

Desarrollo y Caracterización de Andamios para Aplicaciones en Sistema Nervioso

D. M. Osorio¹, J. R. Godínez², J. Morales³, R. Olayo^{3,*}

¹ Maestría en Ciencias (Ingeniería Biomédica), Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México, México

² Departamento de Ingeniería Eléctrica, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México, México

³ Departamento de Física, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México, México

* oagr@xanum.uam.mx

Resumen— La regeneración tisular es una de las áreas más novedosas del sector de la salud. Dado el potencial de los biomateriales para funcionar como soporte en el proceso de regeneración tisular, se han propuesto diversos andamios que pretenden facilitar dicho proceso. En este trabajo se diseñaron e implementaron andamios basados en poliácido láctico, fabricados mediante la técnica de electrohilado, y modificados en su superficie con polipirrol sintetizado por plasma. Dichos andamios fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido, microscopía infrarroja, termogravimetría y pruebas mecánicas de tensión. Los resultados de la caracterización muestran que los andamios poseen propiedades fisicoquímicas adecuadas para sustentar el la adhesión y proliferación celular, por lo que pueden constituir una alternativa en la reparación de lesiones en el sistema nervioso.

Palabras clave — Electrohilado, Polipirrol, Poliácido láctico, Regeneración Tisular.

I. INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de nuevas estrategias de restauración de la función de órganos y tejidos lesionados, por causa de accidentes o patologías, el campo de los biomateriales ha incursionado de forma importante al brindar soluciones robustas y prácticas a este tipo de padecimientos. Una de las áreas de mayor relevancia actualmente es la regeneración tisular, la cual parte del concepto de ingeniería de tejidos para generar neot Tejido a partir de implantes que fungen como sustrato de crecimiento celular. Asimismo, se han propuesto biomateriales que al ser implantados en un sistema, mimetizan la matriz extracelular del tejido, presentan respuestas adecuadas por parte del organismo y promueven el crecimiento celular, así como tisular, empleando el biomaterial como soporte [1].

Las propiedades fisicoquímicas de los materiales participan de forma importante para favorecer la adhesión, proliferación, diferenciación y supervivencia de las células. El poliácido láctico (PLA) es un material biocompatible y biodegradable que presenta propiedades mecánicas adecuadas para soportar y contribuir al crecimiento celular

[2]. Además, la modificación de la superficie de los materiales resulta en cambios en sus propiedades fisicoquímicas, las cuales tienen un impacto en las interacciones físicas, químicas y bioquímicas con las células, haciéndolos más efectivos para funcionar como andamios en ingeniería de tejidos [3].

La modificación de la superficie mediante polímeros biocompatibles sintetizados por plasma tiene ventajas en aplicaciones biomédicas dado que es un proceso carente de contaminantes secundarios al proceso de polimerización [4]. En el empleo de esta técnica se producen películas delgadas de polímero, de estructura densa y entrecruzada, con una tasa de degradación baja [5], [6].

Diversos estudios han demostrado que el polipirrol sintetizado por plasma (PPPy), posee propiedades fisicoquímicas que le confieren una fuerte interacción con el medio biológico, sin reacción adversa al material por parte del tejido y favoreciendo la supervivencia y proliferación celular [7]–[10].

Las características de la matriz extracelular del tejido que se desea regenerar definen el diseño de los andamios, así como las distintas técnicas de fabricación a emplear. La técnica de electrohilado es un método popular de fabricación de andamios para ingeniería de tejidos, ya que es sencillo de implementar, y por el cual se obtienen configuraciones distintas de fibras con gran relación superficie a volumen, modificando las variables que rigen el proceso [11].

II. METODOLOGÍA

Se fabricaron andamios con fibras aleatorias y alineadas mediante la técnica de electrohilado, basados en PLA, en una concentración de 15% m/v. Los parámetros de la técnica fueron ajustados a 20kV de diferencia de potencial entre aguja y colector, una razón de inyección del polímero de 2ml/h, 22cm de distancia entre aguja y colector, a temperatura y humedad ambientales. Para la obtención de fibras aleatorias, se empleó una placa colectora plana, y para el

andamio de fibras alineadas, un tambor giratorio a 2500 rpm, aproximadamente.

A continuación, los andamios fueron recubiertos con polipirrol (PPy) sintetizado por plasma, dentro de un reactor conformado por un tubo de borosilicato, sellado por tapas de acero inoxidable, acoplados a dos electrodos colocados a 10cm de distancia entre ellos, conectados a un generador de pulsos a 13.5MHz. Las condiciones de síntesis fueron 30W por 30 min a una presión de 1 ± 0.1 Torr. Se realizaron dos tipos de recubrimiento de PPy, dopado con yodo (PLA+PPy/I) y sin dopar (PLA+PPy).

Los andamios fueron caracterizados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para estudiar la morfología y arquitectura de las fibras; microscopía infrarroja con reflexión total atenuada (IR-ATR) y termogravimetría (TG) para estudiar sus propiedades fisicoquímicas; y por pruebas mecánicas para evaluar la respuesta del andamio a la tensión. En esta última prueba, los andamios alineados se analizaron tanto en dirección paralela como perpendicular a las fibras, y los andamios aleatorios se analizaron en dirección arbitraria. En este estudio se comparan los resultados obtenidos para un experimento por cada tipo de andamio, las pruebas para el análisis estadístico se encuentran en curso y no se muestra en este trabajo.

A. Microscopía electrónica de barrido

En el caso de las fibras de PLA sin modificación en su superficie, se observa porosidad a lo largo de toda la fibra (Fig. 1). Además, se observa una clara organización de las fibras orientadas en una dirección preferencial, contrario a la disposición de las fibras del andamio aleatorio. La media de diámetros de las fibras es de $1.92\pm 0.79\mu\text{m}$ en el andamio aleatorio de PLA, 4.04 ± 1.07 en el andamio aleatorio de PLA+PPy, $3.44\pm 1.12\mu\text{m}$ en el andamio aleatorio de PLA+PPy/I, $1.27\pm 0.55\mu\text{m}$ en el andamio orientado de PLA, 5.57 ± 1.65 en el andamio orientado de PLA+PPy y $4.67\pm 1.1\mu\text{m}$ en el andamio orientado de PLA+PPy/I.

B. IR-ATR

Esta técnica muestra los grupos funcionales característicos del material (Fig. 2). En los andamios de PLA destacan los grupos funcionales carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) en 1750 cm^{-1} y el $-\text{OH}$ entre 2500 y 3300 cm^{-1} , así como los enlaces $\text{C}-\text{O}$ en 1180 cm^{-1} y $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ entre 1250 y 1050 cm^{-1} . Los andamios modificados con PPy o PPy/I sintetizados por plasma, se caracterizan por presentar aminas primarias y secundarias entre 3500 y 3300 cm^{-1} , nitrilos ($\text{C}\equiv\text{N}$) entre 2260 y 2200 cm^{-1} , grupos funcionales $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$ entre 2960 y 2850 cm^{-1} , enlaces $\text{N}-\text{H}$ entre 1550 y 1640 cm^{-1} , y $\text{C}=\text{N}$, entre 1660 y 1480 cm^{-1} .

III. RESULTADOS

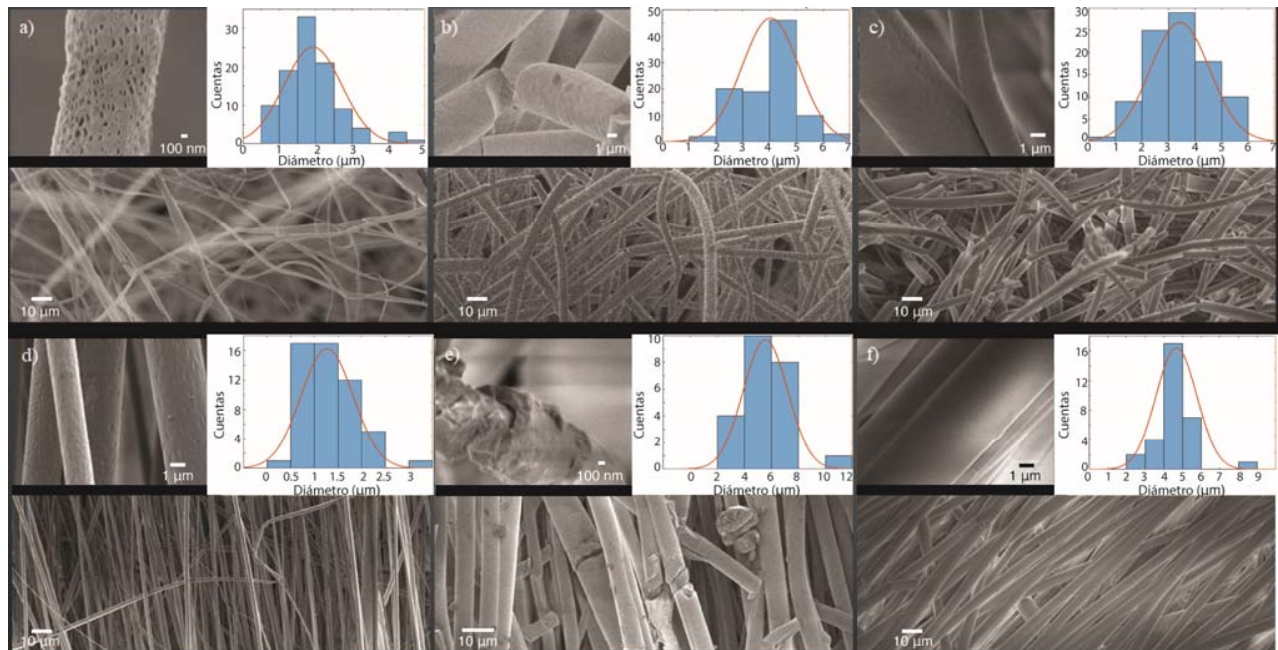


Fig. 1. Micrografías de los andamios. a) Fibras aleatorias de PLA, b) fibras aleatorias de PLA+PPy, c) fibras aleatorias de PLA+PPy/I, d) fibras orientadas de PLA, e) fibras orientadas de PLA+PPy, f) fibras orientadas de PLA+PPy/I.

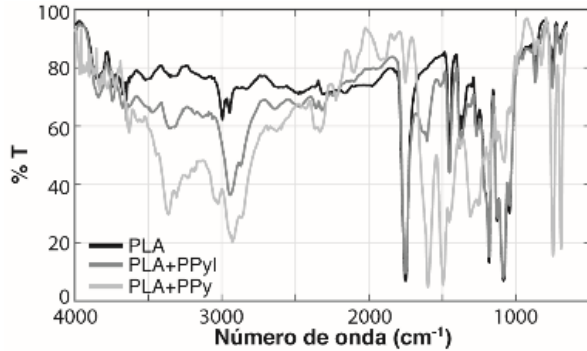


Fig. 2. Espectro IR-ATR de PLA, PLA+PPy/I, PLA+PPy

C. Análisis TG

En este análisis se observó la degradación de los andamios por efecto de la temperatura (Fig. 3). Los andamios de PLA se degradan a 300°C, en una sola etapa. En los andamios modificados cambia la estabilidad térmica, iniciando el proceso de degradación desde los 50°C, en distintas etapas, 3 en el caso de los andamios PLA+PPy y 4 en los andamios PLA+PPy/I. Además, se muestra que en los andamios PLA+PPy la degradación es más acelerada que en los andamios PLA+PPy/I, y que éstos últimos presentan una pérdida masiva alrededor de los 320°C. Sin embargo, en general se observa que la modificación de la superficie ralentiza el proceso de degradación térmica de los andamios.

D. Pruebas mecánicas

En este estudio se muestran las variables que caracterizan el comportamiento mecánico de los andamios al aplicar una elongación constante de 1 mm/min, estos resultados se exponen en la Tabla I. El módulo elástico tiende a aumentar cuando el andamio alineado es elongado en la dirección paralela a las fibras, y disminuye drásticamente al ser

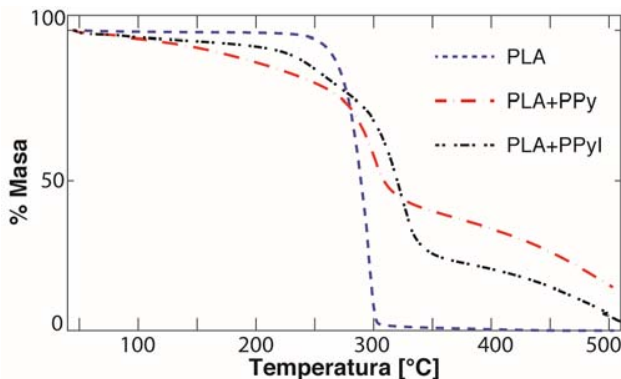


Fig. 3. Análisis termogravimétrico de los andamios.

elongado en dirección perpendicular a las fibras, dado que en esta prueba el esfuerzo está asociado a la separación de fibras en el andamio. Asimismo, el esfuerzo máximo tiene una tendencia a ser mayor en las fibras dispuestas en forma paralela que en las aleatorias, y éstas a su vez tienen un esfuerzo máximo mayor respecto a las dispuestas en forma perpendicular. Sin embargo, la tendencia observada en el modulo elástico se modifica en el andamio PLA+PPy/I, donde éste es mayor en el ensayo con fibras dispuestas perpendicularmente.

Por otro lado, se observa un notorio aporte a la fragilidad de los andamios modificados en su superficie, lo cual se ve reflejado en la deformación al quiebre, característica que es mucho menor en dichos andamios, respecto a los de PLA sin modificar, tanto de andamios con fibras aleatorias como orientadas.

IV. DISCUSIÓN

La morfología de los andamios poliméricos fabricados por electrohilado y modificados por PPPy o PPPy/I, muestran una porosidad característica, que sugiere sitios de anclaje, que pueden servir a las células como sitios de adhesión y proliferación [12]. Asimismo, la disposición de las fibras en condiciones aleatorias u orientadas de manera preferencial, tienen un efecto sobre la porosidad del andamio, siendo más poroso el andamio aleatorio que el orientado. Esta propiedad está asociada directamente a la manera en que las células crecen sobre el andamio, y el tipo de tejido que se puede generar [13]. Por ejemplo, dado que la estructura natural del sistema nervioso periférico es altamente organizada, la reparación de lesiones en este tipo de tejido podría verse beneficiada por un injerto basado en andamios fibrilares orientados en la dirección de los axones que componen el nervio afectado.

TABLA I
Características mecánicas de los andamios electrohilados

Muestra	Módulo elástico (MPa)	Deformación al quiebre (%)	Máximo esfuerzo (MPa)
Aleatorios	PLA	1.8	17.47
	PLA+PPy	0.92	0.68
	PLA+PPy/I	0.63	4.3
Orientados, dirección paralela	PLA	1.85	19.92
	PLA+PPy	1.12	2.11
	PLA+PPy/I	2.06	3.19
Orientados, dirección perpendicular	PLA	0.13	93.36
	PLA+PPy	0.4	1.1
	PLA+PPy/I	3.5	1.12

La disposición y morfología presentes en los andamios, está dada por los parámetros del proceso de electrohilado, mismos que se pueden ajustar para diseñar andamios adecuados para determinado tipo celular. Por otro lado, existen parámetros que dependen de la cámara y de otras variables, por lo que se buscaron aquellos parámetros que producen las fibras más uniformes y un proceso de electrohilado más eficiente.

De esta manera se obtuvieron andamios con fibras uniformes y diámetros variables, siendo las fibras orientadas más delgadas debido a un efecto de elongación dado por el tambor giratorio a alta velocidad. Por otro lado, el diámetro de las fibras en andamios PLA+PPy y PLA+PPy/I se ve afectado por la modificación de la superficie, así como la cantidad de fibras y la porosidad, dado que las condiciones de síntesis producen una película de polímero, cuyo grosor depende del tiempo de síntesis. Dicha película se deposita en las fibras, cambiando su morfología. Este parámetro puede influir en la manera en que las células se distribuyen para formar un tejido organizado o densamente interconectado.

Los grupos funcionales encontrados en los andamios de PLA+PPy y PLA+PPy/I provienen del rompimiento de anillos del monómero (Pirrol, Py) y entrecruzamiento, produciendo una película con una gran riqueza química, distribuida por toda la superficie, que incluye aminas primarias y secundarias, nitrilos y secciones alifáticas, lo cual constituye un medio complejo en el cual las células pueden anclarse y proliferar hasta formar un tejido.

Si bien los andamios son térmicamente estables en la temperatura de trabajo deseada (37°) el análisis TG muestra que los andamios adquieren estabilidad térmica al ser modificados superficialmente con PPPy o PPPy/I, y que el dopaje con yodo aumenta aún más dicha propiedad.

Dada la disposición de las fibras en los andamios, el comportamiento mecánico se ve modificado incluso entre andamios fabricados con los mismos polímeros, de tal manera que, al aplicar tensión mecánica sobre un andamio aleatorio, se encuentra una menor rigidez que al aplicarla en la dirección preferencial de las fibras de un andamio orientado. Esto se debe a que las fibras aleatorias se reacomodan durante la prueba mecánica, gracias a una mayor porosidad respecto al andamio orientado.

V. CONCLUSIÓN

Se obtuvieron andamios poliméricos en configuración aleatoria y orientada, modificados superficialmente con PPy

y PPy/I sintetizados por plasma, los cuales fueron caracterizados por distintas técnicas. Los resultados obtenidos de la caracterización sugieren que los andamios cuentan con las propiedades topográficas, fisicoquímicas y mecánicas para aplicaciones en la regeneración de tejido nervioso.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Asimismo, agradecemos el apoyo de la Universidad Autónoma Metropolitana, y del laboratorio de Microscopía Electrónica de la UAMI.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Moroni *et al.*, "Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine," *Nat. Rev. Mater.*, vol. 3, no. 5, pp. 21–37, 2018. DOI: 10.1038/s41578-018-0006-y
- [2] P. Saini, M. Arora, and M. N. V. R. Kumar, "Poly(lactic acid) blends in biomedical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 107, pp. 47–59, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2016.06.014
- [3] P. Roach, D. Eglin, K. Rohde, and C. C. Perry, "Modern biomaterials: A review - Bulk properties and implications of surface modifications," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 18, no. 7, pp. 1263–1277, 2007. DOI: 10.1007/s10856-006-0064-3
- [4] L. Minati, C. Migliaresi, L. Lunelli, G. Viero, M. Dalla Serra, and G. Speranza, "Plasma assisted surface treatments of biomaterials," *Biophys. Chem.*, vol. 229, no. May, pp. 151–164, 2017. DOI: 10.1016/j.bpc.2017.07.003
- [5] P. K. Chu, "Surface engineering and modification of biomaterials," *Thin Solid Films*, vol. 528, pp. 93–105, 2013.
- [6] J. Morales *et al.*, "Modificación Superficial por Plasma Aplicada a Biomateriales," in *La Física Biológica en México: Temas Selectos 2*, 2008, pp. 241–257.
- [7] G. J. Cruz, J. Morales, and R. Olayo, "Films obtained by plasma polymerization of pyrrole," *Thin Solid Films*, vol. 342, pp. 119–126, 1999. DOI: 10.1051/jp4:1999858
- [8] R. Olayo *et al.*, "Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 817–826, 2008.
- [9] E. Colín, M. G. Olayo, G. J. Cruz, L. Carapia, J. Morales, and R. Olayo, "Affinity of amine-functionalized plasma polymers with ionic solutions similar to those in the human body," *Prog. Org. Coatings*, vol. 64, no. 2–3, pp. 322–326, 2009.
- [10] E. Zuñiga-Aguilar, R. Olayo, O. Ramírez-Fernández, J. Morales, and R. Godínez, "Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 25, no. 7, pp. 729–747, 2014.
- [11] T. Jiang, E. J. Carbone, K. W.-H. Lo, and C. T. Laurencin, "Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 46, pp. 1–24, 2015. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2014.12.001
- [12] A. Lesman, J. Notbohm, D. A. Tirrell, and G. Ravichandran, "Contractile forces regulate cell division in three-dimensional environments," *J. Cell Biol.*, vol. 205, no. 2, pp. 155–162, 2014. DOI: 10.1083/jcb.201309029
- [13] L. C. Lins, F. Wianny, S. Livi, C. Dehay, and J. Duchet-rumeau, "Effect of polyvinylidene fluoride electrospun fiber orientation on neural stem cell differentiation," pp. 2376–2393, 2016. DOI: 10.1002/jbm.b.33778