



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Desarrollo de andamios fibrosos de policaprolactona, condroitín sulfato y ácido hialurónico para regeneración de cartílago

Autor

Guillermo Landa Baila

Director

Silvia Irusta Alderete

Máster en Ingeniería Biomédica

Curso académico 2016/2017

Escuela de Ingeniería y Arquitectura, Universidad de Zaragoza



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

(Este documento debe acompañar al Trabajo Fin de Grado (TFG)/Trabajo Fin de Máster (TFM) cuando sea depositado para su evaluación).

D./D^a. Guillermo Landa Baila

con nº de DNI 18056703R en aplicación de lo dispuesto en el art. 14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de septiembre de 2014, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el Reglamento de los TFG y TFM de la Universidad de Zaragoza,

Declaro que el presente Trabajo de Fin de (Grado/Máster) Máster en Ingeniería Biomédica, (Título del Trabajo) "Desarrollos de andamios fibrosos de policaprolactona, condroitín sulfato y ácido hialurónico para regeneración de cartílago"

es de mi autoría y es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser citada debidamente.

Zaragoza, 20 de abril de 2018

Fdo: Guillermo Landa Baila

RESUMEN

El cartílago es un tejido conjuntivo del cuerpo humano caracterizado por su escasa capacidad de regeneración, debida fundamentalmente a la falta de riego sanguíneo, la escasa innervación y la baja actividad mitótica de sus células. Cuando se produce un defecto de este tejido por una lesión, un trauma o una enfermedad como puede ser la osteoartritis, es muy difícil que el cartílago llegue a restaurar por completo su integridad y funcionalidad, aun con los tratamientos médicos habituales.

La ingeniería de tejidos es una estrategia prometedora para el tratamiento de las patologías que afectan al tejido cartilaginoso. Esta tecnología involucra andamios de biomateriales que, con los principios activos adecuados presentes, son capaces de promover la colonización y proliferación celular, así como la regeneración y restitución del tejido original. Parte del éxito de esta estrategia radica en la capacidad de imitar estructuralmente la matriz extracelular presente en los tejidos biológicos. El electrospinning es una técnica de síntesis de nanofibras poliméricas profusamente empleada para este fin.

En este trabajo se ha optimizado la síntesis por electrospinning de un andamio conformado por fibras nanométricas de policaprolactona, condroitín sulfato y ácido hialurónico. Los ensayos de viabilidad realizados han reportado que el andamio sintetizado no solo es biocompatible, si no que aumenta significativamente la viabilidad celular con respecto a andamios conformados solo por fibras de policaprolactona. Con estos resultados, se ha demostrado la idoneidad del andamio para la regeneración de cartílago, habiendo proporcionando un soporte adecuado para la proliferación celular.

Palabras clave: Cartílago, ingeniería de tejidos, electrospinning, policaprolactona, condroitín sulfato, ácido hialurónico.

Índice

1. Introducción	1
1.1. El electrospinning	1
1.1.1. Principios	1
1.1.2. Aplicaciones.....	2
1.1.3. Características de las fibras	3
1.1.4. Funcionalización	4
1.1.5. Variantes del proceso.....	4
1.2. El cartílago	6
1.2.1. Generalidades	6
1.2.2. Medicina regenerativa e ingeniería de tejidos aplicada a cartílago.....	7
2. Objetivos	8
3. Materiales y equipos	8
3.1. Electrospinning.....	8
3.2. Cultivo celular.....	8
3.3. Análisis estadístico	9
4. Resultados	9
4.1. Síntesis de los materiales	9
4.1.2. Electrospinning de condroitín sulfato	9
4.1.2. Electrospinning de policaprolactona y condroitín sulfato	11
4.1.3. Electrospinning de policaprolactona y ácido hialurónico.	13
4.1.4. Electrospinning de PCL+CS y PCL+HA: Síntesis del andamio final.....	13
4.2. Caracterización biológica de los materiales	15
4.2.1. Cultivo en 3D - MTT	15
5. Discusión	17
6. Perspectivas	18
7. Conclusiones.....	19
8. Bibliografía	20

1. Introducción

1.1. El electrospinning

El electrospinning es una técnica de síntesis de fibras poliméricas que permite obtener diámetros de los nanómetros a las micras (**Figura 1**). Se trata de una técnica altamente versátil aplicable a prácticamente cualquier polímero soluble, orgánico o sintético. El interés por esta técnica radica esencialmente en el control que se puede ejercer sobre el tamaño y la estructura de las fibras, la amplia gama de polímeros sobre los que puede emplearse y las exclusivas características del material final: alta e interconectada porosidad, flexibilidad y rendimientos mecánicos superiores a los del material de partida, entre otras (Greiner y Wendroff, 2007).

1.1.1. Principios

La técnica del electrospinning se fundamenta en la aplicación de un potencial eléctrico a una solución polimérica. En la **Figura 2** se esquematiza el montaje básico para este tipo de proceso, el cual puede dividirse en tres componentes esenciales: un generador de corriente capaz de aplicar el potencial eléctrico necesario, una aguja de diámetro controlado y un colector sobre el que recoger las fibras.

Al inicio, la aguja está montada a la salida de una jeringa que contiene la solución polimérica y cuyo flujo se puede controlar mediante una bomba. Cuando se propulsa la solución a través de la aguja y se aplica un potencial eléctrico entre ella y el colector, la gota que sale de la aguja se carga eléctricamente, ocasionando la acumulación de cargas en su superficie. Bajo estas circunstancias, la repulsión electrostática que experimentan las cargas contrarresta la tensión superficial del líquido, ocasionando que la superficie de la gota se deforme progresivamente hasta formar el llamado Cono de Taylor (**Figura 3**).

Esta deformación continúa hasta que se alcanza un punto crítico en el que la repulsión electrostática sobrepasa a la tensión superficial, provocando la eyección de un *jet*, o una corriente de la solución en la punta del cono. Atraída por el colector, esta corriente describe una trayectoria de vuelo inestable que ocasiona un mayor estiramiento y la eventual evaporación del solvente. Como resultado, en el colector se depositan fibras del polímero seco de una forma aleatoria (Huang et al., 2003).

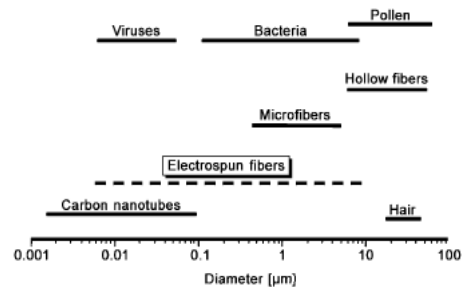


Figura 1: Comparación de los diámetros de las fibras que pueden ser obtenidas por electrospinning con otros elementos naturales y sintéticos (Greiner y Wendroff, 2007).

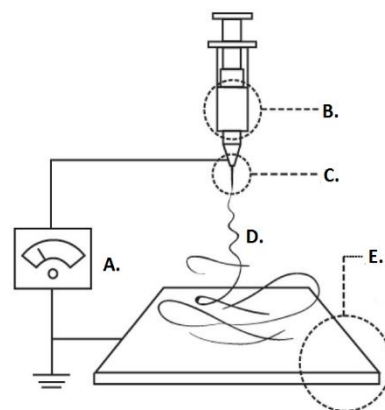


Figura 2: Esquema de un proceso básico. A: Generador de corriente. B: Solución polimérica. C: Aguja (polo positivo). D: Jet. E: Colector (polo negativo). Adaptado de Merrit et al. 2011.

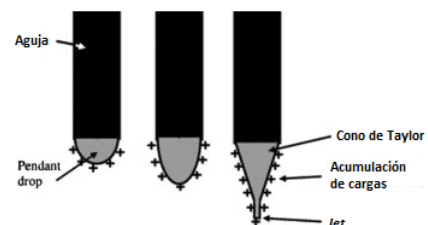


Figura 3: Representación gráfica de la acumulación de cargas electrostáticas y del cono de Taylor (Bajji et al., 2010).

Tal y como se ha mencionado, parte del interés que suscita esta técnica se basa en el extenso abanico de polímeros que pueden utilizarse. Entre los empleados con interés biomédico se incluyen: polímeros orgánicos (colágeno, ácido hialurónico, quitosano, gelatina, fibrina, quitina, celulosa...), polímeros solubles en agua (polivinil alcohol, polietilenglicol, hidroxipropil celuosa...) y polímeros biodegradables (policaprolactona, ácido poliláctico, ácido poliglicólico...), entre otros (Greiner y Wendroff, 2007).

1.1.2. Aplicaciones

Las aplicaciones del electrospinning derivan tanto de las propiedades únicas de los materiales nanoestructurados que pueden sintetizarse como de la versatilidad de la propia técnica. En la **Figura 4** se incluyen múltiples campos de estudio en los que el electrospinning está presente y la forma en la que lo está:

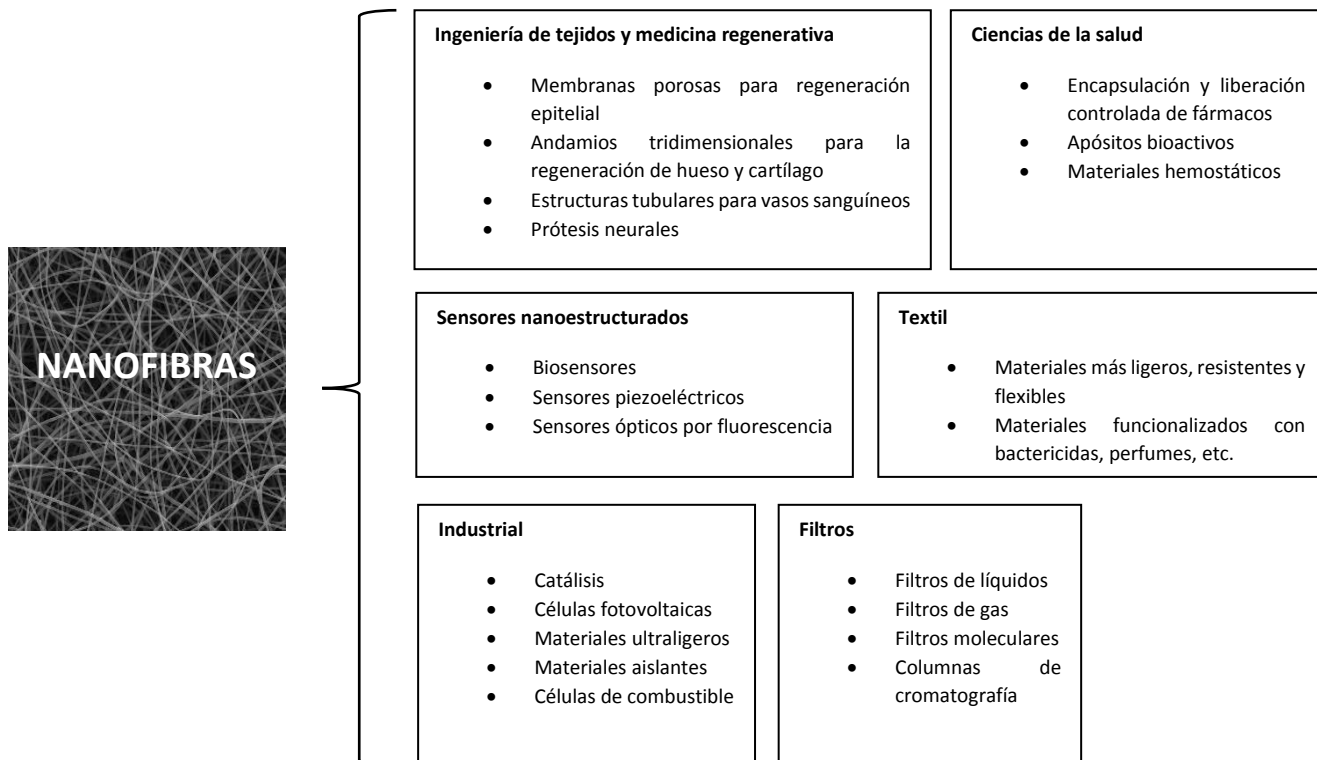


Figura 4: Aplicaciones del electrospinning (Adaptado de Schiffman y Schauer, 2008).

Una de las aplicaciones donde el electrospinning ha ganado verdadera notoriedad ha sido en la ingeniería de tejidos, donde puede ser empleado para la fabricación de andamios o *scaffolds*. Los andamios fabricados por esta técnica son potencialmente idóneos, ya que las nanofibras artificiales pueden sintetizarse con los mismos materiales y con la misma morfología que las fibras orgánicas presentes en la matriz extracelular de los tejidos. Por otra parte, las fibras artificiales también pueden funcionalizarse con fármacos y principios activos que promuevan procesos tan determinantes como la migración, proliferación y diferenciación celular. De esta forma, pueden fabricarse *scaffolds* que se adapten convenientemente a las necesidades histológicas, fisiológicas o anatómicas que se requieran (Hasan et al., 2014).

Tal y como se adelantaba en la **Figura 4**, el electrospinning está siendo desarrollado en la ingeniería de tejidos de vasos sanguíneos (Ercolani et al., 2013), hueso (Di Martino et al. 2011), cartílago (Kazemnejad et al., 2016) y tejido nervioso (Chen et a. 2016), entre otras más minoritarias.

1.1.3. Características de las fibras

La síntesis de fibras por electrospinning es un proceso en el que intervienen varias fuerzas físicas, en eventos de naturaleza por lo general inestable. Por ello, la fisionomía de las fibras obtenidas depende de un gran número de parámetros, los cuales pueden clasificarse en las siguientes tres categorías:

- **Propiedades intrínsecas del polímero:** Peso molecular, distribución del peso molecular, temperatura de transición vítrea y solubilidad.
- **Propiedades de la solución polimérica:** Concentración, viscosidad, viscoelasticidad, tensión superficial y conductividad.
- **Condiciones de operación:** Voltaje, flujo, distancia aguja-colector, diámetro de la aguja, humedad relativa y temperatura.

La variación de alguno de estos parámetros en un protocolo de electrospinning previamente establecido puede alterar completamente el diámetro y la morfología de las fibras obtenidas. Por ejemplo, el aumento de la viscosidad de la solución polimérica se relaciona con el aumento del diámetro de las fibras, mientras que el aumento de la tensión superficial o de la conductividad se relaciona con el efecto contrario: la disminución del diámetro (Cramariuc et al., 2013).

En lo referente a las condiciones de operación, se ha constatado que un aumento en el voltaje provoca de igual forma una disminución en el diámetro de las fibras (Lee et al. 2004), así como un aumento en el flujo de salida y en la distancia entre la aguja y el plato colector (Kang et al, 2010). Esto se debería a que, bajo esas condiciones, la fibra experimentaría más estiramiento, un aumento en su superficie específica y un aumento en su tiempo de vuelo. Estas condiciones influyen directamente en el tiempo de evaporación del solvente, el cual repercute en la forma con la que las fibras llegan al colector (**Figura 5, A**). En referencia a las aplicaciones biomédicas de los materiales obtenidos mediante electrospinning, se ha reportado que el tamaño de las fibras es determinante en vistas a los procesos de proliferación y diferenciación celular (Cristopherson et al., 2009).

Si las condiciones de operación de un proceso no están optimizadas, es probable que la síntesis de fibras sea problemática y tenga lugar de manera imperfecta. Uno de los problemas más comunes es el de la aparición de estructuras conocidas como “beads” (**Figura 5, B**). Estas estructuras se relacionan especialmente con una alta tensión superficial de la solución y con sus propiedades viscoelásticas. No obstante, la mayoría de las condiciones de operación (voltaje, distancia aguja-colector...) pueden influir en la aparición de las mismas (Fong et al., 1999).

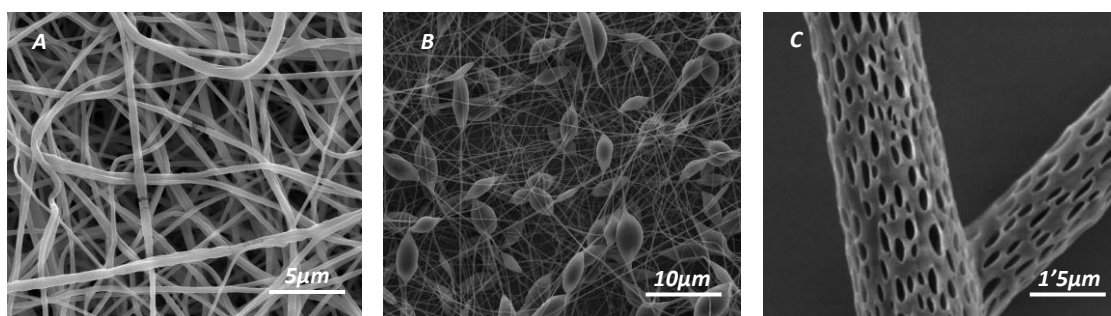


Figura 5: Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido. **A:** Fibras de policaprolactona (PCL) obtenidas a partir de una preparación con un porcentaje de disolución acuoso (poco volátil). Si el solvente es poco volátil puede ocasionar que las fibras se depositen de una forma aun maleable. **B:** Fibras de PCL con beads. **C:** Fibras porosas de ácido poliláctico y polietilenglicol (Greiner y Wendroff, 2007).

Representan un problema notable de cara a la funcionalización de los materiales resultantes, donde se busca precisamente una homogeneidad en el diámetro de las fibras.

Mediante la variación de los parámetros que han sido expuestos, tanto la geometría como la morfología superficial de las fibras pueden modelarse. En vistas a aplicaciones como la ingeniería de tejidos o la liberación controlada de fármacos, existe la posibilidad de obtener fibras con una superficie porosa (**Figura 5, C**).

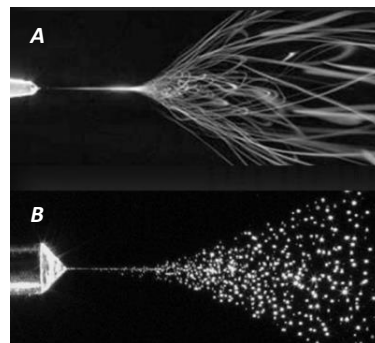


Figura 6: A: Electrospinning. B: Electrospraying. (Nanoscience.com, 2018).

Otro de los escenarios que puede acarrear una falta de optimización de los parámetros descritos es el de la obtención de nanopartículas en lugar de fibras. En estos casos, no se estaría dando un proceso de electrospinning, si no de *electrospraying* (**Figura 6**). Si bien a este proceso se le considera un potencial método de síntesis de nanopartículas con múltiples aplicaciones, observarlo durante la optimización de una síntesis de fibras por electrospinning no es deseable.

1.1.4. Funcionalización

Las fibras sintetizadas por electrospinning pueden funcionalizarse con diversos principios activos, tales como fármacos (antibióticos, antitrombóticos), (Zhang et al., 2017); partículas inorgánicas (nanotubos, nanopartículas metálicas, cerámicas), (Hamlett et al., 2008); proteínas (proteínas morfogénicas óseas, anticuerpos), (Luo et al. 2010) o aceites esenciales (Carvacrol, eugenol, cinamaldehído), (Yao et al., 2017); entre otros.

La funcionalización de las fibras puede plantearse de diversas formas: Los principios activos pueden incorporarse en la superficie de las fibras después de la síntesis (usualmente tras un proceso de activación de la superficie), pueden incluirse en la preparación de la que parte el electrospinning (de forma disuelta en la misma fase o mediante una emulsión) o pueden incorporarse a la síntesis mediante variantes del proceso convencional de electrospinning, como son el electrospinning coaxial o el electrospinning sobre colector rotatorio.

1.1.5. Variantes del proceso

Electrospinning coaxial

El electrospinning coaxial es una modificación de la técnica convencional en la que, mediante el electrospinning simultáneo de dos preparaciones diferentes, se obtienen fibras con una estructura en forma de núcleo/corteza. El montaje de esta técnica (**Figura 7**) se diferencia del montaje básico en el empleo de dos soluciones poliméricas, donde una de ellas se hace discurrir por una aguja normal, mientras que la otra se conduce por una aguja de mayor diámetro que rodea a la otra. Si el proceso se estabiliza y las condiciones se optimizan adecuadamente, el resultado es una fibra con los dos componentes, uno contenido en el interior del otro (Sun et al., 2003).

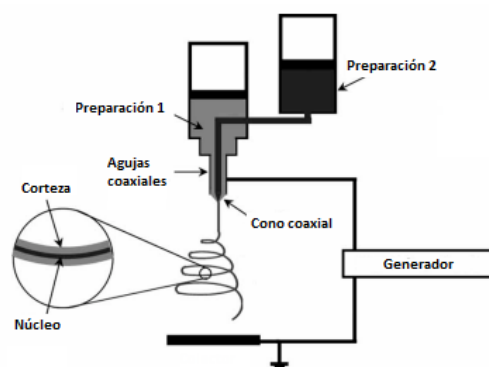


Figura 7: Representación gráfica de un proceso de electrospinning coaxial (Nanotechnology solutions, 2018).

Esta técnica puede emplearse para la síntesis de fibras con elementos de diferente naturaleza, así como para la encapsulación de principios activos, donde éstos estarían convenientemente protegidos por una cubierta en vistas a una liberación controlada (Leung et al., 2011). Una de las ventajas de esta técnica es que no se requiere que ambas soluciones tengan unas características idóneas que se requerirían para un proceso de electrospinning tradicional: la preparación que circula por el exterior puede actuar como solución “conductora” y ayudar a la otra en la creación de la fibra.

Por último, el montaje del electrospinning coaxial también puede emplearse para estabilizar protocolos simples de síntesis e impedir que el cono de Taylor llegue a secarse durante procesos prolongados en el tiempo. En estos casos, por la aguja exterior se hace circular el disolvente de la preparación que circula por el interior.

Electrospinning sobre colector rotatorio

El electrospinning sobre colector rotatorio es otra variable del electrospinning tradicional. Su única diferencia radica en la sustitución del colector plano por uno con una superficie cilíndrica capaz de girar en el eje horizontal mientras dure el proceso. Esta técnica se emplea con dos propósitos principales: La obtención de materiales con una orientación de las fibras (**Figura 8**) y la obtención de materiales con más de un tipo de fibra (**Figura 9**).

Ambos fines han encontrado su aplicabilidad en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa: Por un lado, la direccionalidad de las fibras en los materiales ha demostrado influir en procesos de proliferación y crecimiento celular (Avis et al., 2010). Por otro, la posibilidad de obtener materiales complejos compuestos por más de un elemento nanoestructurado abre la puerta al diseño de materiales más bioactivos (Wade et al. 2015).

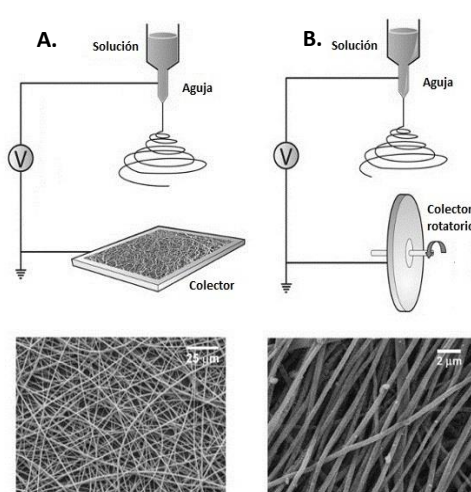


Figura 8: A: Proceso normal de electrospinning de PCL. B: Mismo proceso con el uso de un colector rotatorio. Se aprecia una clara orientación de las fibras en el material del segundo proceso.

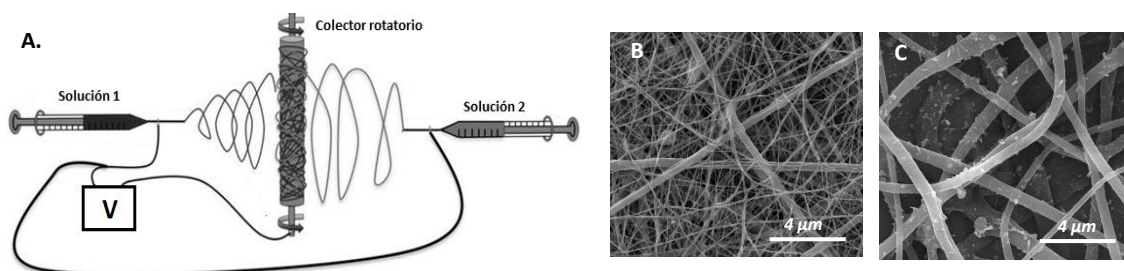


Figura 9: A: Esquema de un electrospinning múltiple sobre colector rotatorio. B: Material obtenido en este proyecto por medio de esta técnica. Se observan dos clases de fibras de PCL, las cuales han sido obtenidas en el mismo proceso, pero a partir de dos preparaciones diferentes. C: Fibras de PCL con nanopartículas de condroitín sulfato en su superficie: mediante esta técnica se pueden llevar a cabo procesos conjuntos de electrospinning y electrospraying.

Por último, el colector rotatorio ha sido empleado también dentro de la ingeniería de tejidos para la obtención de la forma anatómica de los vasos sanguíneos y otros segmentos anatómicos tubulares (Hasan et al., 2008). Tanto el electrospinning coaxial como el electrospinning sobre colector rotatorio fueron empleados en este trabajo.

1.2. El cartílago

1.2.1. Generalidades

El cartílago es un tejido conectivo especializado del cuerpo humano. Forma el esqueleto de todos los vertebrados durante el desarrollo embrionario, persistiendo en la edad adulta en parte del esqueleto y en otros tejidos del organismo, realizando funciones específicas. Tiene unas características mecánicas únicas, tratándose de un tejido moderadamente flexible y elástico, pero también incompresible. Desempeña funciones tales como la reducción del rozamiento de los huesos que confluyen en las articulaciones o servir de molde para el desarrollo de los huesos largos.

Este tejido está conformado por unas células especializadas llamadas condrocitos, encargadas de sintetizar y mantener la matriz extracelular. Esta matriz extracelular consiste en una densa red de fibras de colágeno (tipo II), elastina, proteoglicanos (condroitín sulfato¹, queratán sulfato, heparán sulfato...) y ácido hialurónico² embebida en una sustancia fundamental

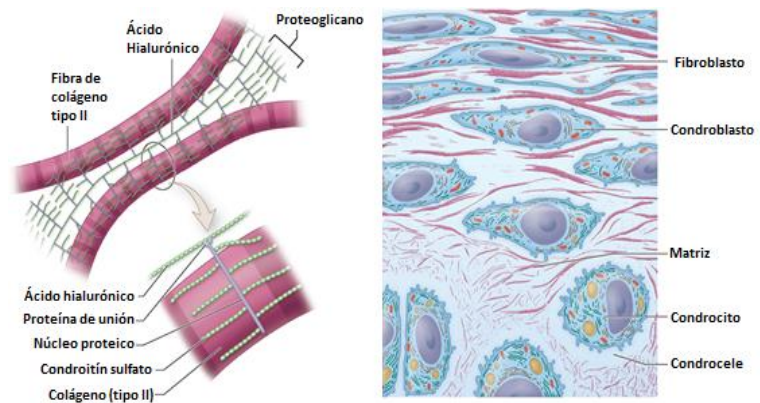


Figura 10: Esquema de la estructura histológica del cartílago humano (Adaptado de Mescher, 2009)

amorfa altamente hidratada. (**Figura 10**) La elevada electronegatividad de los proteoglicanos causa que el agua se retenga en el interior del tejido, lo que ocasiona una turgencia que capacita a éste a oponerse a fuerzas de compresión. Dependiendo del balance entre los elementos que lo componen, se puede diferenciar entre tres tipos de cartílago: hialino (presente en las articulaciones, reduciendo el rozamiento), elástico (epiglotis, pabellón auricular...) y fibrocartílago (discos intervertebrales) (Schaffer, 2015).

Una de las particularidades del cartílago es que es un tejido avascular (no contiene una red de vasos sanguíneos) y aneural (no está inervado), por lo que la nutrición de los condrocitos tiene lugar mediante la difusión de sustancias a través de la matriz extracelular. Esto, sumado a que el tejido tiene una baja celularidad y una baja actividad mitótica, hace que el cartílago cuente con una muy limitada capacidad de regeneración. Cuando se dan patologías que conducen a la destrucción del mismo, tales como la osteoartritis, la artritis reumatoide, traumas o accidentes, es muy difícil que el cartílago recupere enteramente su integridad y funcionalidad.

1. Condroitín sulfato: Polisacárido perteneciente a los glucosaminoglicanos sulfatados, compuesto por dos monosacáridos: ácido D-glucurónico y N-acetyl-D-galactosamina. La proporción de los dos monómeros, así como la longitud de la cadena polimérica es variable (Mw promedio: 463, 363 g/mol). Usualmente se encuentra asociado a proteínas conformando proteoglicanos. Es un importante componente del cartílago humano y de otros tejidos blandos, donde colabora en la retención del agua para dotar de incompresibilidad (Baeurle et al., 2009).

2. Ácido hialurónico: Es un polímero lineal (Mw promedio: 820,615 g/mol) perteneciente a los glucosaminoglicanos, destacándose entre los mismos por no encontrarse sulfatado y sintetizarse en la membrana celular. Está presente en todos los tejidos de los vertebrados, siendo especialmente abundante en el tejido conectivo blando. Actúa como un componente estructural y regulador de la homeostasis del agua en los tejidos, así como de lubricante biológico en las articulaciones y tendones (Fraser, Laurent and Laurent, 1997).

1.2.2. Medicina regenerativa e ingeniería de tejidos aplicada a cartílago

Existen varias estrategias ampliamente extendidas destinadas a restituir la funcionalidad del cartílago dañado y a reducir el dolor de los pacientes, como la estimulación de la médula ósea por microfractura o la implantación de condrocitos autólogos (ACI, *Autologous Chondrocyte Implantation*, **Figura 11 A**). Aunque estos procedimientos reducen el dolor y aumentan la movilidad articular a largo plazo, el tejido regenerado es usualmente tejido fibroso o fibrocartilago, el cual presenta unas características mecánicas, morfológicas y bioquímicas inferiores a las del cartílago original. Además, estos procedimientos pueden requerir de intervenciones quirúrgicas posteriores o progresar negativamente hasta el momento en que se necesite la instalación de una prótesis. Por ello, actualmente se están investigando nuevas estrategias para la regeneración del cartílago, entre las que sobresale la ingeniería de tejidos (Kazemnejad et al., 2017).

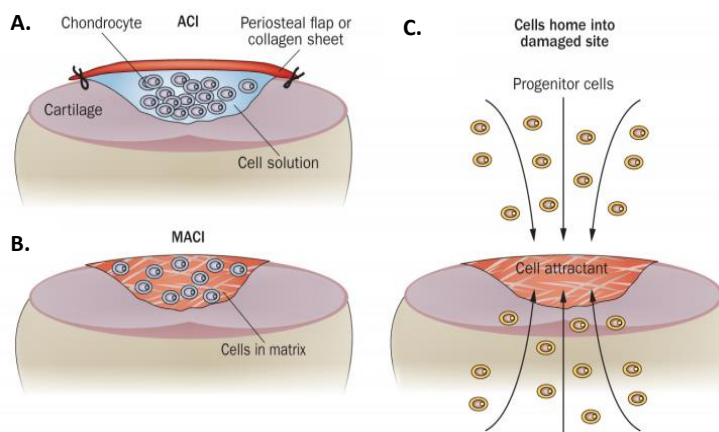


Figura 11: Principales ejemplos de medicina regenerativa aplicada a cartílago. **A:** Implantación de condrocitos autólogos. **B:** Implantación de condrocitos autólogos asistida por matriz. **C:** Implantación de un scaffold para regeneración in situ. (Ringe et al., 2012).

La ingeniería de tejidos aplicada al cartílago involucra, como es habitual en esta clase de terapias, andamios de biomateriales funcionalizados con principios activos que puedan promover la colonización y proliferación celular, así como la regeneración y restitución del tejido original. Una técnica enmarcada en la ingeniería de tejidos y llevada a la práctica en el tratamiento de lesiones cartilaginosas es la ACI asistida por matriz (MACI, Matrix-assisted autologous chondrocyte implantation, **Figura 11 B**). En ella, condrocitos autólogos extraídos del paciente son expandidos mediante cultivos celulares y trasladados a un andamio artificial, que posteriormente es implantado en la zona de la lesión (Daher et al., 2009).

Uno de los problemas que presenta tanto la ACI como la MACI es la necesidad de la extracción de condrocitos autólogos sanos, que puede ser invasiva y no ser viable. Por ello, el implante de andamios carentes de células, pero diseñados de tal forma que pudieran promover el reclutamiento, proliferación y diferenciación de las células presentes en el organismo es una interesante solución (**Figura 11 C**). En el caso del cartílago, estos materiales podrían provocar el reclutamiento de células mesenquimales presentes en la médula ósea y, mediante la morfología y los factores de crecimiento adecuados, promover su diferenciación a células condrocitarias y la producción de matriz cartilaginosa (Ringe et al., 2012).

Parte del éxito de esta técnica, y de la ingeniería de tejidos en general, subyace en la capacidad de imitar estructuralmente la matriz extracelular. Tal y como se adelantaba en el apartado 1.1.2., los materiales nanoestructurados obtenidos mediante la técnica del electrospinning han sido empleados como potenciales scaffolds en la ingeniería de tejidos, y en especial en la de cartílago (Kazemnejad et al., 2016). Por otra parte, tanto el condroitín sulfato como el ácido hialurónico han sido identificados como dos componentes bioactivos capaces de favorecer la diferenciación de células mesenquimales a células de la línea condrocítica (Varghese et al., 2008; Egewald et

al., 2004), promover la síntesis de colágeno tipo II y favorecer el metabolismo de los condrocitos (Akmal et al., 2005, Zhang et al. 2011). Por ello, su implementación y aplicación a los andamios de la ingeniería de tejidos de cartílago ha sido muy estudiada y es por lo que fueron tomados en consideración para plantear este proyecto.

2. Objetivos

Este proyecto se enmarca en la medicina regenerativa de cartílago. Su objetivo final es la síntesis de un andamio o *scaffold* polimérico, biodegradable, biocompatible y que sea capaz de promover la regeneración del tejido cartilaginoso *in vivo* (bioactivo). Para realizar este objetivo se realizaron las siguientes tareas:

1. El desarrollo y síntesis de un andamio (*scaffold*) de fibras de policaprolactona, condroitín sulfato y ácido hialurónico mediante la técnica del electrospinning.
2. La caracterización morfológica y funcional del andamio sintetizado.
3. La determinación y evaluación de la biocompatibilidad del andamio sintetizado mediante diferentes ensayos de viabilidad celular.

3. Materiales y equipos

3.1. Electrospinning

Para el desarrollo de este proyecto, se empleó condroitín sulfato (sal de sodio, origen bovino) de la casa comercial Honest Science (Jiaxing Hengie Biopharmaceutical co.), hialuronato de sodio (Mw: 5.0×10^5 - 1.2×10^6 g/mol) de origen bacteriano (*Streptococcus sp.*) de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology® y policaprolactona (Mw: 80,000 g/mol) de la casa comercial Sigma-Aldrich®. También se emplearon los siguientes disolventes: diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF, ambos de la casa comercial Fisher Chemical), ácido acético (99,8%) y ácido fórmico (99%), ambos de la casa comercial ACROS Organics.

El equipo de electrospinning empleado en este proyecto fue un Electrospinner 2.2.D-500 de la empresa Yflow® S.D. La obtención de imágenes de los materiales preparados se realizó a través del servicio del Laboratorio de Microscopía Avanzada (LMA-INA), mediante su microscopio electrónico de barrido de emisión de campo CSEM-FEG INSPECT F50.

El diámetro de las fibras de los materiales obtenidos se midió a partir de imágenes obtenidas al SEM por medio del programa ImageJ.

3.2. Cultivo celular

Los ensayos celulares se planificaron para una línea de células madre mesenquimales de ratón (mMSC, *mouse Mesenchymal Stem Cell*), donada por la Dra. Pilar Martín Duque (IACS).

Las células eran cultivadas en DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12*; Biowest) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco), 1% de glutamina (Biowest) y 1% de una mezcla de antibióticos y antifúngico (penicilina-estreptomicina-anfotericina; Biowest). Los ensayos con cultivos celulares se realizaron en campanas de flujo laminar en condiciones de esterilidad, cultivándose en un incubador a 37 °C y con una atmósfera controlada (5% CO₂) en condiciones de hipoxia (3% O₂) (**Figura 12**).

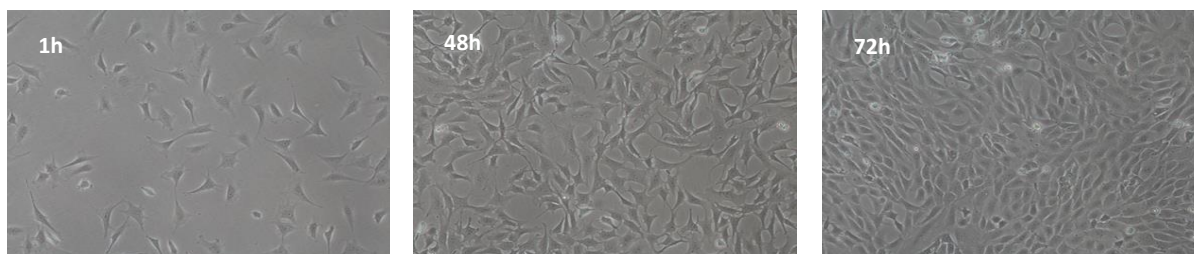


Figura 12: De izquierda a derecha, se puede apreciar el aumento en el número de células desde que eran cultivadas por primera vez en una placa de cultivo hasta que alcanzaban el estado de confluencia o monocapa, momento en el que se empleaban para los ensayos. Imágenes obtenidas en microscopía óptica (x10).

3.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los ensayos celulares se analizaron por medio del programa GraphPad Prism 7. Se evaluó la distribución de los datos de la viabilidad obtenidos por medio de un test Saphiro-Wilk. Posteriormente, se realizó un test t de student entre los datos obtenidos de los controles y la membrana final en cada ventana de tiempo (24h, 48h y 7d) para determinar la existencia de diferencias significativas. Adicionalmente, se llevó a cabo un ANOVA unidireccional con un post-tratamiento de comparaciones múltiples entre los datos obtenidos de la membrana final en cada ventana de tiempo.

4. Resultados

4.1. Síntesis de los materiales

4.1.2. Electrospinning de condroitín sulfato

Se realizaron una serie de preparaciones con el fin de obtener fibras de condroitín sulfato (CS) mediante electrospinning, tal y como refleja la **Tabla 1**. Durante la planificación y preparación de las mismas, se trató de emular concentraciones y solventes que habían sido empleados previamente con éxito en el electrospinning de polímeros orgánicos relacionados con el CS.

Para la preparación de las muestras, el CS era pesado en una balanza de mesa y disuelto en 10 ml de solvente. La cantidad necesaria de CS se calculaba de acuerdo con el porcentaje peso/volumen (w/v) deseado. Las muestras se mantenían en agitación magnética (400 rpm) a temperatura ambiente (21 °C) durante al menos 1 h.

Para llevar a cabo el electrospinning, las preparaciones se trasvasaban a una jeringa de 10 ml. La aguja de extrusión (23G, 0,6 mm de diámetro) se colocaba a una distancia variable (5 cm-20 cm) de un colector de 10 cm de diámetro cubierto con papel de aluminio (**Figura 13**).

Tabla 1 - Electrospinning de CS

Nº muestra	% CS (w/v)	Solvente	Cono de Taylor (estable)
1	20	H ₂ O	No
2	10	9:1 H ₂ O/Ac. Acético	No
3	10	1:1 H ₂ O/Ac. Acético	No
4	10	1:9 H ₂ O/Ac. Acético	No
5	5	5:1 DMF/H ₂ O	No
6	5	3:1 DMF/H ₂ O	Si
7	5	2:1 DMF/H ₂ O	Si
8	10	1:1 DMF/H ₂ O	Si
9	7	5:2 DMF/H ₂ O	Si

Obsérvese que no se pudo obtener un cono de Taylor estable en todos los procesos.

Las preparaciones se bombeaban a un flujo y a un voltaje que permitiera la observación de un cono de Taylor estable y la deposición de material en el plato colector. El flujo oscilaba entre 0,1 ml/h y 1 ml/h, mientras que el potencial eléctrico se situaba entre los 10 kV y los 15 kV.

Cuando el cono de Taylor se encontraba estabilizado y se observaba la deposición de material en el colector, el proceso se mantenía durante 60 min. Posteriormente, se tomaban varias muestras del material depositado para ser metalizadas con oro-paladio y observarlas en el microscopio electrónico de barrido (SEM).

Aun así, no se consiguió optimizar una síntesis de fibras de CS por electrospinning. Una proporción inferior a la mitad de las muestras que se prepararon no pudo emplearse en un proceso estable. Aun así, los materiales recogidos en las síntesis que pudieron estabilizarse no fueron nanofibras, si no nanopartículas con una morfología indefinida y elevada polidispersidad (**Figura 14**).

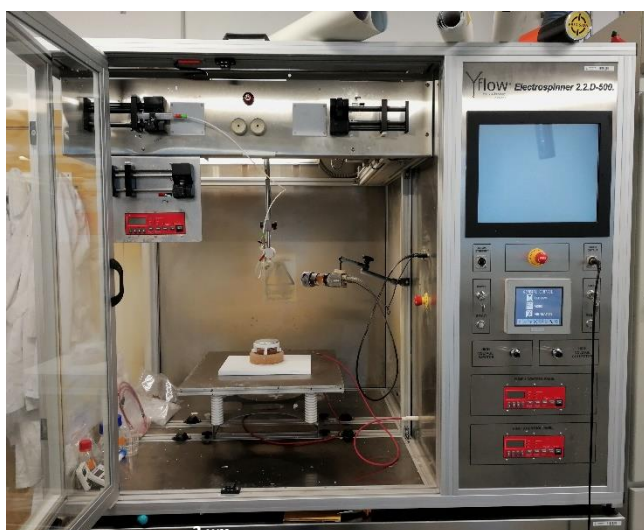


Figura 13: Electrospinner empleado durante el proyecto, con el montaje básico para las muestras de CS.

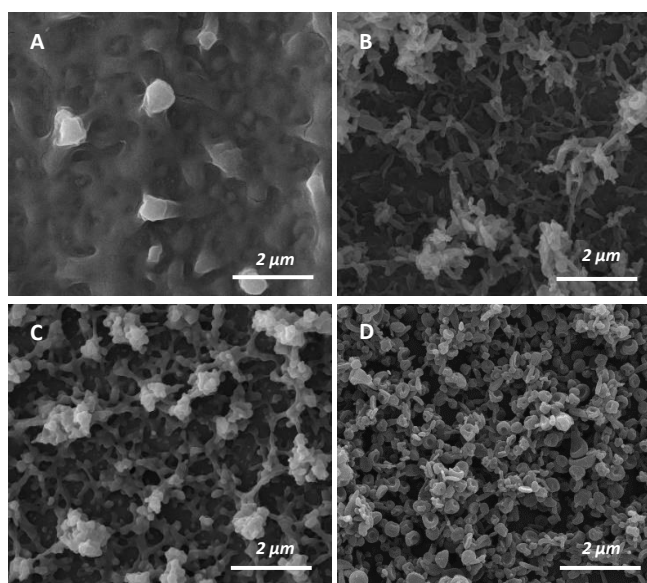


Figura 14: A: 5% CS (w/v) en DMF:H₂O (3:1). B: 5% CS (w/v) en DMF:H₂O (2:1). C: 10% CS (w/v) en DMF:H₂O (1:1). D: 7% CS (w/v) en DMF:H₂O (5:2).

La problemática de los procesos llevados a cabo se debió presumiblemente a la falta de viscosidad, volatilidad y conductividad de las soluciones que se emplearon. Solo la preparación N° 9 (**Figura 14, D**) fue considerada para un protocolo de síntesis por electrospraying de nanopartículas de CS. No obstante, problemas en la reproducibilidad del proceso llevaron a desistir en su optimización. Por otro lado, estas pruebas sirvieron para establecer que el CS podía concentrarse hasta el 20% en una disolución acuosa, algo que se tendría en consideración para la realización de otras preparaciones.

4.1.2. Electrospinning de policaprolactona y condroitín sulfato

De acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado anterior, se optó por incorporar la policaprolactona (PCL) a los procesos de electrospinning. La PCL es un polímero biodegradable y biocompatible, capaz de producir fibras mediante esta técnica de una forma versátil (Cipitria et al., 2011).

Se realizaron una serie de preparaciones que contenían tanto PCL como CS, en distintos disolventes y proporciones, llevándose a cabo su electrospinning (**Tabla 2**). La incorporación de la PCL a los procesos trajo la problemática de la incompatibilidad de solventes: la PCL es soluble solo en disolventes orgánicos (DCM, cloroformo, etanol, etc.) mientras que el CS solo es soluble en agua. Esta problemática trató de solventarse mediante la adición de surfactantes como el Tween® 80 o la adición del CS concentrado en una mínima cantidad de agua.

Para la preparación de las muestras, la cantidad necesaria de PCL era pesada en una balanza de mesa y disuelta en 10 ml de solvente. La preparación se mantenía en agitación magnética (400 rpm), a temperatura ambiente (21 °C) y en campana extractora durante al menos 12h. Posteriormente, se añadía la cantidad de CS deseada, calculada de acuerdo al porcentaje peso/peso (w/w) con respecto a la PCL. El CS podía incorporarse seco o concentrado en una disolución acuosa al 10-20% (w/v).

Tabla 2 - Electrospinning de PCL+CS

Nº muestra	Solvente	% PCL (w/v)	% CS (w/w)	Coaxial	Cono de Taylor	Notas
1	Cloroformo/Metanol (8:2)	10	1	Cloroformo	Si	Deposición del CS
2	DMF/DCM (1:1)	20	1	DCM	Si	Deposición del CS
3	DMF/DCM (1:1) 1% (v/v) Tween 80	10	1	DCM	No	-
4	DMF/DCM (1:1)	10	1, al 18% (w/v) en H ₂ O	DCM	Si	Precipitación de la PCL
5	DMF/DCM (1:1) 1% (v/v) Tween 80	10	2, al 20% (w/v) en H ₂ O	DCM	No	Precipitación de la PCL
6	DMF/DCM (1:1)	5	1, al 20% (w/v) en H ₂ O	DCM	Si	Precipitación de la PCL
7	DMF/DCM (1:1)	10	3, al 10% (w/v) en H ₂ O	DCM	Si	-
8	DMF/DCM (1:1)	10	4, al 10% (w/v) en H ₂ O	DCM	Si	-
9	DMF/DCM (1:1)	10	5, al 10% (w/v) en H ₂ O	DCM	Si	Aglutinación problemática de las fibras

Las estrategias para solventar la incompatibilidad de disolventes no fueron eficaces en todos los casos, llegándose a observar la precipitación de alguno de los componentes tras procesos prolongados en el tiempo.

Las condiciones de operación se tomaron de un proceso de electrospinning de PCL desarrollado con anterioridad en el laboratorio, variándolas lo mínimo posible, siempre en vistas a la estabilización del cono de Taylor. Para llevar a cabo estos procesos se empleó un montaje coaxial, donde por la aguja interior circulaban las muestras y por la aguja exterior un disolvente en el que la PCL es altamente soluble (DCM o cloroformo).

Para comenzar el electrospinning, las muestras se trasvasaban a una jeringa de 10 ml. Debido a su alta viscosidad, era habitual la necesidad de depositar la jeringa en un baño ultrasónico para permitir la eliminación de las burbujas de aire. Las agujas (interior y coaxial) se colocaban a una distancia de 18 cm de un colector de 10 cm de diámetro cubierto con papel de aluminio. Para las muestras se fijó un flujo de 1 ml/h, mientras que el disolvente coaxial se hacía circular a un ritmo variable (0,1 - 0,5 ml/h) en vistas a la estabilización. El voltaje de operación osciló en torno a los 14 kV.

A diferencia de los procesos que habían sido llevados a cabo únicamente con el CS, el electrospinning de PCL+CS resultó mucho más estable y fructífero. La obtención de fibras podía constatarse a simple vista con una rápida inspección visual del plato colector. Cuando se apreciaba que el proceso se estabilizaba, se dejaba operar el aparato alrededor de una hora. Posteriormente, se tomaban varias muestras del sustrato recogido, que procedían a ser metalizadas con oro-paladio para su observación en el SEM.

Con ello, se consiguió establecer una síntesis de nanofibras de PCL con CS mediante electrospinning. Una gran proporción de las preparaciones planteadas para este fin experimentaron problemas relacionados con la precipitación de sus componentes (**Tabla 2**). Esto fue debido a la incompatibilidad entre los solventes y los disolventes empleados. Se valoró que la PCL al 20% sería una disolución lo suficientemente viscosa como para retener el CS disperso aun estando insoluble pero no fue así. De igual forma, debido al fuerte carácter hidrófobo de la PCL, el añadir CS en una cantidad muy alta de H₂O o con una mala praxis ocasionaba la precipitación de la misma. La precipitación podía no apreciarse instantáneamente y observarse al cabo de un tiempo, habiendo empezado ya el proceso de electrospinning.

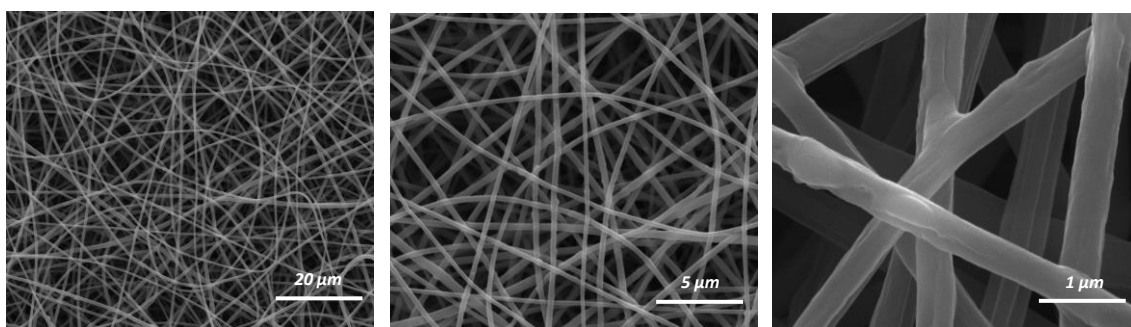


Figura 15: 10% PCL (w/v) en DCM/DMF (1:1), 4% CS (w/w) (al 20% (w/v) en H₂O).

No obstante, las preparaciones 7 y 8 demostraron ser estables en el tiempo y tener la capacidad de formar fibras fácilmente. Entre ellas, se eligió la 8 como potencial integrante de la síntesis final por tener el porcentaje de CS más elevado y una distribución del diámetro de fibras homogénea. (**Figura 15**).

El porcentaje en peso del CS en las preparaciones no pudo aumentarse, debido a que el CS se aportaba disuelto en una solución acuosa. Las soluciones acuosas no son elementos que favorezcan el electrospinning en absoluto, debido a la escasa volatilidad del agua. En la preparación 9 (con un porcentaje del 5% de CS) esto podía constatarse al observar que las fibras no se depositaban secas en el colector, lo que ocasionaba aglomeraciones de material.

4.1.3. Electrospinning de policaprolactona y ácido hialurónico.

El ácido hialurónico (HA, *Hyaluronic Acid*) no pudo incorporarse a las preparaciones que contenían PCL y CS debido a su total incompatibilidad con los disolventes orgánicos. De esta forma, hubo que descartar la idea de obtener una fibra polimérica que integrara en su composición los tres componentes que se deseaban en el andamio final (PCL+CS+HA). Antes de progresar en otra dirección, se decidió optar por el siguiente paso: optimizar una síntesis independiente para la obtención de fibras de PCL con HA.

La síntesis de fibras de PCL con HA mediante electrospinning se realizó siguiendo el protocolo desarrollado en Entekhabi et al., (2016). Brevemente, se preparó una disolución de polímero al 7% ([w/v], 95:5 PCL/HA) en una mezcla de ácido fórmico/ácido acético (3:1), agitando a temperatura ambiente (21 °C) y a 600 rpm durante 4 h. La preparación se dispuso en una jeringa de 10 ml para el electrospinning. La aguja de 23 G (0,6 mm de diámetro) se colocó a una distancia de 10 cm de un colector de 10 cm de diámetro cubierto con papel de aluminio. La preparación se bombeó a un flujo de 1 ml/h y se aplicó un voltaje en torno a los 16 KV. Se recogieron fibras en un proceso con un cono estable durante al menos 1 h. Posteriormente, se tomaron varias muestras del material depositado para ser metalizadas y caracterizarlas al SEM.

Con éste método se obtuvieron fibras de PCL+HA en un proceso estable con diámetros homogéneos (**Figura 16**).

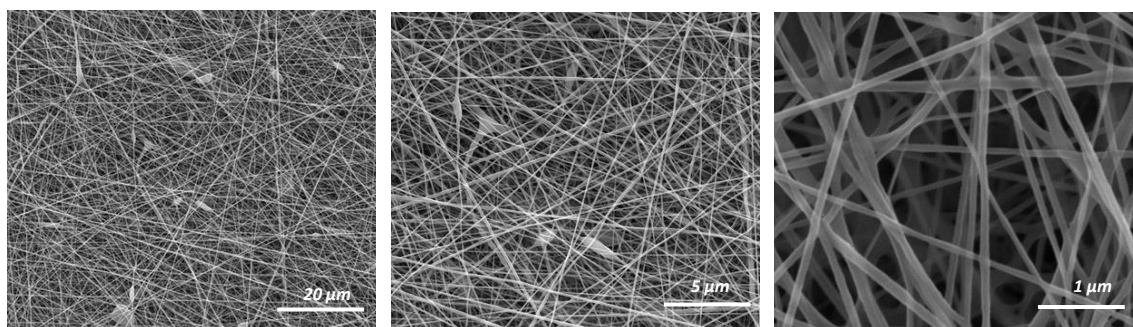


Figura 16: 7% PCL:HA (95:5, w/v) en Ac. Fórmico/Ac. Acético (3:1) (SEM).

Las fibras de PCL+HA obtenidas resultaron ser considerablemente mas finas que las de PCL+CS, pero se consideraron adecuadas para su aplicación en la síntesis final.

4.1.4. Electrospinning de PCL+CS y PCL+HA: Síntesis del andamio final

Para la síntesis de un material que integrara tanto la PCL como el CS y el HA, se realizó un montaje donde las dos síntesis previamente optimizadas podían llevarse a cabo de forma simultánea sobre un colector rotatorio (**Figura 17**). De esta forma, ambos tipos de fibras (Fibras de PCL+CS y fibras de PCL+HA) estarían presentes en el material que se recogiera, de manera uniforme.

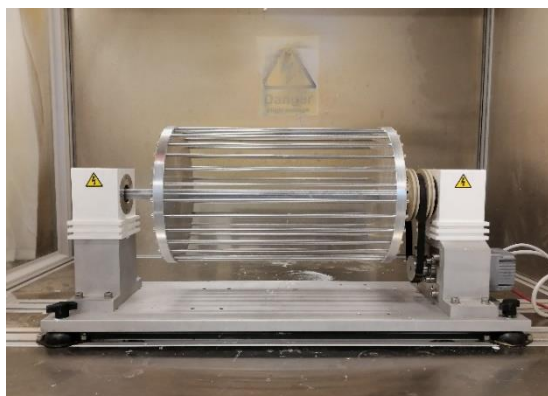


Figura 17: Colector rotatorio empleado.

Las muestras fueron preparadas tal y como se recoge en los apartados anteriores. En lo referente a las condiciones de operación en el nuevo montaje, la altura de las agujas y el flujo de las muestras pudieron ajustarse de manera

independiente, pero no así el voltaje: se tuvo que buscar un punto en el que ambos procesos fueran relativamente estables y depositaran fibras (≈ 15 kV).

Durante el proceso de electrospinning, el colector rotatorio se hacía girar a una velocidad de 100 rpm, mientras que la parte superior del montaje se hacía oscilar sobre él a una velocidad de 2,5 mm/s en el eje horizontal. La velocidad de rotación del tambor se mantuvo baja para evitar obtener una orientación de las fibras. El electrospinning se mantuvo en marcha durante 8 h, tras lo cual se recogieron muestras del material para su observación al SEM. El material final tenía la apariencia de una membrana fina y elástica de color blanco, que podía desprenderse fácilmente del papel de aluminio.

Ambas síntesis optimizadas (Fibras de PCL+CS y fibras de PCL+HA) pudieron llevarse a cabo sobre el colector rotatorio de manera simultánea. En el material final se aprecian las dos clases de fibras, las de PCL+CS con un diámetro considerablemente mayor que las de PCL+HA (**Figura 18**).

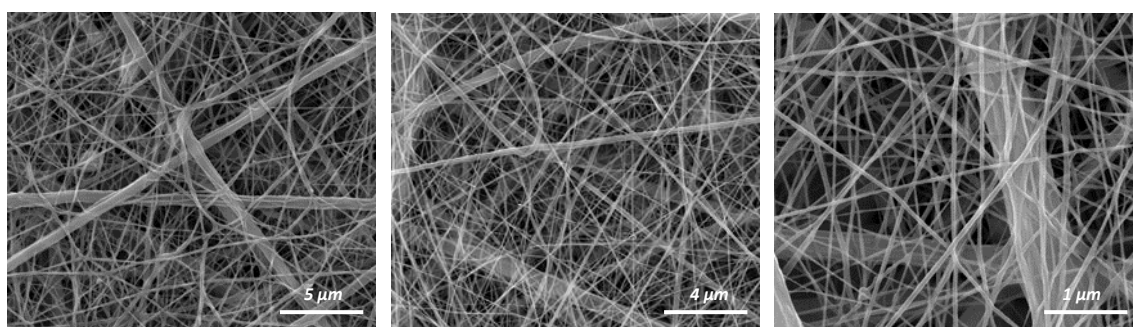


Figura 18: Andamio final con dos clases de fibras: PCL+CS y PCL+HA. PCL:HA (95:5, w/v) en Ac. Fórmico/Ac. Acético (3:1).

En la **Figura 19 A** se muestra la frecuencia y distribución de los diámetros de las fibras en el material final. Las fibras de PCL+HA tienen diámetros comprendidos entre los 0 y 200 nanómetros (>80%), mientras que las fibras de PCL + CS mostraron diámetros entre los 400 y 800 nm. Si se compara este histograma con los de las fibras obtenidas mediante las síntesis individuales (**Figura 19 B**), se observa que las fibras de PCL+CS dentro del andamio final presentan un diámetro mayor que el que se había reportado con anterioridad.

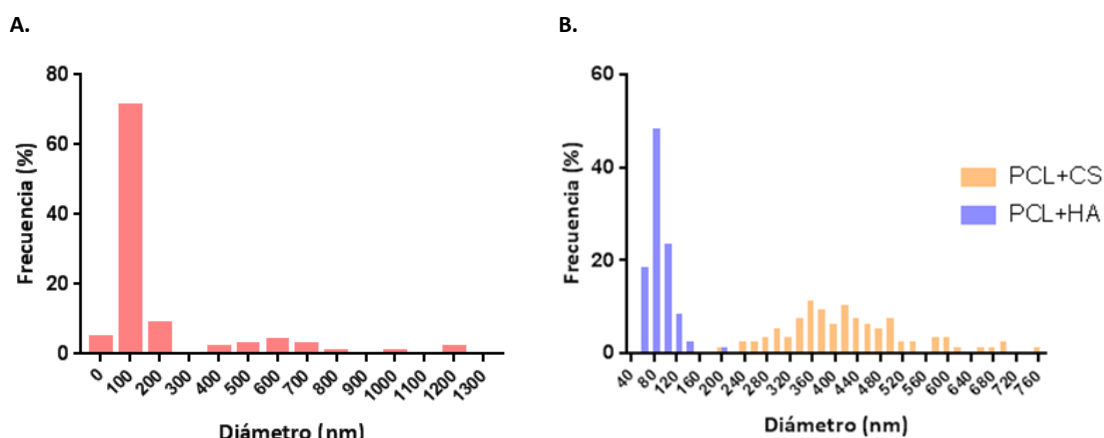


Figura 19: A: Histograma del diámetro de las fibras en el andamio final. B: Histogramas de las fibras de PCL+CS y PCL+HA obtenidas en síntesis separadas.

Esto podría deberse a los cambios en el potencial eléctrico con respecto a las síntesis originales. El potencial eléctrico es un parámetro que ocasiona problemas en la reproducibilidad de los métodos. Para este caso, hay que recordar que las síntesis por separado se optimizaron en torno

a unos voltajes diferentes al empleado en la síntesis final. Entre otras razones que podrían haber causado esta diferencia figuran el cambio entre los colectores empleados o a las condiciones ambientales.

4.2. Caracterización biológica de los materiales

El propósito de estos ensayos fue valorar la viabilidad de las células al ser cultivadas en el andamio sintetizado.

4.2.1. Cultivo en 3D - MTT

El MTT es un ensayo colorimétrico que evalúa la actividad metabólica de las células. Se considera un procedimiento fiable y es profusamente empleado para la estimación de la viabilidad en cultivos celulares, tanto en 2D como en 3D (Heydari et al. 2013). En este proyecto, se planteó la observación de la viabilidad de los cultivos celulares en 3D sobre el andamio sintetizado a las 24 h, las 48 h y los 7 días.

En vistas a la preparación de este ensayo, se recortaron con la ayuda de un torno secciones circulares de 14mm de diámetro de la membrana (andamio). Para realizar un control, se recortaron de igual forma secciones de una membrana compuesta únicamente por fibras de PCL (sin CS ni HA). Todas las secciones fueron esterilizadas mediante la exposición a luz ultravioleta por cada una de sus caras durante al menos una hora.

El cultivo de las células sobre las membranas se realizó por triplicado para cada tipo de membrana (PCL control y PCL+CS+HA) en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Con el fin de simplificar el procedimiento y realizar el ensayo del MTT solo una vez, se cultivaron 3 placas: una a 7 días de realizar el ensayo, otra a 48 horas y la última a 24 horas, siguiendo ordenadamente los siguientes pasos:

- I. Las secciones de la membrana, ya en la placa, eran sumergidas en 500 µl de medio de cultivo y se mantenían en incubación una hora con el objetivo de acondicionarlas para el cultivo celular.
- II. Se tripsinizaba una placa de mMSC que habían alcanzado previamente el estado de confluencia y se realizaba un conteo del número de células.
- III. La solución celular se centrifugaba a 1500 rpm durante 5 minutos. El pellet de células era resuspendido en el volumen necesario para obtener una solución celular con una densidad de 3.2×10^6 células/ml.
- IV. El medio que se había incubado con las membranas era retirado. Seguidamente, sobre cada membrana se depositaban 10 µl de la solución celular (32.000 células), dejándose incubar una hora. Durante esta hora, las células en suspensión se habrían adherido a la superficie de la membrana.
- V. Por último, se añadían 500 µl de medio. A partir de este momento, el medio de cultivo era renovado cada 24 h hasta el día en que se realizaba el ensayo.

Los reactivos “MTT” (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*) y el SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*, 98,5%) se adquirieron de la casa comercial Sigma Aldrich®. El ensayo MTT se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- I. Se pesaron 10 mg de MTT y se disolvieron en 2 ml de PBS, dejando la preparación agitando durante 10 min. La solución resultante se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm.
- II. Se realizó una segunda disolución tomando 1,5 ml de la primera y disolviéndolos en 13,5 ml de medio de cultivo.
- III. Se extrajo el medio de cultivo de todas las placas y se lavó tres veces cada membrana con 500 µl de PBS. Seguidamente, a cada pocillo con membrana se le añadió 500 µl de la segunda dilución de MTT.
- IV. Las placas se dejaron incubando 6 h en el incubador (37 °C, 5% CO₂, 3% O₂). A lo largo de este tiempo, se observó la aparición progresiva de cristales coloreados en la superficie de las membranas.
- V. Tras la incubación, se retiró el medio de los pocillos y se añadió en su lugar 500 µl de buffer (DMSO, 1% (w/v) SDS, 0,6% (v/v) ácido acético). Sin retirar las membranas de los pocillos, los cristales eran resuspendidos cuidadosamente en el buffer, dando lugar a una disolución coloreada.
- VI. Se tomaron 150 µl de cada muestra y se trasvasaron a una placa de 96 pocillos. De cada muestra se hizo un triplicado (tres pocillos por muestra).
- VII. Se leyó la absorbancia a 540 nm por medio de un lector de placas Synergy HT microplate reader (Biotek).

El ensayo se realizó dos veces, por triplicado para cada tipo de membrana y para tres ventanas de tiempo diferentes (n=6).

Para el cálculo de la viabilidad en los cultivos 3D de las mMSC sobre las membranas se emplearon los valores de la absorbancia obtenidos de las muestras de PCL control, de acuerdo con la fórmula:

$$Viabilidad = \frac{Abs\ muestra - Abs\ blanco}{Promedio\ (Abs\ Control - Abs\ blanco)} \times 100$$

Donde “Abs control” corresponde con la absorbancia obtenida de los cultivos sobre la membrana de PCL (no cargada con CS y HA) y “Abs blanco” corresponde con la absorbancia obtenida de una sección de membrana de PCL sin células sembradas sobre ella.

Se calculó tanto la viabilidad de las células cultivadas en la membrana de PCL+CS+HA como en la de PCL control. Los resultados se recogen en el gráfico de la **Figura 20**, donde se representa el porcentaje de la viabilidad de las muestras en las tres ventanas de tiempo en base a la muestra control (100% de viabilidad).

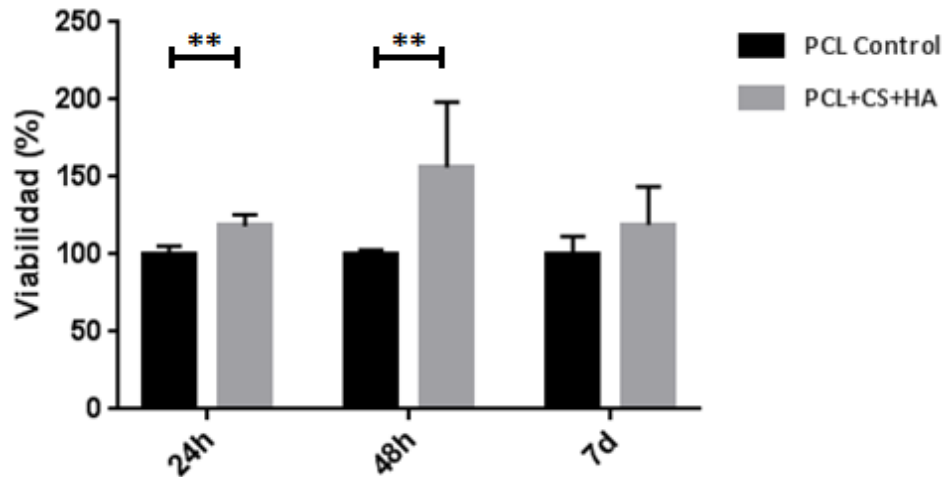


Figura 20: Viabilidad celular de las mMSC sembradas sobre las membranas de PCL+CS+HA. El doble asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,01$).

La viabilidad de las células cultivadas en PCL+CS+HA durante 24 y 48h aumentó de manera significativa ($p < 0,01$) con respecto a las cultivadas en PCL (control). Esto podría indicar que la viabilidad de las mMSC en el cultivo 3D se ve incrementada cuando las membranas contienen CS y HA, debido a que proporcionan un ambiente favorable que se asemeja al de la matriz extracelular de los tejidos biológicos. Este ambiente óptimo favorece tanto su crecimiento como proliferación.

Con estos resultados, se demuestra la citocompatibilidad y la idoneidad de las membranas sintetizadas para la regeneración de cartílago, habiendo proporcionando un soporte adecuado para la proliferación celular.

5. Discusión

El CS en disoluciones acuosas no es apto para el electrospinning, debido a la escasa viscosidad, volatilidad y conductividad que se alcanzan incluso en disoluciones en porcentajes cercanos a su saturación. En caso de querer obtener fibras, debe ser combinado con un polímero que facilite la obtención de fibras por electrospinning. En este proyecto se seleccionó la policaprolactona por ser un polímero biocompatible, biodegradable, muy versátil de cara a la obtención de fibras y aprobado por la FDA para su uso en aplicaciones biomédicas (Cipitria et al., 2011). De igual forma, se tuvo en cuenta que el ritmo de degradación de la PCL en condiciones fisiológicas es muy lento, lo que permitiría la liberación sostenida en el tiempo de los principios activos (Sun et al., 2006). Esto último resultaba especialmente importante para este proyecto, puesto que el cartílago es un tejido de crecimiento y regeneración lenta (Schaffer, 2015). Por otro lado, el CS y HA son componentes altamente solubles en agua: de no estar encapsulados en un polímero de degradación lenta, podrían dispersarse rápidamente in vivo y no provocar una acción condroregenerativa.

No obstante, en lo referente a la síntesis de fibras de PCL con CS, la incompatibilidad de solventes representó un problema grave. Podrían haberse explorado otras opciones que incluyeran polímeros solubles en fase acuosa tales como el polivinil alcohol (PVA; Guo et al., 2016), la gelatina (Pezeshki-Modaress et al., 2017) u otras formas de funcionalizar las fibras con el condroitín: adhesión post-síntesis (Meade et al., 2012), empleo de emulsiones, etc.

En una publicación anterior (Mohan et al., 2015) se ha desarrollado una síntesis para fibras de PCL+CS, empleándose como disolvente únicamente fase orgánica (Cloroformo:metanol, 8:2). Si bien el CS no es soluble en tales disolventes, su baja concentración (1% w/w) y la alta viscosidad proporcionada por la PCL concentrada al 20% (w/v) habrían contribuido a mantener el CS disperso y homogéneo para el electrospinning. En comparación con este trabajo, la síntesis desarrollada en nuestro proyecto aumentó la proporción de CS en fibras de PCL sustancialmente (del 1% al 4% w/w).

En lo referente a la caracterización biológica de nuestro material, se encontró una significativa mayor viabilidad celular en los cultivos 3D realizados sobre las membranas de PCL+CS+HA con respecto a las membranas de PCL control. El aumento de la proliferación y actividad celular en scaffolds con presencia de CS y HA ha sido ampliamente recogido en diversos estudios relacionados con la ingeniería de tejidos. Bhowmick et al. (2016) observaron una mayor adhesión y proliferación de hMSC (*human Mesenchymal Stem Cells*) en scaffolds de gelatina catiónica con CS, HA y sericina que sobre scaffolds de gelatina (ambos obtenidos por electrospinning). Mohan et al. (2015) emplearon membranas fibrosas de PCL con CS para el enriquecimiento de hidrogeles aplicados a la regeneración de cartílago, observándose una disminución en el tiempo de regeneración tisular. Por último, Zhang et al. (2011) sintetizaron scaffolds de colágeno, CS y HA, los cuales mostraron excelentes resultados relacionados con la proliferación de condrocitos.

De acuerdo con el protocolo de síntesis de fibras de PCL+HA que fue revisado (Entekhabi et al., 2016), la proporción de HA en las fibras podría aumentarse considerablemente sin comprometer el proceso de electrospinning. No obstante, en ese mismo estudio se señala que la cantidad de HA en el material no es directamente proporcional a los niveles de proliferación celular, existiendo una proporción de PCL/HA óptima para la viabilidad de las células (9:1 para células SY5Y de neuroblastoma). Con esto en mente, se podrían incrementar los niveles de HA presentes en el material desarrollado en nuestro proyecto, en vistas a un aumento en los niveles de proliferación celular obtenidos. Por último, la necesidad de emplear un montaje de electrospinning sobre colector rotatorio para la síntesis también guarda ventajas potenciales: de acuerdo con Accardi et al. (2013), la orientación de las fibras de PCL en scaffolds tiene importantes implicaciones en la regeneración del tejido cartilaginoso.

6. Perspectivas

Para la caracterización funcional del material sintetizado se planeó hacer un estudio de los perfiles de liberación del CS y del HA a lo largo del tiempo. El estudio de estos sería realizado a partir de secciones de la membrana final, en PBS 1x a 37 °C, por medio de la extracción de muestras cada 30 minutos. Posteriormente, la concentración de CS y HA en cada muestra sería calculada para evaluar la liberación acumulada de ambos principios activos.

La idea inicial era examinar las muestras obtenidas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), por medio de una columna apolar (cromatografía de fase reversa). Al comienzo de este proyecto no se había establecido un protocolo de HPLC para la detección y cuantificación de ninguno de los dos principios activos, por lo que se realizaron las siguientes preparaciones: CS a 100 ppm en PBS 1x, HA a 100 ppm en PBS 1x y PBS 1x (blanco). Estas preparaciones se analizaron por medio del servicio del Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea de la Universidad de Zaragoza.

Debido a la elevada similitud química entre el CS y HA, ambos compuestos no pudieron ser separados en el cromatograma por medio de las columnas disponibles en el servicio y las condiciones de operación de las que se disponían. Por ello, el estudio de los perfiles de liberación se pospuso para más adelante con el fin de buscar metodologías más adecuadas.

Considerando la importancia de estos perfiles en el campo de los materiales nanoestructurados y funcionalizados, es indispensable que estos se realicen en vistas a una posible publicación de los resultados expuestos en este trabajo y a su potencial aplicación biomédica. Actualmente se están explorando soluciones para el problema de la separación de los componentes en el HPLC: el empleo de nuevas columnas, la liofilización de las muestras para su resuspensión en dimetilacetamida, el empleo de sales de litio, etc. Otras soluciones que no incluyan el uso de HPLC pasan por ensayos colorimétricos como el del DMMB (Coulson-Thomas and Gesteira, 2014), si bien se presume que estas metodologías puedan ser menos sensibles.

La solución a este problema permitirá determinar el contenido de los principios activos en el andamio sintetizado y evaluar la cinética de liberación de los mismos.

Paralelamente a la determinación de los perfiles de liberación, también se considera la realización de un ensayo de tracción uniaxial para la determinación de la curva tensión-deformación y el módulo elástico del material sintetizado.

Por último, se espera colaborar con la Dra. Nadia Benkirane-Jessel del grupo de investigación de Nanomedicina Regenerativa Dental y Osteoarticular del INSERM (Universidad de Estrasburgo, Francia), para la realización de ensayos de diferenciación celular e *in vivo* en modelos animales.

7. Conclusiones

Se ha logrado sintetizar un andamio conteniendo condroitín sulfato y ácido hialurónico mediante electrospinning. La combinación de estos compuestos en una malla de fibras nanométricas de PCL es óptima para su aplicación en regeneración de tejido cartilaginoso.

El proceso de obtención se basa en el electrospinning simultáneo de fibras de PCL conteniendo CS y fibras del mismo polímero conteniendo HA. Así pues, en el andamio pueden apreciarse ambas clases de fibras al tener estas unos diámetros diferentes: 50-300 nm para las de PCL con HA y 400-700 nm para las de PCL con CS.

Si bien aún no se ha podido determinar el contenido de los compuestos activos en el material final por problemas prácticos, las pérdidas de material en los procesos de electrospinning son mínimas, por lo que se espera encontrar un contenido muy similar al teórico: 22,5 mg de CS y 20,5 mg de HA por cada gramo de material.

Los ensayos de viabilidad demuestran que este andamio es biocompatible y bioactivo, puesto que promueve el crecimiento y la proliferación de células madre mesenquimales. Con respecto a células sobre fibras poliméricas de PCL sin principios activos, la viabilidad se ve incrementada entre un 20% y un 60%.

Con estas prometedoras perspectivas, se continuará con la caracterización del material desarrollado, con la intención de realizar un manuscrito con los resultados para su publicación en una revista científica.

8. Bibliografía

1. Accardi, M., McCullen, S., Callanan, A., Chung, S., Cann, P., Stevens, M. and Dini, D. (2013). Effects of Fiber Orientation on the Frictional Properties and Damage of Regenerative Articular Cartilage Surfaces. *Tissue Engineering Part A*, 19(19-20), pp.2300-2310.
2. Akmal, M., Singh, A., Anand, A., Kesani, A., Aslam, N., Goodship, A. and Bentley, G. (2005). The effects of hyaluronic acid on articular chondrocytes. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, 87-B(8), pp.1143-1149.
3. Aviss, K., Gough, J. and Downes, S. (2010). Aligned electrospun polymer fibres for skeletal muscle regeneration. *European Cells and Materials*, 19, pp.193-204.
4. Baeurle, S., Kiselev, M., Makarova, E. and Nogovitsin, E. (2009). Effect of the counterion behavior on the frictional–compressive properties of chondroitin sulfate solutions. *Polymer*, 50(7), pp.1805-1813.
5. Baji, A., Mai, Y., Wong, S., Abtahi, M. and Chen, P. (2010). Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites Science and Technology*, 70(5), pp.703-718.
6. Bhowmick, S., Scharnweber, D. and Koul, V. (2016). Co-cultivation of keratinocyte-human mesenchymal stem cell (hMSC) on sericin loaded electrospun nanofibrous composite scaffold (cationic gelatin/hyaluronan/chondroitin sulfate) stimulates epithelial differentiation in hMSCs: In vitro study. *Biomaterials*, 88, pp.83-96.
7. Chen, N., Tian, L., He, L. and Ramakrishna, S. (2016). Nanobiomaterials for neural regeneration. *Neural Regeneration Research*, 11(9), p.0.
8. Christopherson, G., Song, H. and Mao, H. (2009). The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials*, 30(4), pp.556-564.
9. Cipitria, A., Skelton, A., Dargaville, T., Dalton, P. and Hutmacher, D. (2011). Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review. *Journal of Materials Chemistry*, 21(26), p.9419.
10. Coulson-Thomas, V. and Gesteira, T. (2014). Dimethylmethyle Blue Assay (DMMB). *BIO-PROTOCOL*, 4(18).
11. Cramariuc, B., Cramariuc, R., Scarlet, R., Manea, L., Lupu, I. and Cramariuc, O. (2013). Fiber diameter in electrospinning process. *Journal of Electrostatics*, 71(3), pp.189-198.
12. Daher, R., Chahine, N., Greenberg, A., Sgaglione, N. and Grande, D. (2009). New methods to diagnose and treat cartilage degeneration. *Nature Reviews Rheumatology*, 5(11), pp.599-607.
13. Di Martino, A., Liverani, L., Rainer, A., Salvatore, G., Trombetta, M. and Denaro, V. (2011). Electrospun scaffolds for bone tissue engineering. *MUSCULOSKELETAL SURGERY*, 95(2), pp.69-80.
14. Entekhabi, E., Haghbin Nazarpak, M., Moztarzadeh, F. and Sadeghi, A. (2016). Design and manufacture of neural tissue engineering scaffolds using hyaluronic acid and polycaprolactone nanofibers with controlled porosity. *Materials Science and Engineering: C*, 69, pp.380-387.
15. Ercolani, E., Del Gaudio, C. and Bianco, A. (2013). Vascular tissue engineering of small-diameter blood vessels: reviewing the electrospinning approach. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(8), pp.861-888.
16. Eriskin, C., Kalyon, D., Wang, H., Örnek-Ballanco, C. and Xu, J. (2011). Osteochondral Tissue Formation Through Adipose-Derived Stromal Cell Differentiation on Biomimetic

- Polycaprolactone Nanofibrous Scaffolds with Graded Insulin and Beta-Glycerophosphate Concentrations. *Tissue Engineering Part A*, 17(9-10), pp.1239-1252.
17. Fong H, Chung I, Reneker DH "Beaded Nanofibers Formed During Electrospinning", *Polymer*, 40, 4585 (1999)
 18. Fraser, J., Laurent, T. and Laurent, U. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 242(1), pp.27-33.
 19. Greiner, A. and Wendroff, J. (2007). Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *ChemInform*, 38(42).
 20. Guo, J., Zhou, H., Akram, M., Mu, X., Nie, J. and Ma, G. (2016). Characterization and application of chondroitin sulfate/polyvinyl alcohol nanofibres prepared by electrospinning. *Carbohydrate Polymers*, 143, pp.239-245.
 21. Hamlett, C., Jayasinghe, S. and Preece, J. (2008). Electrospinning nanosuspensions loaded with passivated Au nanoparticles. *Tetrahedron*, 64(36), pp.8476-8483.
 22. Hasan, A., Memic, A., Annabi, N., Hossain, M., Paul, A., Dokmeci, M., Dehghani, F. and Khademhosseini, A. (2014). Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomaterialia*, 10(1), pp.11-25.
 23. Hegewald, A., Ringe, J., Bartel, J., Krüger, I., Notter, M., Barnewitz, D., Kaps, C. and Sittinger, M. (2004). Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. *Tissue and Cell*, 36(6), pp.431-438.
 24. Heydari, Z., Mohebbi-Kalhor, D. and Afarani, M. (2017). Engineered electrospun polycaprolactone (PCL)/octacalcium phosphate (OCP) scaffold for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 81, pp.127-132.
 25. Huang, Z., Zhang, Y., Kotaki, M. and Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63(15), pp.2223-2253.
 26. Kang H, Zhu Y, Jing Y, Yang X, Li C "Fabrication and Electrochemical Property of Ag-Doped Sio2 Nanostructured Ribbons," *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 356, 120 (2010)
 27. Kazemnejad S, Khanmohammadi M, Baheiraei N, Arasteh S. Current State of Cartilage Tissue Engineering using Nanofibrous Scaffolds and Stem Cells. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2017;9(2):50-65.
 28. Lee JS, Choi KH, Ghim HD, Kim SS, Chun DH, Kim HY, Lyoo WS "Role of Molecular Weight of Atactic Poly(Vinyl Alcohol) (Pva) in the Structure and Properties of Pva Nanofabric Prepared by Electrospinning", *J. Appl. Polym. Sci*, 93, 1638 (2004)
 29. Leung V, Ko F "Biomedical Applications of Nanofibers," *Polym. Adv. Technol*, 22, 350 (2011)
 30. Luo, Y., Nartker, S., Miller, H., Hochhalter, D., Wiederoder, M., Wiederoder, S., Settingington, E., Drzal, L. and Alcocilja, E. (2010). Surface functionalization of electrospun nanofibers for detecting E. coli O157:H7 and BVDV cells in a direct-charge transfer biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4), pp.1612-1617.
 31. McCann, J., Marquez, M. and Xia, Y. (2006). Highly Porous Fibers by Electrospinning into a Cryogenic Liquid. *Journal of the American Chemical Society*, 128(5), pp.1436-1437.
 32. Meade, K., White, K., Pickford, C., Holley, R., Marson, A., Tillotson, D., van Kuppevelt, T., Whittle, J., Day, A. and Merry, C. (2012). Immobilization of Heparan Sulfate on Electrospun Meshes to Support Embryonic Stem Cell Culture and Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), pp.5530-5538.

33. Merritt, S., Exner, A., Lee, Z. and von Recum, H. (2011). Electrospinning and Imaging. *Advanced Engineering Materials*, 14(5), pp.B266-B278.
34. Mescher, A. (2009). *Junqueira's Basic Histology*. Blacklick: McGraw-Hill Publishing.
35. Nanoscience.com. (2018). Electrospinning & Electrospraying Equipment. [online] Available at: <https://www.nanoscience.com/products/electrospinning-equipment/> [Accessed 8 Apr. 2018].
36. Nanotechnology Solutions. (2018). *Coaxial Electrospinning*. [online] Available at: <https://nanotechnologysolutions.wordpress.com/2013/07/29/coaxial-electrospinning/> [Accessed 19 Apr. 2018].
37. Neethu Mohan. Biomimetic fiber assembled gradient hydrogel to engineer glycosaminoglycan enriched and mineralized cartilage: An in vitro study. (2015). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(12), pp.3896-3906.
38. Pezeshki-Modaress, M., Mirzadeh, H., Zandi, M., Rajabi-Zeleti, S., Sodeifi, N., Aghdami, N. and Mofrad, M. (2017). Gelatin/chondroitin sulfate nanofibrous scaffolds for stimulation of wound healing: In-vitro and in-vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(7), pp.2020-2034.
39. Ringe, J., Burmester, G. and Sittinger, M. (2012). Regenerative medicine in rheumatic disease—progress in tissue engineering. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(8), pp.493-498.
40. Riss, T., Moravec, R., Niles, A., Duellman, S., Benink, H., Worzella, T. and Minor, L. (2018). Cell Viability Assays. [online] Ncbi.nlm.nih.gov. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> [Accessed 6 Apr. 2018].
41. SCHAFER, E. (2015). *ESSENTIALS OF HISTOLOGY*. [S.I.].
42. Schiffman, J. and Schauer, C. (2008). A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polymer Reviews*, 48(2), pp.317-352.
43. Sun Z, Zussman E, Yarin AL, Wendorff JH, Greiner A "Compound Core–Shell Polymer Nanofibers by Co Electrospinning.," *Adv. Mater*, 15, 1929 (2003)
44. Sun, H., Mei, L., Song, C., Cui, X. and Wang, P. (2006). The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials*, 27(9), pp.1735-1740.
45. ThermoFisher.com. (2018). LIVE/DEAD Cell Viability Assays | Thermo Fisher Scientific. [online] Available at: <https://www.thermoFisher.com/es/es/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/live-dead-viability-brand-page.html> [Accessed 9 Apr. 2018].
46. Varghese, S., Hwang, N., Canver, A., Theprungsirikul, P., Lin, D. and Elisseeff, J. (2008). Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biology*, 27(1), pp.12-21.
47. Wade, R., Bassin, E., Rodell, C. and Burdick, J. (2015). Protease-degradable electrospun fibrous hydrogels. *Nature Communications*, 6(1).
48. Yao, Z., Chen, S., Ahmad, Z., Huang, J., Chang, M. and Li, J. (2017). Essential Oil Bioactive Fibrous Membranes Prepared via Coaxial Electrospinning. *Journal of Food Science*, 82(6), pp.1412-1422.
49. Zhang, L., Li, K., Xiao, W., Zheng, L., Xiao, Y., Fan, H. and Zhang, X. (2011). Preparation of collagen–chondroitin sulfate–hyaluronic acid hybrid hydrogel scaffolds and cell compatibility in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), pp.118-125.
50. Zhang, W., Ronca, S. and Mele, E. (2017). Electrospun Nanofibres Containing Antimicrobial Plant Extracts. *Nanomaterials*, 7(2), p.42.

