



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Iztapalapa**

**División de Ciencias Básicas e Ingeniería**

**Desarrollo de un composito para reparación y  
regeneración de nervio periférico**

Tesis que para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias**

**(Ingeniería Biomédica)**

Presenta:

Diana María Osorio Londoño

Asesores:

Dr. Roberto Olayo González y Dr. Rafael Godínez Fernández

Sinodales:

Presidente: Dr. Rafael Godínez Fernández

Secretaria: Dra. Esmeralda Zuñiga Aguilar

Vocal: Dra. Angélica Berenice Coyoy Salgado

México, 30 de mayo de 2019

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por todo el apoyo económico, gracias al cual fue posible desarrollar este trabajo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana y su planta docente, por otorgarme la oportunidad de realizar este trabajo y de adquirir nuevos conocimientos.

A mis asesores, el Dr. Roberto Olayo González y el Dr. José Rafael Godínez Fernández, así como el Dr. Juan Morales Corona, por creer en mí, apoyarme y guiarme con sus valiosos aportes y experiencia.

A la Dra. Angélica B. Coyoy Salgado y la Dra. en C. Esmeralda Zuñiga Aguilar por sus importantes aportes en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Ma. Cristina Acosta García del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, Edificio W, CBS, Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-I, por introducirme al campo del cultivo celular, su apoyo constante en el manejo de muestras biológicas, así como su colaboración en la preparación y visualización de las muestras al microscopio electrónico de barrido.

A la Ing. Patricia Castillo, del Laboratorio Central UAM-I de Microscopía Electrónica, por su amable colaboración en la visualización de matrices poliméricas por microscopía electrónica de barrido.

Al Ing. Ricardo Rosas, del Laboratorio de análisis cuantitativo de rayos X.

Al Dr. Carlos Enrique Orozco Barrios y la Dra. Angélica Berenice Coyoy Salgado, de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

Al Dr. Gerardo Félix Martínez y el Dr. Israel Morales Reyes, del Laboratorio de Biofísica e Ingeniería de Tejidos de la UAM-I, por sus consejos, apoyo y valiosos aportes a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Humberto Vázquez Torres del Laboratorio de Polímeros de la UAM-I.

A mis amigos M. C. Jocelyn Alvarado Muñoz, M. C. Roberto Carlos Martínez Hernández, M. C. Erika Fragosó Pérez, M. C. Omar Uribe, M. I. Francisco Daniel Ruiz Díaz, Fis. Luis Martínez Benítez, por todas sus enseñanzas.

A mi familia, por su paciencia y apoyo incondicional.

# Índice

Índice de Cuadros.....	4
Índice de Figuras .....	4
Resumen.....	5
Abstract .....	6
1. Introducción .....	7
1.1. Fundamentos .....	9
1.1.1. Electrohilado .....	9
1.1.2. Polimerización por plasma .....	12
1.1.3. El polipirrol (PPy) .....	13
1.1.4. Caracterización de biomateriales.....	15
1.1.5. Líneas celulares .....	18
1.1.6. Línea celular NG108-15.....	18
1.2. Antecedentes .....	20
1.3. Justificación.....	22
1.4. Hipótesis.....	24
1.5. Objetivo general .....	24
1.5.1. Objetivos particulares.....	24
2. Metodología .....	25
2.1. Electrohilado .....	25
2.2. Modificación superficial por plasma.....	26
2.3. Caracterización de los andamios .....	28
2.4. Caracterización biológica.....	29
2.4.1. Caracterización morfológica de las células sobre los andamios por microscopía electrónica de barrido .....	30
2.4.2. Pruebas de viabilidad celular.....	30
2.5. Análisis estadístico.....	30
3. Resultados .....	31
3.1. Caracterización morfológica de los andamios por microscopía electrónica de barrido .....	31
3.2. Espectroscopía infrarroja con reflectancia total atenuada (IR-ATR) .....	34
3.3. Espectroscopía Raman de los andamios electrohilados .....	35
3.4. Análisis termogravimétrico (TG) .....	36
3.5. Difracción de rayos X (DRX) .....	37
3.6. Caracterización mecánica.....	38
3.7. Microscopía electrónica de barrido de las muestras biológicas .....	41
3.8. Viabilidad celular .....	47
4. Discusión.....	49
5. Conclusiones y perspectivas.....	55
Bibliografía .....	57

Apéndice A.....	66
Apéndice B.....	69

## Índice de Cuadros

Cuadro 1. Constante dieléctrica de algunos solventes estudiados.....	11
Cuadro 2. Condiciones de fabricación en el proceso de electrohilado.....	25
Cuadro 3. Condiciones de síntesis por plasma.....	26
Cuadro 4. Diámetro promedio de las fibras.....	31
Cuadro 5. Configuraciones implementadas en la obtención de fibras electrohiladas.....	67

## Índice de Figuras

Figura 1. Esquematización del enfoque de reparación en nervio periférico con biomateriales.....	9
Figura 2. Esquema del proceso de electrohilado.....	10
Figura 3. Modelo estructural del polipirrol sintetizado por plasma.....	13
Figura 4. Estructura propuesta del polipirrol sintetizado por plasma.....	14
Figura 5. Elementos de la de curva esfuerzo/deformación ( $\sigma - \epsilon$ ).....	16
Figura 6. Morfología de las células NG108-15.....	19
Figura 7. Cono de crecimiento de una célula NG108-15.....	20
Figura 8. Diseño experimental del reactor de plasma.....	26
Figura 9. Procedimiento para la polimerización de polipirrol dopado con yodo.....	27
Figura 10. Microscopía electrónica de barrido de los andamios.....	32
Figura 11. Espectro infrarrojo de los andamios.....	34
Figura 12. Espectro Raman del PLA.....	35
Figura 13. Termogramas de los andamios.....	36
Figura 14. Difractogramas de los andamios.....	37
Figura 15. Curvas esfuerzo/deformación de andamios de PLA.....	38
Figura 16. Curvas esfuerzo/deformación de andamios de PLA+PPPy.....	39
Figura 17. Curvas esfuerzo/deformación de andamios de PLA+PPPy/I.....	40
Figura 18. Caracterización mecánica de los andamios.....	41
Figura 19. Células NG108-15 en andamio aleatorio de PLA.....	42
Figura 20. Células NG108-15 en andamio aleatorio de PLA+PPPy.....	43
Figura 21. Células NG108-15 en andamio aleatorio de PLA+PPPy/I.....	44
Figura 22. Células NG108-15 en andamio orientado de PLA.....	45
Figura 23. Células NG108-15 en andamio orientado de PLA+PPPy.....	46
Figura 24. Células NG108-15 en andamio orientado de PLA+PPPy/I.....	47
Figura 25. Medida de la cantidad de células viables en los andamios.....	48
Figura 26. Representación de la estructura química del pirrol y el PPPy/I.....	51
Figura 27. Espectros IR de los andamios modificados con PPPy/I.....	68

## Resumen

El uso de biomateriales en medicina regenerativa ha cobrado relevancia en la actualidad, con el diseño y fabricación de sustratos de soporte en la reparación de lesiones y regeneración tisular. Se han implementado infinidad de andamios destinados a facilitar la regeneración del nervio periférico en lesiones de gran magnitud, agregando distintos componentes de origen biológico y sintético, a fin de constituir un sustrato que promueva la elongación de los conos axónicos, la migración y proliferación de células gliales, así como el flujo de nutrientes para restituir el microambiente del nervio, sin lograr hasta el momento una recuperación completa y funcional.

En este trabajo se fabricaron andamios electrohilados basados en ácido poliláctico, en configuración aleatoria y orientada, ajustando las condiciones y parámetros de fabricación para proporcionarles una estructura volumétrica adecuada para la adhesión y crecimiento celular, así como la topografía que funcione como guía física de orientación y elongación neurítica. Los andamios se modificaron en su superficie con polipirrol y polipirrol dopado con yodo, sintetizados por plasma, a fin de mejorar sus propiedades fisicoquímicas e incrementar su biocompatibilidad.

Las propiedades morfológicas, químicas y mecánicas de los andamios se estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido, espectroscopía infrarroja con reflectancia total atenuada, espectroscopía Raman, termogravimetría, difracción de rayos X y pruebas de tensión uniaxial (esfuerzo/deformación). Se evaluó el desempeño de los andamios en un cultivo tridimensional *in vitro* de células de línea celular neuronal, para estudiar la respuesta celular a los distintos andamios fabricados, por medio de microscopía electrónica de barrido y el ensayo de reducción de MTT por actividad enzimática, para estudiar su viabilidad celular.

Mediante las pruebas de caracterización de biomateriales, se determinó la morfología de los andamios fibrilares, su estructura tridimensional, la composición química y cristalinidad de su superficie, así como su resistencia mecánica a la deformación, obteniendo una mejor respuesta por parte de las células a los andamios modificados respecto a los andamios sin modificar en su superficie.

Por lo tanto, se concluyó que los andamios fibrilares orientados, modificados en su superficie con polipirrol y polipirrol dopado con yodo, sintetizados por plasma, tienen las propiedades fisicoquímicas y mecánicas adecuadas para la adhesión, sobrevivencia y elongación neurítica de células neuronales, así como el potencial para funcionar como soporte en el proceso de reparación y regeneración de tejido neuronal.

## **Abstract**

The use of biomaterials in regenerative medicine has become relevant nowadays, with the design and fabrication of support substrates for injury repair and tissue regeneration. A plethora of scaffolds developed to facilitate peripheral nerve regeneration across large distances has been implemented, with the addition of multiple components from biological and synthetic source to form a substrate that promotes axonal cone growth, migration and proliferation of neuroglia, as well as nutrient flow, to restore nerve microenvironment, without achieving complete and functional recovery.

In this work, electrospun polylactic acid scaffolds were fabricated in random and aligned orientation, adjusting fabrication conditions and parameters to provide the volumetric structure for adhesion and cellular growth, as well as the topography that functions as physical cue for neurite orientation and elongation. The scaffolds were modified along the surface with polypyrrole and polypyrrole doped with iodine, synthesized by plasma, to improve its physicochemical properties and enhance its biocompatibility.

Morphological, chemical and mechanical properties were investigated by means of scanning electron microscopy, infrared spectroscopy with attenuated total reflectance, Raman spectroscopy, thermogravimetry, X ray diffraction and uniaxial tensile tests for stress-strain analysis. Scaffolds performance within three-dimensional in vitro culture was studied to evaluate neural cell response to the different scaffolds developed, by means of scanning electron microscopy and MTT enzymatic reduction assay, to determine cell viability.

Through the techniques for characterization of biomaterials, the morphology, three-dimensional structure, chemical composition and molecular configuration of fibrillar scaffolds was determined, improving the response from the cells in culture when seeding on modified scaffolds, compared to unmodified scaffolds.

In conclusion, aligned fibrillar scaffolds, modified with plasma synthesized polypyrrole and plasma synthesized polypyrrole doped with iodine, have the adequate physicochemical and mechanical properties for neural cell adhesion, survival and neuritic growth, as well as the potential for supporting the process of neural tissue repair and regeneration.

# 1. Introducción

El tratamiento de las lesiones en el sistema nervioso sigue siendo un reto para la comunidad dedicada al sector de la salud. Producidas por enfermedades hasta traumatismos, estas lesiones tienen graves repercusiones en la calidad de vida, economía y bienestar general de los pacientes. Dada la complejidad de este sistema, así como su limitada capacidad de regeneración y auto reparación, los tratamientos actuales distan de proveer una completa recuperación funcional del tejido, en especial cuando se trata del sistema nervioso central.

El sistema nervioso se constituye por el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico. El sistema nervioso central, que incluye el cerebro, la médula espinal y los sistemas óptico, olfatorio y auditivo, tiene una capacidad regenerativa endógena limitada (Akter et al., 2016; Schmidt and Leach, 2003). El sistema nervioso periférico, constituido por los nervios craneales, los nervios espinales y los ganglios dorsales, a diferencia del sistema nervioso central, tiene la capacidad de regenerarse bajo condiciones determinadas (Akter et al., 2016; Frostick et al., 1998; Hall, 1989; Schmidt and Leach, 2003).

En condiciones normales, los nervios periféricos lesionados tienen la capacidad de regenerarse cuando la magnitud de la lesión es muy pequeña, siendo el periodo de recuperación muy largo, que puede abarcar desde semanas hasta años. Este proceso de regeneración endógena implica mecanismos a nivel molecular, celular y tisular en los que participan canales iónicos ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ), células (macrófagos, células de Schwann) y proteínas (factores neurotróficos, citocinas) (Menorca et al., 2013). Dichos mecanismos incluyen la modificación de la membrana celular de la neurona, los niveles de concentración de factores neurotróficos (aumento o disminución de la concentración normal), desmielinización, desdiferenciación y proliferación de las células de Schwann, reclutamiento de macrófagos y la síntesis de proteínas, de tal manera que se reestructura el microambiente del nervio para favorecer el proceso de regeneración (Menorca et al., 2013; Svehlensky and Dahlin, 2013).

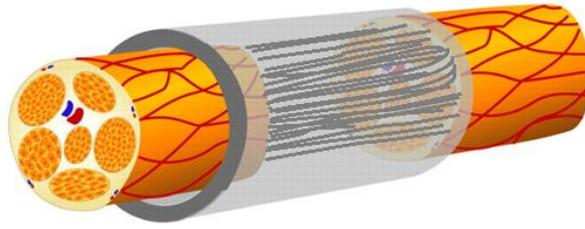
La regeneración del nervio periférico implica un proceso bioquímico mediado de manera importante por las células de Schwann, las células gliales del sistema nervioso periférico. Una vez que se ha producido la degeneración Walleriana, y los macrófagos han retirado los desechos de los axones, las células de Schwann migran entre los segmentos distal y proximal del nervio lesionado, formando un tejido continuo, denominado bandas de Büngner, las cuales guían y estimulan la elongación de los axones para restaurar la inervación de sus tejidos diana. Sin embargo, este proceso endógeno se produce normalmente ante lesiones por aplastamiento y en longitudes pequeñas (menores a 0.5 cm), donde el tejido conectivo que rodea los axones del nervio se mantiene intacto (Grinsell et al., 2014; Hall, 1989).

La capacidad de regeneración del nervio periférico se asocia con la eficiencia de la degeneración Walleriana, la cual se define como el proceso de degeneración de la porción del axón localizada de manera distal a la lesión, que culmina en la desintegración del citoesqueleto axonal y la fragmentación del axón, seguido de la remoción de los residuos celulares por parte de las células gliales y los macrófagos (Coleman and Freeman, 2010; Rotshenker, 2011). Este proceso de remoción de residuos de origen tanto axonal como mielínico es eficiente gracias a que, en el sistema nervioso periférico, está mediado por las células de Schwann y los macrófagos (Vargas and Barres, 2007).

El injerto autólogo o autoinjerto permanece como el “gold standard” en la reparación de lesiones en nervio periférico que superan la longitud en la que se puede aplicar una sutura, entre segmentos aún funcionales, denominada neurorrafía (Dahlin, 2008; Grinsell et al., 2014; Panagopoulos et al., 2017). El injerto autólogo consiste en emplear un segmento de nervio sano del propio paciente, generalmente un nervio sensorial, para formar un puente que permita reconstruir el nervio lesionado, cuya estructura cumple con las características ideales para la estimulación de la reparación y regeneración en el nervio periférico (Grinsell et al., 2014). En ocasiones, la sutura se acompaña con goma de fibrina, a consideración del cirujano, con el objetivo de reducir la tensión sobre el tejido, la cicatrización y fibrosis, así como proveer de una solución de soporte para la reconexión de los axones lesionados (Barton et al., 2014; Sameem et al., 2011).

Los conductos guía para nervio (NGC) son una alternativa para facilitar la regeneración del tejido al ser colocados en forma de puente entre los segmentos del nervio (Mobini et al., 2017). Actualmente, la mayoría de estos conductos son tubos huecos de materiales poliméricos como colágeno (NeuroMend, NeuroMatrix, Neuroflex, NeuraGen, NeuraWrap), ácido poliglicólico (Neurotube), poliácido láctico-co-policaprolactona (Neurolac) y polivinil alcohol (Spearman et al., 2018). No obstante, se han reportado mejores resultados en cuanto a la regeneración de tejido funcional en conductos que incluyen microestructuras intraluminales (Daly et al., 2012; Gu et al., 2014), tal como se muestra en la Figura 1.

Inspirados en el mecanismo fisiológico de la regeneración del nervio periférico, los andamios de tipo fibrilar pretenden favorecer la elongación de los axones, fungiendo como bandas de Büngrer artificiales, fabricadas a partir de biomateriales poliméricos con propiedades que faciliten la adhesión celular, estimulando la propagación del cono de crecimiento en los axones, de manera que se facilite la reparación de lesiones y la regeneración del nervio (Ribeiro-Resende et al., 2009; Sarker et al., 2018).



**Figura 1. Esquematación del enfoque de reparación en nervio periférico con biomateriales.** Figura modificada de Daly et al., 2012. El diseño de biomateriales se ha enfocado en mimetizar procesos de auto reparación del nervio lesionado, mediante estructuras lineales intraluminales en un conducto que guíe la regeneración del tejido nervioso, en este caso, a través de un nervio seccionado.

Las propiedades fisicoquímicas de los materiales participan de forma importante para favorecer la adhesión, proliferación, diferenciación y supervivencia de las células. Los materiales poliméricos naturales y sintéticos, biodegradables y biocompatibles poseen propiedades fisicoquímicas y mecánicas para servir como sustrato y desencadenar mecanismos celulares para la reparación del tejido. Dichos materiales se emplean para la fabricación de andamios que faciliten la reparación y la regeneración en el nervio periférico, constituyendo un soporte con la estructura adecuada al tejido (Sensharma et al., 2017).

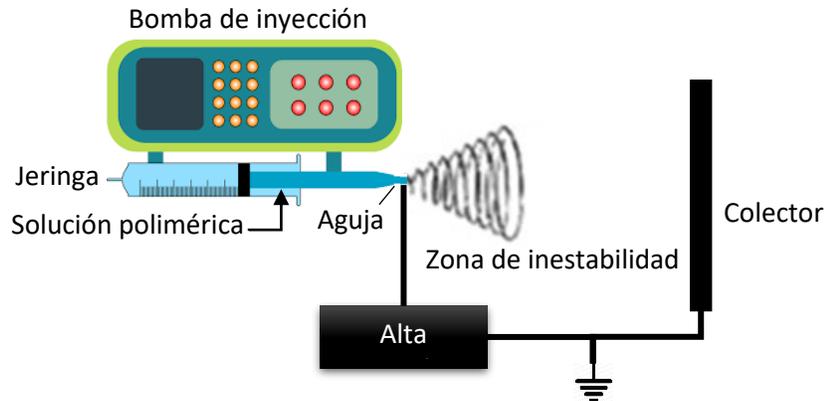
## 1.1. Fundamentos

### 1.1.1. Electrohilado

Entre las diversas técnicas de fabricación de andamios sintéticos para crecimiento celular, el electrohilado consiste en un proceso versátil y sencillo para obtener fibras con altas propiedades mecánicas, cuya arquitectura y morfología se puede controlar, modificando las variables que rigen el proceso (Baji et al., 2010).

En el electrohilado, se induce la formación de fibras mediante las fuerzas electrostáticas de un campo eléctrico (Subbiah et al., 2005). Se utiliza una bomba para inyectar una solución precursora a través de una aguja conectada a una fuente de alta tensión eléctrica, de tal manera que la solución se carga y se dispara hacia un colector, formando filamentos que se ramifican impulsados por las fuerzas electrostáticas presentes en la zona de la inestabilidad inducida por el campo eléctrico entre la aguja y el colector. A medida que el solvente de la solución se va evaporando, las fibras se alargan y se depositan sobre el colector formando una malla o membrana de fibras nano y micrométricas (Jiang et al., 2015; Subbiah et al., 2005; Sun et

al., 2014). En la Figura 2 se muestra un esquema del arreglo experimental básico para el electrohilado.



**Figura 2. Esquema del proceso de electrohilado.** El proceso de electrohilado se implementa utilizando una bomba para inyectar la solución polimérica a través de una jeringa acoplada a una aguja conectada a una fuente de alta tensión, la cual genera un campo eléctrico entre la aguja y el colector para formar fibras nano y micrométricas (Subbiah et al., 2005; Sun et al., 2014).

Las variables que establecen la morfología de las fibras electrohiladas se dividen en tres grupos:

- a) Características de la solución polimérica. Incluyen la viscosidad, conductividad, tensión superficial, peso molecular del polímero, momento dipolar y constante dieléctrica. Están asociadas al polímero que se desea electrohilar y son difíciles de aislar, dado que al variar una de ellas, las demás se modifican a su vez, es decir, se encuentran relacionadas entre sí. Por ejemplo, si se varía la conductividad, se puede modificar también la viscosidad de la solución (Pham et al., 2006).
  - Concentración/viscosidad de la solución. La viscosidad de la solución varía cambiando la concentración del polímero en el solvente. Esta variable tiene una relación directa con el diámetro y morfología de la fibra. Por ejemplo, a concentraciones muy bajas, dependiendo del polímero, se obtienen fibras con defectos en forma de gotas o *beads* (rosarios), o incluso abultamientos en las fibras, indicando que las éstas alcanzan aún húmedas el colector. En este caso, aumentando la viscosidad se logran obtener fibras uniformes, sin gotas o abultamientos (Pham et al., 2006).

- Conductividad/densidad de carga. Esta variable tiene una relación directa con la obtención de fibras uniformes, es decir, sin defectos como gotas o *beads*, y en general, una relación inversa con el diámetro de la fibra (Pham et al., 2006).
- Peso molecular del polímero. Este parámetro tiene efecto sobre la obtención de fibras uniformes, es decir, a mayor peso molecular se reducen las gotas o *beads*. (Pham et al., 2006).
- Momento dipolar y constante dieléctrica. Electrohilados exitosos se logran mediante solventes con constantes dieléctricas altas (Pham et al., 2006). Por ejemplo:

<i>Solvente</i>	<i>Cloroformo</i>	<i>Acetona</i>	<i>Etanol</i>	<i>Dimetilformamida</i>
<b><i>Constante dieléctrica</i></b>	4.8	20.6	24	36.7

Cuadro 1. Constante dieléctrica de algunos solventes estudiados (Casasola et al., 2014; Mohsen-Nia et al., 2010).

b) Parámetros del proceso.

- Flujo o razón de inyección. Su relación con el diámetro de la fibra es directa, por lo que el aumento de este parámetro resulta en el aumento del diámetro de la fibra. Si es muy alto, la fibra puede llegar aún húmeda al colector (Pham et al., 2006).
- Diferencia de potencial o tensión eléctrica. Si la tensión eléctrica es muy alta, pueden aparecer defectos en las fibras, pero su relación con el diámetro de la fibra no es clara (Pham et al., 2006).
- Distancia entre la aguja y el colector. Contribuye a la evaporación del solvente (Pham et al., 2006).
- Diseño del colector:
  - Metálicos. Disipan las cargas de las fibras y se obtienen andamios más empaquetados. Las fibras son más suaves (Pham et al., 2006).
  - Porosos. Estructuras menos empaquetadas se pueden obtener utilizando un colector metálico poroso (Pham et al., 2006).
  - No conductores. Las cargas de la fibra no se disipan, las fibras se repelen y forman poros más grandes (Pham et al., 2006).

- Placa colectora. Las cargas se disipan por toda la superficie de la placa, depositándose las fibras en forma aleatoria (Jiang et al., 2015; Pham et al., 2006).
- Tambor giratorio. Se obtienen fibras alineadas orientadas en la dirección del giro (Jiang et al., 2015; Pham et al., 2006).

c) Variables ambientales

- Temperatura. Tiene una relación inversa con la viscosidad de la solución polimérica, dado que el aumento en la temperatura disminuye la viscosidad de la solución y por lo tanto el diámetro de la fibra (Pham et al., 2006).
- Humedad. Aumentando la humedad se consigue porosidad en la superficie de la fibra (Pham et al., 2006).

La variación de los diferentes parámetros del proceso de electrohilado, por tanto, dan lugar a la fabricación de andamios volumétricos cuya estructura se puede adecuar al tipo de tejido que se desea reparar. Sin embargo, actualmente los sistemas de soporte se complementan mediante diversas estrategias, tales como la funcionalización superficial, liberación de factores de crecimiento y aplicación de potenciales eléctricos (Gu et al., 2014; Mobini et al., 2017).

Los sistemas de funcionalización de superficies, que pueden ser factores de crecimiento, antibióticos, agentes de biocompatibilidad y adhesión, entre otros, aumentan la eficiencia de los andamios para ingeniería de tejidos. Para ello, se modifican las propiedades químicas de la superficie de los andamios mediante el enlazado o depósito de moléculas tales como péptidos, anticuerpos, grupos funcionales y portadores de fármacos, mientras se mantiene la arquitectura y propiedades mecánicas de los mismos (Chen et al., 2018; Chu, 2013).

### **1.1.2. Polimerización por plasma**

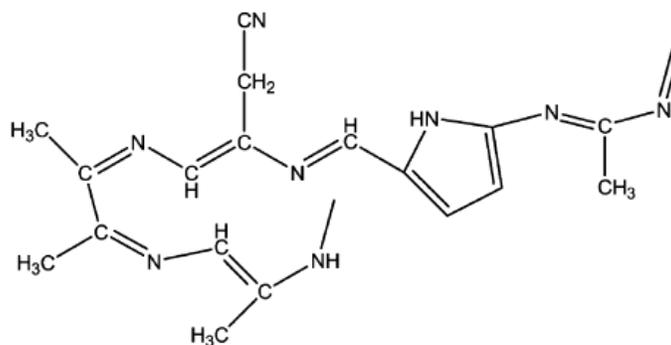
La polimerización por la técnica de plasma se ha estudiado de manera importante por su potencial en el recubrimiento de superficies y la generación de películas y nanopartículas de material polimérico, para ser aplicados en diferentes líneas de investigación. En particular, el recubrimiento de sustratos para su uso en sistemas biológicos se ha beneficiado de esta técnica, ya que produce películas delgadas de material, de estructura densa y entrecruzada, carente de contaminantes agregados en el proceso de polimerización, con una tasa de degradación baja (Chu, 2002; Morales et al., 2008).

En contraste con la polimerización química, la técnica de polimerización por plasma permite obtener películas de polímero densamente entrecruzado y ramificado, constituido por una red tridimensional que amplifica sus propiedades mecánicas (Hosono et al., 2003).

### 1.1.3. El polipirrol (PPy)

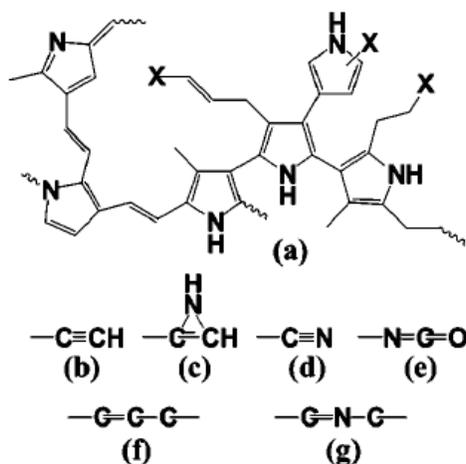
El polipirrol (PPy) es un polímero ampliamente estudiado por sus propiedades electroconductoras, y en particular, se ha estudiado como elemento electroactivo en el tratamiento de lesiones en el sistema nervioso (Spearman et al., 2018). La electroconductividad del PPy está dada por su estructura química de enlaces conjugados, sin embargo, esta organización en los enlaces no es posible en la síntesis por plasma.

Hosono et al. (2003) propusieron un modelo polipirrol sintetizado por plasma (PPPpy), a partir de datos obtenidos del espectro IR, UV-Vis y análisis elemental, a partir de los cuales se concluye que algunos anillos del monómero se descomponen para formar redes tridimensionales (Figura 3). Se observó que la magnitud de la potencia de descarga durante la síntesis influye en la formación de las cadenas poliméricas, de forma tal que a potencias bajas se conserva una mayor cantidad de anillos en la molécula, y que, a potencias más altas, el rompimiento de anillos aumenta, formando la red densamente entrecruzada con menor cantidad de anillos (Hosono et al., 2003).



**Figura 3. Modelo estructural del polipirrol sintetizado por plasma.** Durante la polimerización por plasma, los anillos del monómero (pirrol) se descomponen para formar la estructura del polímero, quedando pocos anillos en la estructura al emplearse altas potencias de síntesis (Hosono et al., 2003).

En la Figura 4 se muestra otra propuesta, presentada por Kumar et al. (2003), en la cual se asume la desintegración de una menor cantidad de sistemas aromáticos durante la formación de la estructura.



**Figura 4. Estructura propuesta del polipirrol sintetizado por plasma.** Propuesto por Kumar y cols. (2003), se muestra el PPPy (a), donde X puede ser (b), (c), (d), (e), (f) y (g) (Kumar et al., 2003).

La electroconductividad del PPPy se puede aumentar mediante la incorporación de un dopante que proporcione electrones libres o huecos (John and Kumar, 2002). El dopaje con un elemento electronegativo, como un halógeno, se ha implementado para introducir transportadores de carga en la estructura entrecruzada de polímeros sintetizados por plasma, con resultados positivos en la conductividad (Olayo et al., 2006; Vásquez et al., 2006; Wang et al., 2004).

La incorporación de yodo (I) durante la polimerización, induce el aumento de la conductividad del PPPy, más aún cuando el polímero se encuentra inmerso en un ambiente de alta humedad relativa, de tal manera que se convierte en un semiconductor (Cruz et al., 1999; Morales et al., 2000). De acuerdo con la literatura, el yodo ocupa vacíos en la estructura del PPPy más que enlazarse en la cadena del mismo, lo cual aumenta la conectividad y la continuidad de las unidades de polímero, con lo que se logra aumentar su conductividad (John and Kumar, 2002; Kumar et al., 2003).

Dada la complejidad de estos materiales, de las interacciones que existen entre los compuestos que los conforman, así como entre los sistemas biológicos en los que estarán inmersos, surge la necesidad de caracterizar rigurosamente sus propiedades. Entre la gran diversidad de técnicas disponibles para caracterizar biomateriales, algunas se mencionan a continuación.

#### 1.1.4. Caracterización de biomateriales

##### *Caracterización morfológica:*

**Microscopía óptica.** Esta es la forma más simple de microscopía, en la cual se utiliza luz visible para obtener una imagen muestra, amplificada entre 50 y 1000 veces. A pesar de su baja resolución, permite complementar la información visual que el ojo no alcanza a percibir (0.2-200  $\mu\text{m}$ ) (Brunella et al., 2017).

**Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).** Esta técnica utiliza un haz de electrones para adquirir una imagen de la muestra, amplificada entre 1-2 millones de veces, cuya resolución se encuentra en la escala nanométrica (hasta 0.2 nm). Dado que el haz de electrones debe interactuar con la muestra para adquirir la imagen, ésta debe ser eléctricamente conductora y no acuosa, por lo que se debe preparar la muestra para cumplir con dichas condiciones (Brunella et al., 2017).

##### *Caracterización química:*

**Espectroscopía infrarroja con reflectancia total atenuada (IR-ATR).** Si al irradiar la muestra con luz infrarroja (IR) su frecuencia coincide con la frecuencia vibracional de un enlace químico, la muestra absorbe dicha luz IR. De este modo, se puede obtener información acerca de la estructura molecular monitoreando la absorción o transmisión de luz IR al incidirla sobre una muestra. Para estudiar la estructura de materiales opacos a la radiación IR, se acopla la reflectancia total atenuada (ATR) a la espectroscopía IR, de modo que la radiación IR penetra la muestra hasta poco más de 1  $\mu\text{m}$  y se puede obtener la relación de la luz IR transmitida respecto a su frecuencia espacial (Wang and Chu, 2013).

**Espectroscopía Raman.** Constituye otra de las herramientas para investigar la química superficial de los materiales. De manera similar a la espectroscopía IR, se basa en la vibración molecular para la identificación de la estructura química, y complementa la espectroscopía IR al ser más sensible a ciertos modos vibracionales que producen poca o nula señal de absorción al IR. Esta técnica puede emplear luz a distintas longitudes de onda, lo cual permite investigar la superficie de los materiales a distintas profundidades (por ejemplo, longitudes de onda menores, penetran menores distancias), así como sus propiedades (Wang and Chu, 2013).

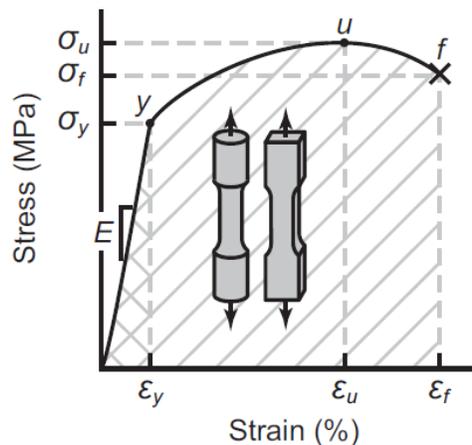
**Termogravimetría (TG).** Consiste en la medición de la cantidad de masa de una muestra en función de la temperatura, mientras dicha muestra se somete a una variación controlada de la temperatura. Permite analizar la temperatura a la cual ocurren reacciones asociadas a la pérdida en masa, en una atmósfera controlada (Kaufmann, 2003).

**Difracción de Rayos X (XRD).** En este método se incide un haz monocromático de rayos X sobre la muestra y se mide la intensidad del haz dispersado en función del ángulo de difracción ( $2\theta$ ). En este caso, se trata de una dispersión elástica, por lo que la técnica no cambia la constitución de la muestra. El ángulo de difracción contiene información acerca de los átomos y su posición en la molécula (Sampath Kumar, 2013).

**Caracterización mecánica:**

**Prueba de tensión uniaxial (esfuerzo-deformación).** Consiste en aplicar una carga de incremento constante a una muestra con geometría definida mientras se mide su deformación, o viceversa: se obtiene la magnitud de la fuerza que opone una muestra geoméricamente definida mientras se aplica una deformación a velocidad constante (Draghi, 2017).

Dado que la fuerza requerida para provocar la deformación de un espécimen depende de las dimensiones de éste, los valores obtenidos de la prueba se normalizan respecto a sus magnitudes geométricas para obtener las propiedades mecánicas del material y no del espécimen en particular. Por lo tanto, normalmente se emplea la curva esfuerzo/deformación y no la curva fuerza/longitud (Draghi, 2017).



**Figura 5. Elementos de la de curva esfuerzo/deformación ( $\sigma - \varepsilon$ ).** Se compone por las regiones elástica ( $0 \rightarrow \varepsilon_y$ ), plástica ( $\varepsilon_y \rightarrow \varepsilon_u$ ) e inestable ( $\varepsilon_u \rightarrow \varepsilon_f$ ), delimitadas por sus puntos críticos: cedencia ( $y$ ) máximo ( $u$ ) y quiebre ( $f$ ). El módulo elástico ( $E$ ) es la pendiente de la recta que se ajusta a la región elástica (Roeder, 2013).

La Figura 5 muestra algunos de los elementos principales para caracterizar mecánicamente los materiales en una prueba de tensión uniaxial. La curva se divide en tres regiones de acuerdo con su deformación: elástica ( $0 \rightarrow \varepsilon_y$ ), donde la forma de la muestra puede recuperarse al retirar la carga o elongación; plástica ( $\varepsilon_y \rightarrow \varepsilon_u$ ), donde la forma ya no se

recupera; e inestable ( $\varepsilon_u \rightarrow \varepsilon_f$ ), región en la que se forma un cuello en el centro de la muestra y la fractura es inminente. Estas regiones se delimitan por los puntos críticos: cedencia ( $y$ ), máximo ( $u$ ) y quiebre ( $f$ ). La pendiente de la recta que se ajusta al comportamiento de la región elástica se denomina módulo elástico ( $E$ ), el cual refleja la rigidez del material: una pendiente alta normalmente representa un material rígido, y una pendiente baja, un material dúctil (Roeder, 2013).

### ***Caracterización biológica:***

Consiste en un conjunto de pruebas para evaluar la interacción biomaterial-célula, y se realiza *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos *in vitro* se utilizan para evaluar la biocompatibilidad, citotoxicidad, viabilidad celular, hemocompatibilidad, actividad metabólica de las células sobre el material, entre otras (Bose and Bandyopadhyay, 2013).

Entre los ensayos empleados para evaluar la viabilidad celular, se encuentra la tinción de azul de tripano y el ensayo *live/dead*, para determinar la sobrevivencia de las células en un sustrato. Estos ensayos se basan en la integridad de la membrana citoplasmática para determinar la viabilidad de la célula (Sousa et al., 2017).

El azul de tripano penetra la membrana de células afectadas, permitiendo discriminarlas de células con membranas intactas y poder realizar un ensayo de exclusión. Esta prueba permite además realizar una cuantificación de las células en un hematocitómetro, sin embargo, existe la limitante de requerir las células en suspensión para poder efectuar el conteo, lo cual implicaría despegar las células del andamio, proporcionando mayores complicaciones al ensayo (Sousa et al., 2017).

La tinción de las células cultivadas en un andamio tridimensional podría dar una idea de la cantidad de células inviables, siendo la detección de células viables más complicada, dada la estructura opaca del material. Además, mediante esta técnica se obtiene una imagen en dos dimensiones de la muestra, perdiéndose la componente volumétrica al tratarse de andamios (Sousa et al., 2017).

Una alternativa es visualizar las células en un microscopio confocal, mediante técnicas de fluorescencia. Comúnmente se emplea el famoso ensayo *live/dead*, el cual incluye una doble tinción, cuya fluorescencia puede ser observada al microscopio de fluorescencia y cuantificada mediante citometría de flujo. La calceína AM es un compuesto permeable a la membrana no fluorescente, que al interactuar con las esterasas intracelulares de las células viables emite una fluorescencia de color verde en 515nm, al ser excitada a 490nm. El homodímero de etidio y el yoduro de propidio son impermeables a la membrana que se

enlazan al ADN, empleados para detectar células muertas o cuya membrana está dañada, ya que son excluidos por las células con la membrana intacta. Este ensayo permite obtener la cantidad de células viables e inviables, ya sea por métodos cualitativos en el microscopio confocal o cuantitativos, en el citómetro de flujo, en cuyo caso se deben despegar las células del andamio (Sousa et al., 2017).

Para evaluar la citotoxicidad, la viabilidad y la actividad metabólica celular, comúnmente se emplea el ensayo de reducción enzimática de MTT, el cual se basa en la cuantificación de la actividad metabólica celular mediante colorimetría. El compuesto de tetrazolio MTT, de color amarillo y soluble en agua, es reducido por las deshidrogenasas o reductasas de células viables a un precipitado de formazan de color morado. Solventes orgánicos como el dimetil sulfóxido (DMSO) y/o detergentes como el SDS se emplean para solubilizar el precipitado de formazan, y así poder medir la absorbancia de la solución mediante un espectrofotómetro o un lector de microplacas. Dado que las células inviables o muertas son incapaces de reducir el MTT, la absorbancia obtenida es proporcional al número de células viables (Sousa et al., 2017).

#### **1.1.5. Líneas celulares**

Las líneas celulares permiten caracterizar biológicamente algún tratamiento, sustancia o sustrato de cultivo. La ventaja de utilizar líneas celulares en lugar de células de cultivo primario es que se asegura el uso de un único tipo celular con características definidas, que no se sacrifican animales de experimentación y que se tiene la disponibilidad casi infinita de células para cultivo *in vitro*, que una vez obtenidas, tienen una complejidad y costo de mantenimiento mucho menores que las células de cultivo primario (Geuna et al., 2016).

Existe una gran cantidad de líneas celulares para la investigación de nuevos tratamientos y biomateriales, donde las provenientes de tejido neural son de especial interés para este trabajo. Emplear una línea celular neuronal en el estudio del crecimiento de neotejido, nos permite caracterizar biológicamente nuevos biomateriales para ingeniería de tejidos neurales (Geuna et al., 2016).

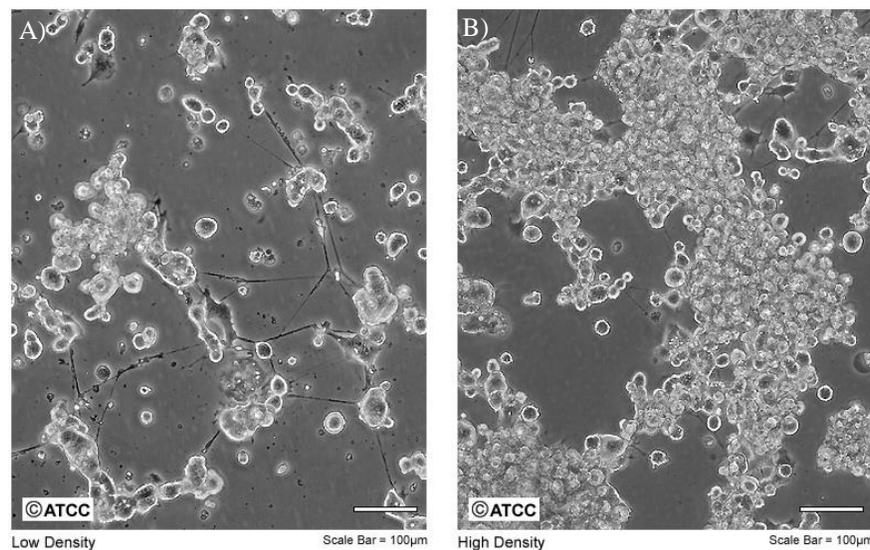
#### **1.1.6. Línea celular NG108-15**

Entre las diversas líneas celulares que existen en el mercado, la línea NG108-5 es un tipo celular somático híbrido. Se forma a partir de neuroblastoma de ratón y glioma de rata,

expresando propiedades observadas en las neuronas, las cuales se expresan en el híbrido aún más que en el neuroblastoma. Gracias a estas propiedades, es posible utilizarla como un modelo de neurona e investigar sobre el sistema nervioso con ventajas sobre un cultivo primario (Hamprecht, 1977).

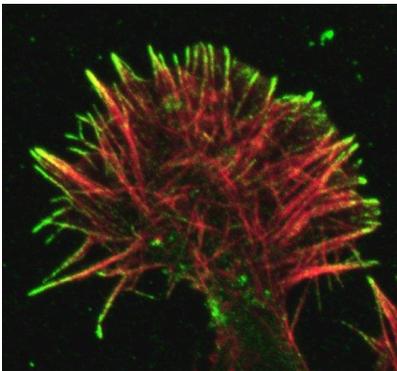
El cultivo de esta línea celular se hace en presencia de HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina), que favorece la selección del hibridoma sobre las líneas celulares parentales, asegurando su replicación (Hamprecht, 1977). De esta forma, se constituye como una herramienta para estudiar procesos tales como memoria, sinapsis, diferenciación, comunicación intercelular, medicamentos, membranas neuronales, neurotransmisores, comportamiento trófico (crecimiento orientado de extensiones celulares, migración dirigida de neuronas y células gliales), transporte axoplásmico, movimiento celular, entre otras, dado que se le pueden aplicar estímulos externos y establecer un modelo de neurona (Hamprecht, 1977; Israel et al., 1994; Molnar and Hickman, 2014; Tojima et al., 2000).

La morfología de las células NG108-15 es redondeada, tienen entre 10-100 $\mu$ m de diámetro, son planas, ocasionalmente forman procesos cortos, crecen en cúmulos y tienden a amontonarse, tal como se muestra en la Figura 6 (ATCC, 2019; Hamprecht, 1977).



**Figura 6. Morfología de las células NG108-15.** En condiciones óptimas marcadas por el fabricante, las células proyectan procesos citoplasmáticos similares a las neuritas, mejor apreciables en bajas densidades. Al encontrarse en altas densidades, las células tienden a amontonarse. A) Baja densidad celular, B) alta densidad celular; barra=100 $\mu$ m (ATCC, 2019).

Las células NG108-15 en cultivo son adherentes, y presentan filopodios (Figura 7) en toda la superficie de la membrana citoplasmática que buscan sitios de adhesión por integrinas para mover el resto de la célula (ATCC, 2019; Galbraith et al., 2007).



**Figura 7. Cono de crecimiento de una célula NG108-15.** Las moléculas de adhesión localizadas en los filopodios del cono de crecimiento están preparadas para unir la matriz extracelular, buscan sitios para formar adhesiones que puedan emplearse para mover el resto de la célula. En esta imagen, la muestra se marcó para actina (rojo) y para receptores de adhesión a integrina (verde) (Galbraith and Galbraith, 2010).

## 1.2. Antecedentes

Se han propuesto infinidad de NGCs, basados en diversos tipos de materiales y arquitecturas, con el objetivo de tratar las lesiones de mayor magnitud. Algunos están basados en polímeros naturales, como el quitosano (Haastert-Talini et al., 2013; Xu et al., 2011), o aquellos presentes en la matriz extracelular como colágeno, laminina y fibronectina, cuyas propiedades mecánicas, con frecuencia resultan deficientes para soportar el proceso de regeneración (Cui et al., 2014; di Summa et al., 2015).

Además, se les han agregado factores neurotróficos e incluso células de Schwann, imitando el microambiente tisular del nervio periférico para incrementar las posibilidades de crecimiento de éste en el andamio (Mobini et al., 2017; Panagopoulos et al., 2017).

Ribeiro-Resende et al. (2009) propusieron una forma de incrementar el desempeño de los NGC, mediante señales topográficas y bioquímicas, para formar bandas de Büngner artificiales y observaron que la orientación de los andamios estimula la alineación de células de Schwann, respecto a andamios no orientados, y que si se agregan factores de crecimiento (NGF/NRG/TGF- $\beta$ 1), el efecto de la alineación aumenta al triple. Además, comprobaron el

efecto de señales topográficas de las fibras, agregándoles microestructuras que favorecían la adhesión celular (Ribeiro-Resende et al., 2009).

Zuñiga-Aguilar et al. (2014), realizaron un modelo de cultivo celular sobre superficies modificadas con PPPy, comparándolo con un modelo comúnmente empleado para cultivo neuronal, sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina, una combinación de proteínas ampliamente utilizada para cultivo de células neuronales de médula espinal, que permite el anclaje, crecimiento de las neuritas y la diferenciación celular, hasta por 8 días. Se demostró que el cultivo celular sobre superficies modificadas con PPPy es un método alternativo que incrementa la sobrevivencia, hasta por 21 días<sup>1</sup>, de las neuronas de la médula espinal lumbar, preservando su integridad morfológica y eléctrica; la cual fue verificada analizando las conductancias iónicas para Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en la membrana celular, mediante la técnica de patch clamp (Zuñiga-Aguilar et al., 2014).

Kim et al. (2016) propusieron una novedosa técnica para fabricar andamios con fibras orientadas y aleatorias en un solo proceso de electrohilado para la generación de un NGC. Mediante un arreglo experimental de alambres de cobre sobre el colector giratorio del equipo de electrohilado, obtuvieron fibras tanto en configuración aleatoria como orientada, en una misma membrana electrohilada. La localización de cada configuración de fibras en la membrana se diseñó para que, al conformar el conducto, las fibras alineadas constituyeran la parte interna, rodeadas por la capa de fibras aleatorias, a modo de proporcionar soporte mecánico al conducto. A partir de sus resultados de viabilidad de células PC12 y S42, se concluyó que las fibras orientadas favorecen la migración y proliferación de células neuronales, mientras que las no orientadas, podrían limitar la formación de tejido fibrótico o la penetración de fibroblastos hacia el tejido neuronal, lo cual podría entorpecer la elongación de los axones hasta su tejido diana y la regeneración del nervio (Kim et al., 2016).

Las células de Schwann son parte fundamental del microambiente adecuado para regenerar el nervio, pues estas contribuyen al crecimiento y alineación celular. Murray-Dunning et al. (2011) emplearon andamios de microfibras poliméricas alineadas de ácido poliláctico (PLA) fabricadas mediante electrohilado, modificadas superficialmente, depositando ácido acrílico polimerizado por plasma, formando una fina película de polímero, que contribuye a la adhesión y el crecimiento celular. En este trabajo, se cultivaron células de Schwann de rata sobre los andamios para realizar crecimiento celular en un cultivo 3D dentro de un biorreactor de perfusión en lazo cerrado. El desarrollo del cultivo se evaluó mediante pruebas de viabilidad celular e inmunofluorescencia, empleando un microscopio confocal. De esta

---

<sup>1</sup> Mediante el método común, la sobrevivencia *in vitro* no supera los 8 días de cultivo.

manera, se observó un crecimiento superior de las células en los andamios modificados superficialmente, respecto a los que no fueron modificados (Murray-dunning et al., 2011).

Por otro lado, la estructura tridimensional de los andamios facilita la migración celular a través de éstos, lo cual favorece la penetración de células gliales, sin las cuales el proceso de regeneración de tejido neuronal funcional no podría llevarse a cabo. Fan et al. (2017) generaron un andamio de colágeno funcionalizado para la liberación controlada del fragmento Fab (fragmento de unión a antígeno) del Cetuximab, un inhibidor del receptor responsable de la activación de la cadena de señalización para la producción de moléculas asociadas a la incapacidad de regeneración neuronal en lesiones de médula espinal (Koprivica et al., 2005). Se demostró que el andamio es un excelente soporte para la liberación controlada de fármacos, la adhesión celular y la elongación neurítica por sus fibras. Además, gracias a la liberación controlada del fragmento Fab enlazado al colágeno, se facilitaron mecanismos de diferenciación de células madre endógenas de la médula espinal, así como la elongación neurítica. Finalmente, demostraron la migración de células madre neuronales hacia la zona afectada, neurogénesis, conexiones sinápticas entre las neuronas, mielinización de fibras nerviosas, menor cantidad de quistes respecto al control y una recuperación en la escala BBB de hasta 8.8 (Fan et al., 2017).

El PPPy, ha demostrado tener propiedades de interacción apropiadas para el medio biológico, al ser biocompatible e inerte, no produce rechazo por parte de las células (Cruz et al., 2012; Morales-Guadarrama et al., 2015; Olayo et al., 2008; Ramírez-Fernández et al., 2015; Zuñiga-Aguilar et al., 2014). Además, el PPPy presenta una gran diversidad química, que incluye aminas primarias, nitrilos y secciones alifáticas, así como una conductividad eléctrica sensible a la humedad relativa (Cruz et al., 1999; Morales et al., 2000), por lo que constituye un material de estructura compleja; capaz de frenar procesos de cicatrización glial, brindar neuroprotección y favorecer la proliferación celular (Fabela-Sánchez et al., 2018).

### **1.3. Justificación**

El estudio de la reparación y regeneración de sistema nervioso periférico es de particular relevancia debido a la incidencia clínica de traumas a nivel de este sistema. Aproximadamente, el 3% de pacientes con traumatismos tienen una lesión en nervios periféricos, y la incidencia de daños en nervios digitales que requieren una reparación quirúrgica de nervio es de 6.2/100000 personas por año, lo cual hace este tipo de lesión una de las más comunes (Svenningsen and Dahlin, 2013).

La lesión en nervio periférico produce la pérdida de la comunicación del órgano o tejido inervado con el sistema nervioso central, perdiéndose funciones motoras, sensoriales, secretoras, etc., lo cual disminuye de manera importante la calidad de vida de los pacientes con este tipo de lesión (Reina et al., 2000).

A diferencia del sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico tiene la capacidad de regenerarse. Sin embargo, la regeneración en el nervio periférico puede ocurrir cuando la lesión es menor a 5mm (Hall, 1989).

Las técnicas actuales para la reconstrucción de nervio periférico tras una lesión tienen resultados aceptables, generalmente parciales, las cuales implican la ejecución de microcirugía sobre el nervio, que puede ser desde una neurografía, hasta el implante autólogo, cuando la lesión excede los 17 mm (White and Rosenthal, 2013). La recuperación funcional del tejido es casi siempre incompleta, en especial donde la magnitud de la lesión requiere utilizar nervio funcional del paciente para la reconstrucción, con repercusiones negativas sobre el sitio donador, tales como la disminución funcional y la muerte de tejido sano.

Por ello, durante las últimas décadas se han investigado diversas estrategias y múltiples enfoques terapéuticos, con el objetivo de mejorar los resultados a nivel funcional en pacientes con lesiones de sistema nervioso periférico, que abarcan desde los 10mm de longitud, limitando daños mayores al paciente.

La ingeniería de biomateriales ha dado lugar al desarrollo de conductos que facilitan la regeneración del nervio periférico, protegen y guían el microambiente del proceso, técnica que ha mostrado resultados prometedores e incluso ha logrado llegar al mercado como una de las soluciones listas para su uso en la clínica (Mobini et al., 2017; Sarker et al., 2018).

Dados los excelentes resultados proporcionados por la terapia con polipirrol sintetizado por plasma, colocado como implante o inyectado en un modelo de lesión de médula espinal (Alvarez-Mejia et al., 2015; Cruz et al., 2012; Fabela-Sánchez et al., 2018; Mondragon-Lozano et al., 2017; Morales-Guadarrama et al., 2015; Olayo et al., 2008), surge la motivación de probar sus excelentes propiedades fisicoquímicas de biocompatibilidad, adhesión celular, neuroprotección y reparación de tejido, como material para la funcionalización de andamios estructurados para favorecer la elongación neurítica, la adhesión y migración celular; los cuales constituyen procesos fundamentales en la regeneración axonal y la reparación de lesiones en el nervio periférico.

## **1.4. Hipótesis**

Los compositos fibrilares, basados en electrohilados de PLA, recubiertos con PPPy o PPPy/I, constituyen un sustrato con las propiedades fisicoquímicas que promueven la adhesión, sobrevivencia y elongación axonal de células de tejido neural, perfilándose como buenos candidatos para la reparación y regeneración de lesiones en el sistema nervioso.

## **1.5. Objetivo general**

Desarrollar compositos poliméricos fibrilares, que posean propiedades fisicoquímicas para la reparación y regeneración de lesiones en el sistema nervioso, tal que promuevan la adhesión, sobrevivencia y elongación axonal de células de tejido neural.

### **1.5.1. Objetivos particulares**

1. Diseñar e implementar matrices electrohiladas basadas en ácido poliláctico, que posea la arquitectura adecuada para el desarrollo de neotejido neural.
2. Modificar la superficie de las matrices electrohiladas con polipirrol y polipirrol dopado con yodo, sintetizados por plasma, que mejoren el desempeño de las matrices electrohiladas en un cultivo celular de células de tejido neuronal.
3. Comparar el efecto de la modificación con polipirrol y con polipirrol dopado con yodo, sintetizados por plasma, respecto a sus propiedades fisicoquímicas y su interacción con células de tejido neuronal.
4. Demostrar la capacidad de los andamios para funcionar como soporte de crecimiento y desarrollo de células neuronales, en un cultivo volumétrico *in vitro*.
5. Verificar la viabilidad celular del cultivo sobre los andamios modificados y sin modificar en su superficie, para evaluar el efecto de los materiales sobre las células.

## 2. Metodología

### 2.1. Electrohilado

Se fabricaron matrices basadas en PLA (Ingeo 3251D) mediante la técnica de electrohilado, en configuración aleatoria y orientada, ajustando los parámetros del sistema y las características de la solución de PLA hasta encontrar las condiciones óptimas para la obtención de fibras adecuadas a la aplicación<sup>2</sup>. La tensión de trabajo, la razón de inyección y la distancia entre aguja y colector se seleccionó con base en los resultados obtenidos en trabajos previos (Fragoso Pérez, 2018; Martínez Hernández, 2018; Zuñiga Aguilar, 2014).

Para obtener matrices de fibras aleatorias, se empleó una placa colectora plana y un colector rotatorio para las alineadas, a 2500 rpm aproximadamente. Las condiciones de electrohilado seleccionadas para este trabajo se exponen el Cuadro 2, mostrado más adelante.

La solución polimérica se preparó disolviendo los *pellets* de PLA en cloroformo (CHL) durante la noche a temperatura ambiente y en reposo. Antes de iniciar el proceso de electrohilado se agregó dimetilformamida (DMF), cuya constante dieléctrica es mayor que la del CHL, además ayuda a aumentar la viscosidad de la solución polimérica, lo cual en conjunto con los demás parámetros del proceso de electrohilado, contribuyen a una adecuada formación de la fibra.

<b>Variable</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Concentración (m/v)</b>	15%
<b>Solvente</b>	CHL/DMF (9:1)
<b>Razón de inyección</b>	2 ml/h
<b>Tensión</b>	20 kV
<b>Aguja</b>	0.6 mm, diámetro interno
<b>Distancia aguja-colector</b>	22 cm
<b>Temperatura y humedad</b>	Ambiente (20°C aprox.)

Cuadro 2. Condiciones de fabricación en el proceso de electrohilado.

Las matrices resultantes se colocaron dentro de un horno de vacío por 4 días, para asegurar la completa evaporación de los solventes y se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido (MEB), espectroscopía infrarroja con reflectancia total atenuada (IR-ATR),

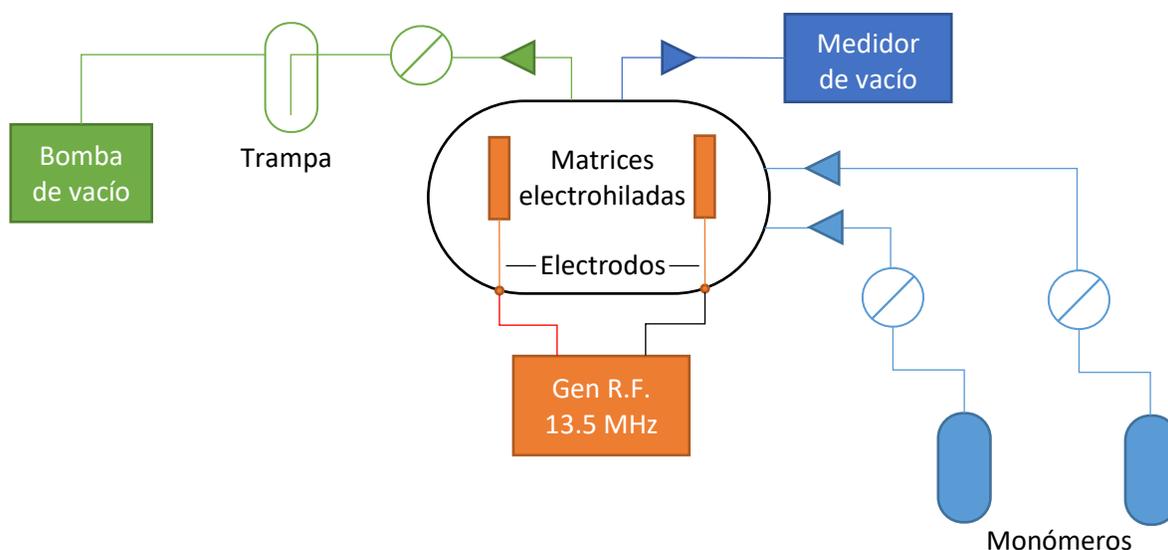
---

<sup>2</sup> Algunas de las configuraciones implementadas para la fabricación de las fibras, se muestran en la sección I del Apéndice A.

espectroscopía Raman con láser rojo (635nm), termogravimetría (TG), difracción de rayos X (DRX) y análisis de la respuesta mecánica a la tensión.

## 2.2. Modificación superficial por plasma

A continuación, las matrices electrohiladas se modificaron superficialmente con polipirrol (Sigma-Aldrich, 98%) y polipirrol dopado con yodo (Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$ ), sintetizados por plasma (PPPy y PPPy-I, respectivamente). El proceso se llevó a cabo dentro de un reactor conformado por un tubo de borosilicato, sellado por tapas de acero inoxidable, acoplados a dos electrodos conectados a un generador de pulsos de 13.5MHz (Cruz et al., 1999). En la Figura 8 se esquematiza la configuración del reactor de plasma.



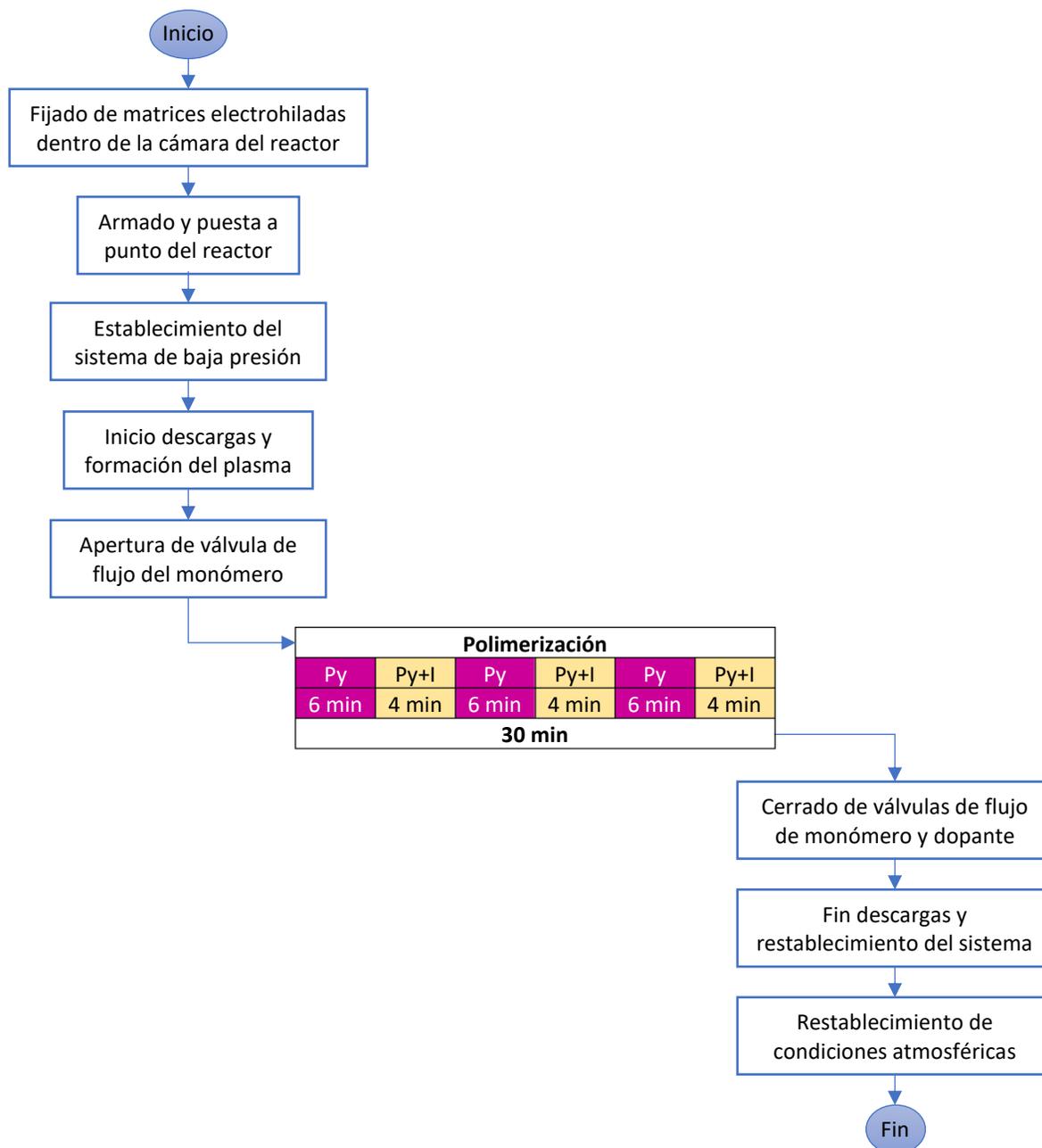
**Figura 8. Diseño experimental del reactor de plasma.** Se esquematizan los componentes del reactor para el proceso de síntesis por plasma: sistema de vacío de la cámara del reactor, generador de radiofrecuencia conectado a electrodos dentro de la cámara del reactor, válvulas y contenedores de monómeros y dopante.

En el siguiente cuadro se muestran las condiciones de síntesis:

Variable	Cantidad
Potencia	30W
Tiempo	30 min
Presión	1±0.1 Torr
Distancia entre electrodos	10 cm

Cuadro 3. Condiciones de síntesis por plasma.

Para la modificación con PPPy/I se alternó el flujo de yodo al reactor durante el periodo de síntesis. La secuencia ejecutada se esquematiza en la siguiente figura:



**Figura 9. Procedimiento para la polimerización de polipirrol dopado con yodo.** Se muestra el diagrama de flujo que describe el procedimiento llevado a cabo para realizar la síntesis por plasma de PPPy/I sobre las fibras electrohiladas.

### 2.3. Caracterización de los andamios

Los andamios obtenidos se caracterizaron por MEB, IR-ATR, TG, DRX y análisis de la respuesta mecánica a la tensión. Se utilizó MEB para caracterizar la morfología de los andamios y se determinó el diámetro promedio de las fibras a partir de las mediciones tomadas de manera perpendicular al eje longitudinal de cada fibra, tomando 100 mediciones por cuadro.

La composición química de los andamios se investigó por IR-ATR y se complementó con espectroscopía Raman (sólo los de PLA, ya que la fluorescencia intrínseca del PPPy y PPPy/I supera la intensidad de la señal Raman), asignando las bandas principales encontradas en los espectros en base a tablas (HORIBA, n.d.; University of Toronto Scarborough, 2010) y la herramienta “Spectroscopic Tools” (St. Thomas, n.d.). Se utilizó el accesorio ATR de diamante DuraSamplIR II acoplado al sistema Spectrum GX (Perkin Elmer) de FT-IR ubicados en el Laboratorio de Polímeros T125 de la UAM-I, así como el microscopio confocal Raman alpha300 RA (WITec) del Laboratorio de Biofísica e Ingeniería de Tejidos (AT221) de la UAM-I.

Para encontrar las características mecánicas de los andamios desarrollados, se utilizó el equipo de caracterización y/o estímulo mecánico de biomateriales y tejidos (Gutiérrez García, 2015) del laboratorio T130 del área de polímeros de la UAM-I, mediante el cual se aplica una elongación a velocidad constante y se registra la fuerza que opone el material a dicho estímulo. Los andamios alineados se estudiaron tanto en dirección paralela como perpendicular al estiramiento, y los andamios aleatorios, en dirección arbitraria.

Las pruebas se realizaron a temperatura ambiente ( $\sim 20^{\circ}\text{C}$ ), una velocidad de elongación de 0.5 (mm/min) y una distancia de muestreo de 0.01 (mm). Se realizaron tres repeticiones por cada muestra y se procesaron los datos obtenidos de fuerza (F[N]) y longitud (L[mm]), para encontrar la curva esfuerzo/deformación.

El esfuerzo se calculó como:

$$E = \frac{F}{A_T}$$

Donde  $A_T$  = grosor  $\times$  ancho. El grosor se calculó como la media de las mediciones del grosor de los andamios en 6 puntos diferentes de la probeta, antes de la prueba de esfuerzo. El ancho de las probetas se midió en la parte central antes de iniciar la prueba.

La deformación se calculó como:

$$D = \frac{L - L_0}{L_0} \times 100$$

Donde  $L_0$  es la longitud inicial de la probeta.

De cada curva esfuerzo/deformación se encontró el módulo elástico, el máximo esfuerzo y el porcentaje de deformación al quiebre y se utilizaron para caracterizar mecánicamente los andamios, tal como lo reportan Lins et al. (2016). Para determinar el módulo elástico se ajustó una recta cuya correlación lineal fuera mayor o igual a 0.9 ( $r \geq 0.9$ ).

#### **2.4. Caracterización biológica**

Los andamios generados se utilizaron como sustrato para el cultivo de células de tejido neuronal. Para ello, se utilizó la línea celular NG108-15, un híbrido de neuroblastoma de ratón y glioma de rata (ATCC, 2019).

Las células se descongelaron en baño maría a 37°C y se les agregaron 10 ml de medio de cultivo<sup>3</sup> a 37°C, se centrifugaron a 1000 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con 2 ml de medio completo a 37°C. Se colocó la solución celular en una caja de cultivo estéril de 10 cm de diámetro y se agregaron 5 ml de medio completo para dejarlas reposar en condiciones óptimas, como lo establece el fabricante (en incubadora estéril a 37°C, 95% aire, 5% CO<sub>2</sub>, cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días).

Al alcanzar la confluencia, las células se despegaron mediante pipeteo y se contabilizaron en una cámara de Neubauer para sembrar en los andamios una cantidad conocida de células, descrita más adelante. Los andamios fueron previamente esterilizados a la luz UV y se utilizaron pinzas estériles para colocarlos en cajas estériles de 35mm de diámetro. Se colocó una gota de 50µl de solución celular sobre cada uno de los andamios y se dejó reposar en condiciones óptimas por 2 horas. A continuación, se les agregó 2 ml de medio completo a 37°C para dejarlas cultivando en condiciones óptimas.

---

<sup>3</sup> La composición del medio completo para el cultivo de células NG108-15 se describe en la sección I del Apéndice B.

#### **2.4.1. Caracterización morfológica de las células sobre los andamios por microscopía electrónica de barrido**

Se sembraron aproximadamente  $2 \times 10^4$  células sobre cada uno de los andamios, se mantuvo el cultivo en condiciones óptimas durante dos semanas y finalmente se procesaron para observar al microscopio electrónico de barrido<sup>4</sup>.

#### **2.4.2. Pruebas de viabilidad celular**

Se sembraron aproximadamente  $1.65 \times 10^4$  células en cada uno de los andamios (por triplicado), se mantuvo el cultivo en condiciones óptimas durante 5 días y se realizó un análisis de viabilidad celular, por el ensayo de reducción de MTT por actividad enzimática (American Type Culture Collection, 2011; Roche Diagnostics GmbH, 2016; Stoddart, 2011).

Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las muestras con PBS y se agregó solución MTT (Sigma, M 5655) a 0.5 mg/ml en PBS. Después de dos horas de reacción, se utilizó DMSO para solubilizar los cristales de formazan, producto de la actividad metabólica de las células viables. La absorbancia de los cristales disueltos se midió en el *Epoch Microplate Spectrophotometer* de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. La lectura se tomó con la longitud de onda de 580 nm para obtener la intensidad máxima de la señal de absorción para el MTT. Se realizó el mismo procedimiento para andamios sin células, como referencia.

Dado que la cantidad de absorbancia de los cristales disueltos es proporcional al número de células viables (Gilbert and Friedrich, 2017; Stoddart, 2011), se calculó la diferencia entre la lectura asociada a los andamios con células y la asociada a los andamios sin células para encontrar la cantidad real correspondiente al número de células viables (Wang et al., 2017).

#### **2.5. Análisis estadístico**

Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) entre medias para encontrar diferencias significativas entre los grupos y adicionalmente se verificó la validez del ANOVA por las pruebas de Levene (homogeneidad de varianzas) y Shapiro-Wilk (normalidad de los datos). Por último, se aplicaron las pruebas entre pares de Tukey y t de Student para identificar los grupos con significancia estadística. Todo el análisis estadístico se realizó en R, versión 3.5.1 (R Core Team, 2018).

---

<sup>4</sup> El protocolo de preparación de las muestras se describe en la sección II del Apéndice B.

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterización morfológica de los andamios por microscopía electrónica de barrido

La estructura volumétrica de los andamios se constituye por fibras uniformes, sin defectos como gotas o *beads*, como se puede observar en la Figura 10. Los andamios aleatorios se distinguen por poseer fibras depositadas al azar, las cuales a su vez forman poros al acomodarse en el andamio. Por el contrario, los andamios orientados se caracterizan por presentar fibras alineadas en una sola dirección, entre las cuales se forman poros más angostos que en los andamios aleatorios. En las fibras de PLA sin modificar en su superficie (PLA) se observa porosidad a lo largo de toda la fibra, topografía que se pierde en los andamios modificados, cuyas fibras se observan lisas, en especial aquellas modificadas con PPPy/I (PLA+PPPy/I), pues en los andamios modificados con PPPy (PLA+PPPy), se observan varias fisuras y grietas en las fibras.

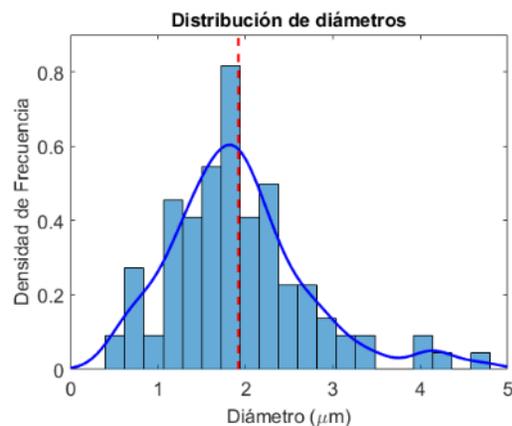
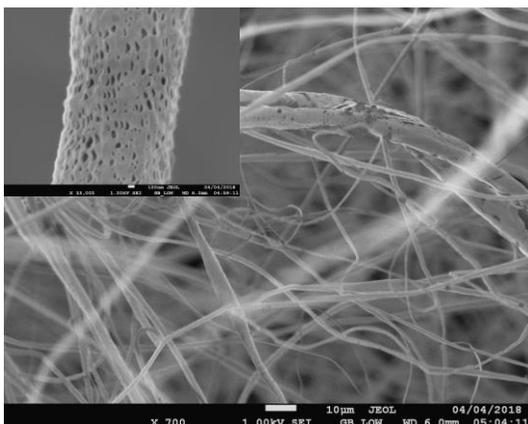
Los resultados de la medición de diámetros se presentan en el Cuadro 4, como media  $\pm$  desviación estándar (n=100).

	PLA	PLA+PPPy	PLA+PPPy/I
Aleatorio	1.92 $\pm$ 0.79 [ $\mu$ m]	4.04 $\pm$ 1.07 [ $\mu$ m]	3.41 $\pm$ 1.14 [ $\mu$ m]
Orientado	1.31 $\pm$ 0.58 [ $\mu$ m]	4.44 $\pm$ 1.56 [ $\mu$ m]	4.31 $\pm$ 1.14 [ $\mu$ m]

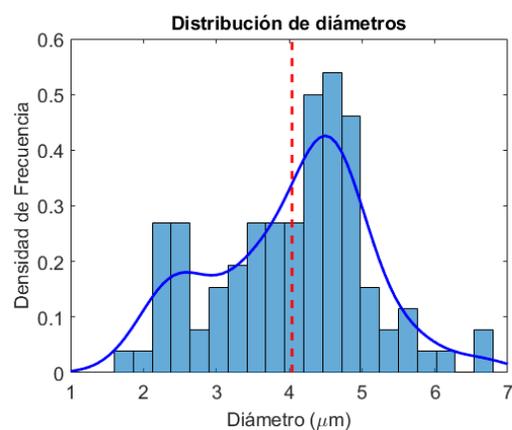
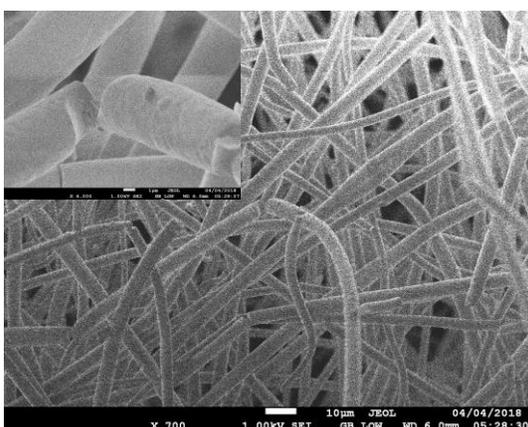
Cuadro 4. Diámetro promedio de las fibras.

El diámetro de las fibras tiende a disminuir en andamios alineados, debido a un alargamiento proporcionado por el giro del colector giratorio a altas velocidades. En los andamios modificados el diámetro tiende a aumentar en andamios de PLA+PPPy, más que en los modificados por PPPy/I.

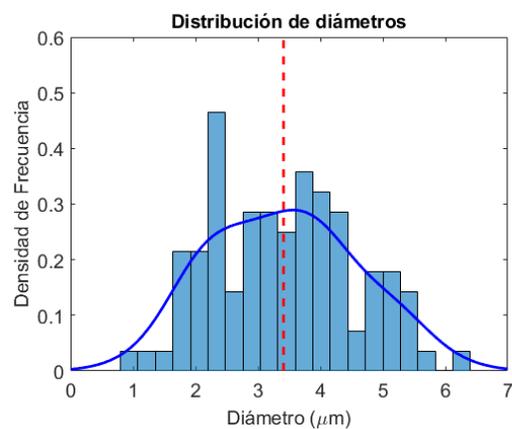
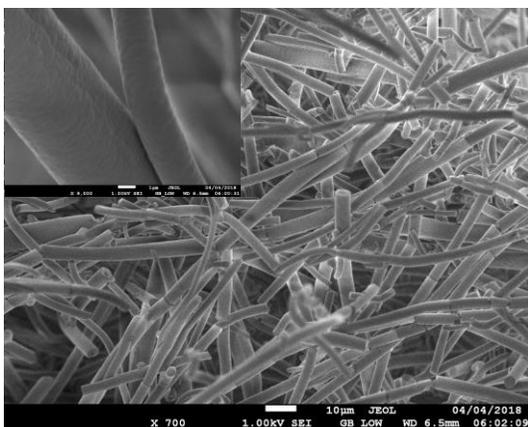
a) PLA aleatorio



b) PLA+PPPy aleatorio

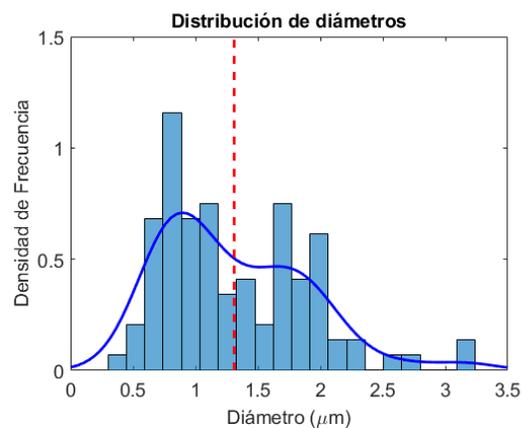
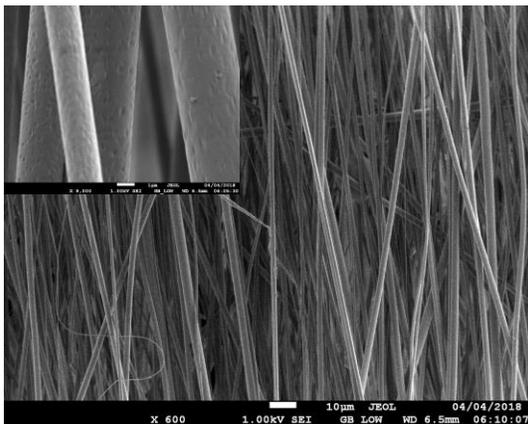


c) PLA-PPPy/I aleatorio

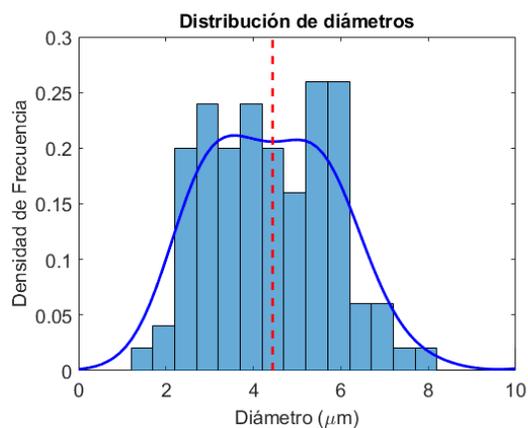
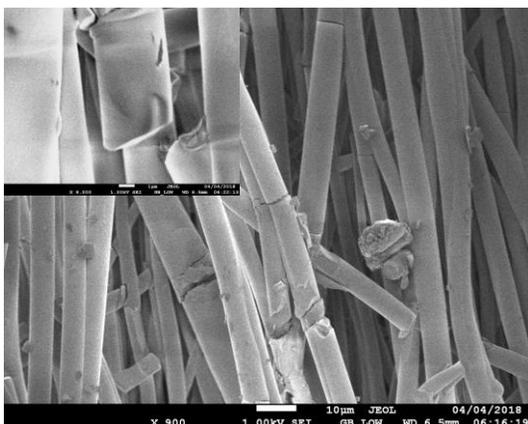


**Figura 10. Microscopía electrónica de barrido de los andamios.** Se muestran las micrográficas de los andamios (lado izquierdo) y la distribución de diámetros (lado derecho), donde la curva azul representa la función de densidad de frecuencia respecto al diámetro y la línea roja punteada, la media de los datos. En a) la barra equivale a: 10µm (imagen principal), 100nm (recuadro). En b) y c) la barra equivale a: 10µm (imagen principal) y 1µm (recuadro). Figura continúa en la siguiente página.

d) PLA orientado



e) PLA+PPPy orientado



f) PLA-PPPy/I orientado

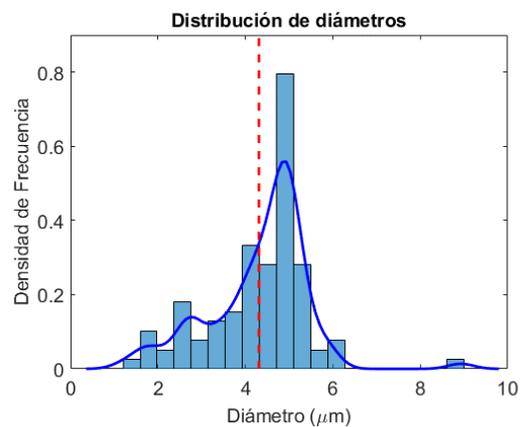
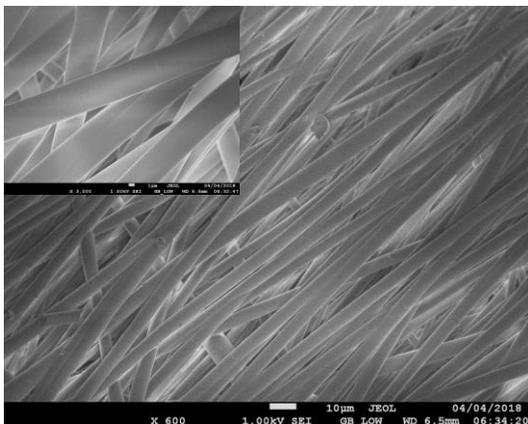


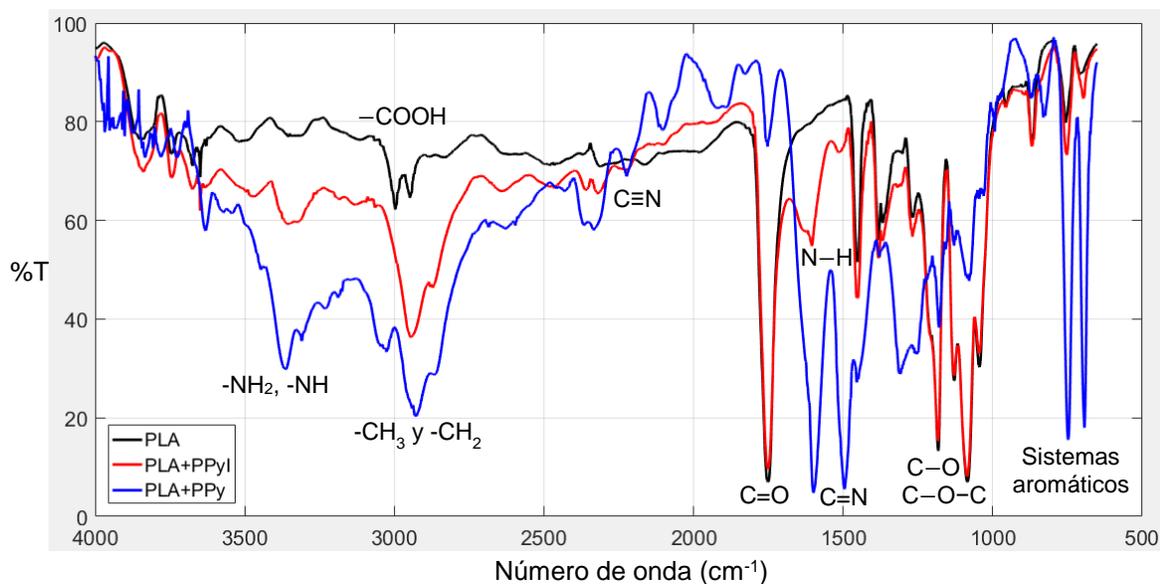
Figura 10. Microscopía electrónica de barrido de los andamios (cont.). En d), e) y f) la barra equivale a: 10 μm (imagen principal) y 1 μm (recuadro).

Respecto a la distribución de diámetros, en las fibras de los andamios aleatorios de PLA y PLA+PPPy/I sugieren un ajuste normal, dado que la mayor densidad se ajusta al valor promedio obtenido de la medición. Sin embargo, la distribución de diámetros para el andamio aleatorio de PLA+PPPy sugiere una mezcla de dos distribuciones gaussianas o bimodalidad, dado que se forman dos crestas en la función de densidad de frecuencia.

Asimismo, dado que la media de diámetros en los andamios orientados de PLA y PLA+PPPy coincide con un valle en la función de densidad de frecuencia, podría significar una distribución bimodal de los diámetros en estos andamios. Por el contrario, en el andamio orientado de PLA+PPPy/I la mayor densidad de frecuencia tiende a la media de diámetros obtenidos, únicamente desplazada por unos pocos valores asociados a diámetros menores.

### 3.2. Espectroscopía infrarroja con reflectancia total atenuada (IR-ATR)

Se utilizó el análisis por IR-ATR para estudiar los enlaces y grupos funcionales que forman la estructura química en la superficie de los andamios. Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 11.



**Figura 11. Espectro infrarrojo de los andamios.** Se muestra la gráfica de los espectros IR para cada tipo de andamio destacando los principales grupos funcionales asociados a sus picos respectivos.

La curva asociada al PLA muestra los picos característicos de los enlaces y grupos funcionales del polímero: entre 3200 y 2500  $\text{cm}^{-1}$  el grupo  $-\text{COOH}$ , el grupo carbonilo ( $\text{C} =$

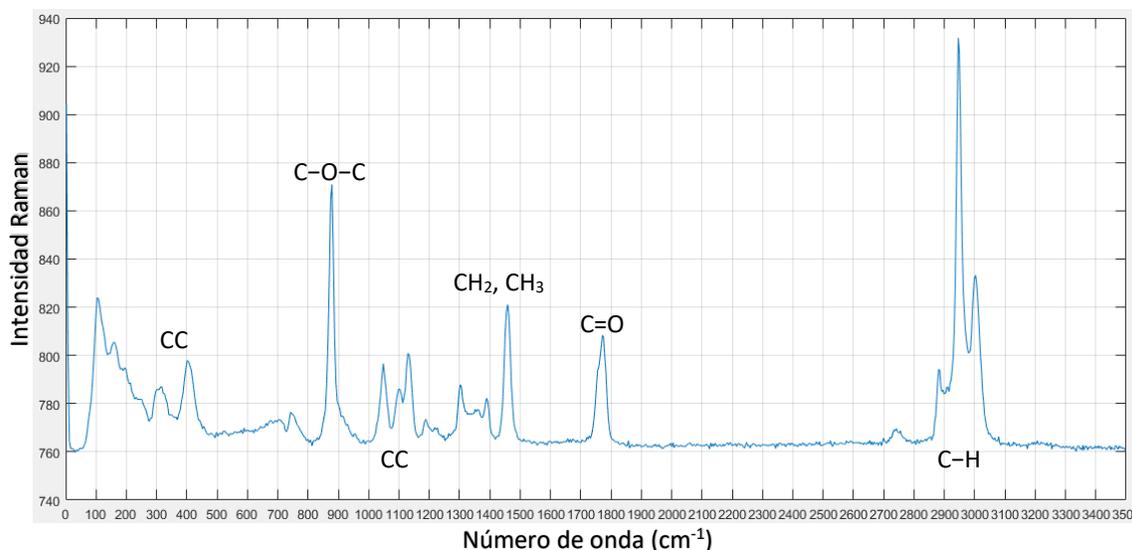
O) en  $1750\text{ cm}^{-1}$  y los enlaces C – O en  $1180\text{ cm}^{-1}$  y C – O – C entre  $1250$  y  $1050\text{ cm}^{-1}$ . Al analizar los andamios modificados con PPPy o PPPy/I, los espectros muestran los enlaces y grupos funcionales característicos del PPPy, tales como aminas primarias ( $-\text{NH}_2$ ) y secundarias ( $-\text{NH}$ ) entre  $3500$  y  $3300\text{ cm}^{-1}$ ,  $-\text{CH}_3$  y  $-\text{CH}_2$  entre  $2960$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$ , nitrilos ( $\text{C} \equiv \text{N}$ ) entre  $2260$  y  $2200\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{C} = \text{N}$  entre  $1660$  y  $1480\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{N} - \text{H}$  entre  $1550$  y  $1640\text{ cm}^{-1}$ , sistemas aromáticos entre  $770 - 735\text{ cm}^{-1}$  y  $710 - 685\text{ cm}^{-1}$ .

De acuerdo con los resultados obtenidos, se comprueba que el proceso de polimerización por plasma se llevó a cabo correctamente, dado que se registraron los enlaces característicos del PPPy y el PPPy/I en el espectro de IR, y que se depositó el polímero sobre las fibras electrohiladas de PLA, resultando el compuesto polimérico de fibras funcionalizadas en su superficie por PPPy y PPPy/I.

El análisis por espectroscopía infrarroja se complementó con la espectroscopía Raman.

### 3.3. Espectroscopía Raman de los andamios electrohilados

El espectro Raman (Figura 12) muestra las bandas características del PLA:



**Figura 12. Espectro Raman del PLA.** Se muestran los grupos funcionales característicos del polímero asociados a sus bandas respectivas.

En las bandas de  $250 - 400$  y  $630 - 1250\text{ cm}^{-1}$  se localizan las cadenas alifáticas, asociadas a cadena principal del PLA. Entre  $800 - 970$  y  $1060 - 1150\text{ cm}^{-1}$  se localizan los enlaces C-O-

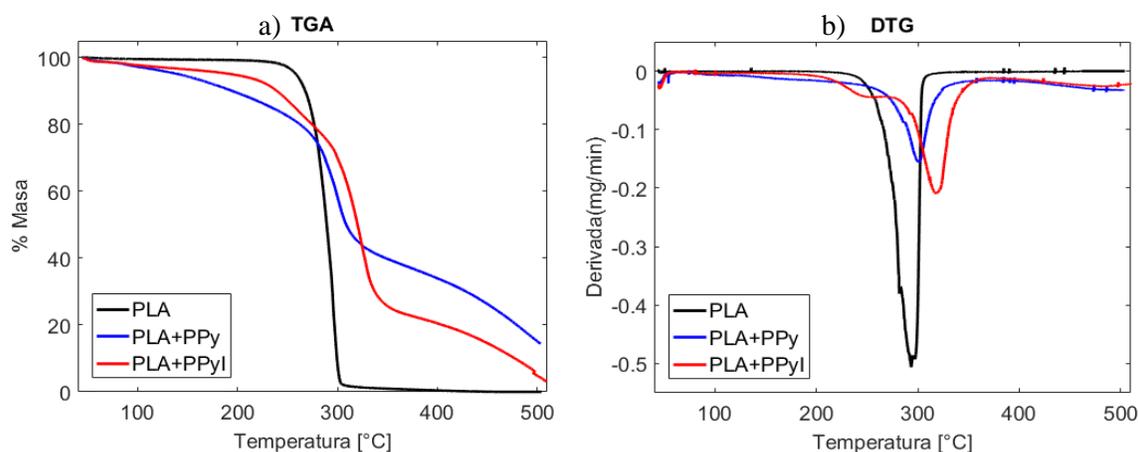
C y en la banda de  $1400 - 1470 \text{ cm}^{-1}$ , los enlaces  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ . Asociada a la banda  $1680 - 1820$  se localiza el grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) y entre  $2800 - 3100$ , el enlace C-H.

Las bandas características del PPPy y PPPy/I no se pudieron obtener en esta técnica, ya que la intensidad de la señal de fluorescencia inherente del PPPy y el PPPy/I es de mayor intensidad que la señal Raman (espectro no se muestra).

### 3.4. Análisis termogravimétrico (TG)

En el análisis termogravimétrico se muestra la descomposición del material por efecto de la temperatura (Thermal analysis, en Kaufmann, 2003). El PLA tiene una descomposición en una sola fase entre los  $250^\circ\text{C}$  y los  $300^\circ\text{C}$  (Figura 13). Al ser modificado con PPPy (PLA+PPPy), su descomposición se lleva a cabo en 3 fases, inicia después de los  $50^\circ\text{C}$  y poco antes de los  $100^\circ\text{C}$ , siendo la pérdida en masa más paulatina que la del PLA solo. La pérdida en masa más importante se produce alrededor de los  $300^\circ\text{C}$  y continúa descomponiéndose bajo el mismo perfil gradual hasta pasar los  $500^\circ\text{C}$ .

El análisis de los andamios de PLA+PPPy/I muestra un perfil en cuatro etapas de descomposición, de la misma forma que con el PPPy, inicia entre los  $50 - 100 [^\circ\text{C}]$ , la segunda entre los  $230 - 290 [^\circ\text{C}]$ , la tercera es la que presenta la mayor pérdida en porcentaje de masa y continúa descomponiéndose alrededor de los  $340^\circ\text{C}$  y hasta los  $500^\circ\text{C}$  con el mismo perfil que los andamios de PLA+PPPy.

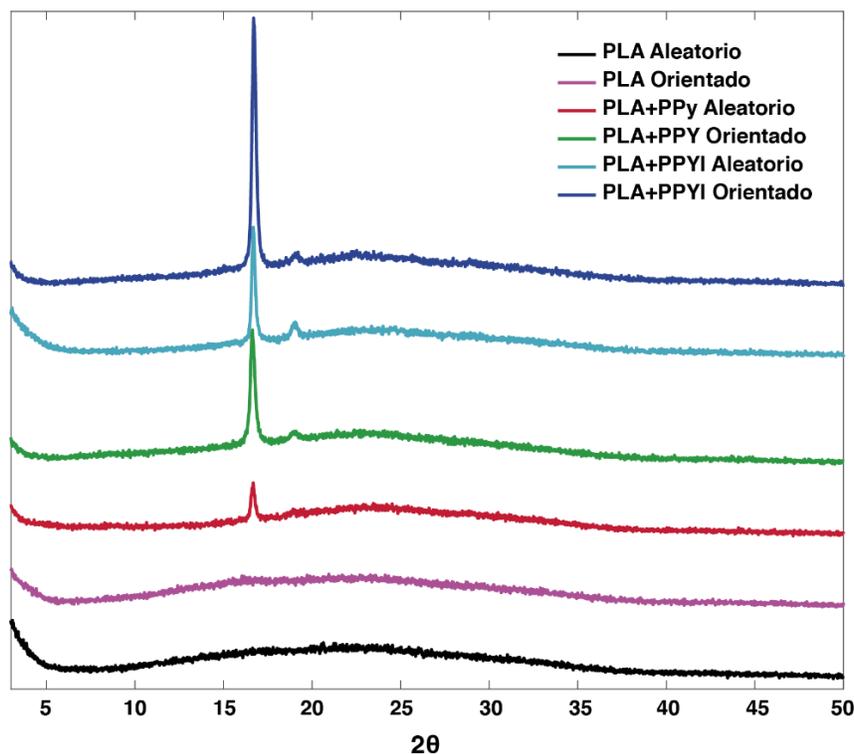


**Figura 13. Termogramas de los andamios.** Pérdida del porcentaje en masa respecto a la temperatura (a) y su derivada (b).

### 3.5. Difracción de rayos X (DRX)

En la Figura 14 se muestran los difractogramas para cada uno de los andamios. La estructura de los andamios electrohilados de PLA es amorfa, ya que no presenta ningún pico en el patrón de difracción, mismo que se obtiene al analizar el PLA en forma de película (difractograma no se muestra).

En los andamios modificados con PPPy y PPPy/I se obtiene un pico de cristalinidad en  $16.7^\circ$ , cuya intensidad es de 890 cuentas en el andamio aleatorio de PLA+PPPy, 2033 en el andamio orientado de PLA+PPPy, 1973 en el andamio aleatorio de PLA+PPPy/I y 3904 en el andamio orientado de PLA+PPPy/I, por lo tanto, la intensidad del pico de difracción es mayor en las fibras alineadas que en las aleatorias. En los andamios modificados con PPPy/I y en el andamio orientado de PLA+PPPy se distingue además un pico de menor intensidad en  $19^\circ$ , con una intensidad de 614 cuentas en el andamio orientado de PLA+PPPy, 644 en el andamio aleatorio de PLA+PPPy/I y 623 en el andamio orientado de PLA+PPPy/I, por lo que, en general, los difractogramas sugieren una mayor cristalinidad en los andamios modificados con PPPy dopado con yodo.

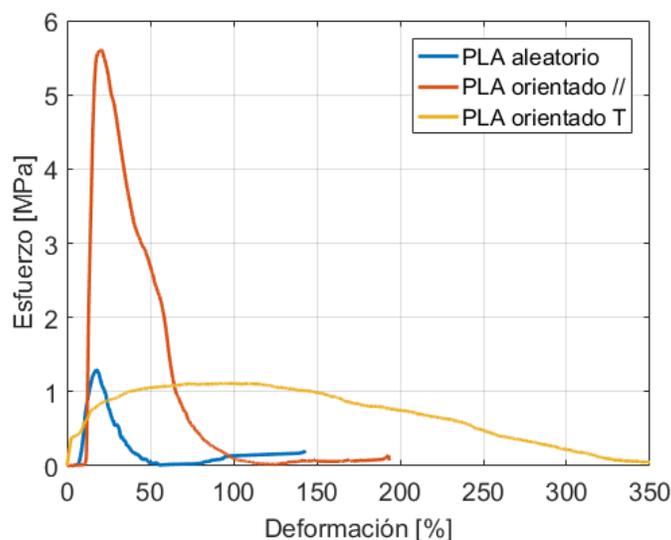


**Figura 14. Difractogramas de los andamios.** Se grafican los patrones de difracción de rayos X (DRX) de cada uno de los andamios estudiados, donde cada curva representa la intensidad (en unidades arbitrarias) respecto al ángulo de difracción.

De acuerdo con la literatura, los difractogramas de los andamios modificados presentan los picos característicos del PLA semi-cristalino (Gómez-Pachón et al., 2014; Shameli et al., 2010; Zhou et al., 2013). Por la misma naturaleza del proceso de polimerización, la estructura química del PPPy y el PPPy/I es entrecruzada y no presenta cristalinidad, por lo que los picos que presenta el difractograma se asocian a la estructura molecular del PLA.

### 3.6. Caracterización mecánica

En las siguientes figuras se presentan algunas curvas de esfuerzo/deformación, resultantes de las pruebas mecánicas. Los andamios de PLA exhiben propiedades mecánicas, tales como módulo elástico o máximo esfuerzo, superiores al ser analizadas de manera paralela a la orientación de las fibras, que perpendicular a éstas, tal como se muestra en la Figura 15.

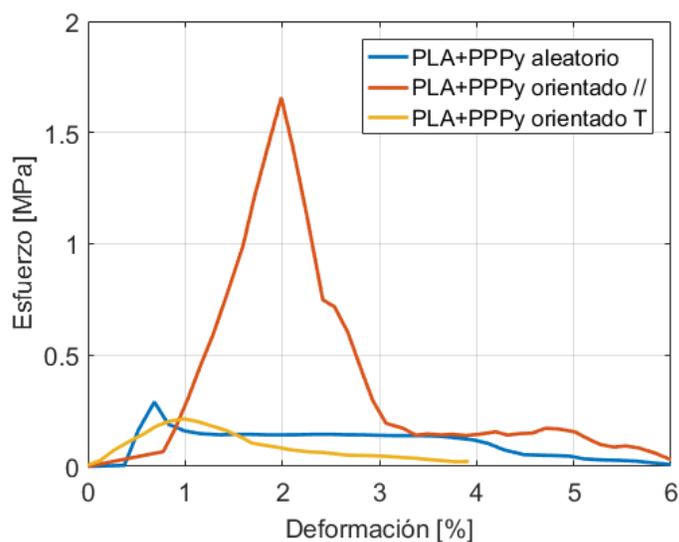


**Figura 15. Curvas esfuerzo/deformación de andamios de PLA.** La curva azul corresponde al PLA aleatorio, la roja y la amarilla al PLA orientado, analizado en dirección paralela (//) y perpendicular (T) a la orientación de las fibras, respectivamente. Los andamios de PLA exhiben propiedades mecánicas, tales como módulo elástico o máximo esfuerzo, superiores al ser analizadas de manera paralela a la orientación de las fibras, que perpendicular a éstas.

El andamio aleatorio presenta un módulo elástico y deformación similar al análisis orientado paralelo a las fibras, debido a la componente paralela de éstas en el andamio. El andamio orientado analizado de manera perpendicular a las fibras alcanza una deformación superior

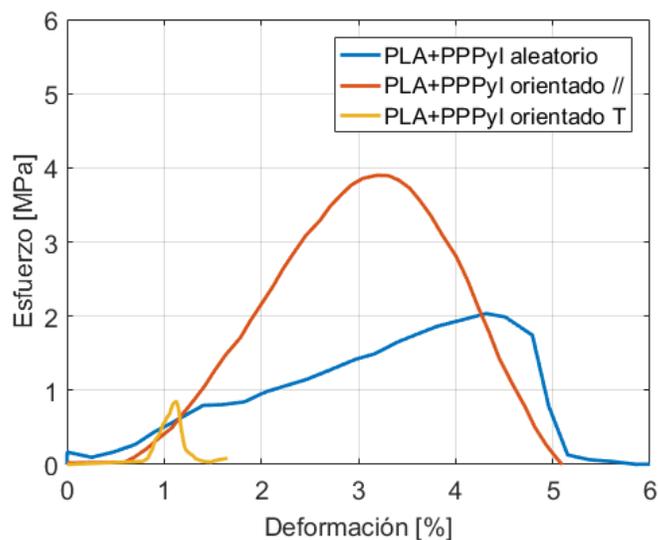
al 300%, y un esfuerzo máximo mucho menor que al ser analizado de manera paralela a las fibras, dado que en este caso no existe una componente de resistencia a la deformación del andamio y su esfuerzo está asociado a la fuerza necesaria para separar el conjunto de fibras. Por lo tanto, la morfología de la curva demuestra que se requiere un mínimo esfuerzo para deformar el andamio dispuesto en forma perpendicular a la dirección preferencial de las fibras.

Al analizar los andamios modificados con PPPy, se obtiene una disminución importante en las características mecánicas, tal como lo describe la Figura 16. El andamio orientado de forma paralela sigue presentando el mayor esfuerzo máximo respecto a las demás configuraciones, pero alcanza una deformación mayor que en el caso orientado perpendicular a las fibras.



**Figura 16. Curvas esfuerzo/deformación de andamios de PLA+PPPy.** La curva azul corresponde al PLA aleatorio, la roja y la amarilla al PLA orientado, analizado en dirección paralela (//) y perpendicular (T) a la orientación de las fibras, respectivamente. Las propiedades mecánicas de los andamios disminuyen ya que muestran esfuerzos máximos y porcentajes de deformación menores que los andamios de PLA.

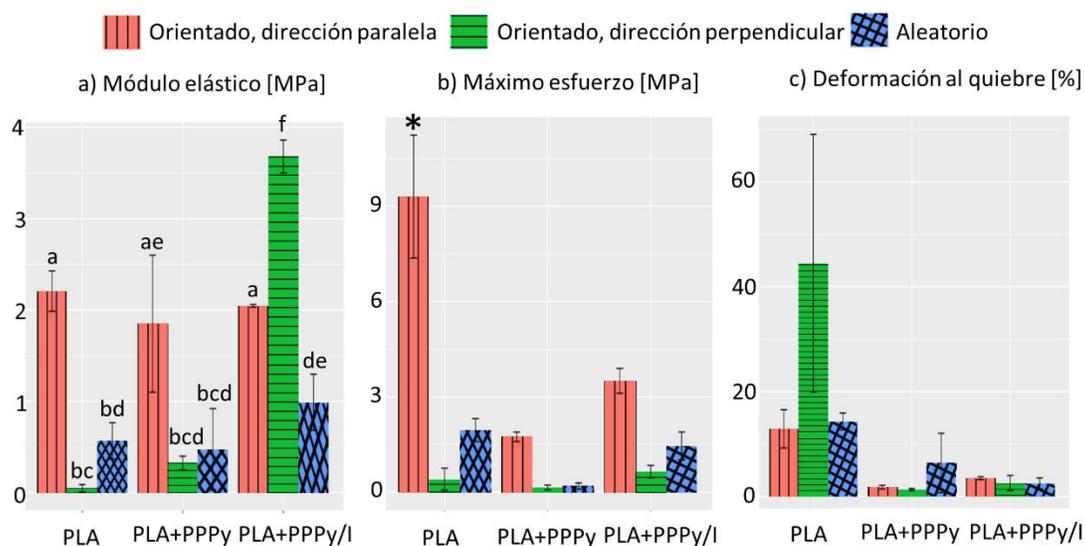
La disminución en las propiedades mecánicas, en el caso de los andamios de PLA+PPPy/I, no son tan drásticas como en el caso anterior, tal como lo muestra la Figura 17. Además, se observa un comportamiento diferente en el análisis perpendicular de las fibras, donde la pendiente de la recta que se ajusta a la región elástica es mayor que en los demás casos y la deformación al quiebre es mucho menor.



**Figura 17. Curvas esfuerzo/deformación de andamios de PLA+PPPy/I.** La curva azul corresponde al PLA aleatorio, la roja y la amarilla al PLA orientado, analizado en dirección paralela (//) y perpendicular (T) a la orientación de las fibras, respectivamente. El módulo elástico es mayor en el andamio orientado analizado en forma perpendicular, sin embargo, sus demás propiedades mecánicas son mucho menores que en las demás orientaciones.

Los resultados estadísticos de la caracterización mecánica se muestran en la Figura 18. Los resultados muestran que el módulo elástico y el máximo esfuerzo tienden a aumentar significativamente cuando el andamio es elongado en la dirección paralela a las fibras, y tienden a disminuir cuando el andamio es elongado en dirección perpendicular a las fibras, tal como se observó previamente, en las curvas esfuerzo/deformación. Sin embargo, la tendencia cambia en el caso del andamio de PLA+PPPy/I, donde el módulo elástico es significativamente mayor en el ensayo con fibras dispuestas perpendicularmente.

Se puede notar en la deformación al quiebre que las fibras sin modificación en su superficie pueden superar el 40% de deformación al estar dispuestas perpendicularmente, y que al ser modificadas con PPPy y PPPy/I esta característica disminuye drásticamente, por lo que dichos andamios se vuelven frágiles y quebradizos. Por ello, en algunos casos no se lograron registrar datos mediante el equipo empleado en este trabajo para las pruebas mecánicas en los andamios modificados en su superficie, por lo que se asumió normalidad de los datos para las pruebas estadísticas paramétricas.



**Figura 18. Caracterización mecánica de los andamios.** Los gráficos muestran la media y su desviación estándar de cada uno de los rasgos característicos estudiados en las pruebas mecánicas de los andamios, donde  $n=3$  para PLA y PLA+PPPy/I aleatorio,  $n=2$  para PLA+PPPy y PLA+PPPy/I orientado. Las barras que no comparten letras iguales indican diferencias significativas con  $p < 0.05$  en a), en b)  $* p < 0.05$  respecto a las demás, en c) no se obtuvieron diferencias significativas.

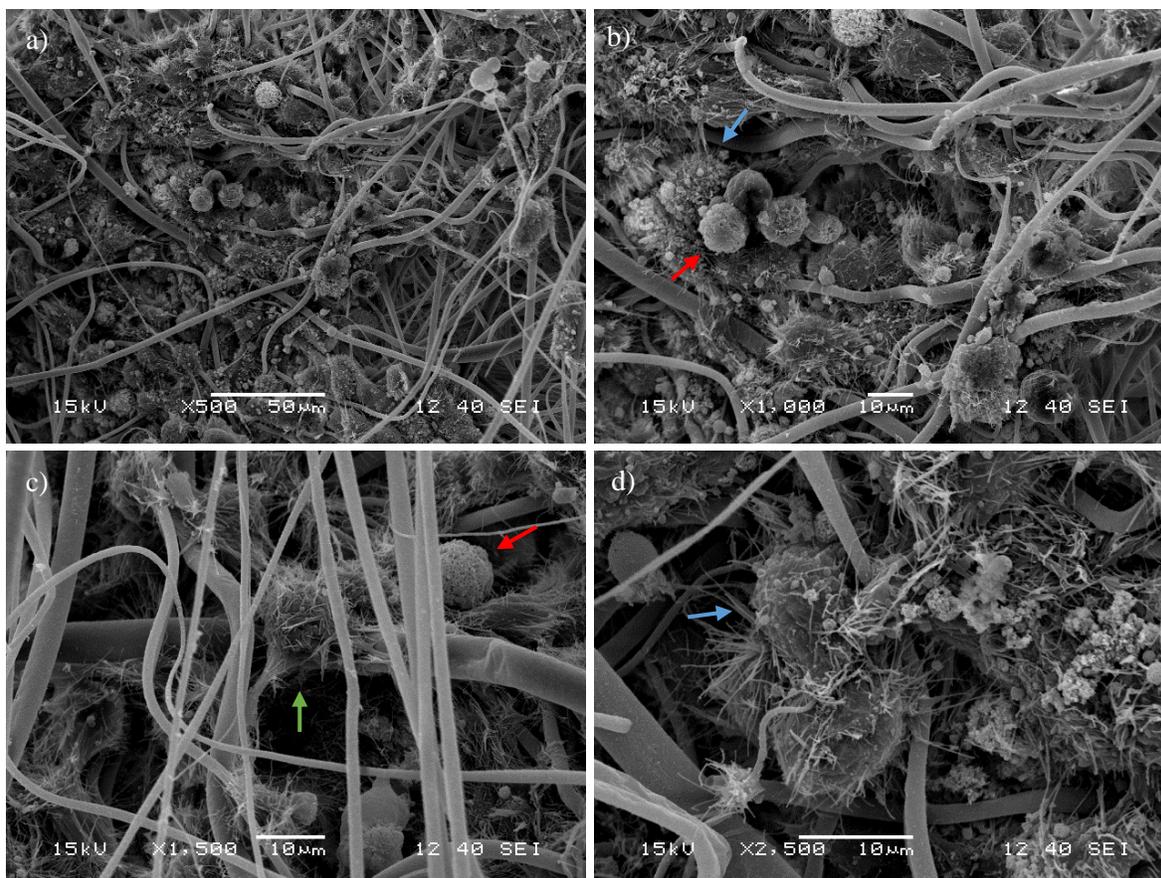
### 3.7. Microscopía electrónica de barrido de las muestras biológicas

Las imágenes de MEB muestran la morfología de las células en el andamio. En general, se encontraron células adheridas en los andamios, proyectando sus prolongaciones citoplasmáticas a lo largo de la superficie de las fibras, así como a las células vecinas, tal como sucede en las condiciones definidas por el fabricante. Sin embargo, destacan diferencias morfológicas sutiles entre los andamios, en especial entre los andamios modificados y sin modificar en su superficie. Asimismo, en los andamios aleatorios hubo una mayor penetración de las células hacia fibras internas del andamio, respecto a los andamios alineados.

Como se puede observar en la Figura 19, una gran cantidad de células ha penetrado los poros del andamio de PLA aleatorio, manteniendo una morfología redondeada. En algunos casos se aprecian células con largas prolongaciones citoplasmáticas (por ejemplo, en recuadro c, señalada por la flecha verde) así como otras desplegando largos filopodios, por toda la superficie membranaral.

Sin embargo, algunas células se pueden notar granuladas (señaladas por flechas azules) y otras cuyas membranas celulares se encuentran erosionadas, sin proyecciones o filopodios y

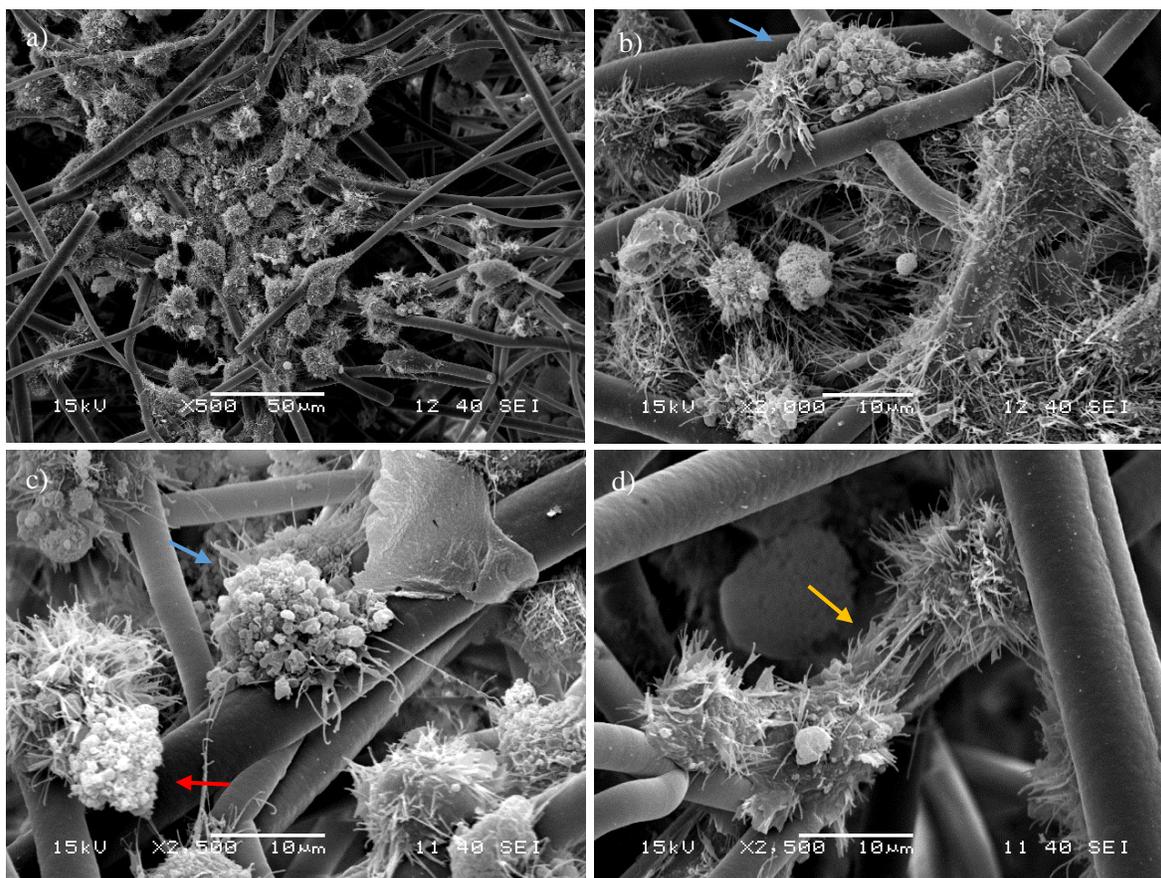
de un característico color blanco (flechas rojas), sugiriendo procesos de apoptosis o muerte celular (Tixeira et al., 2017; Wickman et al., 2013; Zhang et al., 2018).



**Figura 19. Células NG108-15 en andamio aleatorio de PLA.** En a) se muestra un enfoque panorámico de la distribución celular en el andamio fibrilar (X500 de amplificación, barra=50µm). En b), c) y d) se muestran amplificaciones mayores para detallar la morfología celular (X1000 en b), X1500 en c), X2500 en d); barra=10µm). La flecha verde señala una célula con integridad membranal y largas prolongaciones citoplasmáticas, las flechas rojas señalan células muertas y las flechas azules, células con la membrana granulada.

En el caso del andamio aleatorio de PLA+PPPy también se puede apreciar una gran penetración celular en los poros del andamio, tal como se muestra en la Figura 20. En este caso, se puede observar una mayor cantidad de proyecciones celulares, e incluso, el uso de las fibras como soporte y medio para formar conexiones entre ellas (Figura 20, d). Además, se observa la formación de una red densa e intrincada de prolongaciones citoplasmáticas alrededor de la estructura volumétrica del andamio.

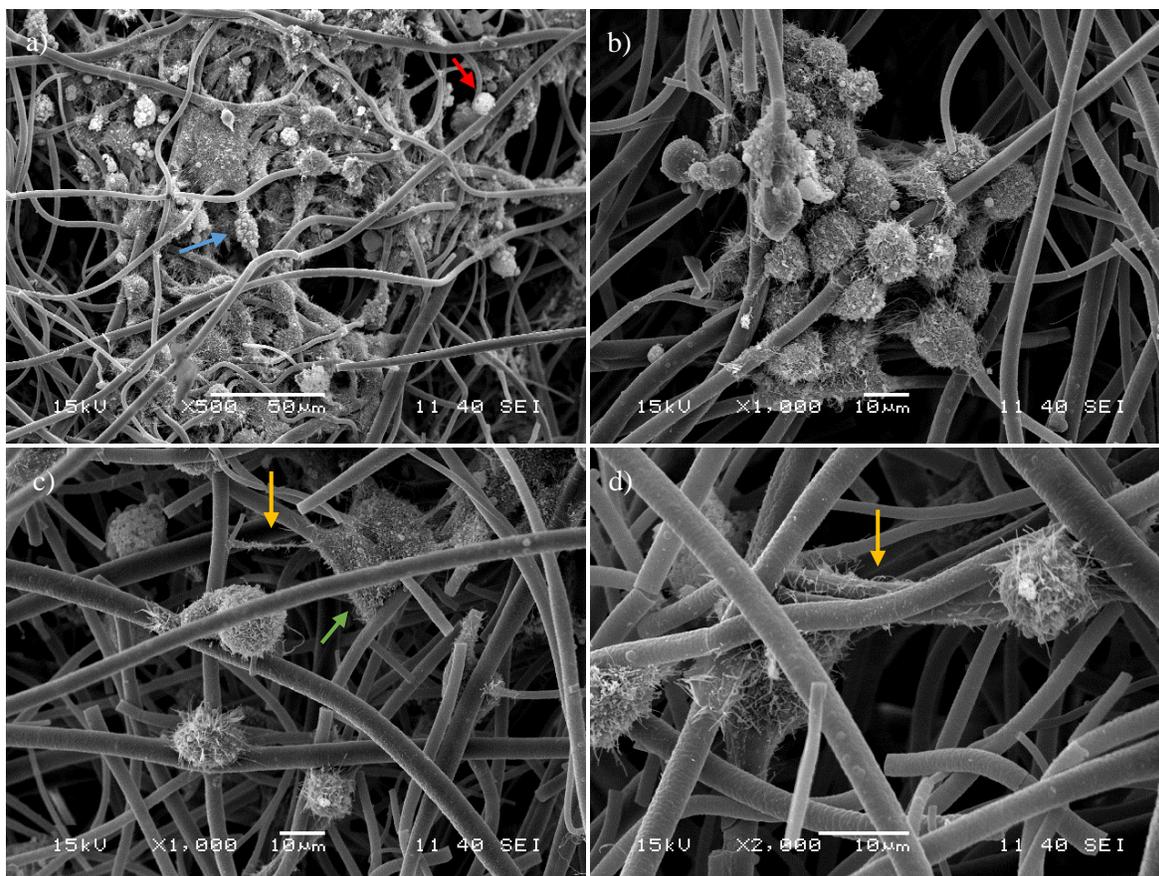
No obstante, también se observan células que han perdido sus prolongaciones citoplasmáticas y su morfología característica, por lo que se desprenden por completo, implicando la pérdida de toda actividad celular (flecha roja). En este caso también se aprecian células con membrana granulada (flechas azules), las cuales mantienen largas prolongaciones citoplasmáticas y una estructura adherida a las fibras.



**Figura 20. Células NG108-15 en andamio aleatorio de PLA+PPPy.** Se muestra la distribución y morfología de las células en el andamio, en a) enfoque panorámico (X500 de amplificación, barra=50µm). En b), c) y d), amplificaciones mayores (X2000 en b), X2500 en c) y d); barra=10µm). La flecha azul señala células con la membrana granulada; la roja, una célula muerta; y la amarilla, múltiples proyecciones citoplasmáticas que utilizan la superficie de la fibra como medio preferencial de prolongación.

La Figura 21 muestra las células en el andamio aleatorio de PLA+PPPy/I, en el cual éstas extienden su citoplasma formando adhesiones focales mediante los filopodios, utilizando el andamio como soporte (Figura 21, a). En general, en este caso la estructura de la membrana celular exhibe mayor integridad que en los casos anteriores, sin embargo, se pueden apreciar

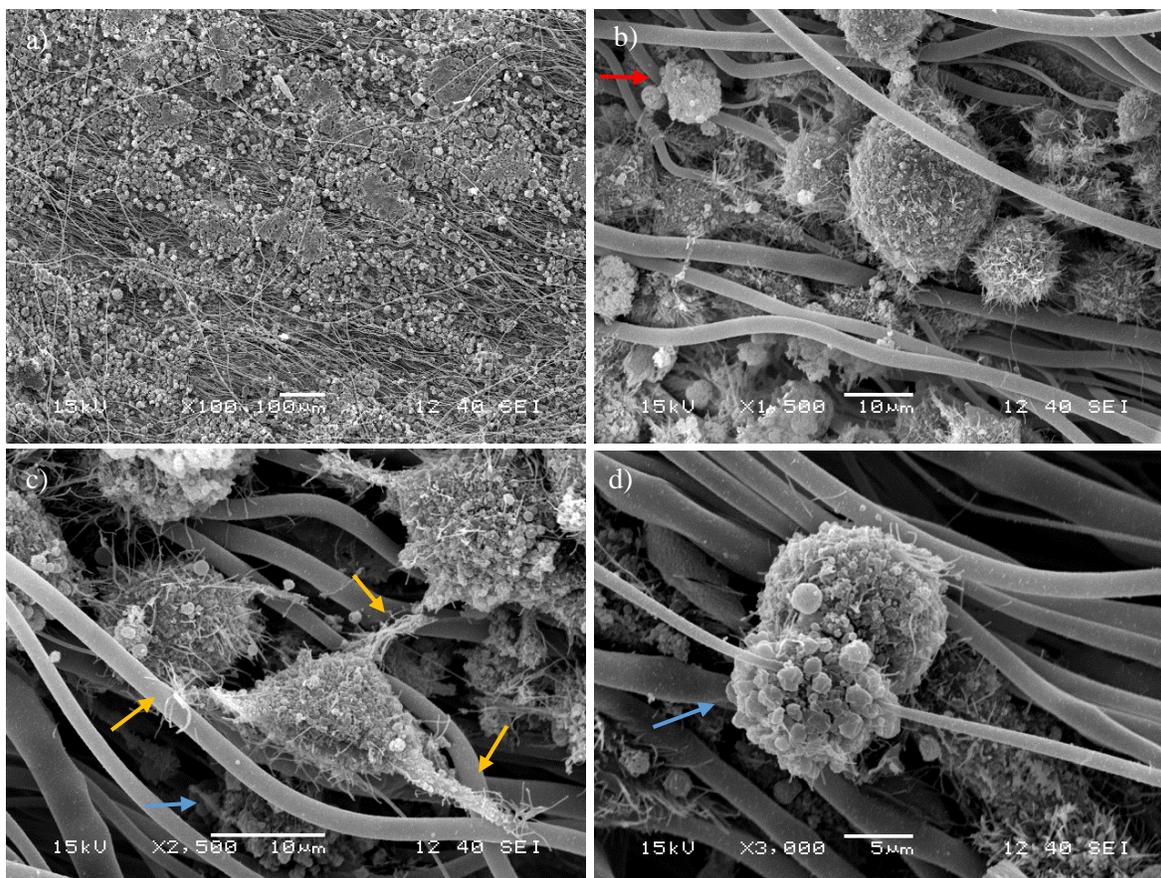
algunos pocos casos de desprendimiento y muerte celular (esferas blancas), así como una densidad menor y menor extensión en cuanto a prolongaciones citoplasmáticas.



**Figura 21. Células NG108-15 en andamio aleatorio de PLA+PPPy/I.** Se muestra la distribución y morfología de las células en el andamio, en a) enfoque panorámico (X500 de amplificación, barra=50µm). En b), c) y d), amplificaciones mayores (X1000 en b) y c), X2500 en d); barra=10µm). La flecha azul señala una célula con la membrana granulada; la roja, una célula muerta; la verde, una célula extendiendo su membrana utilizando la estructura del andamio como soporte; y la amarilla, proyecciones citoplasmáticas.

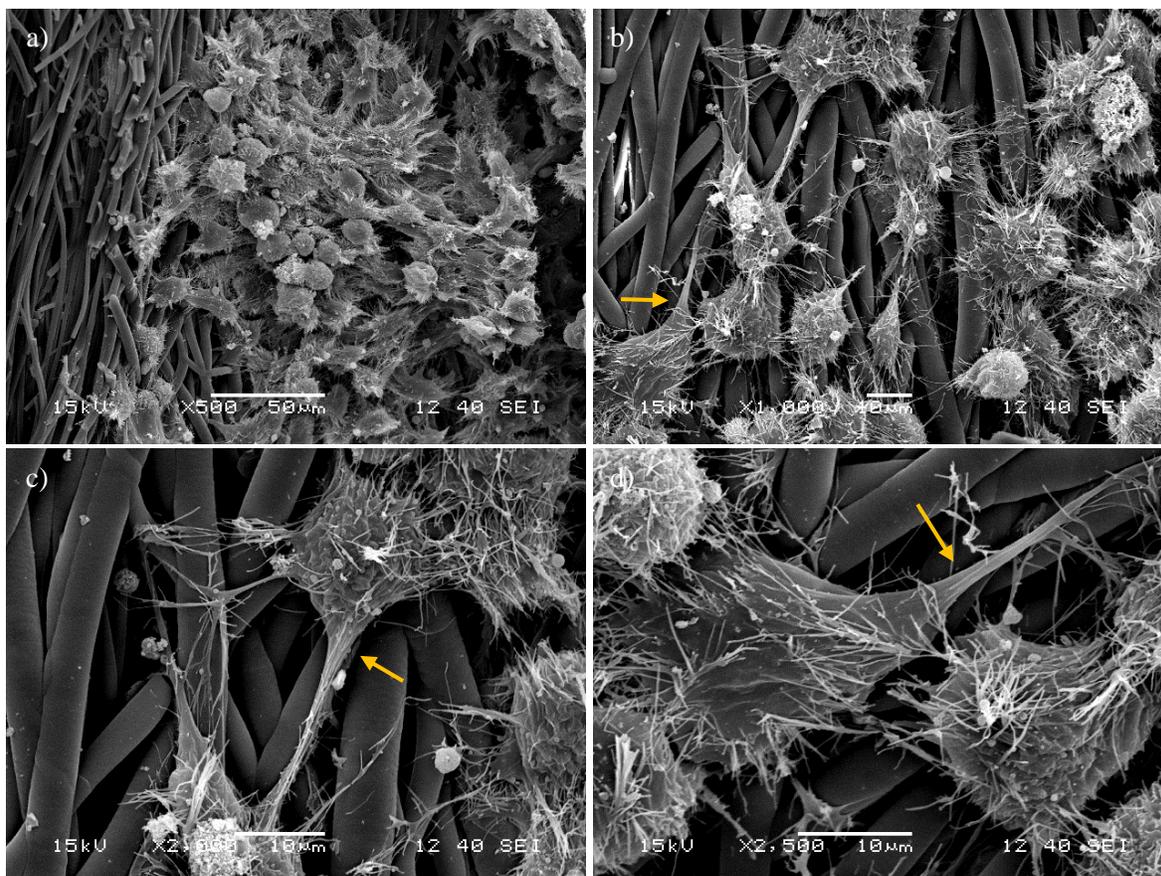
En los andamios orientados en general presentan una menor penetración hacia las fibras internas del andamio, de acuerdo con la magnitud de los poros formados al depositarse las fibras. Como se muestra en la Figura 22, en el caso del andamio de PLA, aunque las fibras alineadas presentan poros más angostos pero alargados, las células sí pueden llegar a penetrar el andamio y formar adhesiones de manera tridimensional. En algunos casos, se pueden ver prolongaciones citoplasmáticas más alargadas hacia las fibras, evidenciando un efecto de la

orientación de las fibras sobre las células. Nuevamente, se observan casos de membranas granuladas y poca densidad de extensiones citoplasmáticas.



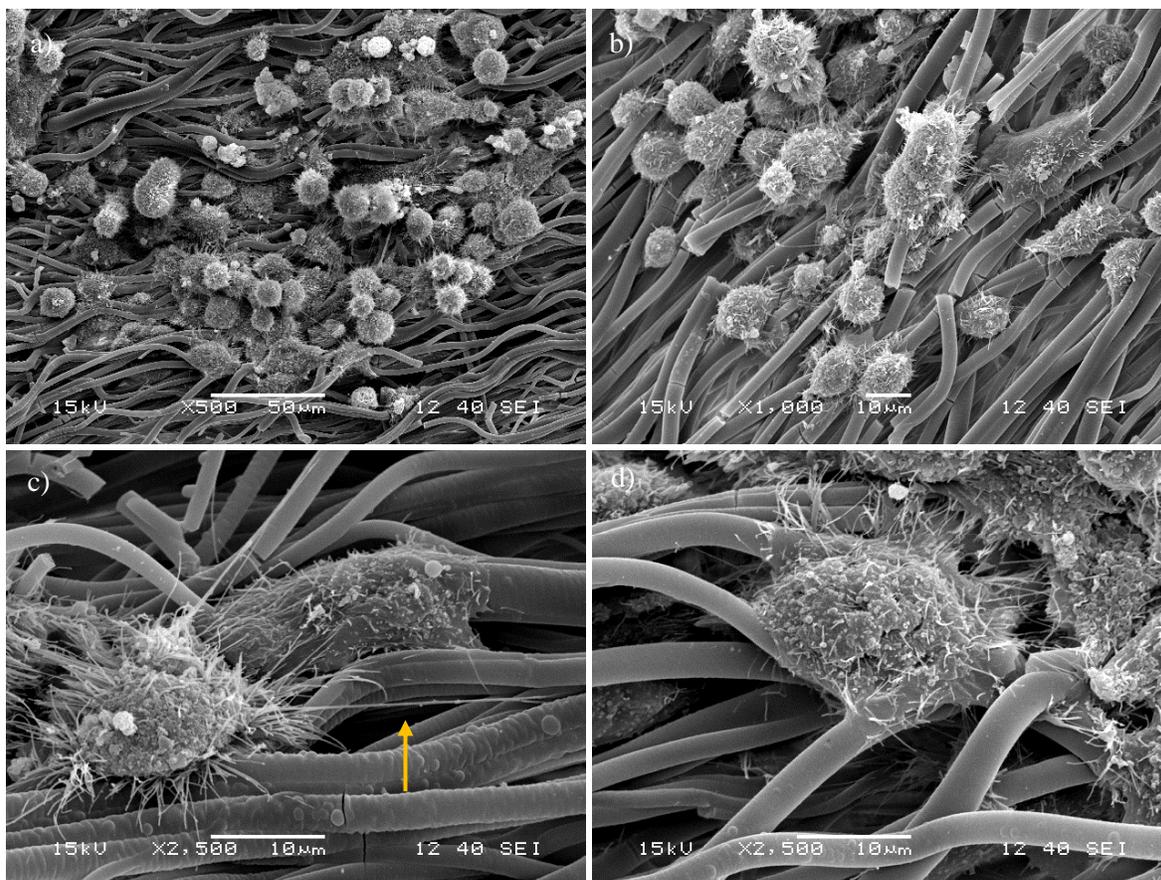
**Figura 22. Células NG108-15 en andamio orientado de PLA.** Se muestra la distribución y la morfología de las células en el andamio, en a) enfoque panorámico (X100 de amplificación, barra=100µm). En b), c) y d), amplificaciones mayores (X1500 en b), X2500 en c), X3000 en d); barra=10µm). La flecha azul señala células con la membrana granulada, sin filopodios; la roja, una célula muerta; y la amarilla, largas proyecciones citoplasmáticas.

En el caso del PLA+PPPy orientado (Figura 23), se obtuvo un crecimiento celular más aplanado, donde las células logran extenderse, alargando aún más sus prolongaciones citoplasmáticas hacia la dirección de las fibras, respecto a los casos anteriores. Además, dado que los poros son de dimensiones más pequeñas que las células, no se observa penetración celular hacia el andamio, efectuándose un crecimiento celular hacia la parte externa, tomando las fibras como base. En general, en este caso se observa una mayor integridad morfológica por parte de las células respecto a los andamios de PLA o el andamio aleatorio modificado con PPPy.



**Figura 23.** Células NG108-15 en andamio orientado de PLA+PPy. Distribución y morfología de las células en el andamio, en a) con un enfoque panorámico (X500 de amplificación, barra=50 $\mu$ m). En b), c) y d), ampliaciones mayores (X1000 en b), X2000 en c), X2500 en d); barra=10 $\mu$ m). La flecha amarilla señala largas proyecciones citoplasmáticas similares a un cono de crecimiento axonal.

En el caso del andamio orientado de PLA+PPy/I (Figura 24), se obtuvo, al igual que en el PLA+PPy orientado, menor penetración celular respecto a los andamios aleatorios, dado el tamaño de poro muy reducido respecto a las magnitudes de las células. Las prolongaciones citoplasmáticas en general se emiten por toda la superficie membranal, mostrando células con membrana celular íntegra, y en algunos casos, filopodios más alargados que se extienden en la dirección de la fibra (flecha amarilla). Sin embargo, en este caso las células mantienen una morfología redondeada, dada por la estructura del andamio, así como la magnitud de las fibras.



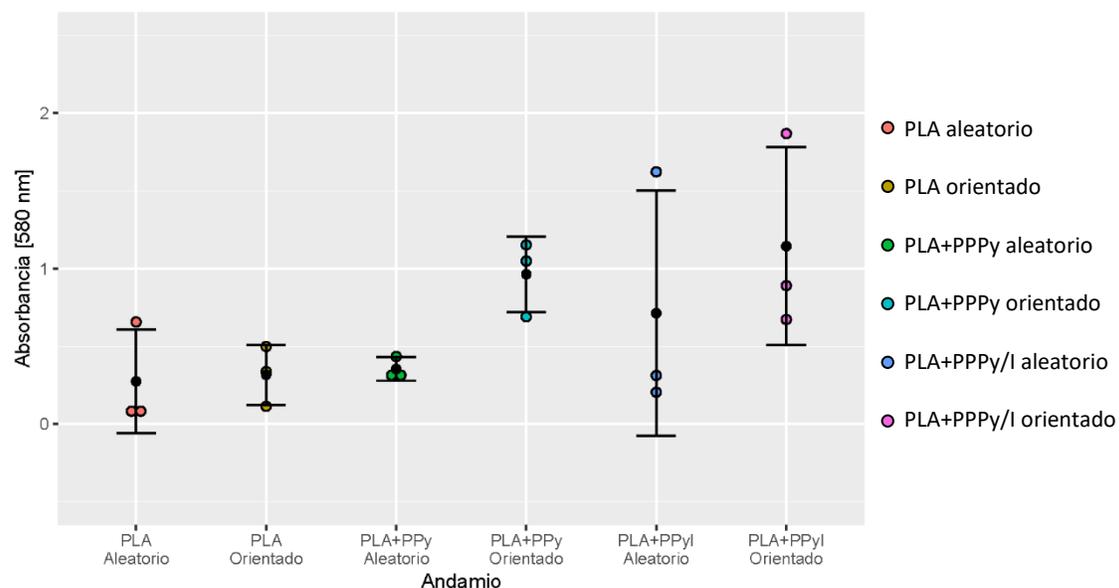
**Figura 24. Células NG108-15 en andamio orientado de PLA+PPPy/I.** Distribución y morfología de las células en el andamio, en a) con un enfoque panorámico (X500 de amplificación, barra=50 $\mu$ m). En b), c) y d), amplificaciones mayores (X1000 en b), X2500 en c) y d); barra=10 $\mu$ m). La flecha amarilla señala largas proyecciones citoplasmáticas en la dirección de la fibra.

### 3.8. Viabilidad celular

En la Figura 25 se muestran los resultados de absorbancia para cada prueba de viabilidad celular mediante MTT, la cual es proporcional al número de células viables en los andamios. En general se observa que en promedio existe un mayor número de células viables en los andamios modificados con PPPy y PPPy/I que en los andamios de PLA, sin embargo, la dispersión de los datos en cada repetición es muy alta.

Se obtuvo una absorbancia media de  $0.274 \pm 0.33$  en el PLA aleatorio,  $0.317 \pm 0.193$  en el PLA orientado,  $0.355 \pm 0.075$  en el PLA+PPPy aleatorio,  $0.964 \pm 0.243$  en el PLA+PPPy orientado,  $0.714 \pm 0.789$  en el PLA+PPPy/I aleatorio y  $1.14 \pm 0.637$  en el PLA+PPPy/I orientado. De

acuerdo con las pruebas estadísticas, no se obtuvieron diferencias significativas entre los andamios, ya que  $p > 0.05$ .



**Figura 25. Medida de la cantidad de células viables en los andamios.** La absorbancia de cada prueba de viabilidad celular mediante MTT es proporcional al número de células viables en los andamios. Se presentan los resultados para cada prueba ( $n=3$ ) y la media  $\pm$  desviación estándar.

Si bien no se encontraron diferencias significativas en estas pruebas, es probable que, al aumentar el número de repeticiones, los andamios modificados con PPy y PPy/I sigan presentando mayor cantidad de células viables que en los andamios sin modificar en su superficie. Por otro lado, dado que el sustrato de cultivo es una estructura tridimensional, el perfil de multiplicación celular cambie y se requiera más tiempo de cultivo para obtener resultados más claros en cuanto a cantidad de células viables.

## 4. Discusión

La morfología y topografía de los sustratos de crecimiento y regeneración tisular juegan un papel muy importante en la ingeniería de tejidos, ya que facilita a las células sitios de anclaje, le proporciona información de su microambiente y puede desencadenar procesos celulares, tales como migración, orientación, proliferación, crecimiento y diferenciación (Chen et al., 2018; Lins et al., 2016).

Mimetizar la matriz extracelular, o el microambiente y organización estructural del tejido, se ha perfilado como una exitosa estrategia en la medicina regenerativa. El diseño de andamios fibrilares orientados sugiere tener la arquitectura adecuada para dar soporte y dirección uniaxial a los conos de crecimiento axónico, necesarios para un eficiente proceso de reparación de nervios periféricos, ya que su estructura tridimensional, mimetiza el microambiente altamente organizado del nervio.

Otra característica importante en los andamios para ingeniería tisular es la porosidad. Un andamio poroso puede facilitar la penetración hacia el andamio y la adhesión celular a las fibras que forman el poro, además facilitar procesos de flujo de nutrientes hacia toda la estructura (Jiang et al., 2015; Pham et al., 2006). Los andamios electrohilados desarrollados en este trabajo cuentan con poros formados al depositarse las fibras en el colector, cuya aleatoriedad se debe a que el *jet* polimérico se ve afectado por la inestabilidad de los iones cargados en la solución polimérica al estar inmersos en el campo eléctrico, antes de alcanzar el colector (Pham et al., 2006; Subbiah et al., 2005).

Si bien los andamios aleatorios tienen una mayor porosidad que los andamios orientados (véase Figura 10), esta propiedad en conjunto con la hidrofobicidad inherente del PLA (Saini et al., 2016), hacen que el andamio tienda a flotar sobre el medio de cultivo, lo cual no permite un flujo adecuado de nutrientes hacia las células en el andamio, y estas se observen con rasgos de deterioro membranal (véase Figura 19) y una menor cantidad de células viables que en los demás andamios (Figura 25). Al modificar los andamios con PPPy y PPPy/I, la hidrocompatibilidad de los andamios aumenta, favoreciendo la adhesión y sobrevivencia de células viables en los andamios modificados, siendo los de PLA+PPPy/I y los de PLA+PPPy orientados los que tienen un mejor desempeño como sustrato de cultivo de las células NG108-15.

En la búsqueda de sustratos que puedan mimetizar la arquitectura de la matriz extracelular en el tejido neuronal, los andamios se diseñaron e implementaron controlando el diámetro de las fibras. Esta variable tiene un efecto sobre la morfología de las células, tal como se observa

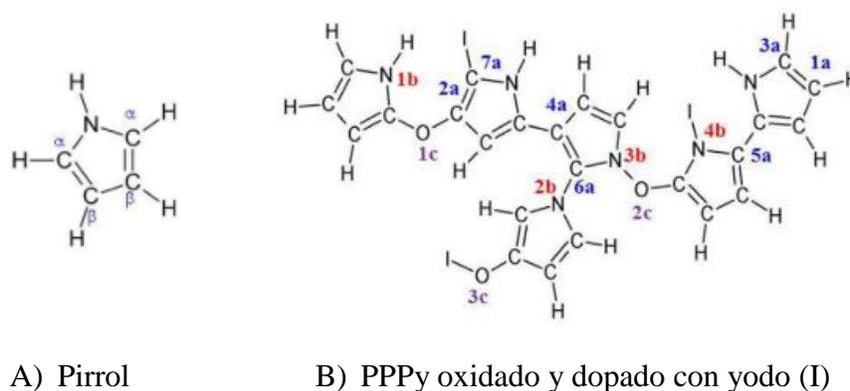
en las imágenes de MEB de las muestras biológicas. Al no tener un sustrato lo suficientemente plano, las células no alcanzan a expandir su morfología, sino que conservan su forma esférica, utilizando sus prolongaciones citoplasmáticas para adherirse a las fibras y células en su vecindad. Por el contrario, donde existe una mayor superficie, tal como sucede en los andamios recubiertos con PPPy y PPPy/I, logran extender su citoplasma a mayores distancias, emitiendo largas proyecciones similares a conos de crecimiento axonal.

La respuesta morfológica de las células ante la arquitectura del andamio puede modularse entonces a través de la optimización de las variables en el proceso de electrohilado, de acuerdo con el tejido que se desea reparar o regenerar. En los nervios periféricos donde se busca elongar los axones de las motoneuronas para alcanzar nuevamente su tejido diana, las fibras alineadas con diámetros de magnitud similar a los axones, pueden promover los procesos de elongación del cono de crecimiento, utilizando las fibras como guía (Ribeiro-Resende et al., 2009; Simitzi et al., 2017). Asimismo, el tejido donde se encuentra una mayor densidad de somas y células gliales puede verse beneficiado por una arquitectura más porosa de fibras con mayor diámetro que le provean de mayor superficie de adhesión, así como los poros que faciliten la migración de células y nutrientes a través del volumen tridimensional del andamio (Lee et al., 2018; Li and Chu, 2016).

La eficiencia en los sistemas de soporte para desarrollo tisular depende de forma crucial en las propiedades químicas de la superficie de los materiales. Actualmente, el diseño de andamios para ingeniería de tejidos incluye sistemas de funcionalización de superficies, que pueden ser factores de crecimiento, antibióticos, agentes de biocompatibilidad y adhesión, entre otros, mientras se mantiene la arquitectura y propiedades mecánicas de los mismos (Chu, 2013). En los espectros de IR de los andamios modificados en su superficie se encontraron enlaces diferentes a los encontrados en el espectro del PLA, los cuales evidencian que la superficie de los andamios se encuentra funcionalizada con los grupos funcionales característicos de la molécula de PPPy (Cruz et al., 1999; Kumar et al., 2003). Ambos espectros son similares, variando únicamente la cantidad de enlaces característicos en la molécula, tales como aminas primarias y secundarias, nitrilos, enlaces NH, C = N y sistemas aromáticos, lo cual se debe a que en este caso no se utilizó un control de flujo para el monómero, que en el caso del PPPy fue mayor que en el PPPy/I, lo cual pudo haber tenido un efecto similar en el diámetro de los andamios de PLA+PPPy.

El espectro IR de PLA+PPPy/I no muestra que el yodo haya quedado enlazado covalentemente a la molécula de PPPy/I, sin embargo, el análisis TG sí sugiere que el yodo quedó integrado al andamio, ya que la primera pérdida en masa se podría asociar a

degradación del yodo, probablemente inmerso entre las cadenas densamente entrecruzadas de PPPy (John and Kumar, 2002). Kumar et al. (2003) propuso que al estar presente el yodo durante la polimerización, se forman bloques íntimamente conectados de cadenas de polímero, lo cual se ve reflejado en la suavizada superficie de los andamios modificados con PPPy/I (Kumar et al., 2003). También se ha propuesto que el yodo sí está enlazado en la molécula de PPPy/I mediante enlaces de tipo  $C = CN-I$ ,  $C-NI-C$  y  $I-O-C$  (Gómez et al., 2017). Una propuesta de cómo podría constituirse la estructura química del PPPy dopado con yodo (I) se observa en la Figura 26., tomada de Gómez et al. (2017).



A) Pirrol

B) PPPy oxidado y dopado con yodo (I)

**Figura 26. Representación de la estructura química del pirrol y el PPPy/I.** A) Estructura química del monómero de pirrol. B) Enlaces presentes en la estructura química propuesta para el polipirrol dopado con yodo (I), sintetizado por plasma (Gómez et al., 2017).

La propiedad de autofluorescencia en el PPPy y el PPPy/I se debe a la presencia de anillos en la molécula, y, por lo tanto, conjugación tipo  $\pi$  (Vasquez-Ortega et al., 2014), y su intensidad aumenta al ser irradiado con luz en longitudes de onda cercanas al infrarrojo. Por ello, no es adecuado utilizar técnicas como la espectroscopía Raman con láser rojo (635 nm) para caracterizar este material.

La descomposición térmica de los andamios se produce a temperaturas mucho mayores que su temperatura de trabajo ( $37^{\circ}\text{C}$ ), por lo que se saben térmicamente estables a esta temperatura. Además, en general se observa mediante el análisis TG que los andamios modificados tienen mayor estabilidad térmica, y que, además, se empiezan a descomponer antes que el PLA. Por otro lado, mediante el análisis TG también podemos estudiar la integración de los componentes en los andamios, observando cómo va cambiando el perfil de degradación en cada etapa del proceso. La morfología del perfil de descomposición del

---

PPPy/I sugiere que la primera etapa se puede asociar con la pérdida del yodo, de acuerdo con el perfil de descomposición del andamio modificado con PPPy.

Dado que las células responden a distintas propiedades químicas en los materiales (Lins et al., 2016), se investigó la organización molecular en los andamios por medio de rayos X. La estructura molecular de los andamios modificados presenta cristalinidad, tal como se muestra en los difractogramas de rayos X. En el proceso de electrohilado, el PLA pierde su estructura semi-cristalina, lo cual se evidencia en el patrón de difracción obtenido para los andamios aleatorios y orientados de PLA (Figura 14), mismo que se obtiene de la película de PLA, y tal como se reporta en la literatura (Dong et al., 2017; Santos and Tavares, 2014). Dado que el proceso de solidificación del PLA en la formación de las fibras electrohiladas ocurre de manera acelerada, no se alcanza a conformar la organización atómica del PLA (Gómez-Pachón et al., 2014). Dicho comportamiento se manifiesta de forma similar en la formación de la película de PLA al evaporarse rápidamente el solvente, y, por lo tanto, se obtiene una estructura molecular amorfa, representada por el patrón de difracción característico de los andamios electrohilados en el análisis por rayos X.

Por el contrario, al analizar los andamios modificados, se encuentran picos asociados a la cristalinidad del PLA, proceso que probablemente ocurre durante el proceso de polimerización por plasma, en el cual la estructura molecular de los andamios electrohilados se pudo haber reorganizado, retornando a su estado semi-cristalino y produciendo el patrón de difracción similar al obtenido en su forma original de *pellet*, tal como se reporta en la literatura (Mukherjee et al., 2013; Santos and Tavares, 2014; Shameli et al., 2010; Zhou et al., 2013). El patrón obtenido, además es similar al que produce el PLLA, donde la tacticidad de la molécula implica la organización a nivel atómico en el polímero, lo cual tiene un efecto en sus propiedades fisicoquímicas, incluyendo el patrón de difracción (Dos Santos Almeida et al., 2012; Inai et al., 2005; Li et al., 2015). Como reportan Li et al. (2015), el patrón de difracción se modifica respecto a la temperatura de cristalización del polímero, por lo que el aumento de temperatura dentro del reactor de plasma podría tener un efecto en la organización del PLA electrohilado, similar a la encontrada en su forma isotáctica PLLA, dando como resultado los patrones observados en el análisis DRX (Figura 14).

Las propiedades mecánicas de los biomateriales son otro elemento importante para determinar su desempeño como implante en ingeniería tisular. La distensibilidad mecánica se considera un factor de biocompatibilidad, dado que las células son sensibles a esta característica y en función de ella pueden modular su comportamiento (Draghi, 2017; Lesman et al., 2014; Vincent and Engler, 2017). Las propiedades mecánicas de los andamios

modificados, en general se ven disminuidas respecto a los andamios de PLA, lo cual se puede observar desde la caracterización morfológica y se comprueba con las pruebas mecánicas. La configuración aleatoria, al contener fibras dispuestas en cualquier dirección, presenta una componente parcial de resistencia a la deformación por parte de las fibras dispuestas de forma paralela a la elongación.

El caso donde el módulo elástico es mayor para PLA+PPPy/I, posiblemente se debe a que la película depositada de PPPy/I sobre las fibras de PLA pudo haber unido fibras en el andamio (tal como se puede observar en las imágenes por MEB de los andamios, Figura 10, f). Sin embargo, como se puede comprobar mediante el máximo esfuerzo y su deformación al quiebre, el andamio se vuelve quebradizo al ser modificado con PPPy/I bajo las condiciones de síntesis empleadas en este trabajo. Estas características podrían ser beneficiosas en el proceso de degradación del andamio *in vivo*, ya que las fibras modificadas con PPPy/I después de cumplir su función pueden ser más fácilmente desintegradas por el tejido.

Por otro lado, las propiedades mecánicas, así como las morfológicas, de los andamios modificados podrían mejorarse aún más modificando las condiciones de síntesis en la polimerización por plasma (Cruz et al., 1999). Por ejemplo, si se disminuye el tiempo de síntesis se obtiene una película depositada de menor grosor, conservando las mismas propiedades químicas del PPPy/I y el PPPy en la superficie de las fibras (véase la sección II del apéndice A), y su efecto en las interacciones celulares.

Dado que las imágenes de MEB de las muestras biológicas muestran diferencias subjetivas entre los andamios modificados con PPPy y PPPy/I, la prueba de viabilidad celular muestra diferencias cuantitativas entre los grupos, estableciendo en promedio un mejor desempeño en los andamios modificados con PPPy/I y los orientados modificados con PPPy. Sin embargo, en este caso las dispersiones son altas en su mayoría, por lo que es indispensable aumentar la  $n$  para las pruebas de viabilidad celular con el fin de disminuir la dispersión de los datos y obtener diferencias claras en el desempeño entre los andamios, además de complementar el ensayo de reducción de MTT con otras técnicas de evaluación cuantitativa de andamios para ingeniería de tejidos y sistemas tridimensionales, tales como los ensayos de proliferación basados en la cuantificación de ADN (por ejemplo, el ensayo PicoGreen y el CyQUANT) (Sousa et al., 2017).

Actualmente existen conductos guía de nervio (NGC) comerciales, fabricados con PLA (POLYGANICS, 2017), así como diversos diseños experimentales que han utilizado PLA en copolímero para reparar nervios periféricos (Lee et al., 2018; Mobini et al., 2017; Spearman et al., 2018). Sin embargo, estos conductos poliméricos carecen de la estructura intraluminal

similar a la encontrada en el nervio, que proporciona mayor soporte en la adhesión y migración celular. Por ello, los andamios electrohilados de PLA se han utilizado como control en este trabajo, para comparar el efecto que tienen sobre las células respecto a los funcionalizados con PPPy y PPPy/I, en un sustrato que permitiera simular el microambiente tisular neural.

Tanto las imágenes de MEB como las pruebas de viabilidad celular por MTT, destacan un mejor desempeño de los andamios modificados por PPPy (orientado) y PPPy/I respecto a los de PLA, y que en conjunto sus propiedades fisicoquímicas tienen el potencial para su aplicación en reparación y regeneración de tejido neuronal.

## 5. Conclusiones y perspectivas

La fabricación de andamios para ingeniería de tejidos mediante electrohilado sigue presentando grandes ventajas para el diseño de distintas configuraciones en matrices fibrilares. Dado el impacto de la variación de los parámetros del proceso en las características morfológicas de la matriz, fue necesario realizar un ajuste de parámetros en función del polímero seleccionado y las condiciones ambientales en la cámara de electrohilado, para encontrar la combinación adecuada a la aplicación.

De esta manera, se encontró que una concentración de 15% de PLA en cloroformo y dimetilformamida en relación 9:1, inyección de 2ml/h, un campo eléctrico de 20kV y 22cm entre la aguja y el colector, constituyen parámetros óptimos para obtener fibras uniformes y sin defectos, con un diámetro promedio entre 1.3 y 2 micras, adecuado para fungir como soporte de adhesión y proliferación de células neuronales.

Las propiedades fisicoquímicas de las matrices electrohiladas de PLA se mejoraron para favorecer las interacciones con sistemas biológicos como la adhesión, sobrevivencia y migración, mediante la modificación en su superficie con PPPy y PPPy/I, aumentando su biocompatibilidad e hidrocompatibilidad, constituyendo un mejor soporte de células neuronales viables, favoreciendo su adhesión, la formación de redes densas e intrincadas de proyecciones citoplasmáticas entre células y fibras, además del desarrollo de prolongaciones citoplasmáticas similares a elongaciones neuríticas, utilizando los andamios como guía.

La técnica de modificación de superficies por plasma se implementa de forma relativamente sencilla, y con un bajo costo, con múltiples beneficios a la fabricación de biomateriales para ingeniería tisular neural, cuyas propiedades fisicoquímicas se pueden modular variando las condiciones de síntesis de la película polimérica de PPPy. Además de la potencia, se puede variar el tiempo de síntesis para obtener mejores propiedades morfológicas, químicas y mecánicas adecuadas para la fabricación de un implante destinado a la reparación de nervios periféricos.

Los andamios aleatorios modificados con PPPy/I mostraron un mejor desempeño en el cultivo *in vitro*, se obtuvo en promedio una mayor cantidad de células viables y una mejor estructura membranal respecto a los andamios aleatorios modificados con PPPy. Por otro lado, en los andamios orientados modificados con PPPy/I se obtuvo en promedio una mayor cantidad de células viables respecto a los modificados con PPPy, aunque las células conservan su forma esférica, mientras que en el andamio orientado modificado con PPPy las células desarrollaron grandes extensiones citoplasmáticas similares a conos de crecimiento

neural. Por lo tanto, es necesario incrementar la cantidad de datos en la evaluación de viabilidad celular, así como implementar técnicas complementarias al ensayo de reducción de MTT para actividad metabólica mediante otros ensayos de análisis cuantitativo de la viabilidad celular en andamios para ingeniería de tejidos.

Los andamios modificados con PPPy/I mostraron mejores propiedades mecánicas que los modificados con PPPy, además de una mayor organización de las cadenas poliméricas del PLA, mostrando valores de módulo elástico, esfuerzo máximo y distensibilidad superiores, y una mejor respuesta por parte de las células; demostrando que estas propiedades constituyen una ventaja a nivel biológico.

Por ello, se debe seguir trabajando para encontrar las propiedades fisicoquímicas adecuadas de los andamios modificados con PPy y la técnica de plasma, dado que se ha reportado que al dopar el PPPy con yodo se obtienen mejores resultados en la locomoción de animales experimentales al ser tratados con este polímero en lesiones medulares (Cruz et al., 2012; Fabela-Sánchez et al., 2018; Mondragon-Lozano et al., 2017; Morales-Guadarrama et al., 2015; Olayo et al., 2008).

Finalmente, tal como lo sugieren los resultados *in vitro*, los andamios tridimensionales fabricados por la técnica de electrohilado, modificados con polipirrol y polipirrol dopado con yodo, sintetizados por plasma constituyen un sustrato de crecimiento de células neuronales con gran relación superficie/volumen, propiedades químicas que contribuyen a la formación de sitios de adhesión, que promueven la sobrevivencia y la elongación de conos de crecimiento, con las propiedades mecánicas adecuadas para funcionar como implante para el tratamiento de lesiones de magnitudes superiores a los 5 mm de longitud en el nervio periférico, además de mostrar potencial para el tratamiento en lesiones tanto agudas como crónicas en médula espinal, ya que en la actualidad se han empezado a explorar estrategias más invasivas que la inyección de sustancias en el sitio de la lesión, con el fin de proveer el soporte y las guías físicas para la migración direccional de las células gliales y la elongación orientada de los conos de crecimiento axónico.

Por lo tanto, surge la motivación de implementar los andamios desarrollados en este trabajo como implante para pruebas *in vivo*, con el fin de mejorar el desempeño del tratamiento de lesiones del sistema nervioso, aumentando las propiedades del polipirrol sintetizado por plasma y dopado con yodo mediante estructuras tridimensionales diseñadas en base a la organización del tejido neuronal.

## Bibliografía

- Akter, F., Ibanez, J., Kotter, M., 2016. Neural Tissue Engineering, in: Tissue Engineering Made Easy. Elsevier, pp. 29–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805361-4.00004-7>
- Alvarez-Mejia, L., Morales, J., Cruz, G.J., Olayo, M.-G., Olayo, R., Díaz-Ruiz, A., Ríos, C., Mondragón-Lozano, R., Sánchez-Torres, S., Morales-Guadarrama, A., Fabela-Sánchez, O., Salgado-Ceballos, H., 2015. Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26, 209. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5541-0>
- American Type Culture Collection, 2011. MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide. ATCC® 30-1010K. Disponible en: <https://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>
- ATCC, 2019. NG108-15 [108CC15] ATCC® HB-12317™ [WWW Document]. URL [https://www.atcc.org/en/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/By\\_Tissue/Brain/HB-12317.aspx](https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Tissue/Brain/HB-12317.aspx)
- Baji, A., Mai, Y.W., Wong, S.C., Abtahi, M., Chen, P., 2010. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Compos. Sci. Technol.* 70, 703–718. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2010.01.010>
- Barton, M.J., Morley, J.W., Stoodley, M.A., Lauto, A., Mahns, D.A., 2014. Nerve repair: Toward a sutureless approach. *Neurosurg. Rev.* 37, 585–595. <https://doi.org/10.1007/s10143-014-0559-1>
- Bose, S., Bandyopadhyay, A. (Eds.), 2013. Characterization of Biomaterials. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04481-2>
- Brunella, M.F., Serafini, A., Tanzi, M.C., 2017. Characterization of 2D polymeric biomaterial structures or surfaces, in: Characterization of Polymeric Biomaterials. Elsevier Ltd., pp. 3–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100737-2.00001-7>
- Casasola, R., Thomas, N.L., Trybala, A., Georgiadou, S., 2014. Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: Effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter. *Polymer (Guildf)*. 55, 4728–4737. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.06.032>
- Chen, L., Yan, C., Zheng, Z., 2018. Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors. *Mater. Today* 21, 38–59. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.07.002>
- Chu, P.K., 2013. Surface engineering and modification of biomaterials. *Thin Solid Films* 528, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2012.07.144>
- Coleman, M.P., Freeman, M.R., 2010. Wallerian Degeneration, WldS, and Nmnat. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 245–267. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153248>
- Cruz, G.J., Mondragón-Lozano, R., Diaz-Ruiz, A., Manjarrez, J., Olayo, R., Salgado-Ceballos, H., Olayo, M.G., Morales, J., Alvarez-Mejía, L., Morales, A., Méndez-

- Armenta, M., Plascencia, N., Del Carmen Fernandez, M., Ríos, C., 2012. Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23, 2583–2592. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4715-2>
- Cruz, G.J., Morales, J., Olayo, R., 1999. Films obtained by plasma polymerization of pyrrole. *Thin Solid Films* 342, 119–126. [https://doi.org/10.1016/S0040-6090\(98\)01450-3](https://doi.org/10.1016/S0040-6090(98)01450-3)
- Cui, Y., Lu, C., Meng, D., Xiao, Z., Hou, X., Ding, W., Kou, D., Yao, Y., Chen, B., Zhang, Z., Li, J., Pan, J., Dai, J., 2014. Collagen scaffolds modified with CNTF and bFGF promote facial nerve regeneration in minipigs. *Biomaterials* 35, 7819–7827. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.065>
- Dahlin, L.B., 2008. Techniques of Peripheral Nerve Repair. *Scand. J. Surg.* 97, 310–316. <https://doi.org/10.1177/145749690809700407>
- 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. *J. R. Soc. Interface* 9, 202–221. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0438>
- di Summa, P., de Luca, A., Raffoul, W., Giacalone, F., Bertolini, M., 2015. Tissue-engineered constructs for peripheral nerve repair: current research concepts and future perspectives. *Plast. Aesthetic Res.* 2, 213. <https://doi.org/10.4103/2347-9264.160889>
- Dong, F., Yan, M., Jin, C., Li, S., 2017. Characterization of type-II acetylated cellulose nanocrystals with various degree of substitution and its compatibility in PLA films. *Polymers (Basel)*. 9, 1–14. <https://doi.org/10.3390/polym9080346>
- Dos Santos Almeida, A., Tavares, M.I.B., Oliveira Da Silva, E., Neto, R.P.C., Moreira, L.A., 2012. Development of hybrid nanocomposites based on PLLA and low-field NMR characterization. *Polym. Test.* 31, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2011.11.005>
- Draghi, L., 2017. Static and uniaxial characterization of polymer biomaterials, *Characterization of Polymeric Biomaterials*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100737-2.00008-x>
- Fabela-Sánchez, O., Salgado-Ceballos, H., Medina-Torres, L., Álvarez-Mejía, L., Sánchez-Torres, S., Mondragón-Lozano, R., Morales-Guadarrama, A., Díaz-Ruiz, A., Olayo, M.G., Cruz, G.J., Morales, J., Ríos, C., Olayo, R., 2018. Effect of the combined treatment of albumin with plasma synthesised pyrrole polymers on motor recovery after traumatic spinal cord injury in rats. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-6016-2>
- Fan, C., Li, X., Xiao, Z., Zhao, Y., Liang, H., Wang, B., Han, S., Li, X., Xu, B., Wang, N., Liu, S., Xue, W., Dai, J., 2017. A modified collagen scaffold facilitates endogenous neurogenesis for acute spinal cord injury repair. *Acta Biomater.* 51, 304–316. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.009>

- Fragoso Pérez, E., 2018. Materiales Nanoestructurados Embebidos en Biopolímeros Degradables para su Uso en Ingeniería de Tejidos. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Frostick, S.P., Yin, Q., Kemp, G.J., 1998. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 18, 397–405.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2752\(1998\)18:7<397::AID-MICR2>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2752(1998)18:7<397::AID-MICR2>3.0.CO;2-F)
- Galbraith, C., Galbraith, J., 2010. CIL:131, mouse/rat NG108-15, glioma, neuroblastoma.  
<https://doi.org/10.7295/W9CIL131>
- Galbraith, C.G., Yamada, K.M., Galbraith, J.A., 2007. Polymerizing Actin Fibers Integrins Primed to Probe Adhesion Position for Adhesion sites. *Science* (80-. ). 315, 992–995.
- Geuna, S., Raimondo, S., Fregnan, F., Haastert-Talini, K., Grothe, C., 2016. In vitro models for peripheral nerve regeneration. *Eur. J. Neurosci.* 43, 287–296.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.13054>
- Gilbert, D.F., Friedrich, O. (Eds.), 2017. *Cell Viability Assays, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9>
- Gómez-Pachón, E.Y., Vera-Graziano, R., Montiel Campos, R., 2014. Structure of poly(lactic-acid) PLA nanofibers scaffolds prepared by electrospinning. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 59. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/59/1/012003>
- Gómez, L.M., Olayo, M.G., González-Torres, M., González-Salgado, F., Basurto, R., Cruz, G.J., Gómez, L.M., González-Torres, M., Cruz, G.J., 2017. Chemical States of Plasma Polypyrrole Coatings on Stainless Steel Stents. *Macromol. Symp.* 374, 1600099.  
<https://doi.org/10.1002/masy.201600099>
- Grinsell, D., Keating, C.P., Grinsell, D., Keating, C.P., 2014. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/698256>
- Gu, X., Ding, F., Williams, D.F., 2014. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 35, 6143–6156.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.064>
- Gutiérrez García, X.H., 2015. Diseño y construcción de un dispositivo versátil para la caracterización y/o estímulo mecánico de biomateriales y tejidos. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Haastert-Talini, K., Geuna, S., Dahlin, L.B., Meyer, C., Stenberg, L., Freier, T., Heimann, C., Barwig, C., Pinto, L.F. V., Raimondo, S., Gambarotta, G., Samy, S.R., Sousa, N., Salgado, A.J., Ratzka, A., Wrobel, S., Grothe, C., 2013. Chitosan tubes of varying degrees of acetylation for bridging peripheral nerve defects. *Biomaterials* 34, 9886–9904. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.074>
- Hall, S.M., 1989. Regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathol. Appl.*

- Neurobiol. 15, 513–529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1989.tb01251.x>
- Hamprecht, B., 1977. Structural, Electrophysiological, Biochemical, and Pharmacological Properties of Neuroblastoma-Glioma Cell Hybrids in Cell Culture. *Int. Rev. Cytol.* 49, 99–170. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61948-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61948-8)
- HORIBA, n.d. Raman Spectroscopy for Analysis and Monitoring. Disponible en: <http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Raman/bands.pdf>
- Hosono, K., Matsubara, I., Murayama, N., Shin, W., Izu, N., Kanzaki, S., 2003. Structure and properties of plasma polymerized and 4-ethylbenzenesulfonic acid-doped polypyrrole films. *Thin Solid Films* 441, 72–75. [https://doi.org/10.1016/S0040-6090\(03\)00865-4](https://doi.org/10.1016/S0040-6090(03)00865-4)
- Inai, R., Kotaki, M., Ramakrishna, S., 2005. Structure and properties of electrospun PLLA single nanofibres. *Nanotechnology* 16, 208–213. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/2/005>
- Israël, M., Lesbats, B., Synguelakis, M., Joliot, A., 1994. Acetylcholine accumulation and release by hybrid NG108-15, glioma and neuroblastoma cells-role of a 16 kDA membrane protein in release. *Neurochem. Int.* 25, 103–109. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0197-0186(94)90029-9)
- Jiang, T., Carbone, E.J., Lo, K.W.-H., Laurencin, C.T., 2015. Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Prog. Polym. Sci.* 46, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.12.001>
- John, R.K., Kumar, D.S., 2002. Structural, electrical, and optical studies of plasma-polymerized and iodine-doped poly pyrrole. *J. Appl. Polym. Sci.* 83, 1856–1859. <https://doi.org/10.1002/app.2312>
- Kaufmann, E.N., 2003. *Characterization of Materials*. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.
- Kim, J.I., Hwang, T.I., Aguilar, L.E., Park, C.H., Kim, C.S., 2016. A Controlled Design of Aligned and Random Nanofibers for 3D Bi-functionalized Nerve Conduits Fabricated via a Novel Electrospinning Set-up. *Sci. Rep.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep23761>
- Koprivica, V., Cho, K.-S., Park, J.B., Yiu, G., Atwal, J., Gore, B., Kim, J.A., Lin, E., Tessier-Lavigne, M., Chen, D.F., He, Z., 2005. EGFR Activation Mediates Inhibition of Axon Regeneration by Myelin and Chondroitin Sulfate Proteoglycans. *Science* (80-). 310, 106–110. <https://doi.org/10.1126/science.1115462>
- Kumar, D.S., Nakamura, K., Nishiyama, S., Ishii, S., Noguchi, H., Kashiwagi, K., Yoshida, Y., 2003. Optical and electrical characterization of plasma polymerized pyrrole films. *J. Appl. Phys.* 93, 2705–2711. <https://doi.org/10.1063/1.1542692>
- Lee, S.-J., Esworthy, T., Stake, S., Miao, S., Zuo, Y.Y., Harris, B.T., Zhang, L.G., 2018. Advances in 3D Bioprinting for Neural Tissue Engineering. *Adv. Biosyst.* 2, 1–18.

- <https://doi.org/10.1002/adbi.201700213>
- Lesman, A., Notbohm, J., Tirrell, D.A., Ravichandran, G., 2014. Contractile forces regulate cell division in three-dimensional environments. *J. Cell Biol.* 205, 155–162. <https://doi.org/10.1083/jcb.201309029>
- Li, J., Xiao, P., Li, H., Zhang, Y., Xue, F., Luo, B., Huang, S., Shang, Y., Wen, H., De Claville Christiansen, J., Yu, D., Jiang, S., 2015. Crystalline structures and crystallization behaviors of poly(l-lactide) in poly(l-lactide)/graphene nanosheet composites. *Polym. Chem.* 6, 3988–4002. <https://doi.org/10.1039/c5py00254k>
- Li, P.H., Chu, P.K., 2016. Thin film deposition technologies and processing of biomaterials. *Thin Film Coatings Biomater. Biomed. Appl.* 3–28. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-453-6.00001-8>
- Lins, L.C., Wianny, F., Livi, S., Dehay, C., Duchet-rumeau, J., 2016. Effect of polyvinylidene fluoride electrospun fiber orientation on neural stem cell differentiation 2376–2393. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33778>
- Martínez Hernández, R.C., 2018. Matrices de Fibras Electrohiladas de Ácido Poliláctico (PLA) como Sistemas de Liberación Controlada: Obtención, Caracterización y Estudios de Liberación con Cafeína. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Menorca, R.M.G., Fussell, T.S., Elfar, J.C., 2013. Peripheral Nerve Trauma: Mechanisms of Injury and Recovery. *Hand Clin* 29, 317–330. <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2013.04.002>
- Mobini, S., Spearman, B.S., Lacko, C.S., Schmidt, C.E., 2017. Recent Advances in Strategies for Peripheral Nerve Tissue Engineering. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 4, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.10.010>
- Mohsen-Nia, M., Amiri, H., Jazi, B., 2010. Dielectric Constants of Water, Methanol, Ethanol, Butanol and Acetone: Measurement and Computational Study. *J. Solution Chem.* 39, 701–708. <https://doi.org/10.1007/s10953-010-9538-5>
- Molnar, P., Hickman, J.J., 2014. Modeling of action potential generation in NG108-15 cells. *Methods Mol. Biol.* 1183, 253–261. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1096-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1096-0_16)
- Mondragon-Lozano, R., Ríos, C., Roldan-Valadez, E., Cruz, G.J., Olayo, M.G., Olayo, R., Salgado-Ceballos, H., Morales, J., Mendez-Armenta, M., Alvarez-Mejia, L., Fabela, O., Morales-Guadarrama, A., Sánchez-Torres, S., Diaz-Ruiz, A., 2017. Delayed injection of polypyrrole doped with iodine particle suspension after spinal cord injury in rats improves functional recovery and decreased tissue damage evaluated by 3.0 Tesla in vivo magnetic resonance imaging. *Spine J.* 17, 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2016.02.012>
- Morales-Guadarrama, A., Salgado-Ceballos, H., Grijalva, I., Morales, J., Ríos, C., Cruz,

- G.J., Diaz-Ruiz, A., Olayo, M.G., Alvarez-Mejia, L., Mondragón-Lozano, R., Ibáñez-Contreras, A., Hernández-Godínez, B., Olayo, R., 2015. Spinal Cord Injury of Rhesus Monkey Implanted with PPy/I Plasma Polymer, MRI Study. *IFMBE Proc.* 49, 174–177. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13117-7>
- Morales, J., Olayo, M.G., Cruz, G.J., Castillo-Ortega, M.M., Olayo, R., 2000. Electronic conductivity of pyrrole and aniline thin films polymerized by plasma. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 38, 3247–3255. [https://doi.org/10.1002/1099-0488\(20001215\)38:24<3247::AID-POLB60>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1099-0488(20001215)38:24<3247::AID-POLB60>3.0.CO;2-U)
- Mukherjee, T., Sani, M., Kao, N., Gupta, R.K., Quazi, N., Bhattacharya, S., 2013. Improved dispersion of cellulose microcrystals in polylactic acid (PLA) based composites applying surface acetylation. *Chem. Eng. Sci.* 101, 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.07.032>
- Murray-dunning, C., McArthur, S.L., Sun, T., Mckean, R., Ryan, A.J., Haycock, J.W., 2011. Three-Dimensional Alignment of Schwann Cells Using Hydrolysable Microfiber Scaffolds: Strategies for Peripheral Nerve Repair, in: *Methods Mol Biol.* pp. 155–166. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_10).
- Olayo, M.G., Enríquez, M.A., Cruz, G.J., Morales, J., Olayo, R., 2006. Polymerization of halogenated anilines by plasma. *J. Appl. Polym. Sci.* 102, 4682–4689. <https://doi.org/10.1002/app.24461>
- Olayo, R., Ríos, C., Salgado-Ceballos, H., Cruz, G.J., Morales, J., Olayo, M.G., Alcaraz-Zubeldia, M., Alvarez, A.L., Mondragon, R., Morales, A., Diaz-Ruiz, A., 2008. Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19, 817–826. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3080-z>
- Panagopoulos, G.N., Megaloikonomos, P.D., Mavrogenis, A.F., 2017. The Present and Future for Peripheral Nerve Regeneration. *Orthopedics* 40, 141–156. <https://doi.org/10.3928/01477447-20161019-01>
- Pham, Q.P., Sharma, U., Mikos, A.G., 2006. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Eng.* 12, 1197–1211. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1197>
- POLYGANICS, 2017. NEUROLAC Peripheral Nerve Regeneration. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.13.030190.000355>
- R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Ramírez-Fernández, O., Godínez, R., Zuñiga-Aguilar, E., Gómez-Quiroz, L.E., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Morales, J., Olayo, R., 2015. Superficial modification of biopolymeric scaffolds for tridimensional hepatic cell model. *Int. J. Med. Eng. Inform.* 7, 110–123. <https://doi.org/10.1504/IJMEI.2015.068505>
- Reina, M.A., López, A., Villanueva, M.C., de Andrés, J.A., León, G.I., 2000. Morfología

- de los nervios periféricos, de sus cubiertas y de su vascularización. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim* 47, 464–475.
- Ribeiro-Resende, V.T., Koenig, B., Nichterwitz, S., Oberhoffner, S., Schlosshauer, B., 2009. Strategies for inducing the formation of bands of Büngner in peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 30, 5251–5259.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.007>
- Roche Diagnostics GmbH, 2016. Colorimetric assay (MTT based) for the non-radioactive quantification of cell proliferation and viability. Protocol. Disponible en:  
<https://www.sigmaaldrich.com/>
- Roeder, R.K., 2013. Mechanical Characterization of Biomaterials, in: *Characterization of Biomaterials*. pp. 49–104. <https://doi.org/10.1109/ICHQP.2016.7783443>
- Rotshenker, S., 2011. Wallerian degeneration: The innate-immune response to traumatic nerve injury. *J. Neuroinflammation* 8, 109. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-109>
- Saini, P., Arora, M., Kumar, M.N.V.R., 2016. Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 107, 47–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.014>
- Sameem, M., Wood, T.J., Bain, J.R., 2011. A Systematic Review on the Use of Fibrin Glue for Peripheral Nerve Repair. *Plast. Reconstr. Surg.* 127, 2381–2390.  
<https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3182131cf5>
- Sampath Kumar, T.S., 2013. Physical and Chemical Characterization of Biomaterials, in: *Characterization of Biomaterials*. pp. 11–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415800-9.00002-4>
- Santos, F.A., Tavares, M.I.B., 2014. Development and characterization of hybrid materials based on biodegradable PLA matrix, microcrystalline cellulose and organophilic silica. *Polímeros* 24, 561–566. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.1653>
- Sarker, M., Naghieh, S., McInnes, A.D., Schreyer, D.J., Chen, X., 2018. Strategic Design and Fabrication of Nerve Guidance Conduits for Peripheral Nerve Regeneration. *Biotechnol. J.* 13, 1–16. <https://doi.org/10.1002/biot.201700635>
- Schmidt, C.E., Leach, J.B., 2003. Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 5, 293–347.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.5.011303.120731>
- Sensharma, P., Madhumathi, G., Jayant, R.D., Jaiswal, A.K., 2017. Biomaterials and cells for neural tissue engineering: Current choices. *Mater. Sci. Eng. C* 77, 1302–1315.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.264>
- Shameli, K., Ahmad, M. Bin, Md Zin Wan Yunus, W., Ibrahim, N.A., Rahman, R.A., Jokar, M., Darroudi, M., 2010. Silver/poly (lactic acid) nanocomposites: Preparation, characterization, and antibacterial activity. *Int. J. Nanomedicine* 5, 573–579.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S12007>

- Simitzi, C., Ranella, A., Stratakis, E., 2017. Controlling the morphology and outgrowth of nerve and neuroglial cells: The effect of surface topography. *Acta Biomater.* 51, 21–52. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.023>
- Sousa, A., Neves, S.C., Gonçalves, I.C., Barrias, C.C., 2017. In vitro interaction of polymeric biomaterials with cells, in: *Characterization of Polymeric Biomaterials*. pp. 285–315. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100737-2.00012-1>
- Spearman, B.S., Desai, V.H., Mobini, S., McDermott, M.D., Graham, J.B., Otto, K.J., Judy, J.W., Schmidt, C.E., 2018. Tissue-Engineered Peripheral Nerve Interfaces. *Adv. Funct. Mater.* 28, 1–18. <https://doi.org/10.1002/adfm.201701713>
- St. Thomas, n.d. Spectroscopic Tools [WWW Document]. URL <http://www.science-and-fun.de/tools/>
- Stoddart, M.J. (Ed.), 2011. *Mammalian Cell Viability, Methods in Molecular Biology*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6>
- Subbiah, T., Bhat, G.S., Tock, R.W., Parameswaran, S., Ramkumar, S.S., 2005. Electrospinning of nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* 96, 557–569. <https://doi.org/10.1002/app.21481>
- Sun, B., Long, Y.Z., Zhang, H.D., Li, M.M., Duvail, J.L., Jiang, X.Y., Yin, H.L., 2014. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Prog. Polym. Sci.* 39, 862–890. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.06.002>
- Svennigsen, Å.F., Dahlin, L.B., 2013. Repair of the Peripheral Nerve—Remyelination that Works. *Brain Sci.* 3, 1182–1197. <https://doi.org/10.3390/brainsci3031182>
- Tixeira, R., Caruso, S., Paone, S., Baxter, A.A., Atkin-Smith, G.K., Hulett, M.D., Poon, I.K.H., 2017. Defining the morphologic features and products of cell disassembly during apoptosis. *Apoptosis* 22, 475–477. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1345-7>
- Tojima, T., Yamane, Y., Takahashi, M., Ito, E., 2000. Acquisition of neuronal proteins during differentiation of NG108-15 cells. *Neurosci. Res.* 37, 153–161. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00110-3](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00110-3)
- University of Toronto Scarborough, 2010. RAMAN Band Correlation Table. Disponible en: [https://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/raman correlation table.pdf](https://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/raman%20correlation%20table.pdf)
- Vargas, M.E., Barres, B.A., 2007. Why Is Wallerian Degeneration in the CNS So Slow? *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 153–179. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094354>
- Vasquez-Ortega, M., Ortega, M., Morales, J., Olayo, M.G., Cruz, G.J., Olayo, R., 2014. Core-shell polypyrrole nanoparticles obtained by atmospheric pressure plasma polymerization. *Polym. Int.* 63, 2023–2029. <https://doi.org/10.1002/pi.4756>
- Vásquez, M., Cruz, G.J., Olayo, M.G., Timoshina, T., Morales, J., Olayo, R., 2006. Chlorine dopants in plasma synthesized heteroaromatic polymers. *Polymer (Guildf)*.

- 47, 7864–7870. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.09.029>
- Vincent, L., Engler, A.J., 2017. Effect of Substrate Modulus on Cell Function and Differentiation, in: *Comprehensive Biomaterials II*. Elsevier, pp. 88–101. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100691-7.00116-6>
- Wang, H., Chu, P.K., 2013. Surface Characterization of Biomaterials, in: Bose, S., Bandyopadhyay, A. (Eds.), *Characterization of Biomaterials*. Elsevier, pp. 105–174. <https://doi.org/10.1002/jbm.820230307>
- Wang, J., Neoh, K.G., Kang, E.T., 2004. Comparative study of chemically synthesized and plasma polymerized pyrrole and thiophene thin films. *Thin Solid Films* 446, 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2003.09.074>
- Wang, Y., Wu, Y., Quadri, F., Prox, J., Guo, L., 2017. Cytotoxicity of ZnO Nanowire Arrays on Excitable Cells. *Nanomaterials* 7, 1–13. <https://doi.org/10.3390/nano7040080>
- White, H., Rosenthal, E., 2013. Static and Dynamic Repairs of Facial Nerve Injuries. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.* 25, 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2013.02.002>
- Wickman, G.R., Julian, L., Mardilovich, K., Schumacher, S., Munro, J., Rath, N., Zander, S. Al, Mleczak, A., Sumpton, D., Morrice, N., Bienvenut, W. V., Olson, M.F., 2013. Blebs produced by actin-myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death Differ.* 20, 1293–1305. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.69>
- Xu, H., Yan, Y., Li, S., 2011. PDLA/chondroitin sulfate/chitosan/NGF conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 32, 4506–4516. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.023>
- Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., Han, J., 2018. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res.* 28, 9–21. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.133>
- Zhou, H., Nabiyouni, M., Lin, B., Bhaduri, S.B., 2013. Fabrication of novel poly(lactic acid)/amorphous magnesium phosphate bionanocomposite fibers for tissue engineering applications via electrospinning. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 2302–2310. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.058>
- Zuñiga-Aguilar, E., Olayo, R., Ramírez-Fernández, O., Morales, J., Godínez, R., 2014. Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 25, 729–747. <https://doi.org/10.1080/09205063.2014.898124>
- Zuñiga Aguilar, E.S., 2014. Crecimiento volumétrico de células de músculo esquelético y motoneuronas de ratón en fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy. Universidad Autónoma Metropolitana, a Unidad Iztapalapa.

## Apéndice A

### I. Ajuste de condiciones de electrohilado de PLA en equipo NaBond electrospinning del laboratorio de polímeros, CBI, UAM-I.

Se realizó una búsqueda de las variables adecuadas para la obtención de fibras uniformes, sin defectos y con distintos diámetros, caracterizando los resultados obtenidos mediante microscopía óptica.

Se estudiaron distintos solventes (grado reactivo marca Baker), con base en los resultados obtenidos en trabajos previos (Casasola et al., 2014; Fragoso Pérez, 2018; Martínez Hernández, 2018; Zuñiga Aguilar, 2014):

- Cloroformo (CHL)
- Dimetilformamida (DMF)
- CHL/Etanol
- CHL/DMF
- Acetona (AC)
- AC/DMF

Los *pellets* de PLA se colocaron en el solvente en una concentración masa/volumen entre 10% y 15%, y se dejaron en reposo durante la noche. Se encontró que en DMF, AC y AC/DMF no disuelven el polímero en las condiciones aplicadas. Por el contrario, el CHL es un excelente solvente del PLA, por lo que para llevar a cabo un proceso de electrohilado adecuado, se le agregó previo al proceso 10% de DMF o etanol, los cuales hacen más viscosa la solución polimérica al ser malos solventes, aglutinando las moléculas de PLA.

En el Cuadro 5 se muestran algunas de las configuraciones empleadas para la obtención de fibras de PLA con características adecuadas en la estructura de las fibras.

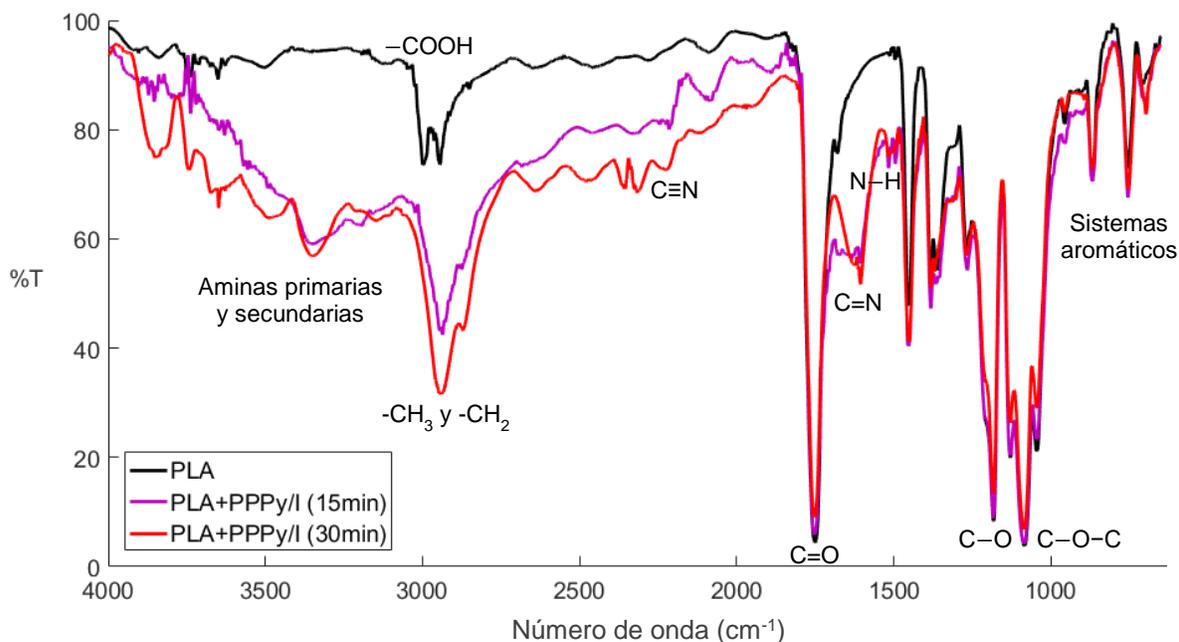
Mediante la caracterización morfológica por microscopía óptica se obtuvieron los diámetros de las fibras electrohiladas, así como su estructura general, encontrando que las configuraciones descritas en el Cuadro 5 permitieron obtener fibras sin defectos como gotas o *beads*. Los diámetros obtenidos, alrededor de 1-1.5  $\mu\text{m}$ , sugerían poco soporte para las células estudiadas en este trabajo (cuyo diámetro está entre los 10-100  $\mu\text{m}$ ), además de un tamaño de poro muy reducido que no permitiría una penetración adecuada de las células al andamio.

Concentración (w/v)	12.5%	12.5%	12.5%	13%	12.3%	12.3%	15%	15%	12.5%	12.5%
Solvente	CHL/ Etanol (9:1)	CHL/ Etanol (9:1)	CHL/ Etanol (9:1)	CHL/ Etanol (9:1)	CHL/ DMF (9:1)	CHL/ DMF (9:1)	CHL/DMF (9:1)	CHL/DMF (9:1)	CHL/ DMF (9:1)	CHL/ DMF (9:1)
Flujo [ml/h]	0.5	0.5	0.1	0.1	2	2	2	2	0.8	0.8
Tensión [kV]	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Distancia aguja-colector	17 cm	17 cm	19 cm	19 cm	22 cm	22 cm	22 cm	22 cm	21 cm	21 cm
Velocidad [RPM]	0	2500	0	2500	0	2500	0	2500	0	2500
Temperatura [°C]	30	30	30	30	20	20	20	20	30	30
Diámetro [ $\mu\text{m}$ ]	1.2	0.4	1.5	1.4	1.4	1.5	1.9	1.2	1.5	1.5

Cuadro 5. Configuraciones implementadas en la obtención de fibras electrohiladas.

## II. Variación del parámetro *tiempo de síntesis* de la polimerización por plasma

Se probó variar el tiempo de síntesis a 15 min con PPPy/I y se caracterizó el resultado por IR-ATR (Figura 27).



**Figura 27. Espectros IR de los andamios modificados con PPPy/I.** Se muestra la gráfica de los espectros IR para los andamios de PLA y PLA+PPPy/I con tiempo de síntesis de 15 y 30 minutos, destacando los principales grupos funcionales asociados a sus picos respectivos.

Los espectros son similares, presentan prácticamente los mismos picos característicos del PPPy, con una pequeña diferencia en la cantidad de enlaces. Sin embargo, disminuyendo el tiempo de síntesis las propiedades morfológicas y mecánicas podrían ser mejores que las obtenidas en 30 min de síntesis, lo que habría que explorar más a fondo en trabajo a futuro.

## Apéndice B

### I. Composición del medio completo para el cultivo de la línea celular NG108-15 (ATCC, 2019).

- 87% de DMEM, alta glucosa, sin piruvato de sodio (Gibco™, código de catálogo: 11965092).
- 2% de HAT 50X (Gibco™ LS21060017), de tal manera que se obtiene la concentración de HAT indicada para la línea celular: 0.1 mM hipoxantina, 400 nM aminopterina, 0.016 mM timidina (conc. final).
- 10% de suero fetal bovino (conc. final).
- 1% de Penicilina/estreptomicina (Gibco™, código de catálogo: 15140122).

### II. Protocolo de preparación de muestras biológicas para ser observadas al microscopio electrónico de barrido, cortesía de la Dra. Ma. Cristina Acosta García, del laboratorio de microscopía electrónica de barrido, edificio W, CBS, departamento de biología de la reproducción, UAM-I.

1. Retirar el medio de cultivo.
2. Se fijan en glutaraldehído al 3.5% en PB al 0.1M, a 4°C, por 48 horas.
3. Retirar el fijador y agregar amortiguador de fosfatos con pH de 7.4 a 4°C.
4. Dejar reposar por 15 min.
5. Repetir pasos 3 y 4 al menos 3 veces o hasta que no se perciba olor a fijador.
6. Dejar en el amortiguador de fosfatos toda la noche.
7. Retirar el amortiguador de fosfatos y realizar la postfijación con tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>).
8. Dejar en reposo por dos horas.
9. Se retira el OsO<sub>4</sub> y se realizan lavados con alcohol a distintas concentraciones hasta llegar al 100% (30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%). Se realizan dos lavados con cada uno, dejando en reposo por 10 min cada aplicación, con el fin de sustituir el agua por el alcohol, sin modificar la estructura y morfología de la muestra biológica.
10. Se secan en al punto crítico para sustituir el alcohol por CO<sub>2</sub>.
11. Se montan en portamuestras conductores, asegurando con cinta doble cara conductora y grafito conductivo adherente.
12. Se recubren con oro para observar al microscopio.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00120

Matrícula: 2163803112

DESARROLLO DE UN COMPOSITO PARA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:30 horas del día 30 del mes de mayo del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ  
DRA. ANGELICA BERENICE COYOY SALGADO  
DRA. ESMERALDA SARAI ZUÑIGA AGUILAR

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: DIANA MARIA OSORIO LONDOÑO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

2019



*Diana Osorio L.*

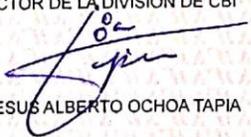
DIANA MARIA OSORIO LONDOÑO  
ALUMNA

REVISÓ



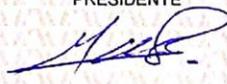
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI



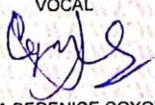
DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE



DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

VOCAL



DRA. ANGELICA BERENICE COYOY SALGADO

SECRETARIA



DRA. ESMERALDA SARAI ZUÑIGA AGUILAR