}}} = \omega_{HA} \cdot \frac{m_{N,HA}}{m_{HA}} = 2,60\%$$

- **Membrana de HA + 30% SF**

En base a la estructura química de la SF ((Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala)_n) se obtiene que su masa molar es de 508,48 g/mol ($M_{SF} = 508,48 Da$). Dado que esta composición química presenta 6 átomos de N, por cada mol de SF habrá 6 moles de N ($\frac{n_N}{n_{SF}} = 6$). En base a esto, y sabiendo que la masa molar del N es de 14 g/mol ($M_N = 14 Da$), se puede obtener la fracción másica de N en SF como:

Ecuación 32

$$\frac{m_{N,SF}}{m_{SF}} = \frac{n_N \cdot M_N}{n_{SF} \cdot M_{SF}} = 6 \cdot \frac{14}{508,48} = 0,1652$$

Para poder obtener la fracción másica de N en el material, es necesario conocer las fracciones másicas de HA y de SF. Dado que se emplearon muestras de HA + 30% SF no lavadas previamente (apartado 4.1.2.1.1.), la fracción másica de HA (ω_{HA}) es del 52,43% y la de SF (ω_{SF}) del 29,76%.

Una vez conocidas las fracciones másicas de HA y de SF, ya se puede calcular la fracción másica de N en el material como:

Ecuación 33

$$\begin{aligned} \omega_{N,HA+30\%SF} &= \frac{m_N}{m} = \frac{m_{N,HA} + m_{N,SF}}{m} = \frac{\frac{m_{N,HA}}{m_{HA}}}{\frac{m}{m_{HA}}} + \frac{\frac{m_{N,SF}}{m_{SF}}}{\frac{m}{m_{SF}}} = \\ &= \omega_{HA} \cdot \frac{m_{N,HA}}{m_{HA}} + \omega_{SF} \cdot \frac{m_{N,SF}}{m_{SF}} = 1,83\% + 4,92\% = \mathbf{6,75\%} \end{aligned}$$

En base a los resultados teóricos anteriores es de esperar que la fracción másica de N para las muestras de HA *sosa* sea aproximadamente de un 2,60%, mientras que para las muestras de HA + 30% SF sea de aproximadamente de un 6,75%. En la figura 31 se muestran los resultados obtenidos en el análisis elemental realizado mediante FESEM. Como puede observarse, las muestras que contienen SF presentan un mayor contenido en N que las muestras que no las contienen, lo cual corrobora la presencia de la SF en las muestras de HA + 30% SF.

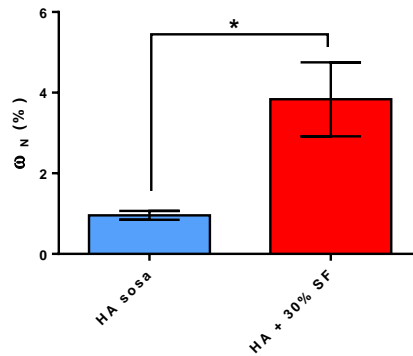


Figura 31. Fracción másica de nitrógeno obtenida con el análisis elemental de la superficie de membranas de HA *sosa* y de HA + 30% SF mediante FESEM.

En cuanto a las fracciones másicas obtenidas, estas son ligeramente inferiores a las esperadas de forma teórica, como se muestra en la tabla 8. No obstante, cabe destacar que el análisis elemental se realiza sobre áreas muy pequeñas de material, por lo que si la SF no se ha repartido de forma perfectamente homogénea, es de esperar que el valor de fracción másica de N pueda variar significativamente del teórico si se analiza un área que apenas contiene SF o un área en la que se haya acumulado la SF por algún motivo. Un indicativo de esto sería la gran dispersión de los datos, sobre todo para las muestras de HA + 30% SF. Además, hay que tener en cuenta que

el análisis elemental solamente estudia la superficie de las muestras, por lo que si por alguna razón se hubiera concentrado más N en el interior del material que en la superficie, también implicaría una diferencia entre la fracción másica de N obtenida de forma teórica y la obtenida de forma experimental.

Muestra	HA sosa	HA + 30% SF
ω_N teórica (%)	2,60	6,75
ω_N experimental (%)	0,96	3,84

Tabla 8. Fracción másica de nitrógeno obtenida de forma teórica y experimental mediante análisis elemental en muestras de membranas de HA sosa y de HA + 30% SF.

De forma teórica se sabe que en las muestras de HA + 30% SF la fracción másica de N correspondiente a la SF es del 4,92 %, mientras que la fracción másica de N correspondiente al HA es del 1,83%. De forma experimental se ha obtenido que la fracción másica de N de las muestras de HA es del 0,96%, lo cual implica que si extrapolamos este valor para las muestras de HA + 30% SF teniendo en cuenta que disminuiría alrededor de un 30% por la adición de SF, la fracción másica de N correspondiente al HA en las muestras de HA + 30% SF sería del 0,67%. Por tanto, esto conllevaría que, del 3,84% de N obtenido para las muestras de HA + 30% SF, un 0,67% pertenecería al N del HA y el otro 3,17% restante al N de la SF.

Esto hace que la proporción teórica entre la fracción másica de N correspondiente a la SF y la correspondiente al HA (ecuación 34) sea relativamente similar a la proporción experimental (ecuación 35). Por tanto, suponiendo que la pérdida de N se ha producido de forma similar tanto para el HA como para la SF, se obtiene que la proporción entre la fracción másica de SF y la de HA $\left(\frac{\omega_{SF}}{\omega_{HA}}\right)$ obtenida de forma experimental es similar a la teórica y, por tanto, el porcentaje de SF sería cercano al obtenido de forma teórica. El hecho de que se obtenga un resultado ligeramente superior para el caso experimental podría ser debido a que la SF se hubiera concentrado en mayor cantidad en la superficie del material, lo cual haría que la relación experimental entre la fracción másica de SF y la de HA fuera ligeramente superior a la teórica.

Ecuación 34

$$\left(\frac{\omega_{N,SF}}{\omega_{N,HA}}\right)_{teórica} = \frac{4,92 \%}{1,83 \%} = 2,7$$

Ecuación 35

$$\left(\frac{\omega_{N,SF}}{\omega_{N,HA}}\right)_{experimental} = \frac{3,17 \%}{0,67 \%} = 4,7$$

Finalmente, también se procedió a obtener los coeficientes entre la fracción másica de N y la de otros elementos presentes en los materiales como el sodio (Na), el oxígeno (O) y el azufre (S). Como se muestra en la figura 32, todos los coeficientes son significativamente superiores en las muestras de HA + 30% SF, comprobándose así la presencia de SF en estas muestras.

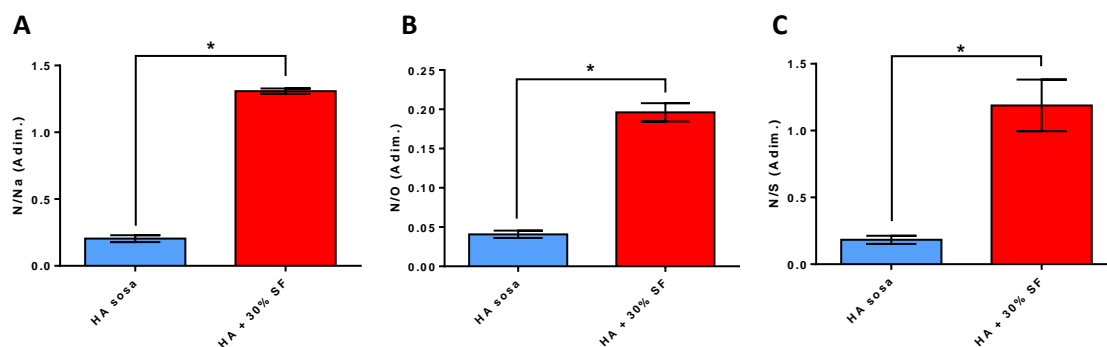


Figura 32. Coeficientes N/Na (A), N/O (B) y N/S (C) obtenidos con el análisis elemental de la superficie de membranas de HA sosa y de HA + 30% SF mediante FESEM.

Por tanto, la conclusión general de este estudio es que se ha podido comprobar la presencia de SF en las muestras de HA + 30% SF gracias a que éstas presentan un contenido en N significativamente mayor que las muestras de HA sosa. Además, pese a que la fracción másica de N total obtenida es ligeramente inferior a la teórica para los dos materiales estudiados, la proporción entre el contenido en N perteneciente a la SF y el perteneciente al HA $\left(\frac{\omega_{N,SF}}{\omega_{N,HA}}\right)$ experimental es similar a la teórica, lo que sería indicativo de que la proporción másica entre SF y HA $\left(\frac{\omega_{SF}}{\omega_{HA}}\right)$ de las muestras también sería cercana a la teórica.

5.2.1.2. Estabilidad frente a ciclos de hinchado y secado

El primer parámetro analizado en este estudio fue la pérdida de masa que sufrieron las muestras tras ser hinchadas en agua. Como puede observarse en la figura 33, no se apreciaron diferencias significativas entre las membranas de HA sosa y las de HA + 30% SF en cuanto a la pérdida de masa, ya que en ambos casos las muestras perdieron alrededor de un 30% de su masa inicial tras ser hinchadas en agua.

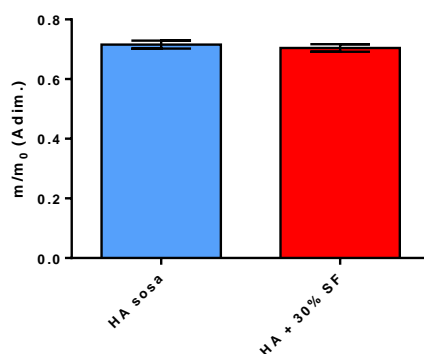


Figura 33. Pérdida de masa experimentada por muestras de HA sosa y de HA + 30% SF tras ser hinchadas en agua. Se expresa como la masa tras el hinchado y posterior desecado de la muestra (m) dividida entre la masa inicial de la misma en estado seco (m_0).

Esta pérdida de masa en las muestras durante el proceso de hinchado en agua es debida a la existencia de una fracción másica que no ha llegado a reticular. Por tanto, en este ensayo

obtenemos que ambos materiales presentan un porcentaje de masa sin reticular similar (alrededor del 30%). En el caso de las muestras de *HA sosa* puede deberse, tanto a la existencia de un porcentaje de HA que no ha llegado a entrecruzar con el DVS, como a la pérdida de NaOH. En cambio, en el caso de las muestras de *HA + 30% SF* habría que añadir a estas dos posibles causas una tercera que sería la pérdida de SF. No obstante, dado que en las muestras con SF es de esperar que la cantidad de HA sin entrecruzar y la pérdida de NaOH sea similar a las que no llevan SF, puede afirmarse que no se está produciendo una pérdida considerable de SF durante el proceso de hinchado en agua.

El segundo parámetro estudiado fue la relación entre el diámetro de los discos tras su hinchado en agua (D) en relación con el diámetro inicial de los mismos (D_0). En la figura 34 se muestra que, para ambos materiales, no existe una diferencia significativa entre el primer y el segundo hinchado en cuanto al aumento del diámetro de los discos. Esto es indicativo de que la capacidad de absorber agua de los materiales es estable en el tiempo frente a ciclos de hinchado y secado.

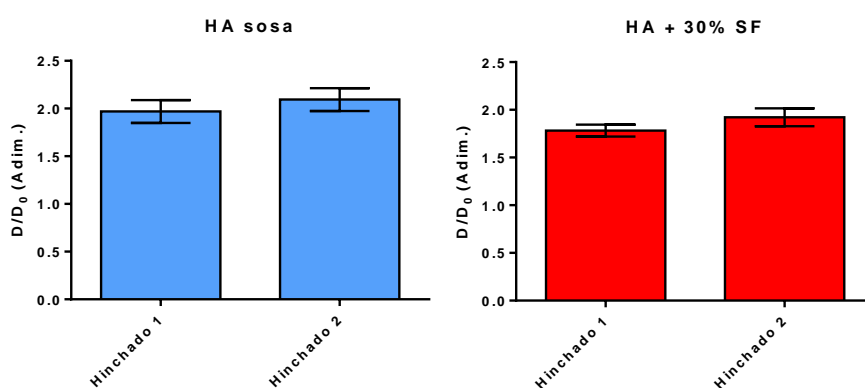


Figura 34. Incremento en el diámetro de los discos de *HA sosa* y de *HA + 30% SF* al ser hinchados en agua. Se expresa como la relación entre el diámetro de los discos tras su hinchado en agua (D) y su diámetro inicial en estado seco (D_0) para cada uno de los materiales estudiados.

Si se compara el aumento del diámetro de los discos experimentado en cada uno de los hinchados para ambos materiales (figura 35), se observa que no existe una diferencia significativa entre la capacidad de hinchado de las muestras de *HA sosa* y las de *HA + 30% SF*. Cabe indicar que parece existir una tendencia a que el hinchado de los discos con SF sea ligeramente inferior, pero no llega a ser estadísticamente significativa.

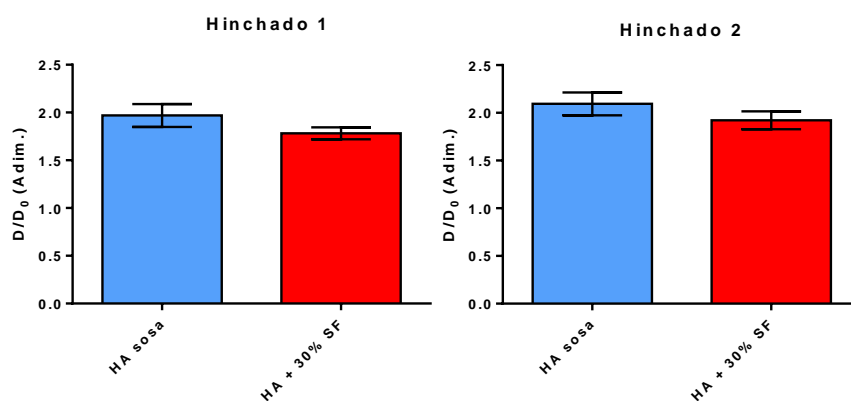


Figura 35. Incremento en el diámetro de los discos de *HA sosa* y de *HA + 30% SF* al ser hinchados en agua. Se expresa como la relación entre el diámetro de los discos tras su hinchado en agua (D) y su diámetro inicial en estado seco (D_0) para cada uno de los dos procesos de hinchado en agua realizados.

5.2.1.3. TGA

5.2.1.3.1. Análisis comparativo de los distintos materiales

❖ Muestras de HA

Como se muestra en la figura 36, el primer análisis termogravimétrico se realizó sobre los materiales basados en HA: membranas de *HA sosa* y de *HA agua* en comparación con *HA puro*. Como se observa, las curva obtenida para las membranas de *HA agua* se superpone a la del *HA puro*, lo cual es indicativo de que el HA no sufre ninguna degradación por su disolución en agua. En comparación, la curva obtenida para las membranas de *HA sosa* difiere significativamente de las otras dos, lo que indica que el HA sufre un proceso de degradación al ser disuelto en NaOH, es decir, en un medio básico.

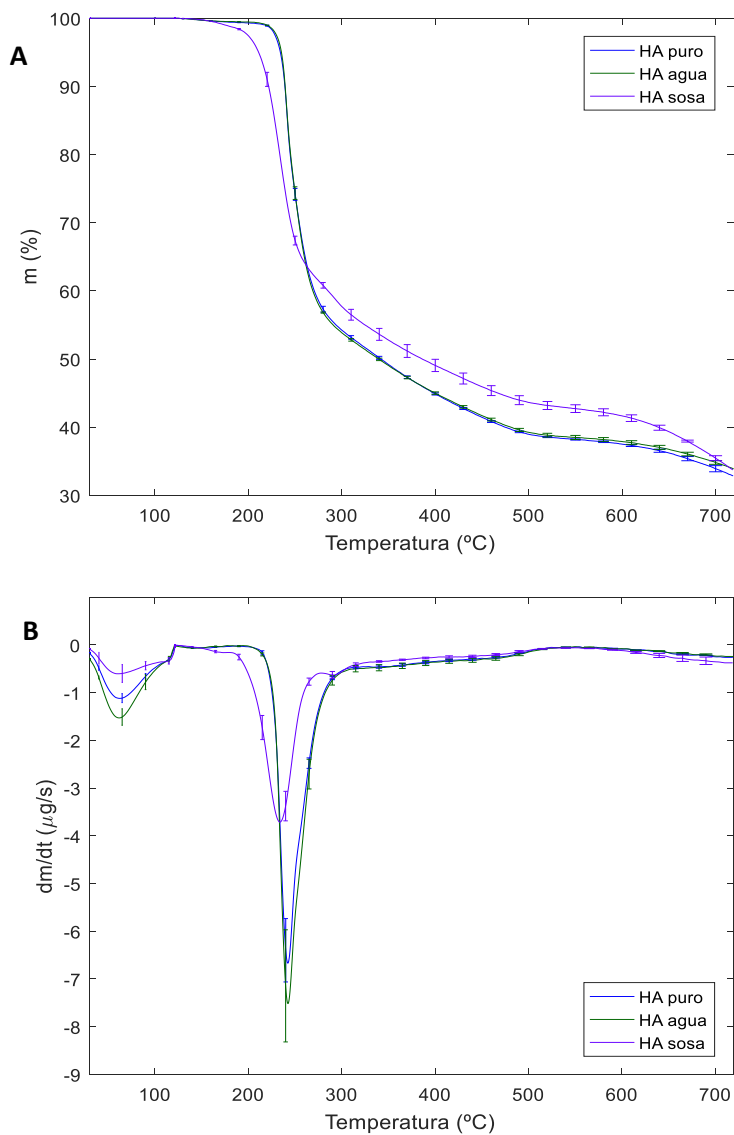


Figura 36. Termogramas de masa restante (A) y primera derivada de la masa respecto del tiempo (B) para los materiales *HA puro*, *HA agua* y *HA sosa*.

La primera diferencia que se observa en la figura 36 A es que la disolución del HA en medio básico produce que las muestras comiencen a degradar (a perder masa) a una temperatura de alrededor de los 160°C, mientras que el HA no degradado comienza a perder masa alrededor de los 220°C. También se aprecia que, por debajo de los 260°C, las muestras de *HA sosa* sufren una mayor degradación, mientras que a partir de esta temperatura las curvas se cruzan de forma que, para una misma temperatura, la pérdida de masa de las muestras de *HA sosa* es menor que la de las muestras de HA no degradado.

A continuación se explica en detalle en qué consiste el proceso de degradación del HA en medio básico.

- **Degradación del HA en medio básico**

Para realizar el entrecruzamiento con DVS, el HA debe estar sometido a un medio básico ($\text{pH} > 12$), lo cual se logra mediante la adición de hidróxido sódico (NaOH). Cuando el HA es sometido a un medio básico ($\text{pH} > 11$) o ácido ($\text{pH} < 4$), este sufre una degradación química irreversible (Maleki, Kjøniksen, & Nyström, 2008). Esta escisión o degradación del HA inducida por el pH se atribuye a la rotura de enlaces glicosídicos, la cual produce la rotura de las cadenas de HA generándose cadenas más pequeñas con un menor peso molecular (M_w) (Maleki et al., 2008). Por tanto, el hecho de que el HA pase a estar compuesto de cadenas poliméricas más pequeñas es lo que hace que varíe su estabilidad térmica y, por tanto, que cambie la forma en que el material pierde su masa al aumentar la temperatura. En la figura 37 puede observarse esta disminución del peso molecular del HA tanto en medio ácido ($\text{pH}=1$) como en medio básico ($\text{pH}=13$) en función del tiempo.

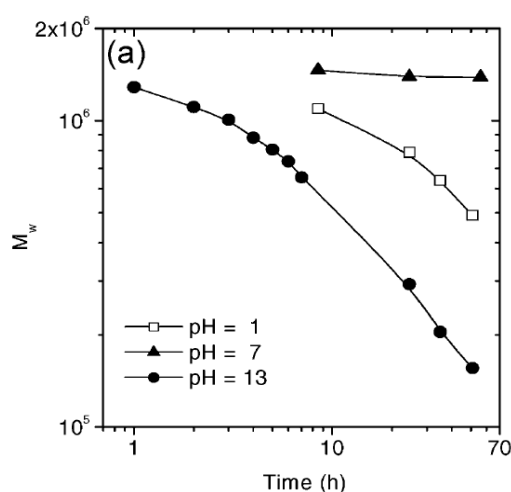


Figura 37. Evaluación temporal de la degradación de soluciones diluidas de HA en términos de peso molecular (M_w) en función del pH (Maleki et al., 2008).

Como se observa en la figura 37, la degradación del HA (escisión de las cadenas poliméricas) empieza rápidamente tras preparar la solución y continúa durante los tres días siguientes. Por tanto, cuanto mayor sea el tiempo que el HA permanece en un medio básico o ácido, mayor será su degradación y, por tanto, menor será el peso molecular de las cadenas poliméricas resultantes. Además, también puede apreciarse que el grado de degradación del HA es más marcado en un medio básico (pH alto) que en un medio ácido (pH bajo), presentándose una cinética de degradación del HA más rápida en medio básico.

En la figura 38 se muestra el mecanismo de escisión de un enlace glicosídico en medio básico. En una solución alcalina los oxígenos de los grupos hidroxilo son ionizados y, entonces, el anión de oxígeno C₂ que es trans al enlace glicosídico puede desplazar fácilmente el enlace de oxígeno C₁ para formar así un epóxido (B) entre los carbonos 1 y 2 (Rowell & Green, 1972).

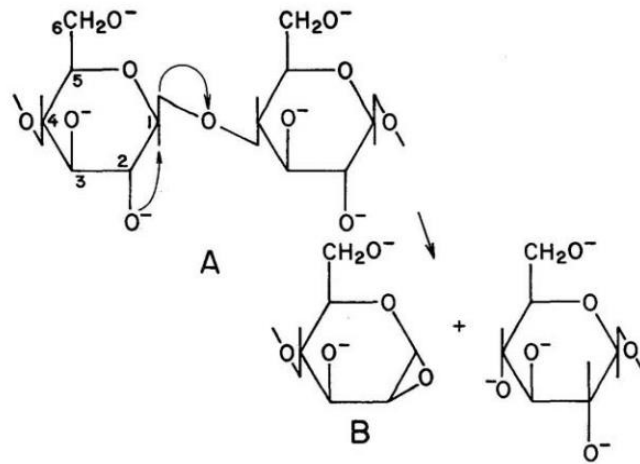


Figura 38. Mecanismo de escisión de un enlace glicosídico en medio básico (Rowell & Green, 1972).

En la figura 39 se ilustra el proceso de degradación del HA en soluciones diluidas o semidiluidas sometidas a un medio ácido (pH=1) y a un medio básico (pH=13), donde se aprecia la rotura de las cadenas poliméricas del HA en cadenas más pequeñas de menor peso molecular. En las soluciones diluidas se produce una escisión intramolecular del HA, mientras que en el régimen de concentración semidiluida la red polimérica se desintegra (Maleki et al., 2008). También se ilustra que el proceso de degradación es más marcado en un medio básico que en un medio ácido, obteniéndose cadenas más pequeñas a un pH alto que a uno bajo.

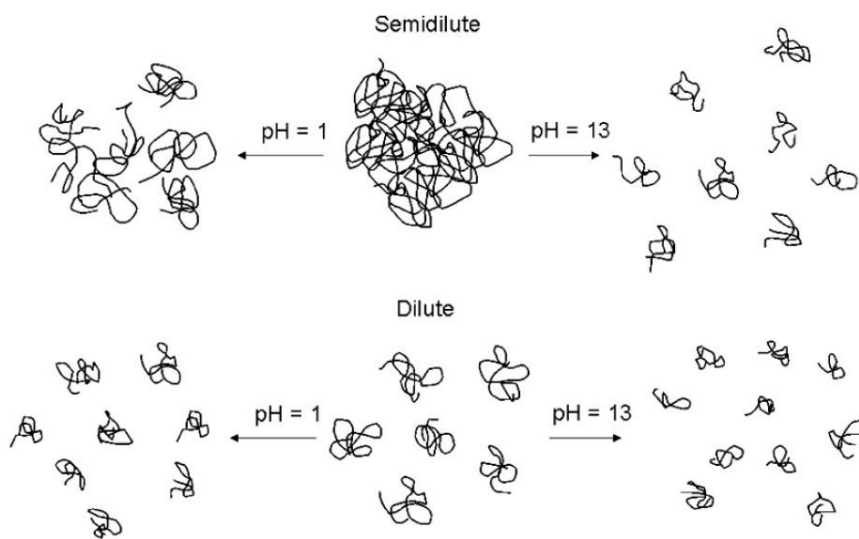


Figura 39. Ilustración de la degradación inducida por el pH de soluciones de HA diluidas y semidiluidas. (Maleki et al., 2008).

Es importante destacar que, además de para realizar el entrecruzamiento con DVS, someter al HA a un medio básico también es necesario para lograr disminuir su viscosidad, ya que de no ser así el HA presentaría una viscosidad demasiado alta para poder ser inyectado posteriormente en los moldes con los que realizar los NGCs.

❖ Muestras de SF

A continuación se realizó el mismo procedimiento con la SF, comparando membranas de *SF sosa* y de *SF agua* con muestras de *SF pura*. Como se observa en la figura 40, las curvas de *SF agua* y de *SF pura* se superponen, lo que indica que la SF no se degrada al ser disuelta en agua. En cambio, cuando la SF se disuelve en NaOH (*SF sosa*), la curva del análisis termogravimétrico sí cambia, lo cual muestra que la SF sí sufre una degradación al ser sometida a un medio básico.

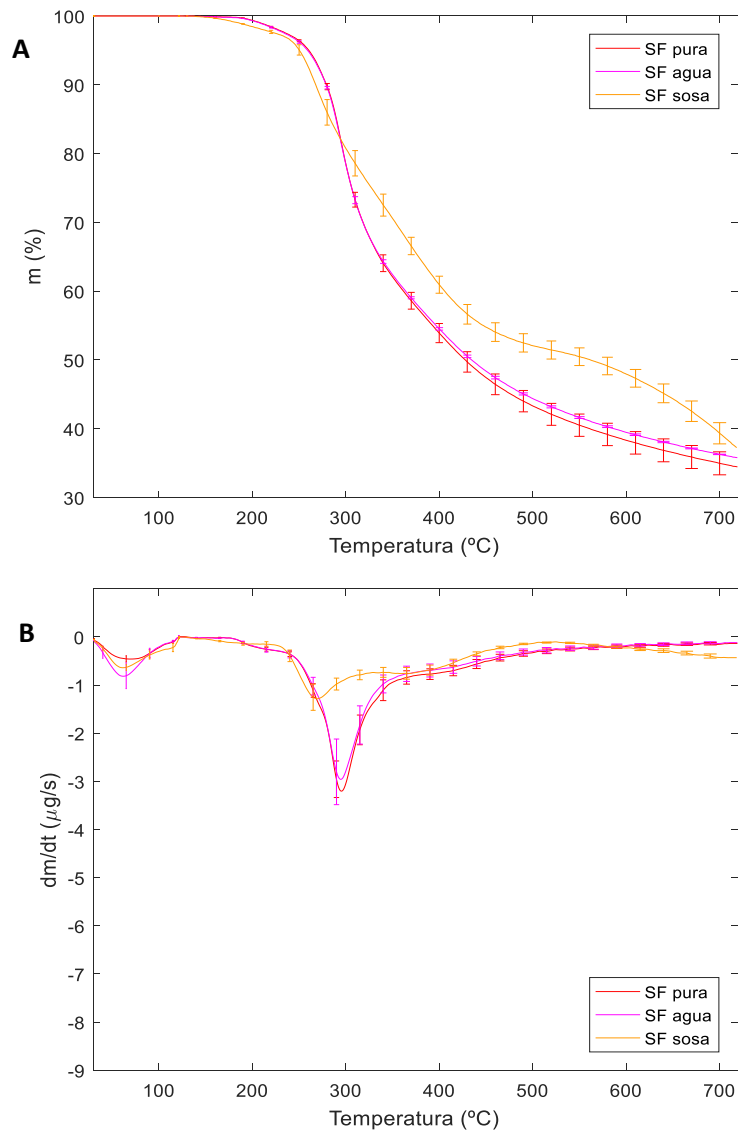


Figura 40. Termogramas de masa restante (A) y primera derivada de la masa respecto del tiempo (B) para los materiales *SF pura*, *SF agua* y *SF sosa*.

Como se observa en la figura 40 A, la SF degradada comienza a perder masa alrededor de los 160°C, mientras que la SF no degradada conserva el 100% de su masa hasta aproximadamente los 185°C. A continuación se aprecia que, para temperaturas bajas (por debajo de los 290°C), la SF degradada sufre una mayor pérdida de masa que la SF pura, mientras que por encima de los 290°C las curvas se cruzan y pasa a ser la SF pura la que sufre una mayor pérdida de masa para una misma temperatura dada.

A continuación se explica en detalle en qué consiste el proceso de degradación de la SF en medio básico.

- **Degradación de la SF en medio básico**

Interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals mantienen unido al sistema polimérico de la seda. En condiciones alcalinas estas fuerzas de atracción interpolímero se hidrolizan, produciéndose la disolución del filamento de seda. Inicialmente, esta disolución significa sólo una separación de los polímeros de seda entre sí, lo cual es empleado en el proceso de desgomado o *degumming* para lograr la separación de la SF de la sericina. Sin embargo, una exposición prolongada a un medio básico resulta en la degradación de la SF por producirse la hidrólisis de los enlaces peptídicos (Taddei, Pavoni, & Tsukada, 2016). Esto es importante tenerlo en cuenta en nuestro caso, ya que al añadir la SF a la solución de HA 5% en NaOH 0,2M, la SF va a verse sometida a un medio básico durante todo el proceso, por lo que sufrirá una degradación por la hidrólisis de los enlaces peptídicos que mantienen unidos a los aminoácidos de la proteína. Esto inducirá la rotura de las cadenas poliméricas de la SF, lo cual conlleva una disminución de su peso molecular y, por tanto, que la forma en que el material pierde su masa al aumentar la temperatura sea diferente que la de la SF sin degradar.

En la figura 41 se muestra el proceso químico por el que se produce la rotura de un enlace peptídico en medio básico por la adición de NaOH. Como se observa, el radical carbonilo forma un éster con el sodio del hidróxido sódico, mientras que el radical imino pasa a convertirse en un radical amino, de forma que los dos aminoácidos que estaban unidos por el enlace peptídico pasan a estar separados y, por tanto, se produce la rotura de la cadena de aminoácidos (Wisniowski, 2013).

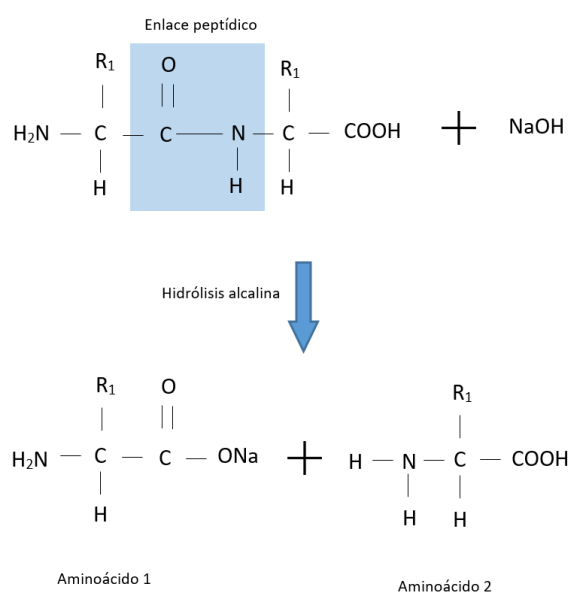


Figura 41. Hidrólisis alcalina de un enlace peptídico en medio básico, representada por la adición de NaOH. Adaptado de (Wisniowski, 2013).

En la Figura 42 se muestra un modelo de degradación de la SF cuando se le somete a un medio básico (pH entre 11 y 12) junto con un incremento de la temperatura para producir la ebullición. Como puede observarse, la degradación de la SF ocurre en los enlaces amorfos y en las regiones N-terminal y C-terminal, de modo que la región cristalina no sufre la degradación (Wray et al., 2011).

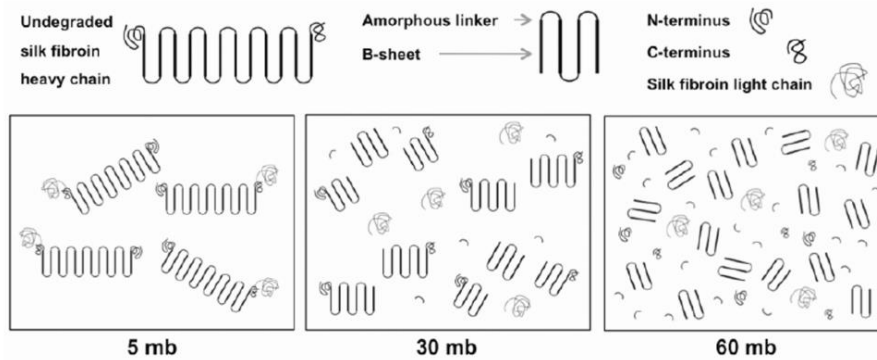


Figura 42. Modelo de degradación de la SF en medio básico junto con ebullición (mb=minutos hirviendo) (Wray et al., 2011).

En la Figura 43 se muestra un análisis densitométrico en el que puede observarse como un incremento de la exposición de la SF al medio alcalino en ebullición conlleva una mayor rotura de las cadenas poliméricas de la proteína y, por tanto, una disminución del peso molecular (M_w) (Wray et al., 2011). Puede apreciarse como, tras 5 minutos hirviendo, la mayoría de las cadenas poliméricas tienen una masa molecular de alrededor de 460 kDa, mientras que conforme aumenta el tiempo en el medio básico la masa molecular va disminuyendo hasta unos 150 kDa para 30 minutos y unos 50 kDa para 60 minutos.

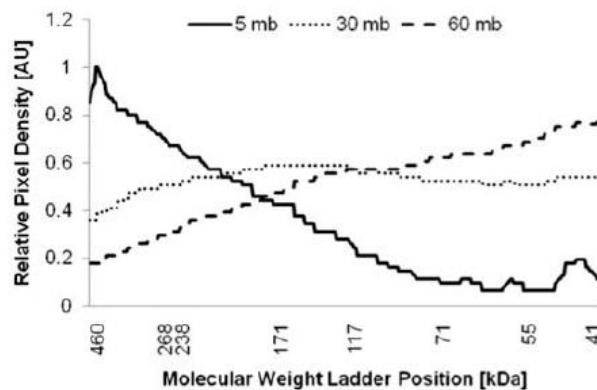


Figura 43. Análisis densitométrico de la SF en medio básico junto con ebullición (mb=minutos hirviendo) (Wray et al., 2011).

Llegados a este punto es importante indicar que en el caso estudiado en este TFM la degradación de la SF en medio básico no va a ser tan importante como la que se muestra en las figuras 42 y 43, ya que va a mantenerse siempre a una temperatura igual o inferior a la temperatura ambiente, sin llegar a hervir en ningún momento. No obstante, la SF sí sufrirá una degradación más ligera basada en los mecanismos descritos en este apartado.

❖ Muestras de HA combinado con SF

Finalmente, como se muestra en la figura 44, se procedió a comparar la pérdida de masa de las membranas formadas por combinación de HA y SF (*HA + 15% SF* y *HA + 30% SF*) con la experimentada por las membranas de *HA sosa* y *SF sosa*. **Nota:** Ya que en el proceso de fabricación de las membranas de *HA + 15% SF* y de *HA + 30% SF* tanto el HA como la SF se disuelven en NaOH, estas muestras se compararon con las membranas de HA y de SF disueltas también en NaOH.

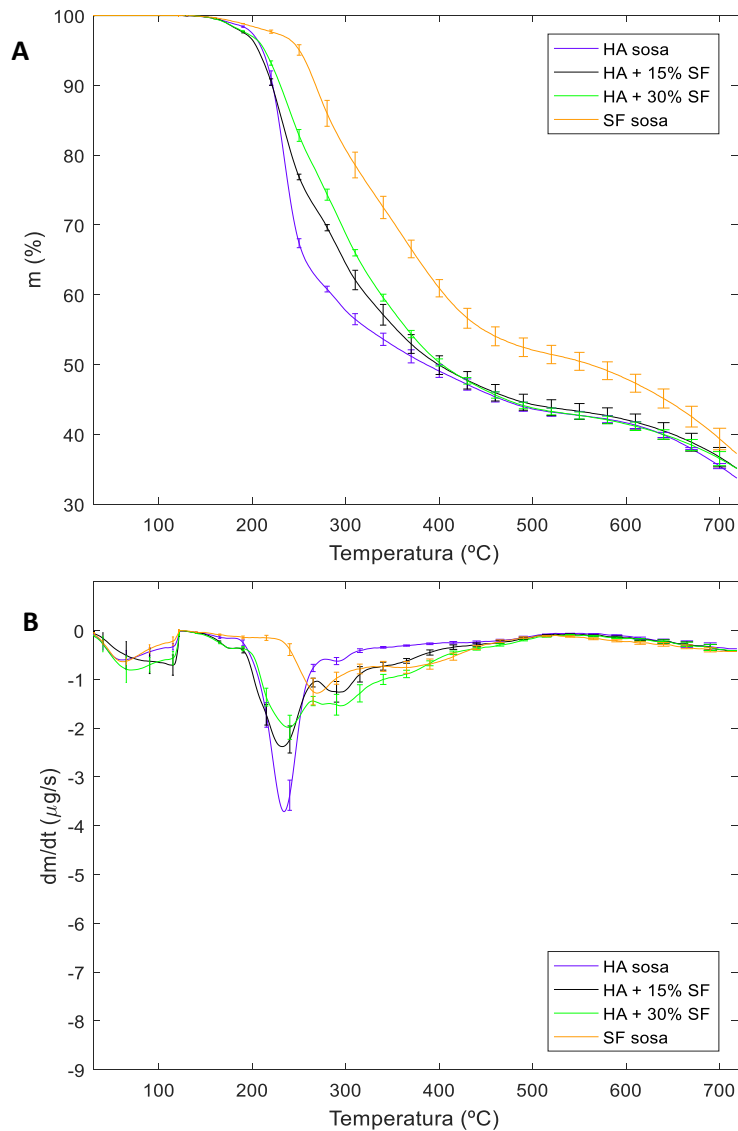


Figura 44. Termogramas de masa restante (A) y primera derivada de la masa respecto del tiempo (B) para los materiales *HA sosa*, *HA + 15% SF*, *HA + 30% SF* y *SF sosa*.

Lo primero que se aprecia en la figura 44 A es que, para temperaturas inferiores a los 220°C y superiores a los 370°C, el comportamiento de las membranas creadas por combinación de HA y SF es muy similar al comportamiento de las membranas de *HA sosa*, quedándose bastante alejadas de la curva de *SF sosa*. No obstante, en el rango de temperaturas entre los 220°C y los

370°C, el comportamiento de las muestras de HA combinado con SF se aproxima más al de las muestras de *SF sosa*, produciéndose una menor pérdida de masa para una temperatura dada.

La máxima diferencia entre las cuatro curvas sucede, aproximadamente, entre los 250°C y los 280°C, punto en el que las curvas de *HA + 15% SF* y *HA + 30% SF* se acercan más a la curva de *SF sosa* y se alejan más de la curva de *HA sosa*. Además, este acercamiento al comportamiento de la SF es más acusado cuanto más SF contiene el material, ya que la curva de *HA + 30% SF* está mucho más próxima a la de *SF sosa* que la de *HA + 15% SF*.

5.2.1.3.2. Comparación entre el comportamiento experimental y el teórico de los materiales creados por combinación de HA y de SF

A continuación se procedió a comparar el comportamiento experimental obtenido para las membranas creadas por combinación de HA y SF (*HA + 15% SF* y *HA + 30% SF*) con el comportamiento teórico que sería de esperar al suponer ausencia de interacción entre ambos componentes.

En el caso de que no existiera interacción entre el HA y la SF, el comportamiento de los materiales obtenidos por combinación de ambos elementos sería predecible a partir de las curvas experimentales obtenidas para *HA sosa* y *SF sosa*. Esta predicción teórica de las curvas de *HA + 15% SF* y *HA + 30% SF* se basa en que, al suponer ausencia de interacciones entre el HA y la SF, es posible suponer la misma pérdida de masa de ambos elementos tanto por separado como en el compuesto. Esto da lugar a la ecuación 36, la cual permite conocer la curva de TGA teórica de los compuestos a partir de las curvas experimentales de *HA sosa* ($m_{HA}(\%)$) y de *SF sosa* ($m_{SF}(\%)$) y de la fracción másica de SF teórica ($\omega_{SF \text{ teórica}}$).

Ecuación 36

$$m_{\text{teórica compuesto}}(\%) = \omega_{SF \text{ teórica}} \cdot m_{SF}(\%) + (1 - \omega_{SF \text{ teórica}}) \cdot m_{HA}(\%)$$

Además, una vez conocida la curva teórica del compuesto, se realizó una estimación de la fracción másica de SF ($\omega_{SF \text{ experimental}}$) que minimizaba el error cuadrático entre la curva teórica y la curva experimental del compuesto, con el objetivo de comprobar si la fracción másica de SF obtenida era similar a la teórica.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los dos compuestos: *HA + 15% SF* y *HA + 30% SF*.

- **HA + 15% SF**

En la figura 45 se muestra una comparación entre la curva de TGA obtenida experimentalmente para el compuesto *HA + 15% SF* y la curva teórica obtenida tras aplicar la ecuación 36. Asimismo, también se muestra la curva teórica del compuesto obtenida con el valor de $\omega_{SF \text{ experimental}}$ que minimiza el error cuadrático entre la curva teórica y la experimental. Finalmente se muestran también las curvas experimentales de *HA sosa* y *SF sosa* empleadas para realizar el cálculo de la curva teórica del compuesto.

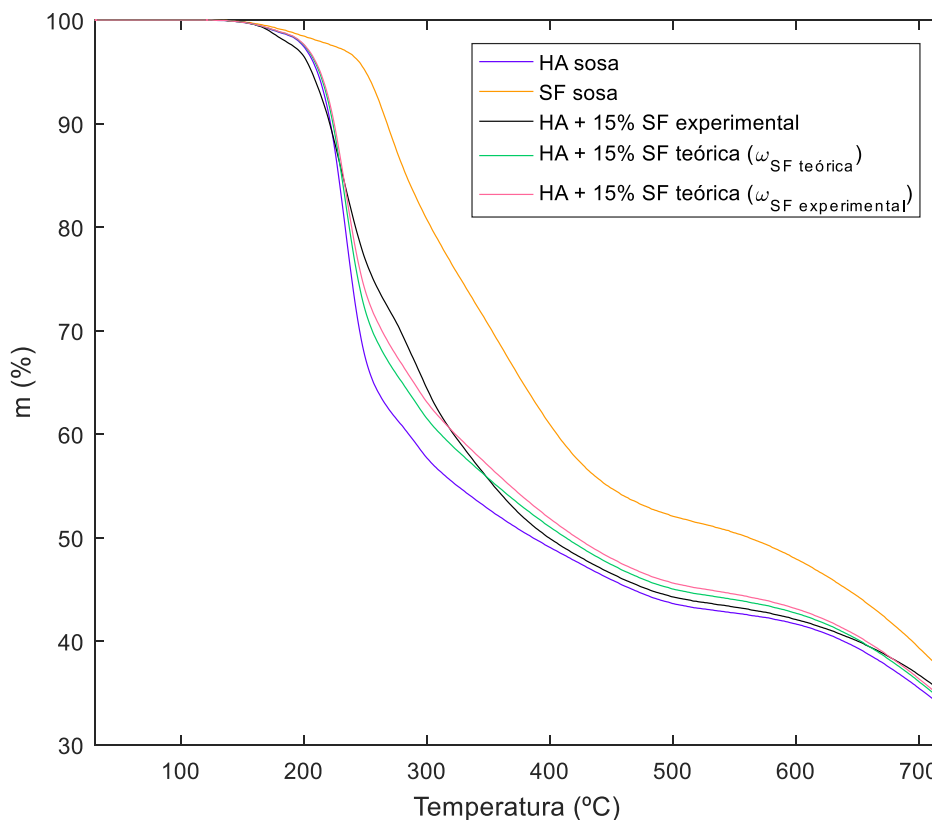


Figura 45. Comparación de la curva experimental de TGA de HA + 15% SF con las curvas teóricas obtenidas con la fracción másica de SF teórica ($\omega_{SF\ teórica}$) y con la que minimiza el error cuadrático entre la curva teórica y la experimental ($\omega_{SF\ experimental}$). Asimismo también se muestran las curvas de TGA experimentales de HA sosa y de SF sosa, las cuales se han empleado para el cálculo de la curva teórica de HA + 15% SF.

Lo primero que se podría comentar es que la curva teórica obtenida mediante $\omega_{SF\ teórica}$ es muy similar a la obtenida mediante $\omega_{SF\ experimental}$, debido a la proximidad entre ambos valores ($\omega_{SF\ teórica} = 16,70\%$; $\omega_{SF\ experimental} = 23,50\%$). Esto es indicativo de que la fracción másica de SF que se encuentra en el material de forma experimental es cercana a la teórica, lo cual muestra que la SF introducida no se ha perdido durante el proceso de fabricación del material.

También es interesante destacar que existe bastante diferencia entre la curva teórica calculada con $\omega_{SF\ teórica}$ y la curva experimental del compuesto, lo cual es indicativo de que sí existe una interacción entre las moléculas de HA y de SF que no puede ser predicha por el modelo teórico, el cual supone que no hay interacción entre ambos componentes.

Como puede observarse, existe un punto de corte de ambas curvas alrededor de los 320°C, que sería la temperatura para la cual la curva teórica no tiene error. No obstante, por debajo de esta temperatura se aprecia que la curva experimental queda por encima de la curva teórica, lo cual conlleva que el modelo teórico sobreestima la degradación del compuesto ya que indica que degrada más de lo que realmente degrada. En cambio, por encima de esta temperatura la curva experimental queda por debajo de la curva teórica, lo que conlleva que el modelo teórico subestima la degradación, ya que indica que degrada menos de lo que realmente degrada.

Una posible explicación de que, para temperaturas inferiores a los 320°C, el material degrade menos de lo que debería degradar de forma teórica podría deberse al hecho de que la SF es más estable térmicamente que el HA. Esto hace que para estas temperaturas existan cadenas poliméricas largas de SF que dificultan la difusión del HA y, por tanto, retrasan el momento en que estas moléculas de HA se desprenden del material. En cambio, el hecho de que para temperaturas superiores a los 320°C el material degrade más de lo que debería degradar de forma teórica podría ser debido a que, una vez la SF comienza a desprenderse del material, ésta genera huecos de gran tamaño que facilitan una difusión más rápida de las moléculas de HA.

- **HA + 30% SF**

Como se realizó en el punto anterior, la figura 46 muestra una comparación de la curva de TGA obtenida experimentalmente para el compuesto *HA + 30% SF* con la curva teórica obtenida con $\omega_{SF\ teórica}$ y la obtenida con $\omega_{SF\ experimental}$. También se muestran las curvas experimentales de *HA sosa* y *SF sosa* empleadas para realizar el cálculo de la curva teórica del compuesto.

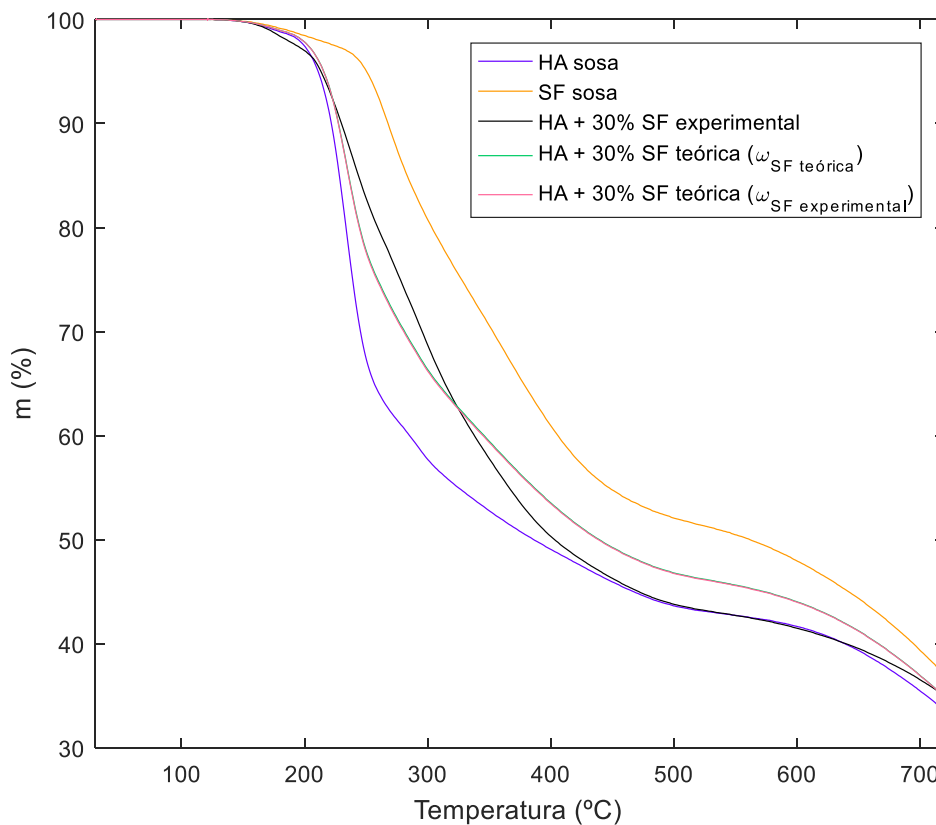


Figura 46. Comparación de la curva experimental de TGA de *HA + 30% SF* con las curvas teóricas obtenidas con la fracción másica de SF teórica ($\omega_{SF\ teórica}$) y con la que minimiza el error cuadrático entre la curva teórica y la experimental ($\omega_{SF\ experimental}$). Asimismo también se muestran las curvas de TGA experimentales de *HA sosa* y de *SF sosa*, las cuales se han empleado para el cálculo de la curva teórica de *HA + 30% SF*.

Igual que ocurría en el caso anterior, la curva teórica obtenida mediante $\omega_{SF\ teórica}$ es muy similar a la obtenida mediante $\omega_{SF\ experimental}$ debido a la proximidad entre ambos valores ($\omega_{SF\ teórica} = 37,50\%$; $\omega_{SF\ experimental} = 36,85\%$). De hecho, en este caso prácticamente se superponen ambas curvas. Por tanto, se puede afirmar de nuevo que la fracción másica de SF que se encuentra en el material de forma experimental es muy cercana a la teórica, demostrando así que la SF introducida no se ha perdido durante el proceso de fabricación.

Finalmente es interesante destacar que en este caso también existe discrepancia entre la curva experimental del compuesto y la teórica calculada con $\omega_{SF\ teórica}$, indicando de nuevo que existe una interacción entre el HA y la SF que no puede ser explicada por el modelo teórico. De hecho, el patrón es el mismo que se encontró en el compuesto anterior: existe una temperatura de corte de ambas curvas alrededor de los 320°C de forma que, por debajo de esta temperatura, el material se degrada menos de lo que debería degradar de forma teórica y, por encima de esta temperatura, el material degrada más de lo que debería degradar de forma teórica. Por tanto, la explicación de esta diferencia entre la curva teórica y la experimental del compuesto puede ser la misma que la indicada para el compuesto anterior, es decir, para temperaturas inferiores a los 320°C existen cadenas poliméricas largas de SF que dificultan la difusión del HA mientras que, para temperaturas superiores a los 320°C, la SF que se ha desprendido del material genera huecos de gran tamaño que facilitan una difusión más rápida del HA.

5.2.1.4. DSC

Con el objetivo de estudiar más a fondo la interacción entre el HA y la SF se realizó una calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las mismas muestras que se estudiaron en el análisis termogravimétrico (TGA). El hecho de que el TGA sea una técnica insensible a los cambios de fase, ya que el hecho de que se produzca un cambio de fase no implica un cambio en la masa de la muestra, hizo interesante realizar un estudio de DSC que permitiera detectar la existencia de transiciones endotérmicas o exotérmicas como fusiones, transiciones vítreas o cristalizaciones. En las figuras 47 y 48 se presentan los resultados obtenidos tanto para la etapa de enfriamiento (*cooling*) como para la etapa de calentamiento (*heating*), respectivamente.

Como se aprecia en ambas figuras, no se observan transiciones endotérmicas ni exotérmicas en ninguna de las muestras estudiadas. Esto es debido a que, al haber eliminado completamente el agua que contenían las muestras durante la etapa previa de precalentamiento, las moléculas no tienen la movilidad suficiente para llevar a cabo las transiciones. Esto es indicativo de que, en ausencia de agua, las transiciones tienen lugar a temperaturas tan altas que antes de alcanzarlas se degradarían los enlaces químicos de los componentes. No obstante, sería interesante realizar un estudio de DSC en el que los materiales presentaran una cierta cantidad de agua retenida, ya que esto permitiría que las moléculas tuvieran una mayor movilidad al tener más espacio para moverse por intercalarse el agua entre ellas y, por lo tanto, sí podrían verse transiciones de fase. Por ejemplo, esto podría realizarse mediante un enfriamiento hasta -70°C sin precalentar los materiales.

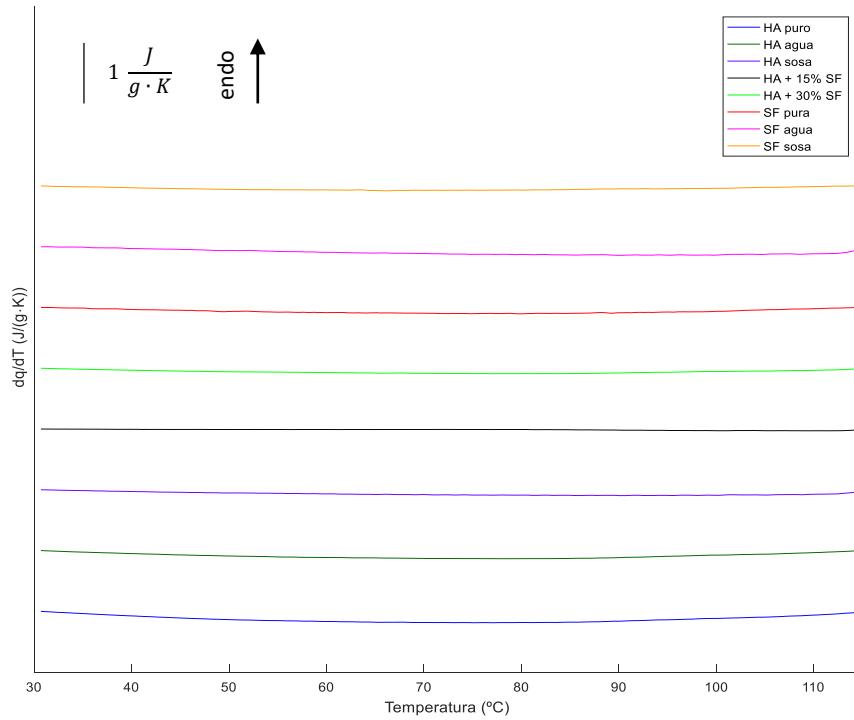


Figura 47. Flujo de calor normalizado obtenido con DSC correspondiente a la etapa de enfriamiento (*cooling*) para los diferentes materiales estudiados.

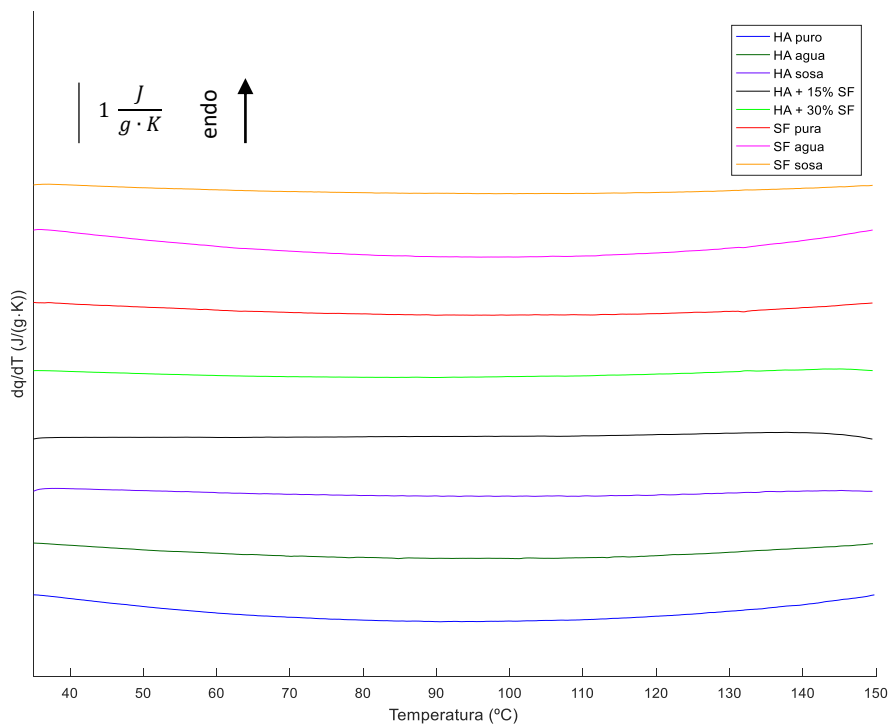


Figura 48. Flujo de calor normalizado obtenido con DSC correspondiente a la etapa de calentamiento (*heating*) para los diferentes materiales estudiados.

5.2.2. Caracterización de las propiedades mecánicas

5.2.2.1. Reómetro

En este estudio se compara el comportamiento a cizalladura de discos de *HA sosa* frente a discos de *HA + 30% SF* con la finalidad de comprobar si la adición de SF mejora las propiedades mecánicas del material. En la figura 49 se muestra el módulo de almacenamiento (G') obtenido en función del par de oscilación para los dos materiales estudiados.

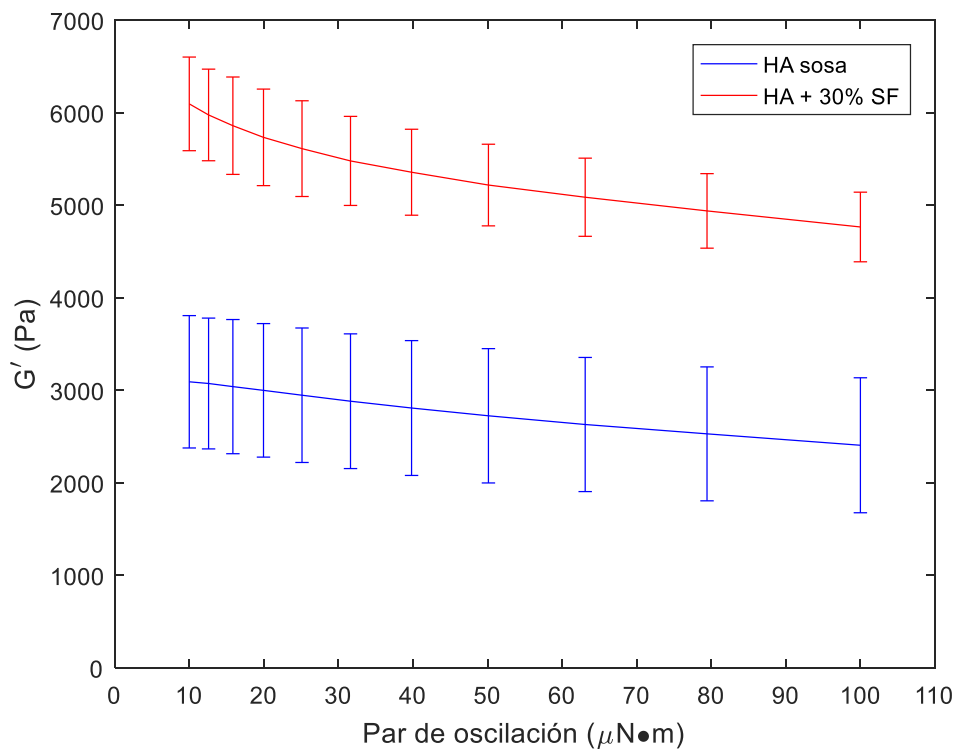


Figura 49. Módulo de almacenamiento en función del par de oscilación obtenido con discos de *HA sosa* y de *HA + 30% SF*.

El módulo de almacenamiento cuantifica la capacidad de un material de almacenar energía cuando se le aplica una fuerza de cizalladura, haciendo referencia a la componente elástica del material. Así pues, para fuerzas menores que las fuerzas moleculares, el material es capaz de volver a su configuración inicial previa a la aplicación de la fuerza.

Como puede observarse en la figura 49, existe un aumento claro de G' en las muestras que contienen SF frente a las que no la contienen, el cual implica prácticamente doblar el valor de G' para todos los valores de par de oscilación en las muestras de *HA + 30% SF*. Esto implica que el hecho de añadir la SF permite al material almacenar una mayor cantidad de energía sin sufrir una deformación permanente, lo cual es indicativo de que el material presenta una mayor rigidez gracias a la adición de la SF.

Es interesante indicar que se aprecia un ligero descenso de los valores de G' conforme aumenta el par de oscilación. Este comportamiento no lineal del material muestra una pérdida de su resistencia a la fuerza aplicada para valores altos del par de oscilación frente a valores bajos del mismo. Este fenómeno, conocido como ablandamiento por deformación o *strain-softening*, puede ser debido a la acumulación de defectos en la red HA a medida que aumenta la amplitud de la deformación.

En la figura 50 se muestra el módulo de pérdidas (G'') obtenido en función del par de oscilación para los dos materiales estudiados.

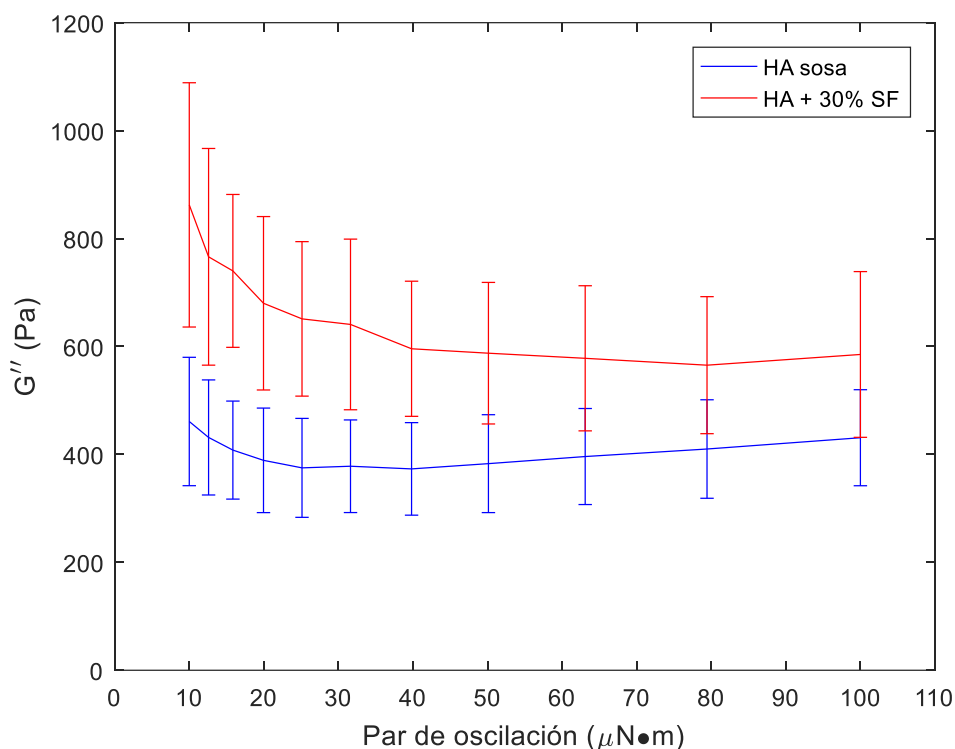


Figura 50. Módulo de pérdidas en función del par de oscilación obtenido con discos de HA sosa y de HA + 30% SF.

El módulo de pérdidas indica la capacidad de un material de disipar (perder) energía en forma de calor cuando se le aplica una fuerza de cizalladura, haciendo referencia a la componente viscosa del material. G'' es importante cuando la fuerza aplicada sobre la muestra es mayor que las fuerzas moleculares, de forma que se produce un colapso de la microestructura y el material comienza a fluir.

Como puede observarse en la figura 50, los valores de G'' para ambos materiales son mucho menores que los obtenidos previamente para G' . Esto implica que la mayor parte del material es capaz de recuperar su estructura interna y su forma original. Sin embargo, dado que G'' no es nulo, hay una pequeña parte del material que se deforma de manera irreversible.

Es interesante indicar que, como ocurría para el módulo de almacenamiento, el módulo de pérdidas también presenta un comportamiento no lineal con el par de oscilación, ya que G'' decae ligeramente cuando aumenta el par de oscilación. Como se ha comentado anteriormente,

esto es debido al fenómeno de ablandamiento por deformación o *strain-softening*, el cual hace que el material pierda su resistencia a la cizalladura para valores altos del par de oscilación.

En cuanto a la comparación de G'' para ambos materiales, se aprecia que la adición de la SF produce un aumento de este módulo, especialmente para valores bajos del par de oscilación, donde el aumento es de prácticamente el doble. Este aumento de G'' es indicativo de que es necesario aplicar una fuerza de cizalladura mayor para provocar el mismo nivel de deformación irreversible en los materiales que contienen SF. No obstante, cuando el par de oscilación supera los $40 \mu N \cdot m$ la diferencia disminuye considerablemente hasta producirse el solapamiento de las desviaciones típicas.

En la figura 51 se muestra una comparación del módulo de almacenamiento y del módulo de pérdidas obtenido para ambos materiales, tanto para un valor bajo de par de oscilación ($30 \mu N \cdot m$) como para un valor alto de par de oscilación ($100 \mu N \cdot m$).

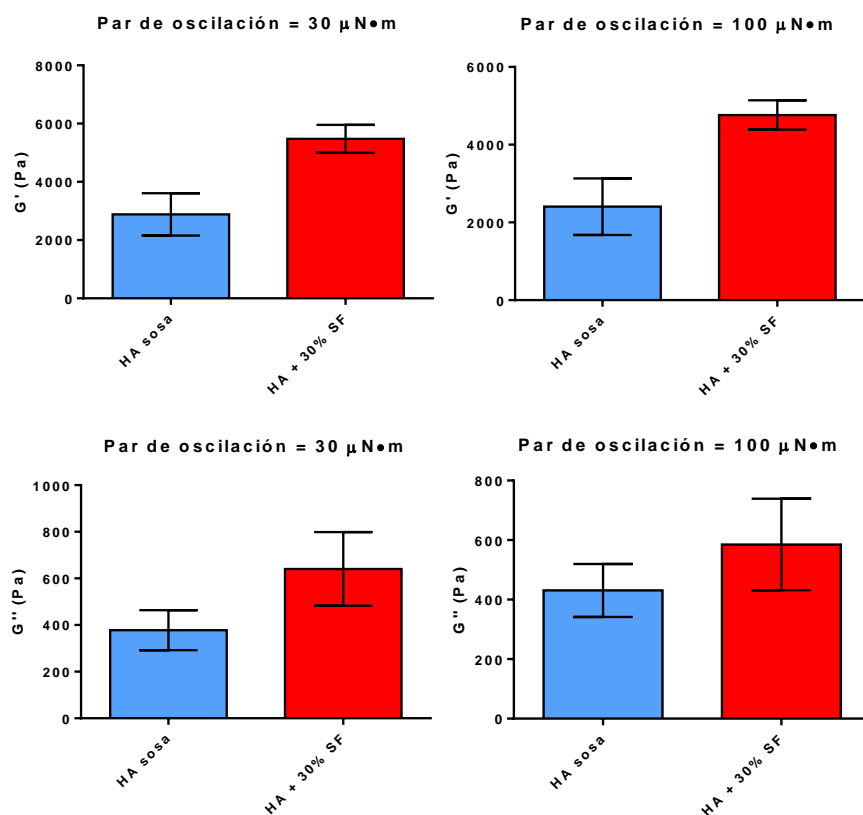


Figura 51. Valores del módulo de almacenamiento y del módulo de pérdidas para un valor bajo ($30 \mu N \cdot m$) y otro alto ($100 \mu N \cdot m$) de par de oscilación para los dos materiales estudiados.

Para poder interpretar estos resultados es necesario tener en cuenta la microestructura de ambos materiales. Si el HA fuera un elastómero ideal, al aplicar una fuerza de cizalladura sobre él, sus cadenas poliméricas únicamente se estirarían, pudiendo recuperar su estado original al dejar de aplicar la fuerza, recuperando el material de este modo su forma original. Si este fuera el caso, el material presentaría un módulo de pérdidas nulo, ya que no se produciría ninguna deformación permanente del material. No obstante, como se observa en la figura 51, el HA presenta un cierto valor de G'' que, pese a ser bastante menor a G' , no es despreciable. Esto indica que el material está sufriendo una deformación permanente y, por tanto, presenta una

cierta componente viscosa. Esto es debido a que las cadenas de HA no sufren solamente un estiramiento reversible, sino que también sufren movimientos permanentes así como cambios en su microestructura. Esto podría deberse, por ejemplo, a la rotura de enlaces de hidrógeno, lo cual daría lugar a deformaciones irreversibles del material.

En cuanto a la adición de SF al HA, puede observarse en la figura 51 que conlleva un aumento considerable de G' a pares de oscilación tanto bajos como altos. Esto indica, por tanto, que la SF está produciendo que las cadenas poliméricas del HA no sean estiradas con la misma facilidad que anteriormente, resultando en una mayor rigidez del material. Además, la SF también conlleva un incremento de G'' , especialmente para valores bajos del par de oscilación. Esto puede ser debido a que las fuerzas de cizalladura inducen la fricción entre las cadenas poliméricas del HA y las de la SF presentes en el material, lo cual conllevaría la rotura de las cadenas de HA de forma irreversible y, por tanto, una deformación permanente del material.

En cuanto al análisis estadístico de los resultados, el hecho de haber realizado un test no paramétrico de los mismos por los motivos indicado en el apartado 4.5 hizo que las diferencias no pudieran llegar a indicarse como estadísticamente significativas. Este es el motivo por el que no aparece ningún asterisco (*) en las figuras mostradas en este apartado. No obstante, el hecho de que las desviaciones estándar de los datos no solaparan (excepto para valores de G'' correspondientes a valores altos del par de oscilación) hace pensar que, si el ensayo se hubiera realizado con un número suficiente de muestras como para haber podido asumir una distribución normal de los datos, la diferencia entre ambos materiales sí hubiera sido estadísticamente significativa, al menos para los resultados de G' .

5.2.3. Estudio de adhesión y proliferación celular

Con el objetivo de comprobar si la adición de SF mejoraba la adhesión y proliferación celular, se realizaron ensayos de cultivos celulares de rSCs a 1 y 5 días en membranas de *HA sosa* y de *HA + 30% SF*. Además, para estudiar el efecto de acondicionar los materiales previamente, se realizaron dos tipos de preacondicionamiento para cada material: uno con PBS (sin proteínas) y otro con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S (con proteínas). Para la visualización de las células mediante microscopía confocal se realizó un proceso de inmunotinción con falacidina 488 para lograr la tinción de las fibras de actina del citoesqueleto (color verde) y con DAPI para obtener la tinción del núcleo (color azul).

5.2.3.1. Día 1

❖ *HA sosa* preacondicionado con PBS

Como se observa en la figura 52, las células presentan una morfología globular, lo cual es signo de una baja adhesión inicial de las células al sustrato de HA.

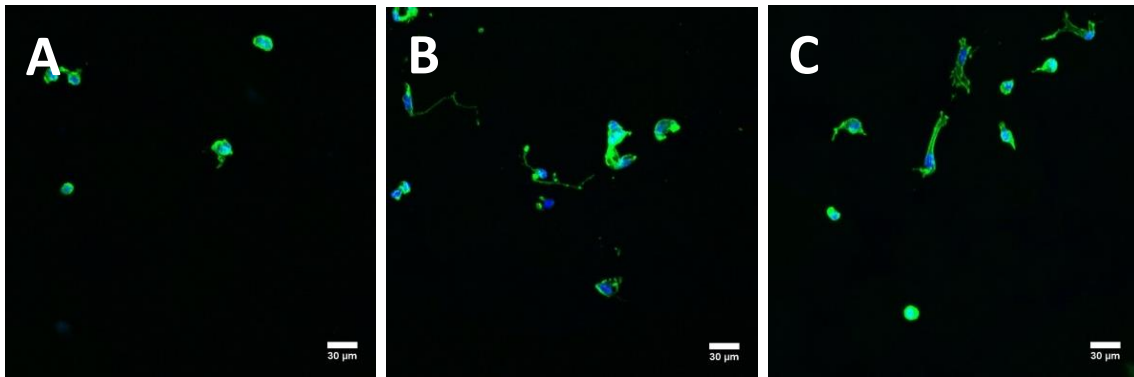


Figura 52. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 1 día en membranas de *HA sosa* preconditionadas con PBS para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.

❖ ***HA sosa* preconditionado con medio de cultivo**

En la figura 53 se aprecia que haber realizado previamente un acondicionamiento de la membrana de HA con proteínas (con FBS) apenas mejora la adhesión celular, ya que las células siguen presentando una morfología globular.

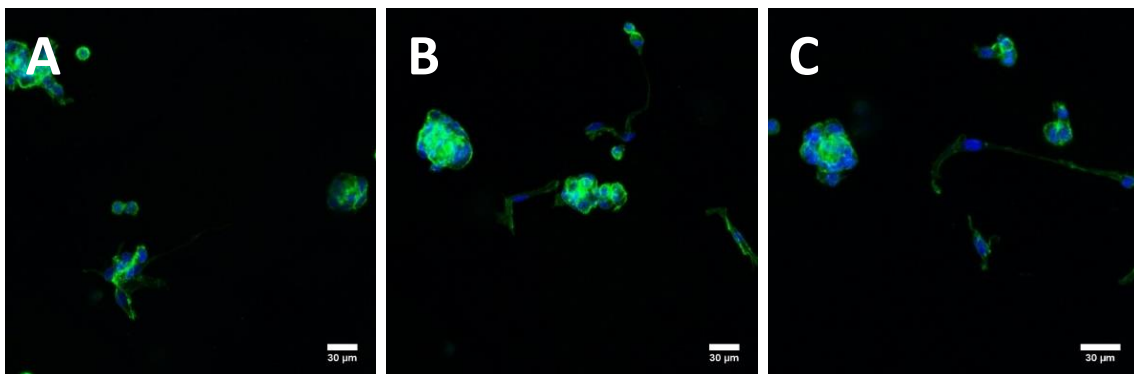


Figura 53. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 1 día en membranas de *HA sosa* preconditionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.

❖ ***HA + 30% SF* preconditionado con PBS**

En la figura 54 se observa que la adición de SF al sustrato mejora considerablemente la adhesión celular ya que, pese a no haber realizado un preconditionamiento con proteínas, el citoesqueleto celular está mucho más extendido que en los casos anteriores.

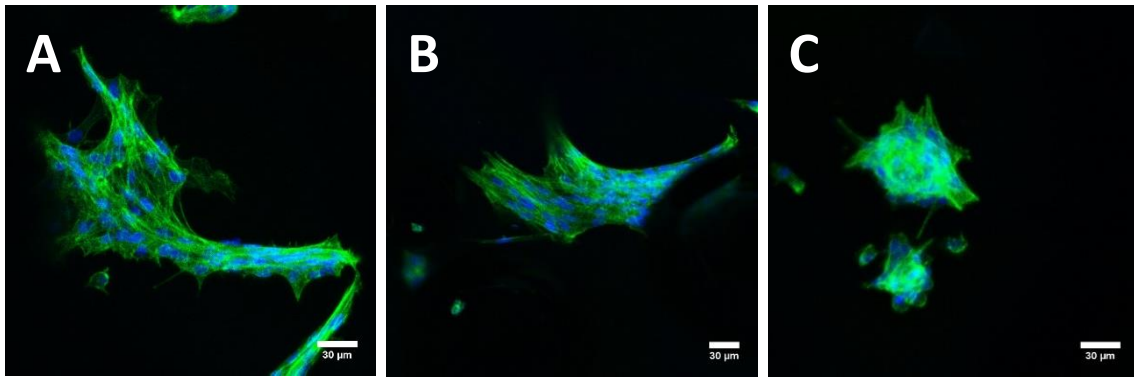


Figura 54. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 1 día en membranas de HA + 30% SF preconditionadas con PBS para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.

❖ HA + 30% SF preconditionado con medio de cultivo

En la figura 55 se aprecia claramente que la combinación de un sustrato con SF junto a un preconditionamiento con proteínas mejora claramente la adhesión celular. Esto es así ya que los citoesqueletos celulares están muy extendidos, ocupando una gran área del sustrato.

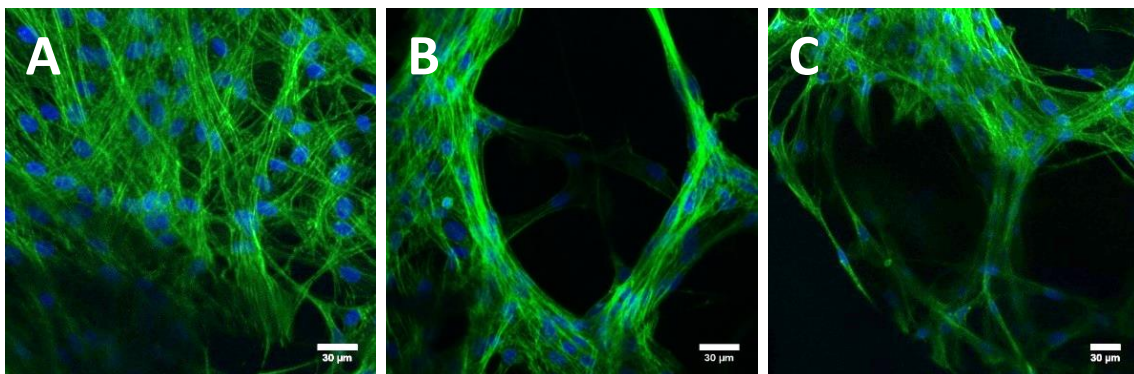


Figura 55. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 1 día en membranas de HA + 30% SF preconditionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.

5.2.3.2. Día 5

❖ HA *sosa* preconditionado con PBS

La figura 56 muestra que las células siguen mostrando una morfología globular, de forma similar a lo observado en el día 1 (figura 52). El hecho de que se formen agrupaciones de células con un citoesqueleto no muy extendido es debido a que las células están conectando más unas con otras que con el sustrato de HA. Así pues, tanto la adhesión como la proliferación celular son bajas en este caso.

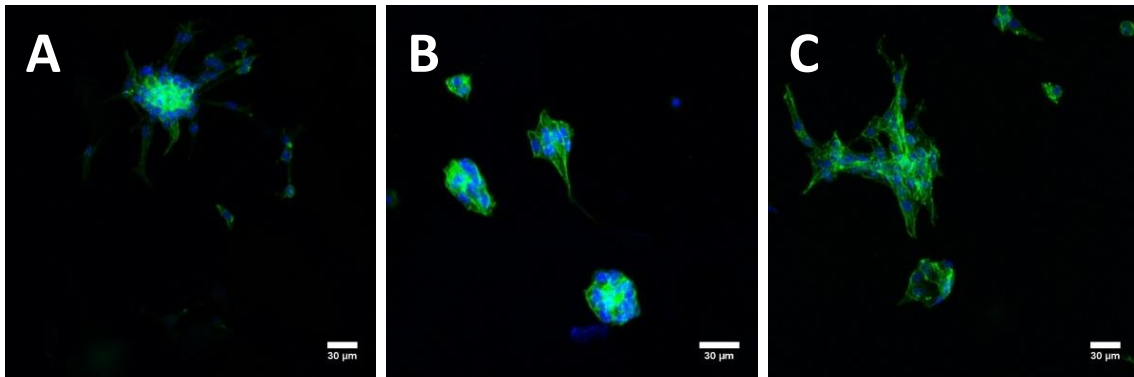


Figura 56. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 5 días en membranas de HA *sosa* preconditionadas con PBS para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.

❖ HA *sosa* preconditionado con medio de cultivo

La figura 57 muestra que el preconditionamiento de las membranas de HA con proteínas mejora la adhesión y proliferación celular, ya que se observan una mayor cantidad de células con un citoesqueleto más expandido que en el caso anterior. No obstante, la adhesión al sustrato sigue siendo bastante baja, ya que las células siguen uniéndose más entre ellas que con el sustrato. Un indicativo de esto es el hecho de que las células muestren una forma alargada o bipolar en forma de collar (indicado con flechas en la figura 57), ya que esto sucede cuando las células prefieren adherirse entre ellas antes que al sustrato.

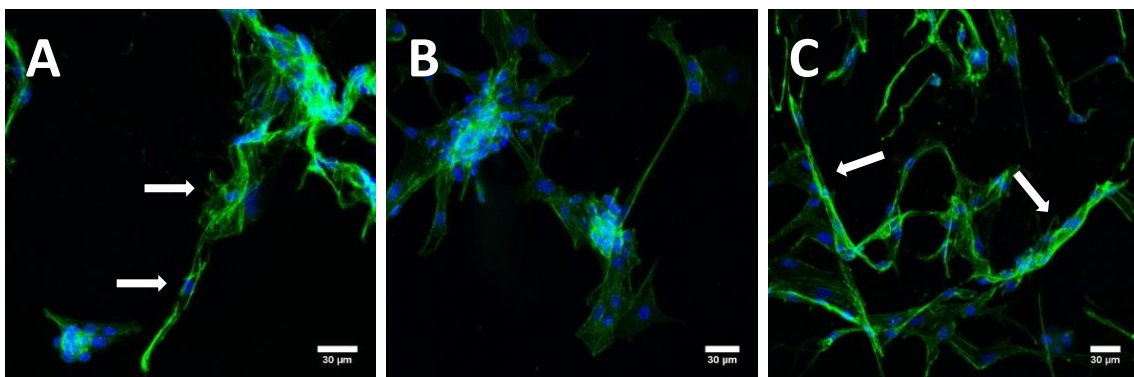


Figura 57. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 5 días en membranas de HA *sosa* preconditionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.

❖ HA + 30% SF preconditionado con PBS

Como puede observarse en la figura 58, existe una clara mejora en la adhesión y proliferación celular en el sustrato que contiene SF, ya que se aprecian unos citoesqueletos ampliamente extendidos. Esto es indicativo de que las células pasan de unirse solamente entre ellas (como ocurría con el sustrato de HA) a unirse también al sustrato.

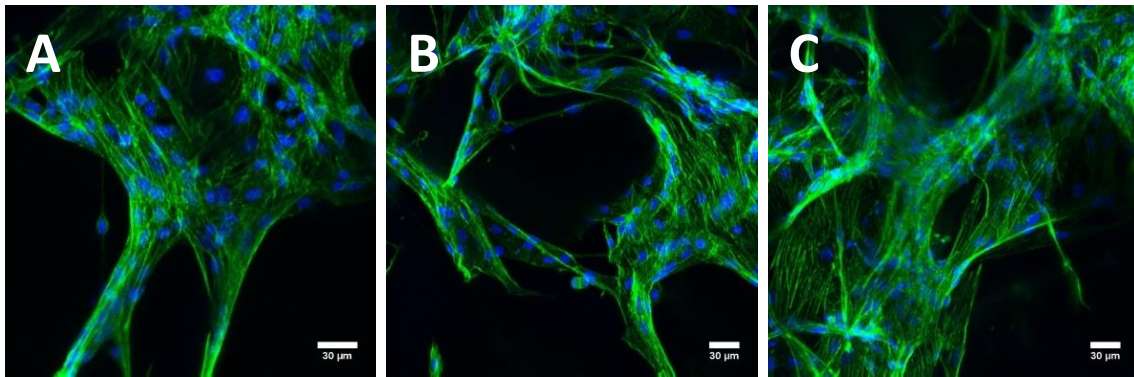


Figura 58. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 5 días en membranas de HA + 30% SF preconditionadas con PBS para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.

❖ HA + 30% SF preconditionado con medio de cultivo

Como muestra la figura 59, las células también muestran una gran adhesión y proliferación en el sustrato de SF preconditionado con proteínas. No obstante, la diferencia con el preconditionamiento sin proteínas no es tan marcada como la ocurrida en el día 1, lo que sería indicativo de que, respecto a la proliferación celular a tiempos largos, tendría una mayor importancia la presencia de SF en el sustrato que el hecho de haber preconditionado con FBS.

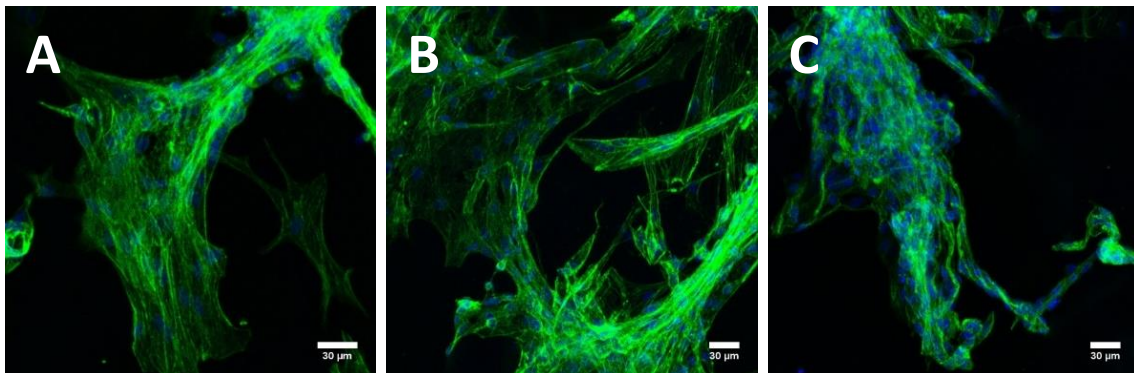


Figura 59. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 5 días en membranas de HA + 30% SF preconditionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S para tres muestras diferentes (A, B y C). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.

5.2.3.3. Comparación del área ocupada por el citoesqueleto

En este apartado se realiza una comparación tanto visual como cuantitativa de la extensión total del citoesqueleto de las células en los diferentes casos estudiados. Este parámetro es importante ya que una mayor área ocupada por el citoesqueleto implica una mayor adhesión y proliferación celular en el sustrato estudiado.

❖ Día 1

En la figura 60 se muestra una imagen representativa de cada uno de los cuatro casos estudiados con una menor ampliación que las imágenes anteriores para poder apreciar mejor las diferencias en cuanto a la extensión total del citoesqueleto de las células (color verde).

Se observa claramente que en los dos casos en que se emplea el sustrato de *HA sosa* (A y B) la adhesión celular temprana es muy escasa, ya que las células presentan una morfología globular muy marcada. En cambio, al emplear el sustrato que contiene SF (C y D) la adhesión temprana mejora claramente ya que el citoesqueleto está mucho más extendido sobre la superficie de la membrana. Esta expansión del citoesqueleto es bastante más marcada en el caso en que la membrana que contiene SF ha sido tratada previamente con proteínas (D), lo cual muestra que este precondicionamiento mejora considerablemente la adhesión celular temprana.

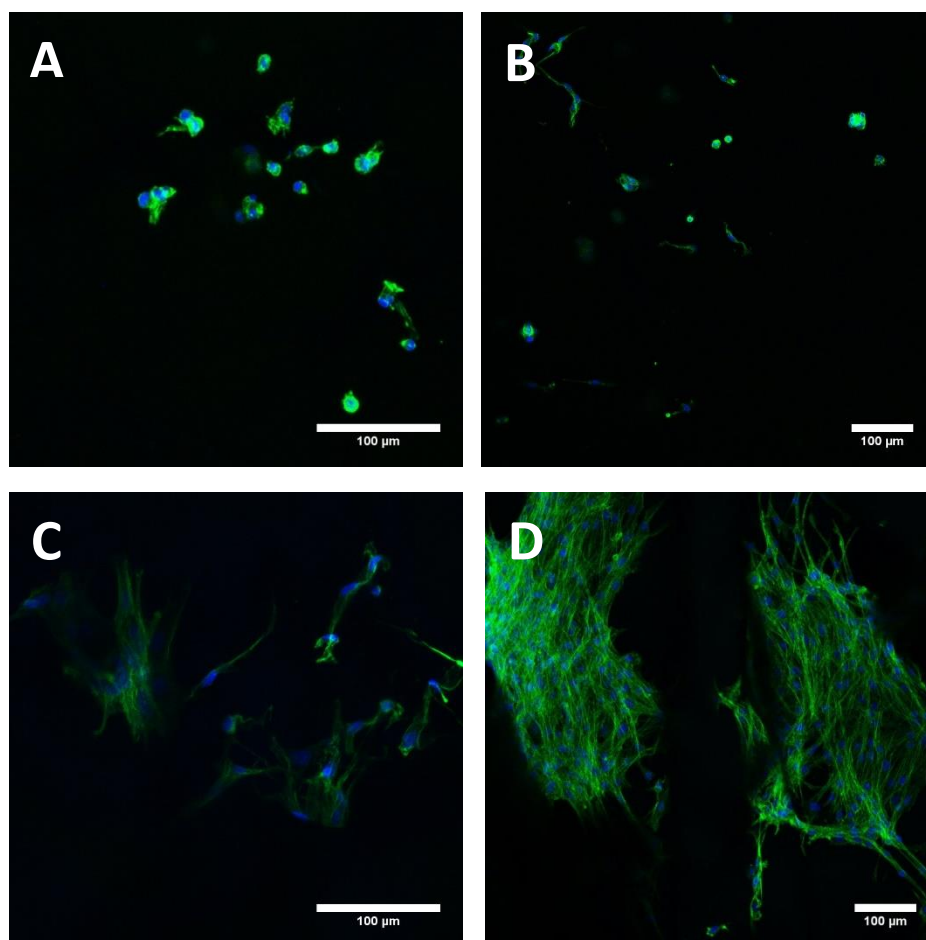


Figura 60. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 1 día en membrana de *HA sosa* preconditionada con PBS (A), membrana de *HA sosa* preconditionada con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S (B), membrana de *HA + 30% SF* preconditionada con PBS (C) y membrana de *HA + 30% SF* preconditionada con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S (D). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.

Para poder cuantificar la extensión del citoesqueleto en cada uno de los casos se procedió a la medición del área ocupada por éste mediante el programa de procesado de imagen ImageJ/FIJI, con el que se midieron las μm^2 que ocupaba la totalidad del citoesqueleto de las células. En la figura 61 se muestran los resultados obtenidos.

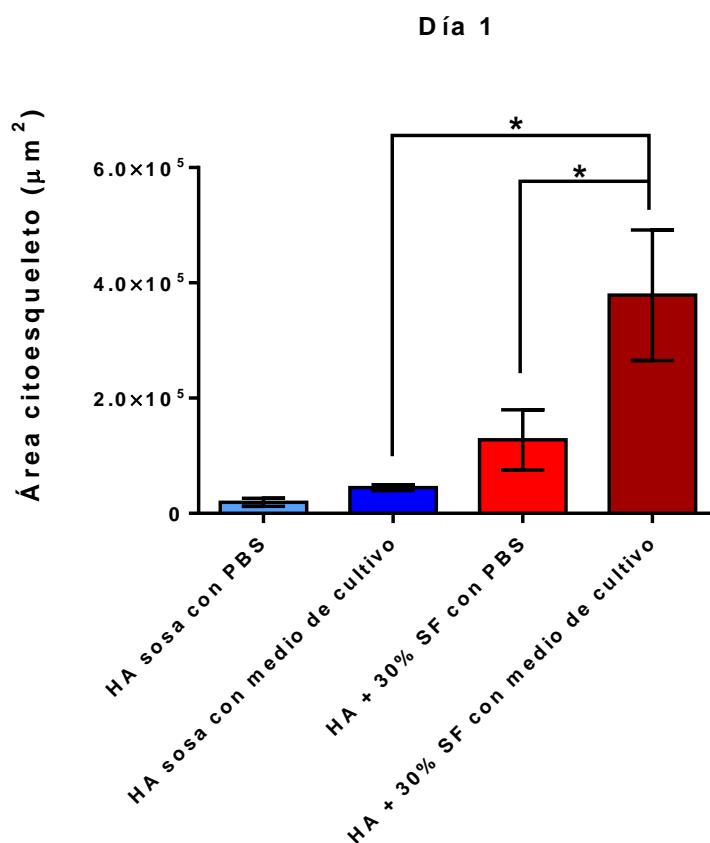


Figura 61. Área total de los citoesqueletos de las rSCs tras 1 día de cultivo obtenida a partir de las imágenes de microscopía confocal gracias a la tinción del citoesqueleto de las células con falacidina 488. Este parámetro se obtuvo para los cuatro casos estudiados: membranas de HA sosa preacondicionadas con PBS, membranas de HA sosa preacondicionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S, membranas de HA + 30% SF preacondicionadas con PBS y membranas de HA + 30% SF preacondicionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S.

Estos resultados confirman las conclusiones obtenidas de forma cualitativa. En primer lugar se aprecia que la adhesión temprana en las membranas de HA es muy baja, sin haber diferencia estadísticamente significativa entre preacondicionar o no las membranas con proteínas. Esto es indicativo de los problemas intrínsecos que presenta el HA para la adhesión celular por su elevada hidrofiliidad. En segundo lugar se observa que el hecho de añadir SF al sustrato mejora claramente la adhesión celular temprana. Esto está especialmente marcado para el caso en que las membranas con SF se han preacondicionado con proteínas, mostrando el papel importante de este preacondicionamiento en la adhesión celular temprana.

❖ Día 5

El proceso anterior se repitió tras 5 días de cultivo con el fin de estudiar tanto la adhesión como la proliferación celular de forma más prolongada en el tiempo. En el caso de las membranas de HA sin precondicionar con proteínas (A) la morfología celular sigue siendo marcadamente globular, indicando que la adhesión celular no ha mejorado tras los 5 días de cultivo. En el caso del sustrato de HA precondicionado con proteínas (B) se observan células con forma alargada, lo que es indicativo de que las células se unen más entre sí que con el sustrato. En cambio, las dos imágenes correspondientes a las membranas con SF (C y D) muestran una amplia extensión del citoesqueleto de las células sobre el material, siendo indicativo de una gran adhesión y proliferación celular en ambos casos.

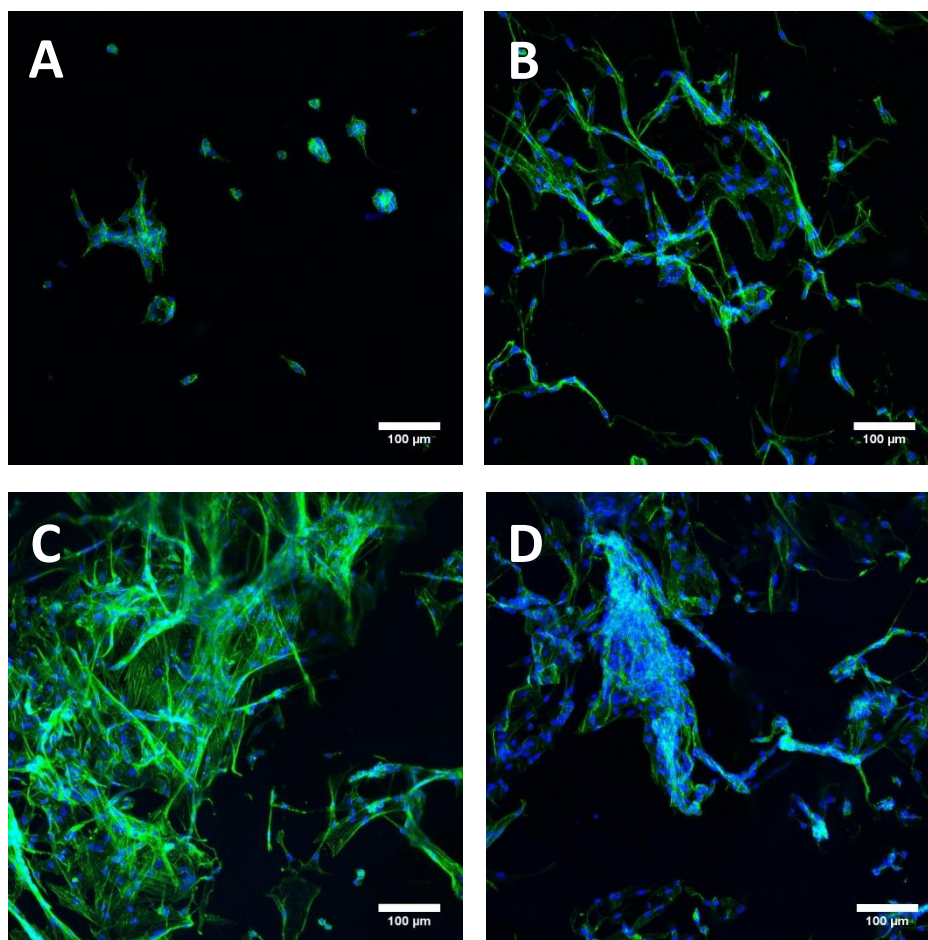


Figura 62. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a rSCs cultivadas durante 5 días en membrana de HA *sosa* precondicionada con PBS (A), membrana de HA *sosa* precondicionada con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S (B), membrana de HA + 30% SF precondicionada con PBS (C) y membrana de HA + 30% SF precondicionada con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S (D). En color verde se muestra el citoesqueleto y en color azul el núcleo de las células.

En cuanto al análisis cuantitativo del área celular tras los 5 días de cultivo (figura 63), se confirma que el precondicionamiento con proteínas mejora significativamente la adhesión en el caso de las membranas de *HA sosa*, aunque la extensión total del citoesqueleto sigue siendo baja al compararse con el sustrato de *HA + 30% SF*, en especial para el caso en que el material no se precondiciona con proteínas. Otro aspecto a destacar es que, tras 5 días de cultivo, no existe una diferencia significativa entre precondicionar o no con proteínas las membranas de *HA + 30% SF*. Esto es indicativo de que, aunque el FBS es importante para mejorar la adhesión celular temprana, su acción no es tan importante cuando el tiempo de cultivo es más prolongado.

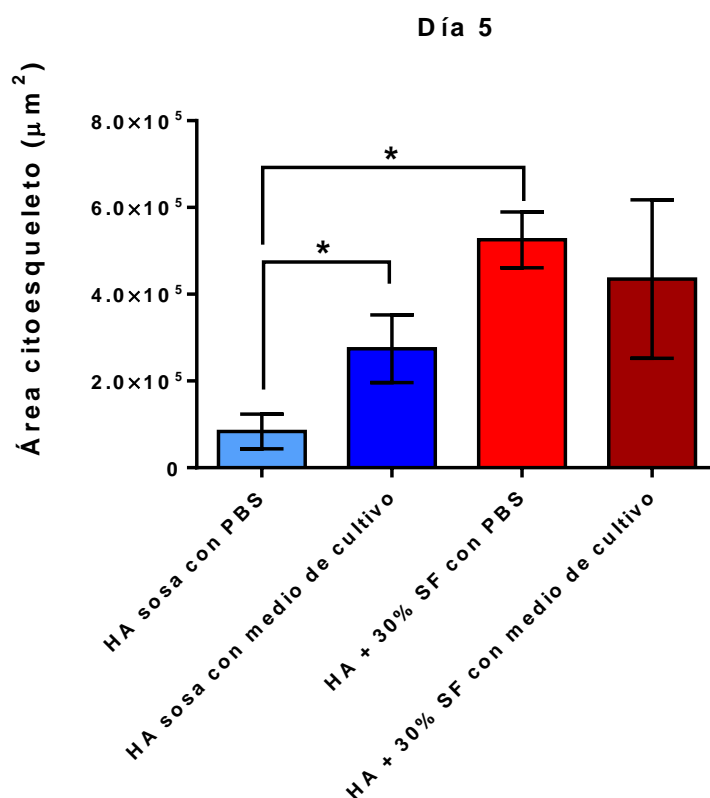


Figura 63. Área total de los citoesqueletos de las rSCs tras 1 día de cultivo obtenida a partir de las imágenes de microscopía confocal gracias a la tinción del citoesqueleto de las células con falacidina 488. Este parámetro se obtuvo para los cuatro casos estudiados: membranas de *HA sosa* precondicionadas con PBS, membranas de *HA sosa* precondicionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S, membranas de *HA + 30% SF* precondicionadas con PBS y membranas de *HA + 30% SF* precondicionadas con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y P/S.

5.2.3.4. Estudios previos de adhesión celular en HA y en SF

En este apartado se procede a comprobar si los resultados obtenidos son coherentes con los obtenidos en otros estudios de adhesión celular realizados con los materiales estudiados. Además se procede a desarrollar las causas que perjudican la adhesión celular al HA, por un lado, y que mejoran la adhesión celular a la SF, por otro.

❖ HA

El HA tiene la habilidad intrínseca de promover la proliferación celular y reducir la formación de cicatrices. No obstante, la aplicación clínica del HA se ha visto muchas veces limitada por sus características altamente hidrófilas que dificultan la adhesión celular sobre su superficie (Hu, Sabelman, Tsai, Tan, & Hentz, 2000), lo cual explica la baja adhesión celular observada en las membranas de *HA sosa*.

Esto hace que la adhesión celular sobre la superficie de *scaffolds* de HA se base sobre todo en fenómenos físicos, como la rugosidad superficial del material, para lograr la adhesión de las proteínas de la ECM a la superficie del material. Esta adhesión celular debida a la rugosidad del material es lo que explica que sí que lleguen a adherirse algunas células a la superficie del HA (especialmente al preacondicionar con proteínas), pero el elevado contenido en agua de la superficie del material impide que más células se adhieran al sustrato y, por tanto, las células empiezan a unirse entre ellas formando las estructuras filamentosas en forma de collar que se observan en los resultados obtenidos.

Finalmente cabe indicar que las pobres propiedades de adhesión celular del HA han propiciado que diversos estudios se hayan centrado en alterar sus propiedades físicas con el objetivo de mejorar la adhesión celular, como por ejemplo mediante un recubrimiento con polilisina, la cual es capaz de promover la adhesión de células de Schwann (Hu et al., 2000).

❖ SF

Diversos estudios han mostrado que la SF posee unas buenas propiedades de adhesión y crecimiento celular, lo cual es coherente con los buenos resultados obtenidos en el estudio realizado. En primer lugar se debe tener en cuenta que la secuencia repetitiva de aminoácidos de la SF de *Bombyx mori* (ver figura 19) no presenta ninguna secuencia de aminoácidos con una función específica de interacción para la adhesión celular, como pudiera ser el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD). No obstante, como se indica en la figura 64, se ha observado la existencia de una secuencia de aminoácidos en una región no repetitiva de C-terminal (extremo 3') con un gran número de aminoácidos básicos, especialmente arginina, los cuales juegan un papel fundamental en las propiedades de adhesión celular de la SF (Minoura et al., 1995). Esto se debe a que los residuos de arginina pueden ser reconocidos por proteínas transmembranales de adhesión celular como las integrinas, las cuales median en la interacción entre célula y sustrato (Calcagno, Lobatto, Robson, & Millon, 2016; Monteiro, Fernandes, Sundararaghavan, & Shreiber, 2011).

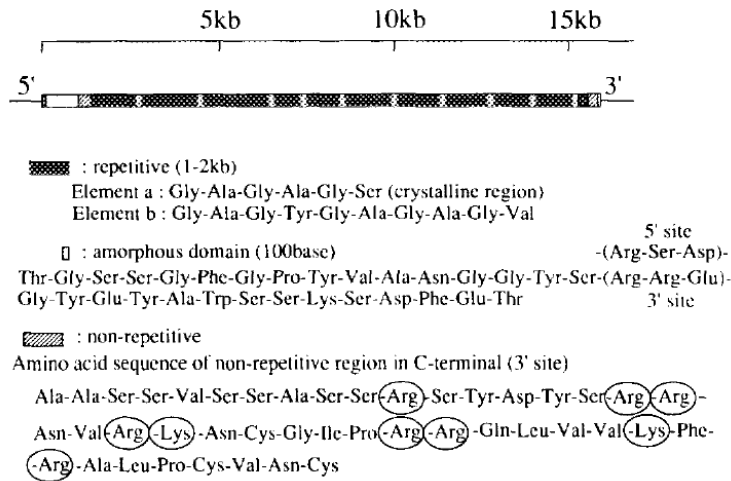


Figura 64. Secuencias de aminoácidos de la SF de *Bombyx mori* (Minoura et al., 1995).

Para demostrar esta teoría, en (Minoura et al., 1995) se comparó la capacidad de adhesión y crecimiento de células fibroblásticas (L-929) en membranas recubiertas con SF de *Bombyx mori* en su forma natural (con la región C-terminal), denominadas DSF, y en membranas recubiertas con SF de *Bombyx mori* a la que se le había eliminado por digestión con α -quimotripsina la región C-terminal, denominadas CSF. Como puede observarse en la figura 65 y en la tabla 9, el hecho de eliminar la secuencia de aminoácidos de la región C-terminal rica en residuos de arginina implica que tanto la adhesión como el crecimiento celular desciendan drásticamente. Esto corrobora el importante papel que juegan estos residuos en las propiedades de adhesión y crecimiento celular. Además en (Minoura et al., 1995) se concluye que la SF de *Bombyx mori* presenta unas capacidades comparables a las del colágeno, el cual es un material considerado como favorable para la adhesión y el crecimiento celular.

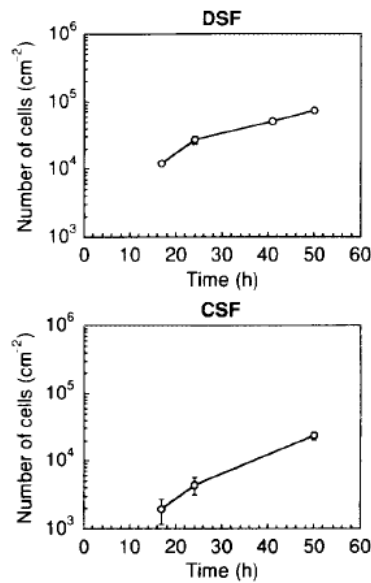


Figura 65. Curvas de crecimiento celular de células fibroblásticas (L-929) en membranas recubiertas con SF de *Bombyx mori* en su forma natural (DSF) y sin la región C-terminal (CSF) (Minoura et al., 1995).

Sample	Initial cell attachment ratio	Growth ratio
DSF	95± 5	126±10
CSF	13± 4	28±19

Tabla 9. Resultados de los experimentos de cultivo celular mostrando el ratio de adhesión celular inicial (A) y el ratio de crecimiento (G) de células fibroblásticas (L-929) en membranas recubiertas con SF de Bombyx mori en su forma natural (DSF) y sin la región C-terminal (CSF). Los ratios se definieron como $A = \frac{S_{17}}{C_{17}} \cdot 100$ y $G = \frac{S_{50}}{C_{50}} \cdot 100$, donde S_t y C_t son el número de células adheridas en la muestra de test y en el material de control, respectivamente, con un tiempo de incubación t. Se indica la media ± SD para cuatro conjuntos de experimentos (Minoura et al., 1995).

Otra consideración que podría complementar a la anterior sería la presencia de grupos amino en la SF, los cuales han demostrado promover la adhesión, proliferación y migración celular de células madre neuronales, así como incrementar la diferenciación neuronal (Li et al., 2013; Ren et al., 2009). También es interesante indicar que se ha observado un incremento en la expresión de genes relacionados con el crecimiento celular en células cultivadas en membranas de SF (Jo et al., 2011).

5.3. NGCs

5.3.1. Caracterización de las propiedades físico-químicas

5.3.1.1. Estudio mediante FESEM

5.3.1.1.1. Morfología superficial

Una vez caracterizadas las membranas de HA y de HA combinado con SF se procedió a la producción de NGCs con estos mismos materiales. Con el objetivo de caracterizar su morfología superficial se realizó un estudio mediante FESEM de NGCs de *HA sosa* y de *HA + 30% SF*. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

- **NGC de *HA sosa***

En primer lugar se realizó un corte longitudinal de la muestra con el objetivo de visualizar el lumen del NGC. En la figura 66 se muestra una imagen representativa de un NGC de *HA sosa* mostrando en detalle la superficie interna del conducto (figura 66 B) y un corte de la pared del conducto (figura 66 C).

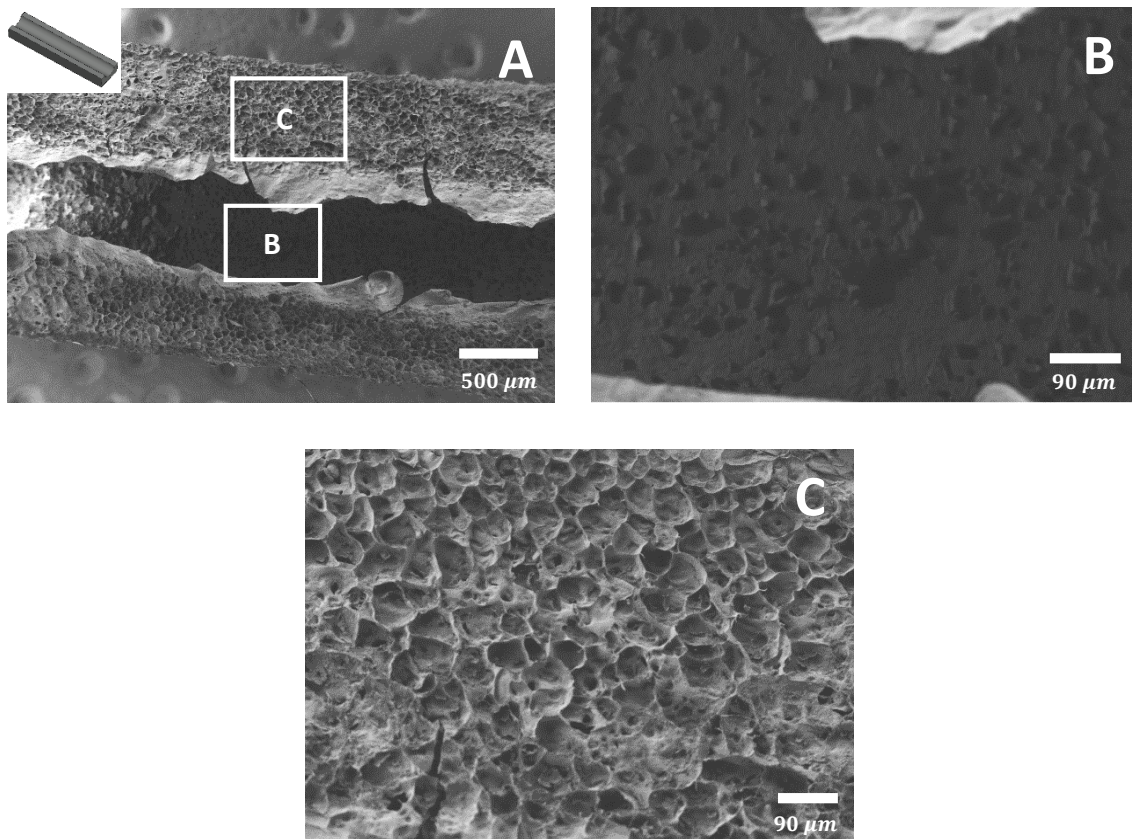


Figura 66. NGC de HA sosa: Corte longitudinal

Como se observa en la figura 66 B, la superficie interior del conducto es lisa, lo cual es de gran importancia para lograr que las células sembradas en el lumen permanezcan adheridas al interior del conducto sin salir exterior. Esto es debido a que la superficie del tubógeno (de la fibra de PCL) es hidrófoba, lo que provoca que en contacto con ella haya solamente una fina capa de HA sin contenido en agua, lo que hace que al liofilizar quede una fina capa sin porosidad.

En cambio, durante el proceso de liofilización del resto de material se ha logrado separar el contenido en agua de la disolución mediante la congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida, creándose así una estructura resistente y porosa. Esto hace que, como se aprecia en la figura 66 C, la pared del conducto presente una porosidad adecuada para permitir el intercambio de nutrientes y oxígeno con el exterior, lo cual es vital para lograr la supervivencia de las células del interior del NGC.

En cuanto al tamaño de los poros, éste se sitúa aproximadamente entre $10\ \mu\text{m}$ y $30\ \mu\text{m}$, el cual es un tamaño suficientemente grande como para permitir el intercambio de nutrientes y oxígeno, y lo suficientemente pequeño como para evitar tanto la entrada de células inflamatorias como la salida de factores de crecimiento. No obstante, hay que tener en cuenta que la imagen se ha realizado sobre una muestra desecada y que en hinchado el tamaño de poro podría variar, por lo que en un futuro sería adecuado realizar un estudio del tamaño de poro con conductos hinchados en agua empleando un crio-SEM.

En la figura 67 se muestra con más detalle cómo la superficie interna del NGC presenta una morfología más continua y lisa, mientras que la pared del conducto presenta una porosidad distribuida en varias capas situadas una sobre otra.

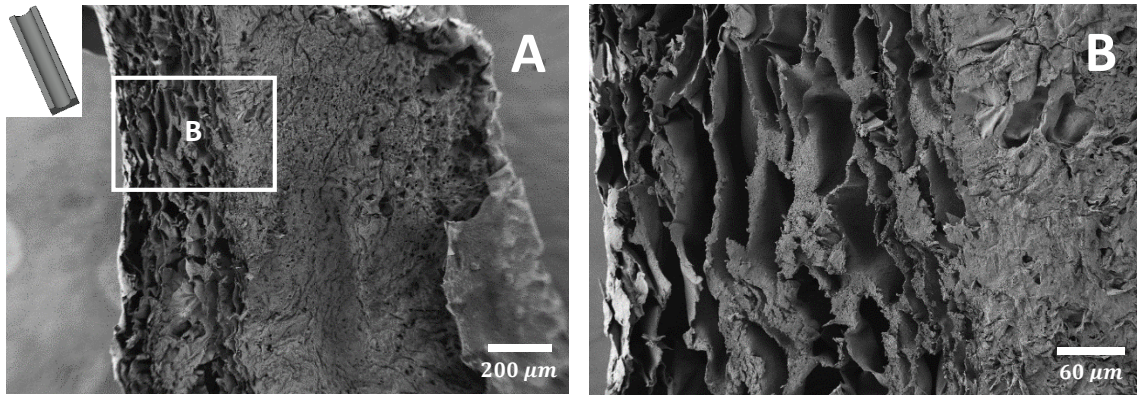


Figura 67. NGC de HA sosa: Corte longitudinal, detalle de la superficie interna y de la pared.

En la figura 68 se muestra un corte transversal donde puede apreciarse la circularidad del lumen gracias al uso de tubógenos cilíndricos de PCL. También puede observarse de nuevo que la superficie interna es lisa para favorecer así la adhesión celular. En la figura 67 C se muestra un detalle de la porosidad de las paredes del conducto, la cual es muy similar a la observada en el corte longitudinal.

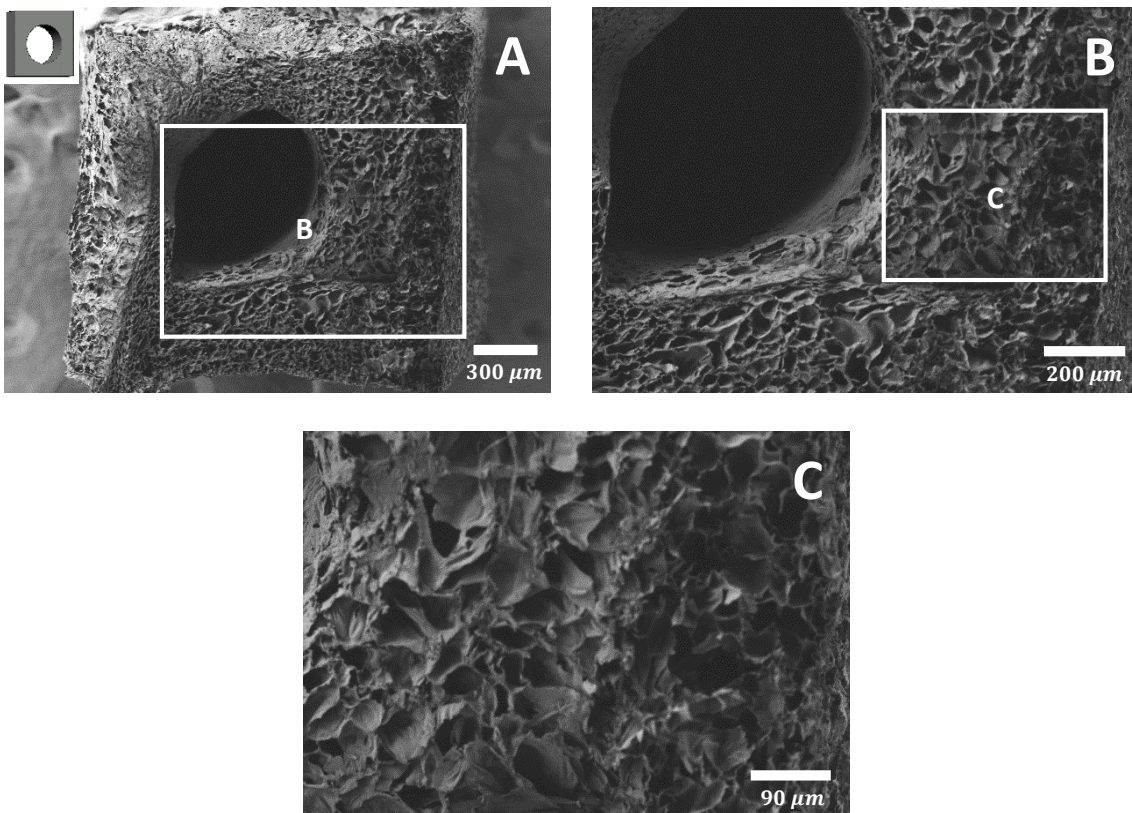


Figura 68. NGC de HA sosa: Corte transversal

- **NGC de HA + 30% SF**

Una vez caracterizados morfológicamente los NGCs basados en HA se procedió a repetir el proceso con los NGCs que incluían SF, con el objetivo de comprobar si las buenas características observadas en los NGCs de *HA sola* se mantenían o no al añadir la SF.

Como puede observarse en la figura 69, el NGC de *HA + 30% SF* mantiene tanto la superficie lisa del interior del conducto como la porosidad dispuesta en capas de las paredes. En la figura 69 B se muestra un detalle de la superficie interna del conducto, pudiéndose apreciar su morfología continua y lisa. Además pueden observarse estructuras alargadas dispuestas sobre la superficie que podrían corresponderse con fibras de SF (indicado con flechas en la figura 69 B). En las figuras 69 C y 69 D se muestra en detalle un corte de la pared del conducto, donde puede observarse que el tamaño de poro también se encuentra aproximadamente entre $10\ \mu\text{m}$ y $30\ \mu\text{m}$, como ocurría en los NGCs de *HA sola*.

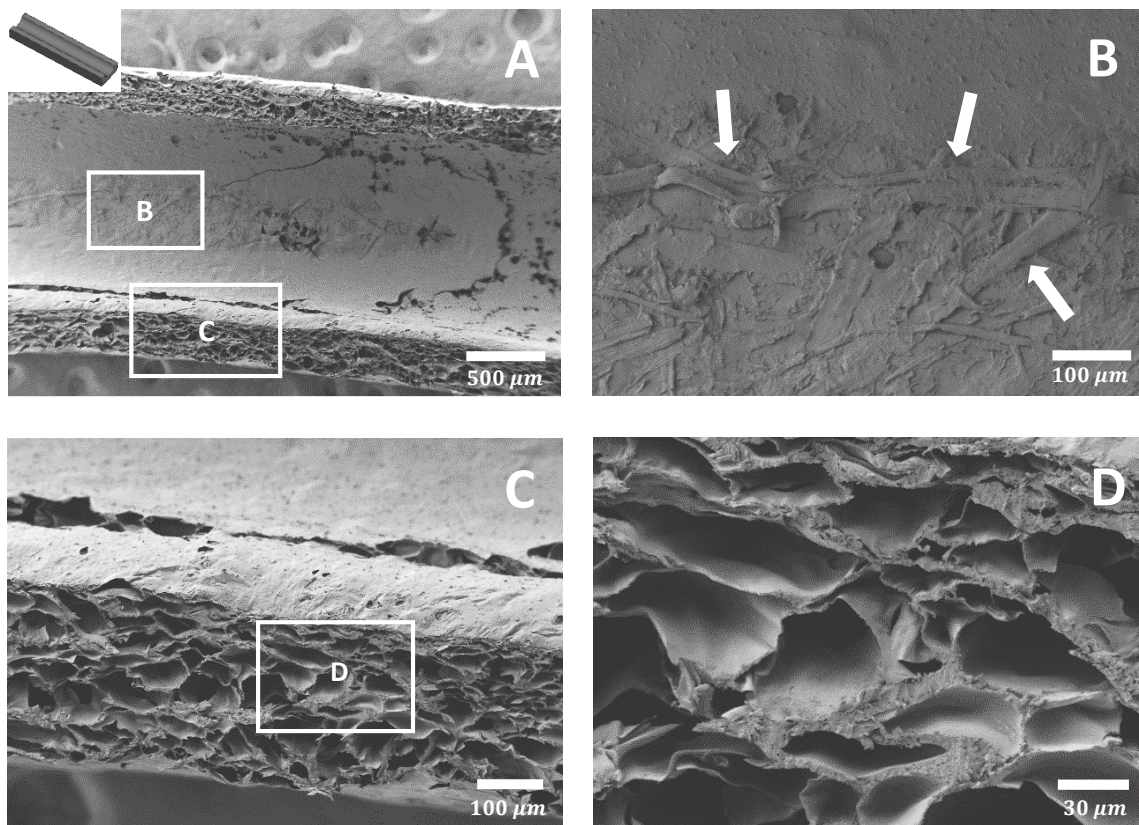


Figura 69. NGC de *HA + 30% SF*: corte longitudinal

Finalmente, en la figura 70 se muestra un corte transversal donde se puede observar la morfología circular del lumen del NGC. Asimismo se vuelve a comprobar que la superficie interna es lisa y que las paredes del conducto presentan una porosidad adecuada.

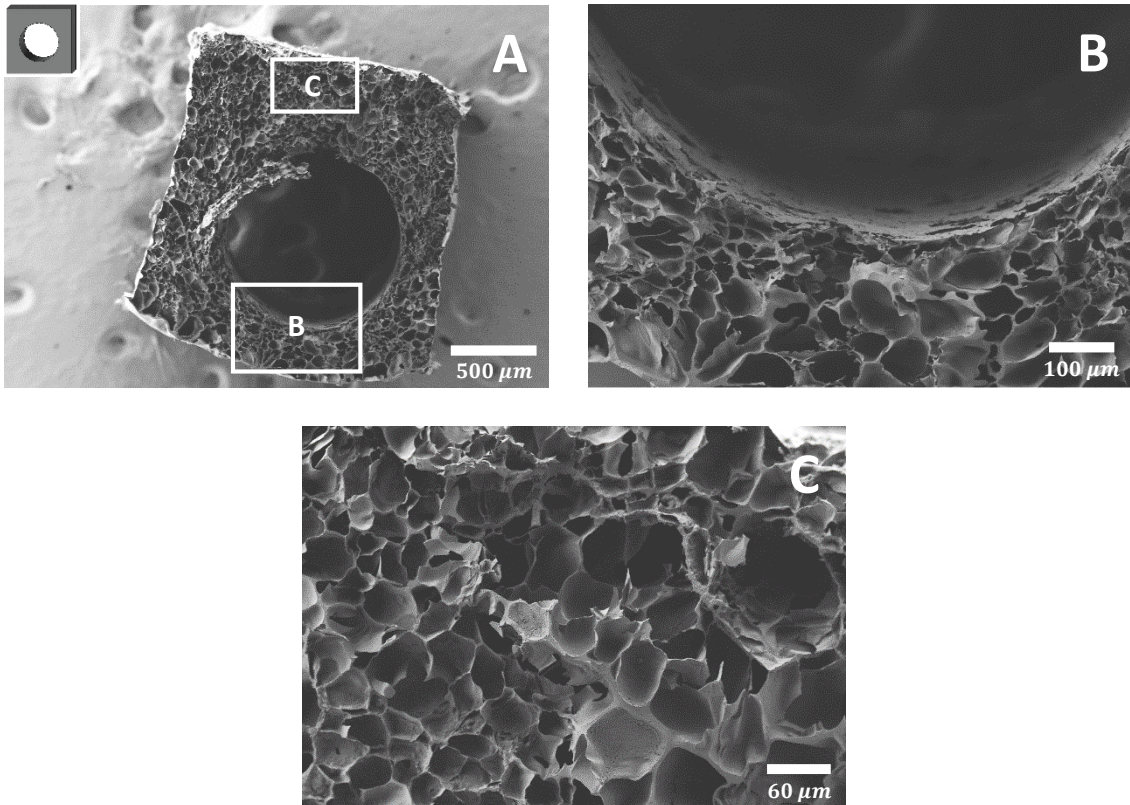


Figura 70. NGC de HA + 30% SF: corte transversal

En conclusión, la caracterización morfológica de los NGCs que incluyen SF muestra que la adición de este material a la disolución de HA no afecta ni a la superficie interna del conducto, la cual sigue presentando una morfología lisa, ni a la porosidad de sus paredes, cuyo tamaño y distribución de poros no cambia de forma significativa.

5.3.1.1.2. Análisis elemental

Como se realizó previamente con las membranas de HA *sosa* y de HA + 30% SF (apartado 5.2.1.1.2.), en este apartado se realizó un análisis elemental mediante FESEM de los NGCs fabricados con estos materiales para comprobar así la presencia de la SF.

Dado que los materiales de los NGCs se produjeron del mismo modo que los de las membranas (solo cambió el tipo de mole en el que se inyectó el material), las fracciones másicas de nitrógeno (ω_N) teóricas de ambos materiales son las mismas que en el caso de las membranas, es decir, un 2,60% de N para las muestras de HA *sosa* y un 6,75% de N para las muestras de HA + 30% SF. En la figura 71 se muestran los resultados obtenidos en el análisis elemental de estas muestras. Como se observa, las muestras que contienen SF presentan un mayor contenido en N, comprobándose así la presencia de SF en las muestras de HA + 30% SF.

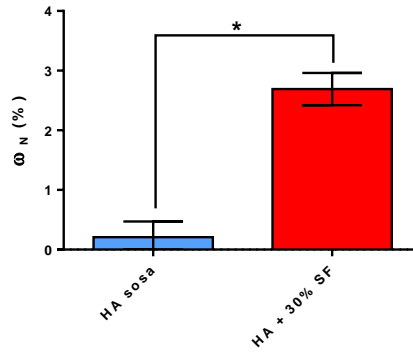


Figura 71. Fracción másica de nitrógeno obtenida con el análisis elemental de la superficie de NGCs de *HA sosa* y de *HA + 30% SF* mediante FESEM.

En cuanto a las fracciones másicas de nitrógeno obtenidas, esta son considerablemente menores que las obtenidas de forma teórica, como se muestra en la tabla 10. No obstante, como se indica en el apartado 5.2.1.1.2., existen diversas razones que podrían explicar este hecho. Por un lado, podría deberse a que el HA y la SF no se hubieran repartido de forma homogénea, por lo que el contenido en N variaría según se hubiera estudiado un área en la que se hubiera acumulado una mayor cantidad de SF u otra en la que la SF no hubiera llegado a difundirse. Un indicativo de esto sería la gran dispersión de los datos de *HA sosa*. Por otro lado, podría ocurrir que el N se hubiera concentrado en mayor cantidad en el interior del material que en la superficie para ambos tipos de muestras, lo cual haría que las medidas del análisis elemental realizado con el FESEM, el cual solamente estudia la superficie de la muestra, no fueran representativas de la fracción másica de N real del material.

Muestra	<i>HA sosa</i>	<i>HA + 30% SF</i>
ω_N teórica (%)	2,60	6,75
ω_N experimental (%)	0,21	2,69

Tabla 10. Fracción másica de nitrógeno obtenida de forma teórica y experimental mediante análisis elemental en muestras de NGCs de *HA sosa* y de *HA + 30% SF*.

Si se estudia la proporción entre la fracción másica de N perteneciente a la SF y la perteneciente al HA, en el apartado 5.2.1.1.2. se obtuvo que la proporción teórica entre ambos valores es la indicada en la ecuación 37. En cuanto a los datos experimentales, se ha obtenido que el porcentaje de N en las muestras de *HA sosa* es del 0,21%. Si se extrapola este porcentaje para las muestras de *HA + 30% SF*, teniendo en cuenta que disminuiría en un 30% por la adición de SF, se obtiene que la fracción másica de N experimental correspondiente al HA en las muestras de *HA + 30% SF* es del 0,15%. Por tanto, esto implica que del 2,69% de N de las muestras de *HA + 30% SF*, un 0,15% corresponde al N del HA y el otro 2,54% al N de la SF. En la ecuación 38 se calcula la proporción experimental entre la fracción másica de N perteneciente a la SF y la perteneciente al HA.

Ecuación 37

$$\left(\frac{\omega_{N,SF}}{\omega_{N,HA}} \right)_{teórica} = \frac{4,92 \%}{1,83 \%} = 2,7$$

$$\left(\frac{\omega_{N,SF}}{\omega_{N,HA}}\right)_{experimental} = \frac{2,54\%}{0,15\%} = 16,9$$

Si se compara la proporción teórica entre la fracción másica de N perteneciente a la SF y la perteneciente al HA con la experimental se observa que se obtiene una proporción mucho mayor de forma experimental. Dado que esta relación es proporcional a la existente entre la fracción másica de SF y la de HA, este resultado sería indicativo de que en la superficie del material existe una fracción másica de SF superior a la teórica. Una posible explicación de este hecho sería que en la superficie del material se hubiera producido una acumulación de SF, lo cual conllevaría que, dado que el FESEM analiza de forma aislada la superficie del material sin tener en cuenta su interior, la fracción másica de SF obtenida fuera superior a la teórica.

Finalmente también se obtuvieron los coeficientes entre las fracción másica de N y la de Na, O y S. Como se muestra en la figura 72, todos los coeficientes son significativamente mayores para las muestras de HA + 30% SF, lo cual indicaría la presencia de la SF en estas muestras.

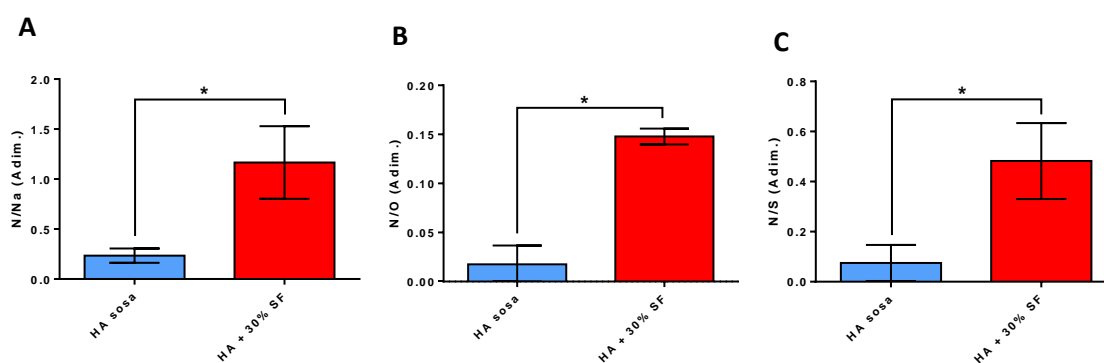


Figura 72. Coeficientes N/Na (A), N/O (B) y N/S (C) obtenidos con el análisis elemental de la superficie de NGCs de HA sosa y de HA + 30% SF mediante FESEM.

En conclusión, mediante el análisis elemental de la superficie de los NGCs de HA sosa y HA + 30% SF se ha logrado comprobar la existencia de SF en la superficie de los tubos a través del mayor contenido en N de las muestras que contenían SF. No obstante, se ha observado de forma experimental que la relación entre la fracción másica de N perteneciente a la SF y la perteneciente al HA $\left(\frac{\omega_{N,SF}}{\omega_{N,HA}}\right)$ es bastante mayor a la teórica, lo cual conlleva que la relación entre la fracción másica de SF y la de HA $\left(\frac{\omega_{SF}}{\omega_{HA}}\right)$ también lo sea. Esto sería indicativo de que la SF tiende a acumularse en la superficie del material en mayor medida que el HA, lo cual produciría que hubiera una mayor proporción de SF en esta zona. Cabe destacar que en el caso de las membranas (apartado 5.2.1.1.2) ya se obtuvo que la relación $\frac{\omega_{SF}}{\omega_{HA}}$ experimental era ligeramente superior a la teórica, lo cual también sería indicativo de una mayor proporción de SF en la superficie del material. No obstante, debe tenerse en cuenta que la gran dispersión de los datos de las muestras de HA sosa podría afectar considerablemente al resultado.

5.3.1.2. Cambio de dimensiones en hinchado

El comportamiento tras el hinchado en agua de NGCs de *HA sosa* y de *HA + 30% SF* se estudió a través del cambio en las dimensiones (longitud del conducto, diámetro del lumen y área de la sección transversal) de las muestras. En la figura 73 se muestra una imagen de una de las muestras de *HA sosa* estudiadas en estado seco e hinchado. En la figura 74 se muestra lo mismo para una de las muestras estudiadas de *HA +30% SF*.

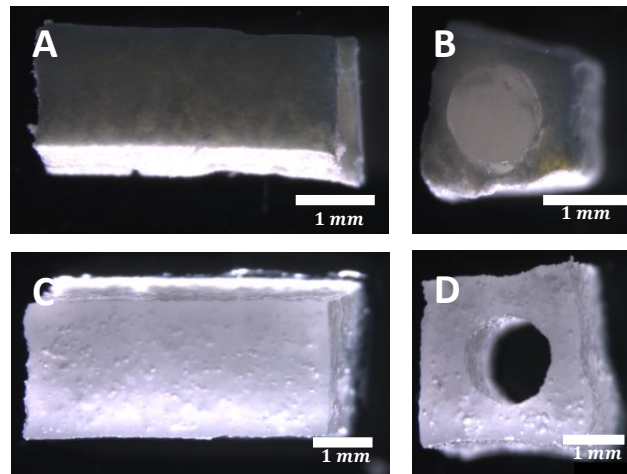


Figura 73. Cambio en las dimensiones en una muestra representativa de un NGC de *HA sosa* tras su hinchado en agua desionizada. A: Imagen longitudinal en estado seco, B: Imagen transversal en estado seco, C: Imagen longitudinal en estado hinchado, D: Imagen transversal en estado hinchado

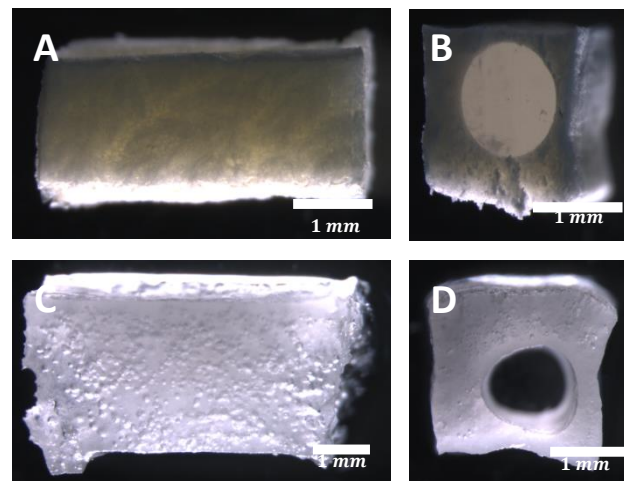


Figura 74. Cambio en las dimensiones en una muestra representativa de un NGC de *HA + 30 SF* tras su hinchado en agua desionizada. A: Imagen longitudinal en estado seco, B: Imagen transversal en estado seco, C: Imagen longitudinal en estado hinchado, D: Imagen transversal en estado hinchado

Como se observa en la figura 75, no existe una diferencia significativa en el cambio de dimensiones de los NGCs entre las muestras de *HA sosa* y las de *HA + 30% SF*. De este modo se comprueba que la adición de SF no ha afectado de forma significativa a la capacidad de absorción de agua de los NGCs.

En cuanto a los resultados obtenidos, se aprecia que la longitud de los NGCs aumenta aproximadamente en un 50% tras su hidratación (figura 75 A), mientras que el área de la sección transversal aumenta cerca de un 100% (figura 75 C). En cuanto al diámetro interno del lumen de los conductos, este no se ve muy afectado por el proceso de hinchado, ya que solamente aumenta en un 10% aproximadamente (figura 75 B). Respecto a las dimensiones concretas obtenidas, estas se indican en la tabla 11.

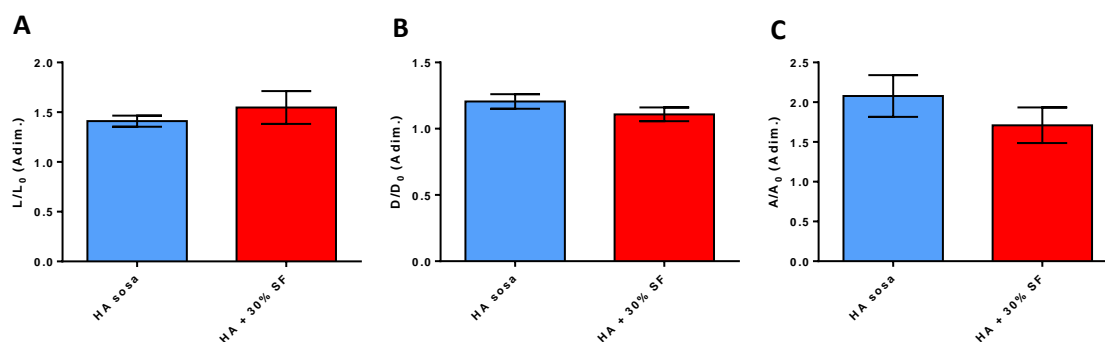


Figura 75. Cambio en las dimensiones de los NGCs tras su hinchado en agua desionizada durante 24 horas. A: Longitud del conducto en estado hinchado (L) dividida entre la longitud del conducto en estado seco (L_0). B: Diámetro del lumen en estado hinchado (D) dividido entre el diámetro del lumen en estado seco (D_0). C: Área de la sección transversal en estado hinchado (A) dividida entre el área de la sección transversal en estado seco (A_0).

	Estado	Longitud (mm)	Diámetro del lumen (mm)	Área de la sección transversal (mm)
HA sosa	Seco	$3,43 \pm 0,30$	$1,05 \pm 0,04$	$3,13 \pm 0,41$
	Hinchado	$4,83 \pm 0,36$	$1,27 \pm 0,06$	$6,43 \pm 0,24$
HA + 30% SF	Seco	$3,62 \pm 0,57$	$1,10 \pm 0,10$	$2,74 \pm 0,15$
	Hinchado	$5,60 \pm 1,07$	$1,23 \pm 0,14$	$4,70 \pm 0,76$

Tabla 11. Dimensiones de los NGCs de HA sosa y HA + 30% SF en estado seco e hinchado.

5.3.1.3. Densidad y porosidad

Por último se estudió la densidad y porosidad de NGCs tanto de HA sosa como de HA + 30% SF mediante un kit de densidad y porosidad. En la figura 76 se muestran los valores de densidad y de volumen específico (valor inverso a la densidad) correspondientes a estos materiales. Como puede observarse, no existe una diferencia significativa entre los valores obtenidos para ambos materiales, lo que implica que la adición de SF no afecta de forma significativa a la densidad de los NGCs.

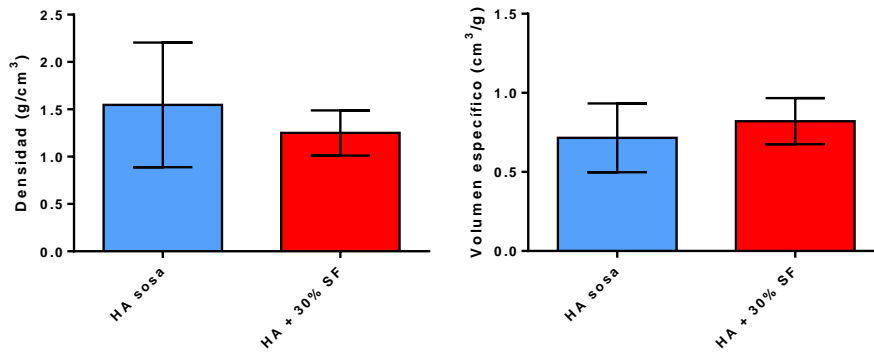


Figura 76. Valores de densidad y volumen específico de NGCs fabricados tanto con *HA sosa* como con *HA + 30% SF*.

En la figura 77 se muestran los valores de porosidad obtenidos para NGCs fabricados tanto con *HA sosa* como con *HA + 30% SF*. Como se aprecia, la adición de SF tampoco afecta de forma significativa a la porosidad de los NGCs. Esto es importante ya que indica que la SF no tapona ni rellena los espacios de los poros del HA, lo cual es de gran importancia a la hora de que los NGCs mantengan una permeabilidad que permita la difusión de oxígeno y nutrientes a través de los poros de la paredes del conducto.

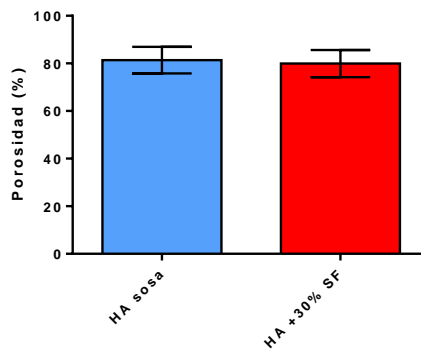


Figura 77. Valores de porosidad de NGCs fabricados tanto con *HA sosa* como con *HA + 30% SF*.

6. Presupuesto

Capítulo 1: Costes de personal						
Perfil	Número de horas	Coste unitario	Coste imputable (sin cuota patronal)	Cuota patronal (37,45%)	Coste imputable total	Tareas a realizar
Ingeniero biomédico	300,00 h	40,00 €/h	12.000,00 €	4.494,00 €	16.494,00 €	Definición y desarrollo de los experimentos, así como la presentación y discusión de los resultados obtenidos
Subtotal (sin cuota patronal)					12.000,00 €	
Subtotal (con cuota patronal)					16.494,00 €	

Tabla 12. Capítulo 1 del presupuesto: costes de personal

Capítulo 2: Costes de materiales								
Capítulo 2.1: Preparación de los biomateriales								
Material	Proveedor/ Referencia	Cantidad a utilizar	Coste unitario (sin IVA)	Formato	Coste imputable (sin IVA)	IVA (21%)	Coste imputable total	Justificación
Divinil sulfona (DVS)	Sigma-Aldrich / V3700	0,80 g	63,10 €	25,00 g	2,02 €	0,42 €	2,44 €	Elemento entrecruzador del HA
Ácido hialurónico (HA) derivado de <i>streptococcus equi</i>	Sigma-Aldrich / 53747	3,00 g	287,50 €	10,00 g	86,25 €	18,11 €	104,36 €	Fabricación de materiales basados en HA
Fibroína de seda (SF) obtenida de <i>Bombyx mori</i>	Universidad Politécnica de Madrid (Prof. Gustavo Guinea)	1,20 g	230,00 €	1,50 g	184,00 €	38,64 €	222,64 €	Fabricación de materiales que incluyen SF
n-octano	Sigma-Aldrich / 412236	50 ml	105,50 €	500 ml	10,55 €	2,22 €	12,77 €	n-octano para la realización de los ensayos de densidad y porosidad
NaOH	Panreac / 131687	1 g	22,00 €	100 g	0,22 €	0,05 €	0,27 €	Preparación de NaOH 0,2M
Agua ultrapura	Mili-Q®	0,1 l	25,00 €	1 l	2,50 €	0,53 €	3,03 €	Preparación de NaOH 0,2M
Agua destilada	Thermo Fisher Scientific / 15230204	0,50 l	15,00 €	1 l	7,50 €	1,58 €	9,08 €	Hinchado de las muestras
PTFE (cinta)	MIARCO	1 rollo	0,50 €	1 rollo	0,50 €	0,11 €	0,66 €	Fabricación de NGCs
PTFE (plancha)	Teflon	400 cm ²	25,00 €	400 cm ²	25,00 €	5,25 €	30,25 €	Fabricación de membranas y NGCs
PCL	Poly-sciences	100 g	59,90 €	100 g	49,50 €	10,40 €	59,90 €	Fabricación de NGCs

Capítulo 2.2: Cultivos celulares								
Material	Proveedor/ Referencia	Cantidad a utilizar	Coste unitario (sin IVA)	Formato	Coste imputable (sin IVA)	IVA (21%)	Coste imputable total	Justificación
Células de Schwann de rata	Innoprot / P10301	2.5 · 10 ⁵ células	565,00 €	5 · 10 ⁵ células	282,50 €	59,33 €	341,83 €	Cultivo celular en membranas
Kit medio de cultivo de células de Schwann	Innoprot / P60123	150 ml	135,00 €	500 ml	40,50 €	8,51 €	49,01 €	Cultivo celular en membranas
DMEM	Fisher / 21331020	400 ml	19,46 €	500 ml	15,57 €	3,27 €	18,84 €	Preacondicionamiento de las membranas
FBS	Fisher / 10270-106/A3381 E	40 ml	87,75 €	500 ml	7,02 €	1,47 €	8,49 €	Preacondicionamiento de las membranas
P/S	Fisher / 15140122	4 ml	13,20 €	100 ml	0,53 €	0,11 €	0,64 €	Preacondicionamiento de las membranas
PBS	Thermo Scientific / 10010015	500 ml	32,51 €	500 ml	32,51 €	6,83 €	39,34 €	Preacondicionamiento de las membranas
Tripsina - EDTA	Invitrogen / 25200-072	500 ml	57,00 €	500 ml	57,00 €	11,97 €	68,97 €	Despegado de las células
Etanol	Scharlab / ET00021000	300 ml	16,95 €	1 l	5,09 €	1,07 €	6,16 €	Esterilización de las membranas
Agua ultrapura	Mili-Q®	500 ml	25,00 €	1 l	12,50 €	2,63 €	15,13 €	Eliminación de los restos de etanol de las membranas
Capítulo 2.3: Inmunotinción								
DPBS	Innoprot / P60305	500 ml	24,67 €	500 ml	24,67 €	5,18 €	29,85 €	Lavado de las membranas
PFA	Sigma-Aldrich / 47608	250 ml	43,10 €	250 ml	43,10 €	9,05 €	52,15 €	Fijado de las células
BSA	Sigma-Aldrich / A7906	1 g	54,20 €	10 g	5,42 €	1,14 €	6,56 €	Tampón de bloqueo
NaCl	Sigma-Aldrich / 71387	8 g	113,00 €	25 g	36,16 €	7,59 €	43,75 €	Tampón de bloqueo
Tween 20	Sigma-Aldrich / P1379	10 ml	23,20 €	100 ml	2,32 €	0,49 €	2,81 €	Tampón de bloqueo
DAPI	Sigma-Aldrich / D9564	5 µl	119,00 €	0,50 ml	1,19 €	0,25 €	1,44 €	Tinción del núcleo celular
Falacidina 488	Invitrogen / B607	20 µl	629,00 €	1,50 ml	8,39 €	1,76 €	10,15 €	Tinción del citoesqueleto (filamentos de actina)
Capítulo 2.4: Fungibles								
Micro-pipeta 100-1000 µl	3B Scientific	1 unidad	75,00 €	1 unidad	75,00 €	15,75 €	90,75 €	Fabricación de los materiales
Micro-pipeta 5-20 µl	3B Scientific	1 unidad	75,00 €	1 unidad	75,00 €	15,75 €	90,75 €	Fabricación de los materiales

Capítulo 2.4: Fungibles								
Material	Proveedor/ Referencia	Cantidad a utilizar	Coste unitario (sin IVA)	Formato	Coste imputable (sin IVA)	IVA (21%)	Coste imputable total	Justificación
Puntas de micro-pipetas 100-1000 μ l	3B Scientific	200 unidades	8,80 €	500 unidades	3,52 €	0,74 €	4,26 €	Fabricación de los materiales
Puntas de micro-pipetas 5-20 μ l	3B Scientific	200 unidades	6,90 €	500 unidades	2,76 €	0,58 €	3,34 €	Fabricación de los materiales
Placas Petri	neoLab	6 unidades	13,34 €	1 unidad	80,04 €	16,81 €	96,85 €	Fabricación de los materiales
Eppendorfs	sanilabo-shop	50 unidades	5,00 €	500 unidades	0,5 €	0,11 €	0,61 €	Fabricación de los materiales
Vasos de precipitado 250 ml	POBEL	4 unidades	2,25 €	1 unidad	9 €	1,89 €	10,89 €	Fabricación de los materiales
Imanes	Nahita	6 unidades	3,93 €	1 unidad	23,58 €	4,95 €	28,53 €	Fabricación de los materiales
Subtotal (sin IVA)						1.211,91 €		
Subtotal (con IVA)						1.466,50 €		

Tabla 13. Capítulo 2 del presupuesto: costes de materiales

Capítulo 3: Costes de equipos y servicios							
Servicio	Marca / Fabricante	Número de horas	Coste unitario (sin IVA)	Coste imputable (sin IVA)	IVA (21%)	Coste imputable total	Justificación
Microscopio confocal	LEICA TCS SP5 / Leica microsystems	6,00 h	135 €/h	810,00 €	170,10 €	980,10 €	Visualización de las tinciones inmunocitoquímicas de rSCs
FESEM – Caracterización morfológica	ULTRA 55 / ZEISS Oxford instruments	4,00 h	135 €/h	540,00 €	113,40 €	653,40 €	Caracterización morfológica de membranas y NGCs
FESEM – Análisis elemental	ULTRA 55 / ZEISS Oxford instruments	2,00 h	325 €/h	650,00 €	136,50 €	786,50 €	Análisis elemental de membranas y NGCs
Reómetro	Discovery Hybrid Rheometer DHR / TA Instruments	8,00 h	33,00€/h	264,00 €	55,44 €	319,44 €	Caracterización de las propiedades mecánicas de los materiales
TGA	TGA-SDTA 851 / Mettler-Toledo	24 muestras	70,00 €/muestra	1.680,00 €	352,80 €	2.032,80 €	Caracterización de las propiedades físico-químicas de los materiales
DSC	DSC 8000 / PerkinElmer	25,00 h	70,00 €/h	1.750,00 €	367,50 €	2.117,50 €	Caracterización de las propiedades físico-químicas de los materiales
Balanza con kit de densidad y porosidad	AX205 / Mettler-Toledo	4,00 h	25,00 €/h	100,00 €	21,00 €	121,00 €	Caracterización de las propiedades físico-químicas de los materiales
Miniextrusora	HAAKE MiniLab II / Thermo Scientific	4,00 h	30 €/h	120,00 €	25,20 €	145,20 €	Creación de fibras de PCL para su uso como tubógenos
Liofilizadora	LyoQuest-85 / Telstar Life Science	20,00 días	10,00 €/día	200,00 €	42,00 €	242,00 €	Liofilización de las muestras

Capítulo 3: Costes de equipos y servicios							
Servicio	Marca / Fabricante	Número de horas	Coste unitario (sin IVA)	Coste imputable (sin IVA)	IVA (21%)	Coste imputable total	Justificación
Congelador -20 °C	FFGL 3030 A / Thermo Fisher Scientific	20,00 días	10,00 €/día	200,00 €	42,00 €	242,00 €	Congelación de las muestras
Congelador -80 °C	8584/ Thermo Fisher Scientific	20,00 días	10,00 €/día	200,00 €	42,00 €	242,00 €	Congelación de las muestras
Agitador magnético		20,00 días	5,00 €/día	100,00 €	21,00 €	121,00 €	Fabricación de los materiales
Vaivén	BOE 8059000 / BOECO	20,00 días	5,00 €/día	100,00 €	21,00 €	121,00 €	Fabricación de los materiales
Desecador	AG -15 B / RAYPA	20,00 días	5,00 €/día	100,00 €	21,00 €	121,00 €	Desecado de las muestras
Campana de flujo laminar	AV -100 / JAELSA	20,00 sesiones	8,00 €/sesión	160,00 €	33,60 €	193,60 €	Fabricación de los materiales y esterilización de las membranas para cultivo celular
Incubador CO ₂ 5%	Forma 310 Direct Heat CO ₂ / Thermo Fisher Scientific	5,00 días	5,00 €/día	25,00 €	5,25 €	30,25 €	Incubación de los cultivos celulares
Subtotal (sin IVA)						6.999,00 €	
Subtotal (con IVA)						8.468,79 €	

Tabla 14. Capítulo 3 del presupuesto: costes de equipos y servicios

Capítulo 4: Costes de informática								
Capítulo 4.1: Software								
Software	Coste licencia (sin IVA)	Número de licencias	Duración de la licencia	Periodo de uso	Coste imputable (sin IVA)	IVA (21%)	Coste imputable total	Justificación
Sistema Operativo Microsoft Windows 10 Pro	230,58 €	1	Indefinida	1 año	230,58 €	48,42 €	279,00 €	Sistema operativo a instalar en el equipo informático
Microsoft Office Profesional 2016	181,81 €	1	Indefinida	1 año	181,81 €	38,18 €	219,99 €	Procesado de los resultados obtenidos y redacción de proyectos y memorias
GraphPad Prism 6	14,79 €	1	1 mes	1 mes	14,79 €	3,11 €	17,90 €	Análisis estadístico de los resultados obtenidos
Capítulo 4.2: Hardware								
Hardware	Coste del equipo (sin IVA)	Unidades	Periodo de amortización	Periodo de uso	Coste imputable (sin IVA)	IVA (21%)	Coste imputable total	Justificación
Ordenador personal	495,04 €	1	3 años	1 año	495,04 €	103,96 €	599,00 €	Procesado de los resultados obtenidos y redacción de proyectos y memorias

Capítulo 4: Costes de informática	
Subtotal (sin IVA)	922,22 €
Subtotal (con IVA)	1.115,89 €

Tabla 15. Capítulo 4 del presupuesto: costes de informática

Resumen del presupuesto (con cuota patronal e IVA incluidos)	
Costes de personal	16.494,00 €
Costes de materiales	1.466,50 €
Costes de equipos y servicios	8.468,79 €
Costes de informática	1.115,89 €
Total	27.545,18 €

Tabla 16. Resumen del presupuesto

7. Conclusiones

De acuerdo al análisis de los resultados obtenidos en la caracterización de las propiedades físico-químicas, mecánicas y de adhesión y proliferación celular *in vivo* de los materiales desarrollados se pueden indicar las siguientes conclusiones:

- Se ha logrado incorporar la SF de forma satisfactoria al proceso de fabricación de *scaffolds* basados en HA, tanto con forma de membrana como de NGC.
- Se ha comprobado la presencia de la SF en los materiales mediante dos técnicas diferentes: un análisis elemental de la superficie y un análisis termogravimétrico. Asimismo se ha comprobado que la fracción másica de SF presente en los materiales es cercana a la teórica. Esto confirma que la SF está contenida en el material y no se ha perdido durante el proceso de fabricación.
- Los materiales desarrollados son estables en el tiempo frente a ciclos de hinchado y secado. Esto corrobora que la SF no se pierde durante el proceso de hinchado del material en agua, lo cual es de vital importancia ya que el modo de trabajo final de los materiales es en un entorno fisiológico en estado de hinchado.
- En comparación con los *scaffolds* basados únicamente en HA, se ha logrado obtener una mejora de las propiedades mecánicas del material gracias a la adición de SF. Con ello se han obtenido materiales capaces de almacenar aproximadamente el doble de energía sin sufrir deformaciones permanentes, es decir, se ha doblado la rigidez del material. Esto es de gran importancia por las pobres propiedades mecánicas que presentan los hidrogeles de HA, lo cual complica su manipulación.
- El cultivo *in vitro* de rSCs en membranas de HA y de HA combinado con SF durante 1 y 5 días ha mostrado una mejora de las propiedades biológicas en términos tanto de adhesión como de proliferación celular sobre la superficie del material gracias a la adición de SF. Esto se debe a que la SF proporciona residuos de arginina que interactúan con proteínas transmembranales de adhesión celular como las integrinas, lo cual es de gran importancia para lograr la adhesión de células de soporte a las paredes internas del conducto para lograr así un microentorno que favorezca la extensión axonal. Esto representa una mejora importante en comparación con los *scaffolds* basados únicamente en HA, ya que su carácter altamente hidrófilo produce que la adhesión celular sea muy baja. Asimismo se ha podido observar la ausencia de reacciones citotóxicas en el material en base a los resultados de adhesión y proliferación celular obtenidos.
- Se han desarrollado con éxito NGCs que presentan una estructura tubular adecuada, con una superficie interna lisa que favorece la adhesión celular y unas paredes con una porosidad adecuada que permite la difusión tanto de nutrientes como de oxígeno a la vez que evita tanto la entrada de células inflamatorias como la salida de factores de crecimiento.

En resumen, los resultados obtenidos confirman que es viable el uso de NGCs basados en HA en combinación con SF dentro del campo de la ingeniería tisular del sistema nervioso y, por tanto, pueden ser propuestos para su uso dentro de la regeneración axonal tanto del SNP como del

SNC. En comparación con los NGCs basados únicamente en HA, la adición de SF mantiene todas las buenas propiedades que presentan estas estructuras a la vez que mejora dos de sus puntos débiles: por un lado mejora las propiedades mecánicas del NGC, lo cual facilita su manipulación en etapas *in vitro* e *in vivo* y, por otro lado, mejora las propiedades de adhesión celular en el interior del conducto, lo cual permitirá mejorar la biofuncionalización del mismo con células de soporte gliales para crear así un microentorno favorecedor del crecimiento axonal en el interior del NGC.

8. Trabajo futuro

En este TFM se han desarrollado NGCs de HA combinado con SF en los cuales se ha comprobado que, además de mantener las favorables características estructurales de los NGCs basados únicamente en HA, son capaces de mejorar sus propiedades tanto mecánicas como biológicas. Una vez logrado esto, existen más pasos a seguir en un trabajo futuro, los cuales se detallan a continuación. Estas acciones se desarrollarán en el marco de dos proyectos de investigación en curso financiados por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad de España: “Biohíbridos para la promoción del crecimiento axonal y la regeneración en el sistema nervioso central y periférico” (MAT2015-66666-C3-1-R) y “Neurocables modulares: multiplicando conexiones neurales” (Proyecto EXPLORA, DPI2015-72863-EXP).

Dado que se ha comprobado que el material presenta unas buenas propiedades biológicas con una alta adhesión y proliferación celular, el siguiente paso sería realizar una biofuncionalización de los NGCs mediante la siembra en su luz de células gliales que proporcionen un entorno biológico adecuado para dar soporte y ejercer un efecto neuroprotector que favorezca el crecimiento axonal.

Asimismo, también se deberían incorporar estructuras en el interior del conducto que favorezcan el guiado axonal. Una posible forma de llevarlo a cabo sería la introducción de microfibrillas en el lumen que discurrieran paralelamente a las paredes del conducto sobre las que pudieran disponerse las células y que las guiaran de un extremo a otro del NGC (ver figura 78). Estas fibrillas deben fabricarse con materiales que permitan la adhesión y proliferación celular sobre su superficie, a la vez que mantienen unas propiedades mecánicas adecuadas. Un ejemplo sería el uso de haces de fibras de ácido poli-L-láctico (PLLA) dispuestas a lo largo del lumen.

Con estas acciones realizadas ya se podrían realizar cocultivos *in vitro* de células gliales como células de Schwann con neuronas en el interior del conducto para evaluar el crecimiento axonal en el seno del biohíbrido. Un esquema de las estructuras biohíbridas a desarrollar que incluye las mejoras nombradas anteriormente se muestra en la figura 78.

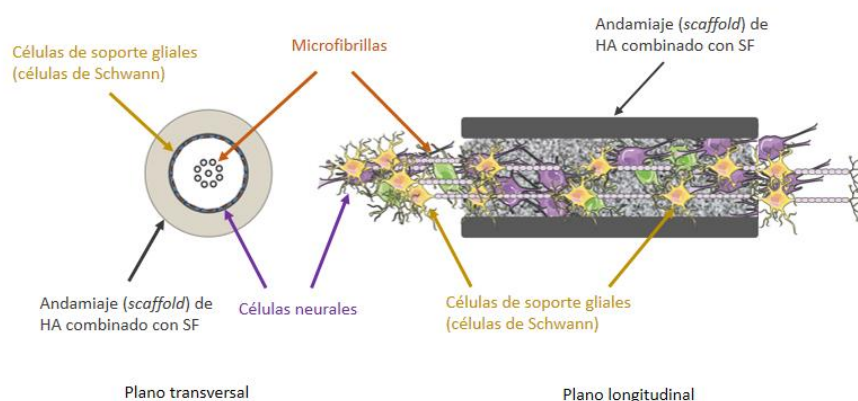


Figura 78. Representación de las estructuras biohíbridas a desarrollar en un futuro para favorecer la extensión axonal (producción propia)

Una vez realizada una caracterización biológica *in vitro* del biohíbrido que permitiera comprobar la conectividad funcional ente poblaciones neurales situadas a ambos extremos del conducto mediante ensayos de electrofisiología, el siguiente paso sería la realización de experimentación *in vivo* en modelos animales, en concreto de rata, con el objetivo de evaluar tanto la regeneración axonal producida como si existe una mejora en la manipulabilidad de los conductos durante el proceso de sutura. En la figura 79 se muestra un esquema con los diferentes campos de aplicación de los NGCs desarrollados. Cabe destacar que las dimensiones de los NGCs son modificables a través de un cambio en las medidas del molde empleado, por lo que el conducto puede adaptarse tanto a distintos modelos de lesión (nervio ciático, médula espinal, tractos cerebrales) como a diferentes especies animales.

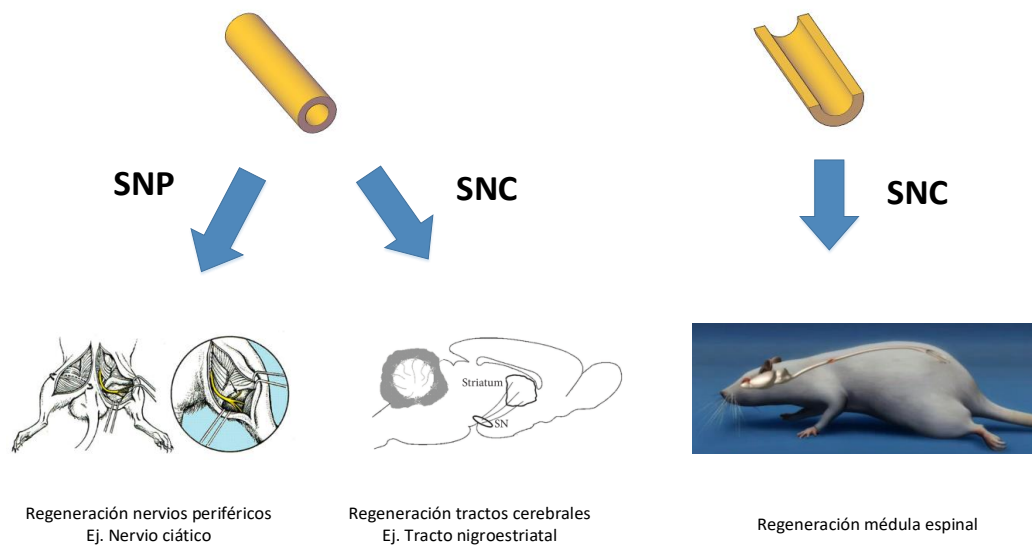


Figura 79. Campos de aplicación de los NGCs desarrollados (producción propia). Imágenes: (Jozwiak, Liu, Yang, & Gates, 2014; Keirstead et al., 2005; Yonekawa, n.d.).

En cuanto a los campos concretos de aplicación, por un lado estaría la utilización de los NGCs para la regeneración de lesiones largas (*gap* > 3 cm) del SNP como, por ejemplo, para la reparación de lesiones de nervio ciático. Por otro lado, los conductos también se podrían aplicarse para la regeneración de lesiones del SNC, en concreto de médula espinal. Dado que en estas lesiones no suele producirse el seccionamiento completo del tracto axonal y que la situación de la médula espinal no permite la introducción de un conducto que la rodee de forma completa, la morfología de los conductos debería adaptarse a un modelo de conducto abierto en lugar de cerrado, como se muestra en la figura 79. Finalmente, otra posible aplicación de los NGCs desarrollados sería la regeneración de tractos cerebrales. En concreto se ha pensado en la regeneración del tracto nigroestriatal, ya que es una estructura formada por neuronas encargadas de transmitir dopamina con axones que recorren toda su longitud y que se daña como consecuencia de la enfermedad de Parkinson.

En conclusión, se espera que la evaluación histológica, morfológica, inmunocitoquímica y funcional de la integración *in vivo* del implante revele que se haya producido la reconexión de ambos extremos de la lesión con una recuperación de la función perdida, permitiendo avanzar hacia la mejora de las terapias clínicas actuales.

9. Referencias

- Allen, S. J., Watson, J. J., Shoemark, D. K., Barua, N. U., & Patel, N. K. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacology and Therapeutics*, *138*(2), 155–175.
- Apel, P. J., Garrett, J. P., Sierpinski, P., Ma, J., Atala, A., Smith, T. L., ... Van Dyke, M. E. (2008). Peripheral nerve regeneration using a keratin-based scaffold: long-term functional and histological outcomes in a mouse model. *The Journal of Hand Surgery*, *33*(9), 1541–7.
- Araque-Monrós, M. C., Vidaurre, A., Gil-Santos, L., Gironés Bernabé, S., Monleón-Pradas, M., & Más-Estellés, J. (2013). Study of the degradation of a new PLA braided biomaterial in buffer phosphate saline, basic and acid media, intended for the regeneration of tendons and ligaments. *Polymer Degradation and Stability*, *98*(9), 1563–1570.
- Arnal-Pastor, M., Talla Ferrer, C., Herrero Herrero, M., Martínez-Gómez Aldaravi, A., Monleón Pradas, M., & Valles-Lluch, A. (2016). Scaffolds based on hyaluronan and carbon nanotubes gels. *Journal of Biomaterials Applications*, *31*(4), 534–543.
- Baird, A. (1994). Fibroblast growth factors: activities and significance of non-neurotrophin neurotrophic growth factors. *Current Opinion in Neurobiology*, *4*(1), 78–86.
- Belkas, J. S., Shoichet, M. S., & Midha, R. (2004). Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurological Research*, *26*, 151–160.
- Bradley, W. G. (Walter G. (2004). *Neurology in clinical practice*. Butterworth-Heinemann.
- Brecht, M., Mayer, U., Schlosser, E., & Prehm, P. (1986). Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *The Biochemical Journal*, *239*(2), 445–50.
- Brett Szymik. (2011). A Nervous Journey. ASU - Ask A Biologist. Retrieved May 8, 2017, from <http://askabiologist.asu.edu/parts-nervous-system>
- Burnett, M. G., & Zager, E. L. (2004). Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurgical Focus*, *16*(5), E1.
- Calcagno, C., Lobatto, M. E., Robson, P. M., & Millon, A. (2016). Mapping structural landmarks, ligand binding sites and missense mutations to the collagen IV heterotrimers predicts major functional domains, novel interactions and variation in phenotypes in inherited diseases affecting basement membranes. *Hum Mutat.*, *28*(10), 1304–1314.
- Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal : Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, *17* Suppl 4(Suppl 4), 467–79.
- Chen, L., Huang, H., Xi, H., Zhang, F., Liu, Y., Chen, D., & Xiao, J. (2014). A prospective randomized double-blind clinical trial using a combination of olfactory ensheathing cells and Schwann cells for the treatment of chronic complete spinal cord injuries. *Cell Transplantation*, *23* Suppl 1(May), S35-44.
- Chen, M.-M., Qin, J., Chen, S.-J., Yao, L.-M., Zhang, L.-Y., Yin, Z.-Q., & Liao, H. (2017). Quercetin promotes motor and sensory function recovery following sciatic nerve-crush injury in C57BL/6 J mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *46*(24), 57–67.

- Chen, Y.-S., Chang, J.-Y., Cheng, C.-Y., Tsai, F.-J., Yao, C.-H., & Liu, B.-S. (2005). An in vivo evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material. *Biomaterials*, *26*(18), 3911–8.
- Cheng, Y., Koh, L. D., Li, D., Ji, B., Han, M. Y., & Zhang, Y. W. (2014). On the strength of beta-sheet crystallites of Bombyx mori silk fibroin. *Journal of the Royal Society Interface*, *11*(April), 20140305.
- Chou, R.-H., Lu, C.-Y., Wei-Lee, Jia-Rong, F., Yu, Y.-L., & Shyu, W.-C. (2014). Review The Potential Therapeutic Applications of Olfactory Ensheathing Cells in Regenerative Medicine. *Cell Transplantation*, *23*(May), 567–571.
- Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. *Carbohydrate Polymers*, *92*(2), 1262–1279.
- Cowman, M. K., & Matsuoka, S. (2005). Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*, *340*(5), 791–809.
- Dalamagkas, K., Tsintou, M., & Seifalian, A. (2015). Advances in peripheral nervous system regenerative therapeutic strategies: A biomaterials approach. *Materials Science and Engineering C*, *65*, 425–432.
- Daly, W., Yao, L., Zeugolis, D., Windebank, A., & Pandit, A. (2012). A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *Journal of the Royal Society, Interface*, *9*(67), 202–21.
- de Ruiter, G. C. W., Malessy, M. J. A., Yaszemski, M. J., Windebank, A. J., & Spinner, R. J. (2009). Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurgical Focus*, *26*(2), E5.
- DEPOSITPHOTOS. (n.d.). Estructura del ácido hialurónico. Retrieved June 3, 2017, from <https://sp.depositphotos.com/77526006/stock-illustration-structure-of-hyaluronic-acid.html>
- Di Ferrante, N. (1956). Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *220*(1), 303–6.
- Dubový, P., Klusáková, I., & Hradilová Svíženská, I. (2014). Inflammatory profiling of Schwann cells in contact with growing axons distal to nerve injury. *BioMed Research International*, *2014*.
- Fernández Burguera, E. (2015). Ingeniería de Tejidos. Retrieved May 12, 2017, from <http://www.ciber-bbn.es/programas-transversales/programa-de-difusion-e-internacionalizacion/biomedicina-con-y-para-la-sociedad/miniserie-de-tv/ingenieria-de-tejidos>
- Fu, Q., Hue, J., & Li, S. (2007). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Promote Axon Regeneration via RhoA Inhibition. *Journal of Neuroscience*, *27*(15), 4154–4164.
- Fundación Step by Step. (2013). Terapia celular en la lesión medular, nuevas estrategias de tratamiento de la lesión medular. Retrieved May 14, 2017, from <http://www.fundacionstepbystep.com/investigacion/proyectos/>
- Giudetti, G., del Valle Macia, J., Navarro Acebes, X., & Micera, S. (2014). NGF-loaded PLGA microparticles for advanced multifunctional regenerative electrodes. *Conference Proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference, 2014*, 1993–1995.

- Gréant, C. (2016). Improvement of tubular scaffold for axonal extension: addition of polylactic acid (PLA) microspheres.
- Gu, X., Ding, F., Yang, Y., & Liu, J. (2011). Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Progress in Neurobiology*, *93*(2), 204–230.
- Hadlock, T., Sundback, C., Koka, R., Hunter, D., Cheney, M., & Vacanti, J. (1999). A novel, biodegradable polymer conduit delivers neurotrophins and promotes nerve regeneration. *The Laryngoscope*, *109*(9), 1412–6.
- Hall, S. (2005). The response to injury in the peripheral nervous system. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, *87*(10), 1309–19.
- Houschyar, K. S., Momeni, A., Pyles, M. N., Cha, J. Y., Maan, Z. N., Duscher, D., ... Schoonhoven, J. van. (2016). The Role of Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair. *Plastic Surgery International*, *2016*, 1–8.
- Hsueh, Y. Y., Chang, Y. J., Huang, T. C., Fan, S. C., Wang, D. H., Jason Chen, J. J., ... Lin, S. C. (2014). Functional recoveries of sciatic nerve regeneration by combining chitosan-coated conduit and neurosphere cells induced from adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, *35*(7), 2234–2244.
- Hu, M., Sabelman, E. E., Tsai, C., Tan, J., & Hentz, V. R. (2000). Improvement of Schwann Cell Attachment and Proliferation on Modified Hyaluronic Acid Strands by Polylysine. *Tissue Engineering*, *6*(6), 585–593.
- Huebner, E. a, & Strittmatter, S. M. (2009). Axon Regeneration in the Peripheral and Central Nervous Systems. *Results and Problems in Cell Differentiation. Author Manuscript*, *48*, 339–351.
- Ikeda, M., Uemura, T., Takamatsu, K., Okada, M., Kazuki, K., Tabata, Y., ... Nakamura, H. (2014). Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *102*(5), 1370–1378.
- Isaacs, J., Mallu, S., Wo, Y., & Little, B. (2014). Consequences of Nerve to Nerve Tube Diameter Mismatch. In *American Society for Peripheral Nerve*.
- J. Lancashire, R. (2011). Chemistry of Garments: Animal Fibres. Retrieved June 3, 2017, from http://wwwchem.uwimona.edu.jm/courses/CHEM2402/Textiles/Animal_Fibres.html
- Jiang, D., Liang, J., & Noble, P. W. (2007). Hyaluronan in Tissue Injury and Repair. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *23*(1), 435–461.
- Jin, X., & Yamashita, T. (2016). Microglia in central nervous system repair after injury. *Journal of Biochemistry*, *159*(5), 491–496.
- Jo, Y., Kweon, H., Lee, K., Nam, S., Lee, H., & Yeo, J. (2011). The Promotion of Cell Attachment and Proliferation on Silk Fibroin, *54*(3), 166–170.
- Jones, D. (2011). Volumizing the face with soft tissue fillers. *Clinics in Plastic Surgery*, *38*(3), 379–90, v.
- Jozwiak, A., Liu, Y., Yang, Y., & Gates, M. A. (2014). Development of a stereotaxic device for low impact implantation of neural constructs or pieces of neural tissues into the mammalian brain. *BioMed Research International*, *2014*, 651236.

- Kanno, H., Pearse, D. D., Ozawa, H., Itoi, E., & Bunge, M. B. (2015). Schwann cell transplantation for spinal cord injury repair: its significant therapeutic potential and prospectus. *Reviews in the Neurosciences*, 26(2), 121–128.
- Karahaliloglu, Z., Ercan, B., Denkbaz, E. B., & Webster, T. J. (2015). Nanofeatured silk fibroin membranes for dermal wound healing applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 103(1), 135–144.
- Kehoe, S., Zhang, X. F., & Boyd, D. (2012). FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy. *Injury*, 43(5), 553–572.
- Keirstead, H. S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., & Steward, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(19), 4694–705.
- Khaing, Z. Z., Milman, B. D., Vanscoy, J. E., Seidlits, S. K., Grill, R. J., & Schmidt, C. E. (2011). High molecular weight hyaluronic acid limits astrocyte activation and scar formation after spinal cord injury. *Journal of Neural Engineering*, 8(4), 46033.
- Krueger, H., Noonan, V. K., Trenaman, L. M., Joshi, P., & Rivers, C. S. (2013). The economic burden of traumatic spinal cord injury in Canada. *Chronic Diseases and Injuries in Canada*, 33(3), 113–22.
- Kubinová, Š., & Syková, E. (2012). Biomaterials combined with cell therapy for treatment of spinal cord injury. *Regenerative Medicine*, 7(2), 207–224.
- Lam, J., Truong, N. F., & Segura, T. (2014). Design of cell-matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 10(4), 1571–80.
- Lei, Y., Gojgini, S., Lam, J., & Segura, T. (2011). The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials*, 32(1), 39–47.
- Li, H.-L., Zhang, H., Huang, H., Liu, Z.-Q., Li, Y.-B., Yu, H., & An, Y.-H. (2013). The effect of amino density on the attachment, migration, and differentiation of rat neural stem cells in vitro. *Molecules and Cells*, 35(5), 436–43.
- Lin, C.-M., Lin, J.-W., Chen, Y.-C., Shen, H.-H., Wei, L., Yeh, Y.-S., ... Chiu, W.-T. (2009). Hyaluronic acid inhibits the glial scar formation after brain damage with tissue loss in rats. *Surgical Neurology*, 72 Suppl 2, S50-4.
- Lin, M. Y., Manzano, G., & Gupta, R. (2013). Nerve allografts and conduits in peripheral nerve repair. *Hand Clinics*, 29(3), 331–48.
- Lohmeyer, J. A., Siemers, F., Machens, H. G., & Mailander, P. (2009). The clinical use of artificial nerve conduits for digital nerve repair: a prospective cohort study and literature review. *J Reconstr Microsurg*, 25(1), 55–61.
- Lu, Q., Zhang, B., Li, M., Zuo, B., Kaplan, D. L., Huang, Y., & Zhu, H. (2011). Degradation mechanism and control of silk fibroin. *Biomacromolecules*, 12(4), 1080–1086.
- Mackinnon, S. E., & Hudson, A. R. (1992). Clinical application of peripheral nerve transplantation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 90(4), 695–9.
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3(4), 1377–1397.

- Maleki, A., Kjøniksen, A. L., & Nyström, B. (2008). Effect of pH on the behavior of hyaluronic acid in dilute and semidilute aqueous solutions. *Macromolecular Symposia*, 274(1), 131–140.
- Maltese, A., Borzacchiello, A., Mayol, L., Bucolo, C., Maugeri, F., Nicolais, L., & Ambrosio, L. (2006). Novel polysaccharides-based viscoelastic formulations for ophthalmic surgery: Rheological characterization. *Biomaterials*, 27(29), 5134–5142.
- Meek, M. F., & Coert, J. H. (2008). US Food and Drug Administration /Conformit Europe-approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves. *Annals of Plastic Surgery*, 60(4), 466–72.
- Minoura, N., Aiba, S., Higuchi, M., Gotoh, Y., Tsukada, M., & Imai, Y. (1995). Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Monteiro, G. A., Fernandes, A. V, Sundararaghavan, H. G., & Shreiber, D. I. (2011). Positively and Negatively Modulating Cell Adhesion to Type I Collagen Via Peptide Grafting. *Tissue Engineering Part A*, 17(13–14), 1663–1673.
- Muheremu, A., & Ao, Q. (2015). Past , Present , and Future of Nerve Conduits in the Treatment of Peripheral Nerve Injury, 2015.
- Murphy, A. R., & Kaplan, D. L. (2009). Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *Journal of Materials Chemistry*, 19(36), 6443.
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (n.d.). Peripheral Neuropathy Fact Sheet. Retrieved May 14, 2017, from <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Fact-Sheets/Peripheral-Neuropathy-Fact-Sheet>
- Nectow, A. R., Marra, K. G., & Kaplan, D. L. (2012). Biomaterials for the Development of Peripheral Nerve Guidance Conduits. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 18(1), 40–50.
- Oh, E. J., Kang, S., Kim, B., Jiang, G., Cho, I. H., & Hahn, S. K. (2008). Control of the molecular degradation of hyaluronic acid hydrogels for tissue augmentation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 86A(3), 685–693.
- Oh, S. H., Kim, J. H., Song, K. S., Jeon, B. H., Yoon, J. H., Seo, T. B., ... Lee, J. H. (2008). Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. *Biomaterials*, 29(11), 1601–1609.
- OHAUS. (n.d.). Ohaus 80253384 Solids Density Determination Kit. Retrieved June 10, 2017, from http://www.scalesgalore.com/product/index.cfm?product_id=26538
- Oksala, O., Salo, T., Tammi, R., Häkkinen, L., Jalkanen, M., Inki, P., & Larjava, H. (1995). Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 43(2), 125–35.
- OpenStax-CNX. (2016). Neurons and Glial Cells. Retrieved May 10, 2017, from <https://cnx.org/contents/c9j4p0aj@4/Neurons-and-Glial-Cells>
- Oudega, M., & Xu, X.-M. (2006). Schwann Cell Transplantation for Repair of the Adult Spinal Cord. *Journal of Neurotrauma*, 23(3–4), 453–467.
- Perez Garnes, M. (2015). Structures based on semi-degradable biomaterials for neural regeneration in the central nervous system., (January).
- Pires, L. R., Guarino, V., Oliveira, M. J., Ribeiro, C. C., Barbosa, M. A., Ambrosio, L., & Pêgo, A. P. (2016). Ibuprofen-loaded poly(trimethylene carbonate-co-ε-caprolactone) electrospun

- fibres for nerve regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10(3), E154-66.
- Ray, W. Z., Kale, S. S., Kasukurthi, R., Papp, E. M., Johnson, P. J., Santosa, K. B., ... Tung, T. H. (2011). Effect of cold nerve allograft preservation on antigen presentation and rejection. *Journal of Neurosurgery*, 114(1), 256–62.
- Reijnen, M. M. P. J., Bleichrodt, R. P., & van Goor, H. (2003). Pathophysiology of intra-abdominal adhesion and abscess formation, and the effect of hyaluronan. *The British Journal of Surgery*, 90(5), 533–41.
- Ren, Y. J., Zhang, H., Huang, H., Wang, X. M., Zhou, Z. Y., Cui, F. Z., & An, Y. H. (2009). In vitro behavior of neural stem cells in response to different chemical functional groups. *Biomaterials*, 30(6), 1036–1044.
- Rodríguez-Pérez, E., Lloret Compañ, A., Monleón Pradas, M., & Martínez-Ramos, C. (2016). Scaffolds of Hyaluronic Acid-Poly(Ethyl Acrylate) Interpenetrating Networks: Characterization and In Vitro Studies. *Macromolecular Bioscience*, 16(8), 1147–57.
- Rowell, R. M., & Green, J. (1972). Effects of trans a-hydroxyl groups in alkaline degradation of glycosidic bonds.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
- Scott, J. E. (1989). Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. *Ciba Foundation Symposium*, 143, 6-15-20, 281–5.
- Singh, A., Tetreault, L., Kalsi-Ryan, S., Nouri, A., & Fehlings, M. G. (2014). Global Prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clinical Epidemiology*, 6, 309–331.
- Taddei, P., Pavoni, E., & Tsukada, M. (2016). Stability toward alkaline hydrolysis of B. mori silk fibroin grafted with methacrylamide. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47(6), 731–739.
- Tang, X., Ding, F., Yang, Y., Hu, N., Wu, H., & Gu, X. (2009). Evaluation on in vitro biocompatibility of silk fibroin-based biomaterials with primarily cultured hippocampal neurons. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 91(1), 166–174.
- Tian, L., Prabhakaran, M. P., & Ramakrishna, S. (2015). Strategies for regeneration of components of nervous system: scaffolds, cells and biomolecules. *Regenerative Biomaterials*, 2(1), 31–45.
- Tsintou, M., Dalamagkas, K., & Seifalian, A. M. (2015). Advances in regenerative therapies for spinal cord injury: a biomaterials approach. *Neural Regeneration Research*, 10(5), 726–42.
- U.S. Department of Health and Human Services. (2016). Tissue Engineering and Regenerative Medicine | National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. Retrieved May 12, 2017, from <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>
- Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Jackson, R. B., Minorsky, P. V., & Reece, J. B. (2013). *Campbell biology in focus*. Benjamin-Cummings.
- Vepari, C., & Kaplan, D. L. (2007). Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 32(8–9), 991–1007.

- Vilarriño Feltrer, G. (2015). Conductos de ácido hialurónico para el crecimiento axonal guiado.
- Wang, X., Budel, S., Baughman, K., Gould, G., Song, K.-H., & Strittmatter, S. M. (2009). Ibuprofen enhances recovery from spinal cord injury by limiting tissue loss and stimulating axonal growth. *Journal of Neurotrauma*, 26(1), 81–95.
- Wisniowski, M.-T. (2013). The General Properties of Fiber Polymers and Fibers Fiber Chemistry - Part II. Retrieved June 6, 2017, from <http://artquill.blogspot.com.es/2013/05/the-general-properties-of-fiber.html>
- World Health Organization. (2013). *International Perspectives on Spinal Cord Injury*. (J. Bickenbach, Ed.).
- Wray, L. S., Hu, X., Gallego, J., Georgakoudi, I., Omenetto, F. G., Schmidt, D., & Kaplan, D. L. (2011). Effect of processing on silk-based biomaterials: Reproducibility and biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 99 B(1), 89–101.
- Xiao, L., Wang, B., Yang, G., & Gauthier, M. (2006). Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials : Synthesis , Modification and Applications. *Biomedical Science, Engineering and Technology*, (May), 247–282.
- Yonekawa. (n.d.). Arterial end-to-end anastomosis of the rat carotid artery with 8 interrupted sutures. Retrieved June 26, 2017, from http://web.med.u-szeged.hu/expsur/hefop/angol/microsurgery/microsurgery_advanced_invivo.htm
- Zhu, W., Masood, F., O'Brien, J., & Zhang, L. G. (2015). Highly aligned nanocomposite scaffolds by electrospinning and electrospraying for neural tissue regeneration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(3), 693–704.