



Universidad Nacional Autónoma de México

Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales

“Andamios electrohilados de fibroína de gusano de seda para el crecimiento de astrocitos para lesiones en el tejido neuronal”

Tesis

Que para optar por el grado de:

Maestro en Ciencias e Ingeniería de Materiales

Presenta:

I.Q. Vladimir Barrera Quintero

Tutor Principal

Dr. Ricardo Vera Graziano

Instituto de Investigaciones en Materiales

Miembros del Comité Tutor

Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez

Universidad Autónoma de Baja California

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales

Ciudad Universitaria. CDMX. Agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de vídeos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Investigaciones en Materiales y, al Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos, por brindarme las herramientas necesarias para el desarrollo de este proyecto.

A mi familia: Mi padre (Vicente Barrera), mi madre (Paula Quintero), mis hermanos (Ernesto y Joseph) que siempre me han apoyado en todo momento. A mis mejores amigos (Jorge, Leonardo, Leiser e Ivan) por estar ahí.

Al Dr. Ricardo Vera Graziano; por apoyarme en todo momento, por su confianza y por su asesoría durante la realización de este proyecto.

A mis asesores: Dr. Andrés Castell y Dr. Luis Villarreal; por su apoyo, por sus consejos y por abrir las puertas de sus laboratorios para la realización de este proyecto.

Al Dr. Alfredo Maciel y al Dr. Filiberto Rivera; por sus apoyo, consejos, enseñanzas y confianza.

Al Dr. Francisco Sánchez Arevalo; por abrir las puertas de su laboratorio en cualquier momento, por la confianza, por su paciencia conmigo y mis compañeros.

A los Técnicos de Laboratorio, por su aportación en el análisis de las muestras y entrega oportuna de resultados: A Omar Novelo Peralta por las sesiones de microscopía electrónica, a Miguel Ángel Canseco por los análisis ATR-FTIR, a Karla E. Reyes Morales por la obtención de termogramas, a Adriana Tejada Cruz por la obtención de los difractogramas de DRX, a Gerardo Cedillo Valverde por los espectros RMN.

Al Biólogo Miguel Ángel Herrera Enríquez y la M. en C. Berenice Nohemí Bernal Vicente, por su apoyo para la realización de los cultivos celulares con astrocitos.

A mis Compañeros de laboratorio: Erick, Eliza, Andrés, Gerardo, Emmanuel, Karen, Cuauhtémoc, Asael, Lupita, Angelita, Nadia, Linda, Denisse, Josué, Sergio, Karina, Melissa, Dinorah, Dra. Conchita, los que faltan y los que vienen.

A mis compañeros de maestría y doctorado: Johny, Caro, George, Angie, Abril, Rodrigo, Eugenio, Mayra, Luis, Marisol, Mildred, Reinher, Ricardito. Por su apoyo, enseñanzas, consejos y su amistad.

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada para la realización de este trabajo y al proyecto DGAPA/PAPIIT IN108116.

Índice

Resumen.....	1
Abstract	1
Introducción	2
Justificación	3
Marco teórico.....	5
Ingeniería de tejidos y Medicina Regenerativa.....	5
Fibras de Seda	5
Fibroína	6
Electrohilado	8
Solución polimérica	9
Cono de Taylor	9
Ajuste del chorro en presencia de un campo eléctrico.....	9
Inestabilidad del chorro	10
Colección del chorro.....	10
Células neuronales: Astrocitos.....	11
Células gliales del cerebro.....	11
Las células gliales difieren de las neuronas.....	12
Astrocitos	12
Antecedentes	13
Objetivos	14
Objetivo general.....	14
Objetivos particulares	14
Hipótesis.....	14
Materiales	14
Métodos Experimentales	15
Obtención de la proteína fibroína.....	15
Desgomado	15
Disolución de la Fibroína	16
Electrohilado	17
Cultivo y sembrado celular de fibroblastos.....	18
Cultivo y sembrado celular de astrocitos.....	18
Métodos de análisis y caracterización	19

Análisis termogravimétrico (TGA)	19
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	19
Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	20
Resonancia magnética nuclear (RMN)	20
Angulo mágico de giro (MAS).....	20
Angulo de contacto	21
Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	22
Difracción de Rayos X	22
Pruebas mecánicas.....	23
Tensión uniaxial.....	23
Resultados	24
Caracterización de la fibroína de seda	24
Caracterización mediante FTIR.....	24
Caracterización mediante RMN-Ángulo Mágico	27
Caracterización térmica.....	31
Pruebas de solubilidad de la fibroína	33
Experimentos de electrohilado	35
Resultados de Micrografías obtenidas por SEM	38
Electrohilado de fibras paralelas.....	41
Caracterización de los andamios.....	43
Caracterización por FTIR	43
Caracterización por RMN en estado sólido.....	46
Caracterización Térmica (TGA y DSC).....	48
Caracterización por DRX.....	49
Caracterización por Ángulo de Contacto	50
Pruebas mecánicas.....	51
Pruebas de viabilidad celular	53
Análisis de resultados.....	55
Conclusiones	59
Referencias.....	61

Lista de Abreviaturas

Sistema nervioso central	(SNC)
Sistema nervioso periférico	(SNP)
Matriz extracelular	(MEC)
Fibroína de seda	(FS)
Sericina de seda	(SS)
Cadena pesada de la FS	(H-fibroína)
Cadena ligera de la FS	(L-fibroína)
Glicoproteína de la FS	(P25)
Ácido trifluoroacético	(TFA)
Tetrahidrofurano	(THF)
Tetrafluoroetileno	(TFE)
Dimetilsulfóxido	(DMSO)
N,N-dimetilformamida	(DMF)
Hexafluoro-2-propanol	(HFIP)
Fibroína de seda electrohilada	(FSE)
Suero bovino fetal	(SBF)
Solución "Hanks" sal y equilibrada	(HBSS)
Neuronas del ganglio de la raíz dorsal de rata	(DRGn)
Polimetilmetacrilato	(PMMA)
Esclerosis lateral amiotrófica	(ELA)
Análisis térmico dinámico-mecánico	(DTMA)
Ácido poliacrílico	(PAA)
Bromuro de litio	(LiBr)
Poliácido láctico	(PLA)
Ácido poliglicólico	(PGA)
Ácido poli(láctico-co-glicólico)	(PLGA)
Polietilenglicol	(PEG)
Polihidroxietilmetacrilato	(pHEMA)
Polipirrol	(PPy)
Polianilina	(PANI)
Poli(3,4-etilendioxitiofeno)	(PEDOT)

Índices de Figuras

Figura 1. Fibra de seda, compuesta por fibroína y sericina. Imagen de microscopia SEM x 2000 [3].	6
Figura 2. Principales Aminoácidos que componen a la proteína fibroína.	6
Figura 3. Configuración Básica del proceso de Electrohilado [14].	9
Figura 4. La morfología superficial secundaria de las fibras electrohiladas [21].	11
Figura 5. Tipos de células gliales en humanos. (A) Astrocito protoplasmático, se encuentran en la materia gris cerebral. (B) Astrocitos fibrosos, se encuentran en la materia blanca. (C) Oligodendrocito, se encuentra en las capas profundas de la corteza cerebral. (D) Célula microglía, se distribuye de manera uniforme y abundante en toda la corteza cerebral.	12
Figura 6. Diagrama del proceso de desgomado para las condiciones establecidas en la tabla 1.	15
Figura 7. Proceso para las pruebas de solubilidad.	17
Figura 8. Equipo de electrohilado, Laboratorio de nanofibras para ingeniería de tejidos-IIM, UNAM.	17
Figura 9. Probador de tracción uniaxial, Laboratorio de mecánica y micro-mecánica de sólidos-IIM, UNAM.	23
Figura 10. Espectro FTIR de absorbancia de la fibra de seda del capullo Bombix Mori (en verde) y la SF (en rosa) en la región de 4000 cm^{-1} - 750 cm^{-1}	24
Figura 11. Ampliación del Espectro FTIR de la fibra de seda del capullo Bombix Mori y la SF en la región 1750 cm^{-1} - 750 cm^{-1}	25
Figura 12. Espectro ^{13}C RMN a ángulo mágico de la fibra del capullo de gusano de seda, Bombix mori.	28
Figura 13. Espectro ^{13}C RMN ángulo mágico de la Fibroína obtenida por desgomado del capullo de gusano de seda, Bombix mori.	30
Figura 14. DSC y TGA del capullo de gusano de seda, Bombix mori.	31
Figura 15. DSC y TGA de la FS obtenida mediante desgomado del Capullo de Gusano de Seda, Bombix mori.	32
Figura 16. Prueba de solubilidad con Acetona.	34
Figura 17. Prueba de solubilidad con TFE/Agua [10%].	34
Figura 18. Prueba de solubilidad con TFA.	34
Figura 19. Micrografías obtenidas de SEM a x5000 y x1000 del experimento 27. A la derecha el histograma del diámetro de fibras.	39
Figura 20. Micrografías obtenidas de SEM a x5000 y x1000 del experimento 25. A la derecha el histograma del diámetro de fibras.	39
Figura 21. Micrografías de las fibras obtenidas mediante las condiciones ideales. x5000 aumentos.	40
Figura 22. Colector para fibras paralelas. a) perspectiva desde la vista superior del colector, b) perspectiva desde la vista lateral del colector, c) perspectiva desde el frente del colector, d) perspectiva desde un ángulo de inclinación del colector.	41
Figura 23. Fibras paralelas sobre los costados del colector.	42
Figura 24. Micrografías de SEM de las fibras paralelas obtenidas sobre el colector diseñado. a) x1000 y b) x5000.	42
Figura 25. Comparación entre el espectro FTIR de FS y la FSE en la región de 4000 cm^{-1} - 500 cm^{-1}	43
Figura 26. Comparación entre el espectro FTIR de la FS y la FSE en la región de 2000 cm^{-1} - 500 cm^{-1}	44

Figura 27. Espectro de ¹³ C RMN-MAS de la proteína FS electrohilada.	46
Figura 28. DSC y TGA de la FSE.	48
Figura 29. Espectro DRX de la ESF.	49
Figura 30. Medición del ángulo de contacto para 3 muestras de ESF.	50
Figura 31. Medición del ángulo de contacto de la ESF durante 12 minutos.	51
Figura 32. Grafica esfuerzo vs Razón de elongación para el ajuste del modelo de Mooney–Rivlin (MR) de las probetas 1, 3 y 5.	52
Figura 33. Micrografía de fibroblastos sobre los Andamios de fibras alienadas. Las flechas blancas indican a las células establecidas sobre las fibras. Ampliación 10X.	53
Figura 34. Micrografía de astrocitos sobre el andamio de fibras alineadas después de 3 días en cultivo in vitro. a) Ampliación 10X y b) ampliación 4X.	54
Figura 35. Micrografías de astrocitos con su soma sobre las fibras y extensiones que cruzan entre fibras marcadas con flechas.	54
Figura 36. Micrografías de astrocitos en forma de estrella sobre una zona de poca orientación del andamio de SFE. Ampliación 10X.	54

Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones de desgomado de capullos de gusano de seda. (<i>Bombix mori</i>).	15
Tabla 2. Solventes para las pruebas de solubilidad.	16
Tabla 3. Identificación de las bandas del FTIR de la fibra del capullo de gusano de seda, <i>Bombix mori</i>	26
Tabla 4. Identificación de las bandas del FTIR de la FS.	27
Tabla 5. Desplazamientos químicos de los principales aminoácidos de la SS [43], [44].	29
Tabla 6. Desplazamientos químicos de las señales del capullo de gusano de seda del espectro de la figura 7.	29
Tabla 7. Desplazamientos químicos de los principales aminoácidos de la FS [22], [23].	30
Tabla 8. Desplazamientos químicos de las señales del capullo de gusano de seda.	31
Tabla 9. Resultados para la disolución de la fibroína en diferentes solventes.	34
Tabla 10. Diversos parámetros de electrohilado.	35
Tabla 11. Primera tabla de experimentos.	36
Tabla 12. Segunda tabla de experimentos.	36
Tabla 13. Tercera tabla de experimentos.	36
Tabla 14. Micrografías obtenidas por SEM a partir de la tercera tabla de experimentos. Se muestran las micrografías de los experimentos 17, 21, 22 y 23 a x5000 y x1000 así como el histograma de las medidas del diámetro de las fibras.	38
Tabla 15. Tabla de experimentos de electrohilado a 15 kV.	39
Tabla 16. Tabla de resultados de diámetro de fibra.	40
Tabla 17. Identificación de las bandas del FTIR de la FSE.	45
Tabla 18. Desplazamientos químicos de los principales aminoácidos de la FS [22], [23].	46
Tabla 19. Desplazamientos químicos de las señales del capullo de gusano de seda.	47
Tabla 20. Porcentaje de Elongación máxima promedio.	52

Resumen

En este trabajo se estudiaron andamios electrohilados de fibroína de gusano de seda, *Bombix mori*, con posibilidades de ser aplicados en la regeneración de tejido debido a una lesión dentro del Sistema Nervioso Central (SNC) ya que raramente se tiene un buen pronóstico de recuperación. Al utilizar ácido trifluoroacético (TFA) como solvente el proceso de fabricación de los andamios se redujo obteniendo fibras de diámetro alrededor de los 690 ± 150 nm. Se fabricaron andamios de fibras al azar y paralelas. Para la fabricación de los andamios de fibras paralela se diseñó un nuevo colector tipo "T" invertida. Se caracterizaron los andamios por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Análisis Termogravimétrico (TGA), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Difracción de Rayos X (DRX) y Pruebas Mecánicas Uniaxiales. La viabilidad celular de los andamios se evaluó mediante células gliales neuronales astrocitos, ya que este tipo de células tienen un rol primordial dentro de la regeneración del tejido neuronal dañado. Los astrocitos lograron establecerse sobre los andamios mostrando una forma bipolar alargada y forma de estrella. Además, las extensiones de las células lograron extenderse sobre fibras adyacentes. Este tipo de andamios podrían ser aplicados en la regeneración de tejido neuronal como sustituto de la matriz extracelular del cerebro.

Palabras clave: Fibroína, Electrohilado, Ingeniería de tejidos, Células neuronales, Astrocitos.

Abstract

In this study we evaluate electrospun scaffolds made by Fibroin from silkworm, *Bombix mori*, to improve tissue regeneration after injury in Central Nervous System (CNS) since there is rarely a good prognosis for recovery. Using Trifluoroacetic Acid (TFA) as solvent the fabrication process of scaffolds is reduced, obtaining fibers around of 690 ± 150 nm. We fabricated scaffolds of non-parallel fibers and parallel fibers. We designed a new collector type T inverted for manufacture of parallel fibers. Scaffolds were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (RMN), Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetric Analysis (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-Ray Diffraction (DRX) and Uniaxial Mechanical Test. We evaluated cell viability of scaffolds to be applied in CNS, we used neuronal-glia cells, astrocytes, since this kind of cells play an important role in damaged neuronal tissue. Astrocytes were able to stablish on scaffolds showing bipolar- and star- shape. Moreover, astrocytes filaments were capable of extend on adjacent fibers. This kind of scaffolds could be applied in neuronal tissue regeneration as substituent for brain extracellular matrix.

Keywords: Fibroin, Electospinning, Tissue Engineering, Neuronal Cells, Astrocytes.

Introducción

Actualmente se estiman más de 600 enfermedades que afectan el sistema nervioso central (SNC), que causan daño cerebral. Desafortunadamente pocas de estas enfermedades tienen tratamientos efectivos disponibles. La enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Parkinson producen muerte de tipos de células muy específicos; trayendo consigo problemas en el sistema motor y en las facultades cognitivas. Hasta hace poco se creía que la capacidad de generación de nuevas células (Neurogénesis) no se daba en el sistema nervioso central, que comprende: el encéfalo y la medula espinal. Sin embargo, se ha descubierto que el cerebro cambia a lo largo de la vida. Tal plasticidad ofrece una vía para inducir la autoreparación cerebral tras una lesión o una enfermedad [1].

La ingeniería de tejidos es una combinación de diversas técnicas cuyo objetivo es fabricar un reemplazo de tejido dañado por medio de materiales y de células para crear constructos 3-D que faciliten la regeneración del tejido original y/o restauren directamente la función perdida basada en la integración estructural permanente. Una estrategia emergente de la ingeniería de tejidos aplicada en el SNC toma como ejemplo estructuras que se generan durante el desarrollo prenatal, las cuales sirven para facilitar la migración de neuronas desde el centro del cerebro hasta la corteza cerebral. Este tipo de estructuras son formadas por grupos de células y sus extensiones que recorren el sistema nervioso periférico (SNP), así como el SNC, convirtiéndose en vías de migración hasta alcanzar objetivos específicos o áreas especializadas dentro de estos sistemas.

La técnica de electrohilado es un método efectivo para producir andamios formados por micro- o nano-fibras a partir de soluciones poliméricas para una amplia variedad de aplicaciones en la medicina. Debido a su similitud con la matriz extracelular por la formación de fibras delgadas y continuas, alta relación superficie-volumen y la capacidad de generar diversos tamaños de poro, los andamios electrohilados han sido empleados para diversas aplicaciones en la ingeniería de tejidos. Resultados previos muestran que algunos andamios de fibras electrohiladas formados por polímeros a base de proteínas, como el colágeno, son materiales adecuados para el cultivo y crecimiento de diferentes tipos de células del SNC como: células neuronales y neuroglías (células gliales). Además, sus características topográficas afectan fuertemente la forma de las células sembradas en la superficie de ellos [2].

Es necesario dar énfasis a la investigación *in vitro* de la relación que existe entre las extensiones de las células del SNC (neuritas) sobre nanofibras electrohiladas para poder avanzar hacia investigaciones más profundas que involucren la implantación de estos andamios en organismos vivos o *in vivo* de tal forma que se puedan entender los mecanismos que rigen este tipo de interacciones [2].

Actualmente las proteínas obtenidas a partir de la seda han llamado la atención como posibles candidatas para aplicaciones como sustitutos de tejido neuronal dañado, debido a diferentes razones: por su capacidad para modular sus propiedades mecánicas como la rigidez del material, por su capacidad de ser funcionalizadas por medio de biomoléculas que aumenten la similitud con

la matriz extracelular (ECM) y por su versatilidad para formar gran variedad de estructuras como películas, hidrogeles, fibras y esponjas [3].

Justificación

La regeneración dentro del sistema nervioso, tanto para el SNC como para el SNP, siguen siendo un reto para la medicina regenerativa, ya que estos sistemas tienen una limitada capacidad de autoregenerarse y además se producen déficits funcionales después de una lesión o una enfermedad neurodegenerativa.

Las lesiones y deficiencias del SNC pueden ocurrir por traumas debido a caídas, accidentes de autos, asaltos o incluso deportes del alto contacto. También las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la demencia frontotemporal son un problema de salud grave que provoca pérdida de células en regiones específicas del cerebro.

Al ocurrir una lesión o un trauma grave en el SNC surge una cascada de eventos patológicos que pueden dañar el ambiente. Las células gliales o “neuroglías”, tienen un papel vital en la regeneración del tejido neuronal posterior a una lesión, eliminando células muertas o produciendo mielina alrededor de extensiones de las células, favoreciendo la transmisión de señales en el tejido [4].

Los astrocitos (células gliales) juegan un rol importante en un cerebro saludable y también en un cerebro dañado. En un cerebro sano, los astrocitos colaboran en la sinapsis, participando en la transmisión de señales (transporte de neurotransmisores). Los astrocitos inician una de sus funciones por una herida o lesión que podría tener como consecuencia la formación de una cicatriz glial una barrera alrededor del centro de la herida que actúa como una pared contra objetos extraños que protege a neuronas sobrevivientes cercanas a la inflamación y restringe el área dañada [5].

A pesar de las ventajas que ofrece una cicatriz glial, el ambiente provocado por la cicatriz no es propicio para que los axones se regeneren. Actualmente ha cambiado el antiguo paradigma respecto al rol inhibitor de las cicatrices gliales, en realidad contienen una gran cantidad de agentes capaces de promover el crecimiento de neuritas [5]. Estos agentes son secretados no solo por los astrocitos sino por muchos tipos de células.

Actualmente los tratamientos han avanzado lo suficiente para poder salvar la vida a muchas de las víctimas, aunque todavía no para curarlas. Las terapias actuales tratan el edema agudo y alivian los síntomas, pero hasta el momento no se ha descrito ningún tratamiento integral reproducible y suficientemente fiable que restituya las funciones sensitivomotoras y viscerales perdidas [6]. La rehabilitación enseña a los pacientes a adaptarse y a vivir lo mejor posible con las consecuencias posteriores a la lesión teniendo en cuenta el área del SNC dañada y de la gravedad de la lesión.

Es necesario desarrollar MEC artificiales como sustrato sobre el cual las células neuronales puedan crecer y extenderse, de manera que sus extensiones puedan alcanzar las zonas que han sido dañadas y reestablecer la red entre las células [7].

Diferentes tipos de andamios se han investigado que propicien un ambiente adecuado para la regeneración dentro de un cerebro lesionado [1]. Las fibras electrohiladas surgen como una posible solución, ya que pueden diseñarse para proporcionar las señales químicas y físicas necesarias para ayudar en la reparación y reconexión de un cerebro lesionado [2]. El proceso de electrohilado ofrece muchas ventajas para la fabricación de una gama de variada de andamios, ajustando los parámetros del proceso. También es posible incorporar y administrar moléculas bioactivas en el andamio para cumplir requisitos específicos. Es importante mencionar que la alta porosidad de los andamios electrohilados permite el intercambio de nutrientes y desperdicios al mismo tiempo que proporcionan un microentorno tridimensional (3D) para el soporte y desarrollo celular [8].

De manera similar a las neuronas, los astrocitos también son capaces de migrar dentro de andamios electrohilados. Son capaces de penetrar fibras aleatorias o alineadas, *in vitro*. Sin embargo, la forma de los astrocitos cambia de acuerdo con la alineación de las fibras [7].

Entre los polímeros naturales, la fibroína de seda es atractiva para muchas aplicaciones biomédicas. La fibroína de seda posee muchas ventajas, que incluyen; propiedades mecánicas adecuadas, es de fácil manejo y procesamiento, sus propiedades estructurales pueden ser ajustadas, es biodegradable y es estable a cambios de temperatura [9].

Por lo tanto, en este estudio se propone utilizar andamios electrohilados de fibroína de gusano de seda que en un futuro podrían reconstruir la red o circuito celular como una prometedora estrategia en la regeneración de sitios lesionados o dañados dentro del SNC.

Marco teórico

Ingeniería de tejidos y Medicina Regenerativa

La medicina regenerativa, según el Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus siglas en inglés), es el campo que involucra “la intervención para mejorar la capacidad de autocuración del cuerpo humano mediante el uso de andamios, moléculas biológicamente activas y componentes celulares, o combinaciones de estos componentes” [1].

Hay muchos enfoques dentro de esta disciplina: ingeniería genética de organismos para la implantación de células modificadas, diseño “bottom-up” (de abajo hacia arriba) y síntesis de constructos, obtención de matriz extracelular por descelularización y métodos de regeneración [1]. La ingeniería tisular es un gran subcampo de la medicina regenerativa que se refiere a un enfoque combinatorio de los componentes mencionados anteriormente en un tejido funcional o “Unidad” de tejido *in vitro* [1].

La ingeniería tisular abarca el desarrollo de biomateriales, lo que da como resultado materiales novedosos y biocompatibles adecuados para interactuar con tejidos vivos. La utilización de los biomateriales como soporte o andamios para las células durante el cultivo *in vitro* permite el desarrollo de modelos de tejidos en 3D. Varios modelos apuntan a la reconstrucción de estructuras anatómicas específicas del SNC como la corteza cerebral, el nervio óptico y el tejido de la médula espinal [1].

Fibras de Seda

La seda es muy reconocida por poseer algunas de las propiedades más deseables de las fibras textiles: finura, resistencia, elasticidad, capacidad de teñido, tonos profundos, suavidad, flexibilidad, y brillo. Es la única fibra natural disponible comercialmente en forma de filamento continuo y es producida por la larva de los gusanos de seda [2]. La principal especie de gusanos de seda domesticados es el *Bombyx mori* (*B. mori*); las especies de gusanos de seda salvajes incluyen *Antheraea pernyi*, *Antheraea yamamai*, *Antheraea mylitta*, *Antheraea assama*, *Antheraea proylei* y *Philosamia Cynthia ricini*. También, se clasifican en razas geográficas en función de su origen, es decir; japones, chino, europeo, coreano y tropical. Entre las especies de gusanos de seda, el gusano de seda “*B. mori*”, es la especie comercialmente más utilizada. Además, las técnicas para su crianza, mantenimiento, preservación, procesos de enrollamiento y tejido, ya han sido bien definidos [11]. La fibra de seda derivada de *B. mori* tiene una estructura de núcleo y cubierta, se compone principalmente de dos proteínas macromoleculares: fibroína de seda (FS) y sericina de seda (SS) (Figura 1). SS es un grupo de proteínas de seda adhesivas que se sintetizan en la parte media de las glándulas de seda de los gusanos de seda y se almacenan como una solución acuosa hasta que hilan con un rango de tamaño de 65 a 400 kDa. SS envuelve la fibra de fibroína con capas adhesivas sucesivas, que ayudan en la formación de un capullo. SS constituye el 20-30 % del peso del capullo y asegura la cohesión del capullo pegando los hilos de seda [11].

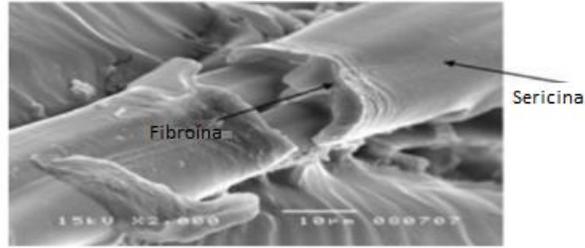


Figura 1. Fibra de seda, compuesta por fibroína y sericina. Imagen de microscopía SEM x 2000 [3].

La conformación molecular de la proteína SS está compuesta de estructuras “random coil” u ovillo aleatorio y lamina-β, con un gran número de aminoácidos hidrofílicos como: serina, tirosina, ácido glutámico, ácido aspártico y lisina. La mayoría tienen grupos laterales polares fuertes como los grupos hidroxilo, carboxilo y amino, que causan su alta hidrofiliidad [11].

Fibroína

La fibroína se secreta por la glándula posterior de los gusanos de seda y la sericina se secreta por su glándula media y anterior de los gusanos. Durante el hilado, las larvas secretan dos hebras gemelas de fibroína muy delgadas (~ 10 µm de diámetro) de las dos glándulas de seda exocrinas (alineadas en ambos lados del cuerpo) a través de las hileras, que las unen simultáneamente con la sericina [11].

La FS es el componente principal (alrededor del 72-81 %) del capullo y el 19-28 % restante es SS. Al ser una glicoproteína hidrófoba, la fibroína es insoluble en agua. Contiene una gran cantidad de enlaces de hidrógeno. La composición molecular y la orientación hacen que esta proteína forme una estructura semicristalina que contiene dos fases: lámina-β antiparalela cristalina altamente ordenada, separada por espaciadores de lámina-β menos ordenada. La parte cristalina contribuye a la fuerza y dureza, y la parte no cristalina aporta flexibilidad y elasticidad a la fibra [11].

La FS es una proteína heterodimérica de 350 kDa [11]. La fibroína de seda se secreta como un complejo de tres proteínas distintas: la cadena pesada (H-fibroína), la cadena ligera (L-fibroína) y una glicoproteína (P25), que está unida a ambas cadenas por interacciones no covalentes y se mantienen en una relación molar de 6:6:1, respectivamente [11]. La determinación de la composición de aminoácidos de la cadena H-Fibroína mostró que la glicina, alanina y serina (figura 2) forman más del 80 % de la proteína [11].

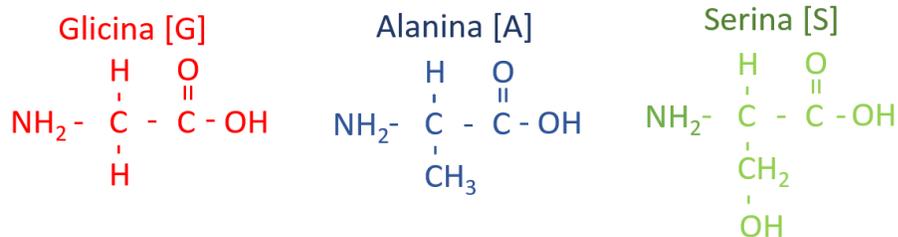


Figura 2. Principales Aminoácidos que componen a la proteína fibroína.

Además de la estructura primaria, las estructuras secundarias y terciarias de una proteína juegan un papel importante en la determinación de sus propiedades. El dominio hidrofóbico de la proteína consiste en secuencias de aminoácidos repetidas que forman las láminas- β y se ensamblan así mismas en nano-cristales a través de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas. La región hidrófila insertada entre estos dominios hidrófobos forma la región amorfa y está presente en conformación ovillo aleatorio. Esta conformación le proporciona elasticidad a la seda [3]. El arreglo espacial, la distribución, el número y el tamaño de las regiones cristalinas y no cristalinas determinan las propiedades mecánicas de la seda [11].

Diversos tipos de materiales han sido utilizados en la reparación de tejido dentro del sistema nervioso, tanto en el SNC como en el SNP. En particular, los polímeros han predominado debido a sus propiedades físicas, químicas, mecánicas y biológicas intrínsecas, en comparación con otros biomateriales como metales o cerámicos. Sin embargo, estas características cambian dependiendo el tipo de polímero. El éxito de un material no sólo reside en su capacidad para permitir el crecimiento o reproducción de las células sino en un conjunto de elementos que promuevan la regeneración y estimulación de la integración del elemento junto con el tejido saludable [12].

Dentro de los polímeros sintéticos utilizados en ingeniería de tejidos para tejido neuronal se encuentran PLA, PGA, PLGA, PEG y pHEMA. Pueden ser considerados biodegradables o no biodegradables. Se han utilizado como plataforma para cultivo *in vitro e in vivo*, comprobando su biocompatibilidad con distintos tipos de células neuronales y animales (ratas y perros, principalmente). El uso de este tipo de polímeros tiene muchas ventajas ya que tienen buenas propiedades mecánicas, son bastante flexibles ya que pueden ser combinados o copolimerizados, fáciles de funcionalizar por diversas técnicas e incluir biomoléculas que aumenten sus propiedades. Además pueden ser procesados mediante diversas técnicas como: hilado mojado, liofilización o electrohilado. A pesar de lo anterior, aún existen algunas dudas sobre su toxicidad dados los monómeros residuales de una polimerización incompleta, así como los subproductos de la degradación y plastificantes [12].

Otro tipo de polímeros sintéticos que se han utilizado son los polímeros conductores eléctricos como PPy, PANi, PEDOT. Incluso se ha utilizado cerámicos conductores como el grafeno y el fosforo de indio. Cabe resaltar que el sistema nervioso opera a través de una delicada red de señales eléctricas para la comunicación de las neuronas con ellas mismas y otras células. Idealmente un andamio para aplicaciones neuronales debería de poseer propiedades eléctricas para mejorar la proliferación y migración de las células neuronales. Por lo tanto, un polímero conductor podría realizar esta función del tejido neuroal y facilitar la reconstrucción de las conexiones neuronales. Aunque hay que considerar que el uso de este tipo de materiales como biomateriales aún permanece en estudio ya que no se degradan *in vivo* lo que podría inducir a inflamación crónica, producir reacciones inmunogénicas lo que requeriría cirugías y tratamientos adicionales. Es por ello que estos materiales se han mezclado con otro tipo de materiales biodegradables, en el caso de los polímeros sintéticos o naturales, combinando las características conductivas con las propiedades biológicas.

Dentro de la ingeniería de tejidos aplicada en tejido neuronal el uso de polímeros naturales es altamente benéfico debido a su alta biocompatibilidad y degradabilidad combinada con propiedades químicas que pueden ser fácilmente modificadas. Además, tienen un bajo riesgo de citotoxicidad y reacciones inmunogénicas después de la implantación en el cuerpo. Dentro de los ejemplos clásicos de estos materiales se encuentran el colágeno, gelatina, elastina, ácido hialurónico, alginato, quitosano, keratina y la seda. Estos materiales han servido como plataformas de cultivo *in vitro* exitosas, pero se sabe que tienen una tasa liberación rápida de las biomoléculas con las que llegan a ser cargados y se degradan rápidamente, lo que no permite un adecuado tiempo para que haya adecuada adhesión y crecimiento celular [13]. El colágeno es un biopolímero que ha sido aprobado para estudios clínicos orientados a la regeneración de nervios del SNP. Sin embargo, carece de buenas propiedades mecánicas, muy sensible a los cambios térmicos y es muy difícil el procesamiento de este material.

La fibroína de seda es un biomaterial que no causa reacción inmunitaria, ha sido utilizado clínicamente para hacer suturas durante décadas. Pierschbacher y colaboradores [14], observaron que la secuencia de los aminoácidos Arg-Gly-Asp en la fibronectina sirve como sitio de adhesión celular. La fibroína de seda y otros polímeros naturales cuentan con estructuras similares, especialmente la arginina en ciertas regiones de sus cadenas. Lo que le confiere ese grado de biocompatibilidad. Las fibras sólidas de fibroína pueden ser fácilmente procesadas a partir de soluciones acuosas para formar una gran variedad de materiales como películas, matrices electrohiladas, esponjas e hidrogeles [13] [15]. También ha sido utilizados para liberación de factores de crecimiento y proteínas, así como en encapsulamiento de células [13] [16]. Las fibras de seda se han utilizado para administrar adenosina para reducir las convulsiones epilépticas en ratas [17]. Otra propiedad importante de este tipo de materiales es que son capaces de degradarse mucho más lento que otro tipo de biomateriales, debido a que sus regiones cristalinas pueden configurarse mediante tratamientos con metanol u otros solventes. Independiente del tratamiento las fibras de la seda siguen siendo biocompatibles [18]. Los materiales como colágeno y fibrina pierden su integridad física y se deshidratan cuando son utilizados en cultivos con PBS durante 2 semanas, sin contar que no han sido sometidos a degradación mediante enzimas (proteasas, quimotripsina alfa) [13]. El módulo elástico de la fibroína (4.8 – 400 kPa) son comparables a los módulos de las células neuronales (0.5-1.6 kPa) así como a otros tipos de biomateriales como fibrina, agarosa y colágeno (3-80 kPa, 5-20 kPa y 1.8 kPa, respectivamente) [13].

Electrohilado

El proceso de electrohilado se ha utilizado como una técnica de procesamiento eficiente y de bajo costo para fabricar nanofibras para una gran variedad de aplicaciones, especialmente en los campos farmacéutico y médico, incluyendo su uso en los vendajes para heridas, la filtración y los sistemas de administración de fármacos, así como los andamios para ingeniería de tejidos. Las matrices (mats) fibrosas producidas se pueden usar como medios filtrantes, soportes catalíticos, materiales de ropa de protección, cosméticos, sensores, nanocompuestos (aplicaciones dentales), sistemas de administración controlada de fármacos, implantes médicos, vendajes para heridas, biosensores y andamios para ingeniería de tejidos [8].

La técnica de electrohilado permite obtener membranas constituidas por nanofibras, las cuales se forman al lanzar por medio de una jeringa. Un chorro delgado de una solución polimérica viaja hacia una placa metálica o colector. Durante el proceso se aplica una diferencia de potencial entre la aguja y el colector, para producir las fibras, que se depositan al azar sobre la placa formando una malla de dimensiones adecuadas para el crecimiento celular (figura 3); esta técnica permite crear membranas porosas de diversos tipos de polímeros y con propiedades específicas [19].

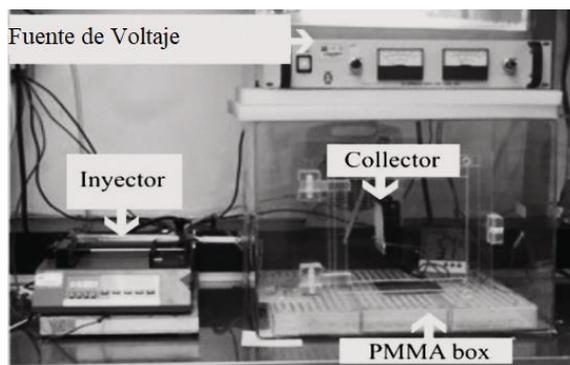


Figura 3. Configuración Básica del proceso de Electrohilado [14].

Solución polimérica

Una jeringa se llena con una solución polimérica y se somete a una diferencia de potencial de entre 10 y 30 kV. Cuando se aplica una diferencia de potencial (voltaje) entre la punta de la jeringa y el colector de fibras, se producen electrones, iones o pares de iones libres en la solución que inducen la formación de un chorro que es atraído hacia el colector. Este estímulo de carga es necesario para la conducción de soluciones en forma de chorro, el cual por evaporación del solvente se convierte en micro o nanofibras. En el caso de solventes no conductores, se incorporan sales iónicas para generar las cargas, haciendo así que la solución sea conductora [8].

Cono de Taylor

La polarización de las soluciones depende del voltaje del generador. La propulsión entre las cargas similares en la doble capa eléctrica libre actúa contra la tensión superficial y la elasticidad de la solución polimérica en la gota que se forma en la punta de la jeringa, distorsionándola en una estructura de forma cónica conocida como cono de Taylor. Por arriba de la densidad de carga crítica, el cono de Taylor se vuelve inestable y se libera en forma de un chorro de fluido que sale de la punta de la aguja hacia el colector [8].

Ajuste del chorro en presencia de un campo eléctrico

El chorro de fluido forma entonces un ligero filamento polimérico continuo cuyo diámetro depende del calibre de la aguja y del voltaje aplicado. El fluido cargado se acelera por la presencia del campo electrostático formando primero un chorro generalmente lineal y delgado el cual posteriormente se hace inestable [8].

Inestabilidad del chorro

Estos elementos fluidos se aceleran y, por lo tanto, se estiran y sucumben a una o más inestabilidades fluidas que se distorsionan a medida que crecen, siguiendo muchas trayectorias en espirales, debido a la evaporación del solvente y al campo electroestático. Esta región de variabilidad también se conoce como “whipping region” [8]. Finalmente, las fibras se depositan en el colector.

Colección del chorro

Las nanofibras polarizadas electrohiladas viajan hasta el impacto con una placa colectora de menor potencial. La morfología del colector afecta la alineación de las fibras en el andamio. Se pueden utilizar diversos tipos de colectores, incluidos un colector de tambor giratorio, una rueda giratoria con borde biselado, un colector de correa móvil, una rosca de multifilamento, barras paralelas y una placa, malla plana o curva. Se pueden optimizar una variedad de parámetros para generar nanofibras con morfología controlada, tales como:

- *Parámetros de la solución:* Peso molecular del polímero, viscosidad de la solución, tensión superficial, conductividad de la solución y efecto dieléctrico del disolvente.
- *Parámetros de Procesamiento:* Voltaje aplicado, caudal (diámetro interior de la aguja), morfología del colector y distancia entre la punta de la aguja y el colector.
- *Parámetros Ambientales:* Temperatura, humedad, corrientes de aire dentro de la cámara y presión [8].

Entre los parámetros de electrospinning que afectan la morfología de la fibra se encuentran; las bajas concentraciones que producen defectos en forma de perlas y uniones, el aumento de la concentración que reduce los defectos, los diámetros de las fibras crecen al aumentar la concentración, aumentar la conductividad eléctrica también ayuda en la producción de fibras uniformes libres de cuentas y al aumentarla se producen fibras más pequeñas (excepciones con PAA y nylon 6) [8].

No existe una relación concluyente establecida entre la tensión superficial y la morfología de la fibra. El aumento del peso molecular del polímero reduce el número de perlas y el goteo de solución en la punta de la aguja hacia el fondo del equipo de electrohilado. Por otro lado, el hilado exitoso se produce con solventes de constante dieléctrica alta. Los caudales más bajos producen fibras con diámetros más pequeños y los caudales altos pueden producir fibras que no están secas al llegar al colector (lo que genera la formación de perlas). En condiciones extremas de tensión, se observa la formación de estructuras en forma de rosario. Sin embargo, la correlación entre el voltaje y el diámetro de la fibra es compleja. Se requiere una distancia mínima entre el colector y el inyector para evitar el cierre del circuito provocando un corto circuito y se debe tener en cuenta obtener fibras secas, ya que las fibras formadas deberán tener un tiempo adecuado para solidificar y evaporar el solvente. Buchko y colaboradores [20] reportaron que a distancias extremadamente cortas (0.5 cm) las fibras pueden fusionarse al entrar en contacto sobre la superficie de colección, lo cual se debió al exceso de solvente sobre las fibras. Por otro lado, distancias muy largas producen que las fibras se extiendan con diámetros mayores ya que la fuerza electrostática es menor, provocando una disminución de la tensión sobre las fibras

[20]. Hay una distancia óptima entre la punta y el colector la cual favorece a la evaporación del solvente para cada sistema de electrohilado.

Las nanofibras se pueden sintetizar con una gran variedad de estructuras usando diferentes estrategias: nanofibras con estructuras de núcleo / coraza, fibras de interior hueco y superficies porosas [8].



Figura 4. La morfología superficial secundaria de las fibras electrohiladas [21].

Usando una aguja coaxial, es decir dos capilares concéntricos, se producen fibras huecas o fibras de dos polímeros con núcleo y coraza. Se emplean múltiples puntas de la aguja para aumentar el rendimiento. Las fibras más suaves resultan de los colectores de metal. Las fibras alineadas se obtienen utilizando un marco conductor, un tambor giratorio o un colector de bobinas en forma de rueda. Finalmente, el aumento de la temperatura causa una disminución en la viscosidad de la solución, lo que resulta en fibras de menor diámetro; mientras que el aumento de la humedad resulta en la aparición de poros circulares en las fibras [8]. Las fibras altamente porosas se obtienen por evaporación muy rápida del solvente (figura 4).

Células neuronales: Astrocitos

Células gliales del cerebro

A pesar de que el sistema nervioso central en humanos tiene millones de neuronas (las estimaciones varían), las células gliales son igual de abundantes [22] [23] [24]. Las células gliales están tanto en el SNC como en el SNP. Los astrocitos, oligodendrocitos y microglía son ejemplos de células gliales en el SNC. Las células de Schwann y satélite son ejemplos de células gliales en el SNP. Los astrocitos y oligodendrocitos surgen dentro de la capa germinal externa formada por un conjunto de células que se originan durante el desarrollo embrionario, las cuales dan origen a la piel y al tejido nervioso (ectodermo). En los hemisferios cerebrales en desarrollo, la aparición de células gliales va de la mano con la vascularización [6].

Las células gliales difieren de las neuronas

Las células gliales difieren de las neuronas de muchas maneras: tienen un solo tipo de proceso (sólo tienen dendritas, las neuronas poseen axones y dendritas), están separadas de las neuronas por espacio intercelular de aproximadamente 150-200 Å y entre sí mismas por uniones gap (las uniones gap permiten el intercambio de iones de una célula a otra). Tampoco pueden generar impulsos, pero muestran registros intracelulares uniformes y tienen un citoplasma rico en potasio. Los procesos de las estas células pasan entre los innumerables axones y dendritas en el neuropilo (la región comprendida entre varios cuerpos celulares o somas de neuronas de la sustancia gris del encéfalo y la médula espinal) que sirven para conservar la matriz de glicoproteínas del espacio extracelular del cerebro [22]. Además, los astrocitos y oligodendrocitos, dos tipos de células gliales, mantienen la capacidad de dividirse, especialmente después de una lesión en el sistema nervioso.

Antiguamente se pensaba que estas células funcionaban como tejido conectivo en los espacios intersticiales del cerebro, una especie de pegamento nervioso, en el que los elementos neuronales están dispersos. Actualmente se sabe que tienen un rol más amplio en las funciones dentro del SNC.

Astrocitos

Se reconocen dos tipos de astrocitos: protoplásmico (Figura 5A) y fibroso (Figura 5B). Los astrocitos son estrellados con filamentos largos y finos. Estos filamentos astrogliales tienen un tamaño de alrededor de 7 a 11 nm y están compuestos de proteína ácida fibrilar glial. A menudo se extienden sobre la superficie de los vasos sanguíneos como procesos o extensiones vasculares. También permanecen por debajo de la cubierta pial (envoltura muy delgada que cubre al cerebro) o en la superficie del cerebro como procesos piales [22].

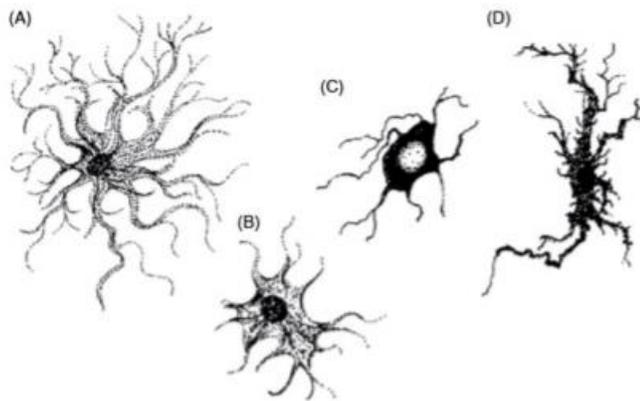


Figura 5. Tipos de células gliales en humanos. (A) Astrocito protoplásmico, se encuentran en la materia gris cerebral. (B) Astrocitos fibrosos, se encuentran en la materia blanca. (C) Oligodendrocito, se encuentra en las capas profundas de la corteza cerebral. (D) Célula microglía, se distribuye de manera uniforme y abundante en toda la corteza cerebral.

Los astrocitos protoplásmáticos aparecen en áreas de materia gris y tienen menos fibrillas que los astrocitos fibrosos. Los astrocitos fibrosos tienen numerosos filamentos gliales y aparecen en la materia blanca donde sus procesos o extensiones se expanden de forma similar a una lámina para cubrir toda la superficie de los vasos sanguíneos cercanos, formando una membrana limitante. Los procesos de los astrocitos fibrosos cubren y separan completamente la corteza cerebral como una

membrana limitante, mientras que a lo largo de las superficies de los ventrículos forman la membrana limitante glial periventricular. Las extensiones astrocíticas cubren las superficies de los cuerpos celulares neuronales y sus dendritas. Estos procesos gliales también rodean ciertas sinapsis y conjuntos separados de axones en la sustancia blanca del SNC.

Antecedentes

En el grupo de síntesis y caracterización de polímeros para usos biomédicos del Instituto de Investigaciones en Materiales, se han preparado y estudiado andamios electrohilados de diferentes tipos para su potencial aplicación en ingeniería de tejidos [8] [25].

En un estudio previo se exploró la fabricación de andamios de quitosano/fibroína de gusano de seda (QS/FS) para posibles aplicaciones en biomedicina [26]. Los resultados fisicoquímicos y biológicos mostraron que los andamios de QS/FS tienen potencial para su aplicación en ingeniería de tejidos.

La técnica de electrohilado es un método efectivo para producir fibras a microescala o nanoescala de manera continua a partir de soluciones poliméricas para una variedad de aplicaciones biomédicas. Las fibras electrohiladas forman prometedores andamios para la reparación del sistema nervioso periférico y sistema nervioso central [27] [28].

Debido a su similitud con la matriz extracelular, incluyendo fibras delgadas y continuas, con una gran cantidad de tamaños variables de poros, andamios electrohilados con diferentes topografías de superficie han sido empleados para diversas aplicaciones de ingeniería de tejidos. Los resultados preliminares han indicado que las fibras electrohiladas de varios tipos de polímeros o proteínas de matriz extracelular, sostienen el crecimiento de diferentes tipos de neuronas primarias y células gliales, además de que sus características topográficas afectan fuertemente la morfología del tejido de las células embebidas en ellos. Se ha examinado el crecimiento neurítico de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal de rata (DRGn) en nanofibras de polimetilmetacrilato (PMMA), alineadas y orientadas al azar y la relación entre neuritas y nanofibras [29].

Fibras altamente hiladas son apiladas en construcciones en tres dimensiones (3-D) con poblaciones de células gliales que podrían representar un acercamiento efectivo para reconstruir los circuitos gliales en sitios de lesiones neuronales [30]. Se ha probado que la fibroína de gusano de seda ayuda a mantener la viabilidad de células del ganglio de la raíz dorsal y células de Schwann sin afectar su fenotipo normal y su funcionalidad. Además compuestos de fibroína de seda con quitosano o poli(ácido L-láctico co-caprolactona) son capaces de tender un puente en una brecha de 10 mm de largo, en el nervio ciático de ratas [31].

Objetivos

Objetivo general

Estudiar andamios de fibras electrohiladas de fibroína de gusano de seda (*Bombyx mori*), para evaluar su viabilidad biológica con células neuronales gliales.

Objetivos particulares

1. Extraer y caracterizar mediante análisis espectroscópico (FTIR, RMN), análisis térmico (DSC, TGA) a la FS a partir de capullo de gusano de seda mediante un proceso de desgomado.
2. Encontrar los parámetros adecuados de electrohilado para obtener andamios de fibras no alineadas y alineadas de FS.
3. Caracterizar los andamios mediante análisis espectroscópico, análisis térmico, análisis de superficies (ángulo de contacto), análisis estructural (DRX), análisis morfológico (SEM) y análisis mecánico (prueba tracción uniaxial).
4. Comprobar la viabilidad celular de los andamios utilizando astrocitos protoplásmicos.
5. Comparar la viabilidad celular de andamios con fibras dispuestas aleatoriamente con la de andamios con fibras orientadas paralelamente.

Hipótesis

- Las fibras de proteína fibroína obtenidas del proceso de desgomado de los capullos de gusano de seda (*Bombyx mori*), son candidatas en aplicaciones dentro de la ingeniería de tejidos, dada su biodegradabilidad y biocompatibilidad.
- Debido a su similitud con la matriz extracelular, los andamios de fibroína fabricados mediante la técnica de electrohilado; con fibras de diámetro homogéneo, alta relación superficie-volumen y una gran cantidad de tamaños de poro, favorecen el crecimiento de diferentes tipos células gliales neuronales.
- Los andamios electrohilados de fibroína de gusano de seda (*Bombyx mori*), serán capaces de guiar el crecimiento de astrocitos y de sus extensiones a través de las nano-micro- fibras.

Materiales

Los capullos del gusano de seda *Bombyx mori* fueron proporcionados por el Centro de Biología Molecular y Biotecnología donados por la Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia. Carbonato de sodio (Na_2CO_3), ácido fórmico (88%), acetona, ácido trifluoroacético (TFA) tetrafluoroetileno (TFE), Hexafluoro-2-propanol (HFIP), N, N-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), solución "Hanks" sal y equilibrada (HBSS), dimetil sulfóxido (DMSO), todos de Sigma-Aldrich. Dispasa y suero bovino fetal (SBF) de GIBCO. Medio de cultivo Eagle Modificado: DMEM y DMEM/F-12, GlutaMAX de Dulbecco. Kit citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD®. Lauril éter sulfato de sodio (SLES) y agujas calibre 22x 1^{1/2}" (0.7 mm diámetro exterior y 0.38 mm de diámetro interior) de Farmacia París, México.

Métodos Experimentales

Obtención de la proteína fibroína

Desgomado

La obtención de la FS se realizó mediante desgomado. El proceso de desgomado se realizó para eliminar a la SS que se encuentra alrededor de las fibras de fibroína. Comúnmente realiza mediante calentamiento de los capullos de gusano de seda en soluciones de sales de sodio [1] [2]. El desgomado se realizó en muestras de 5 gr de capullos de gusano de seda, en 500 mL de solución de sales de sodio, a 80°C, durante 30 minutos, a velocidad de agitación 3 (parrilla de calentamiento y agitación IKA C-MAG HS7 digital). Posteriormente se realizaron dos lavados de 500 mL de agua destilada durante 30 minutos para eliminar los residuos de las sales de sodio (Figura 6). Se realizaron 4 experimentos a diferentes condiciones de acuerdo con la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de desgomado de capullos de gusano de seda. (*Bombix mori*).

Tipo de Sal	Concentración			
	E1	E2	E3	E4
Na ₂ CO ₃	0.25%	0.50%	0.25%	0.50%
SLES	0	0	0.50%	0.50%

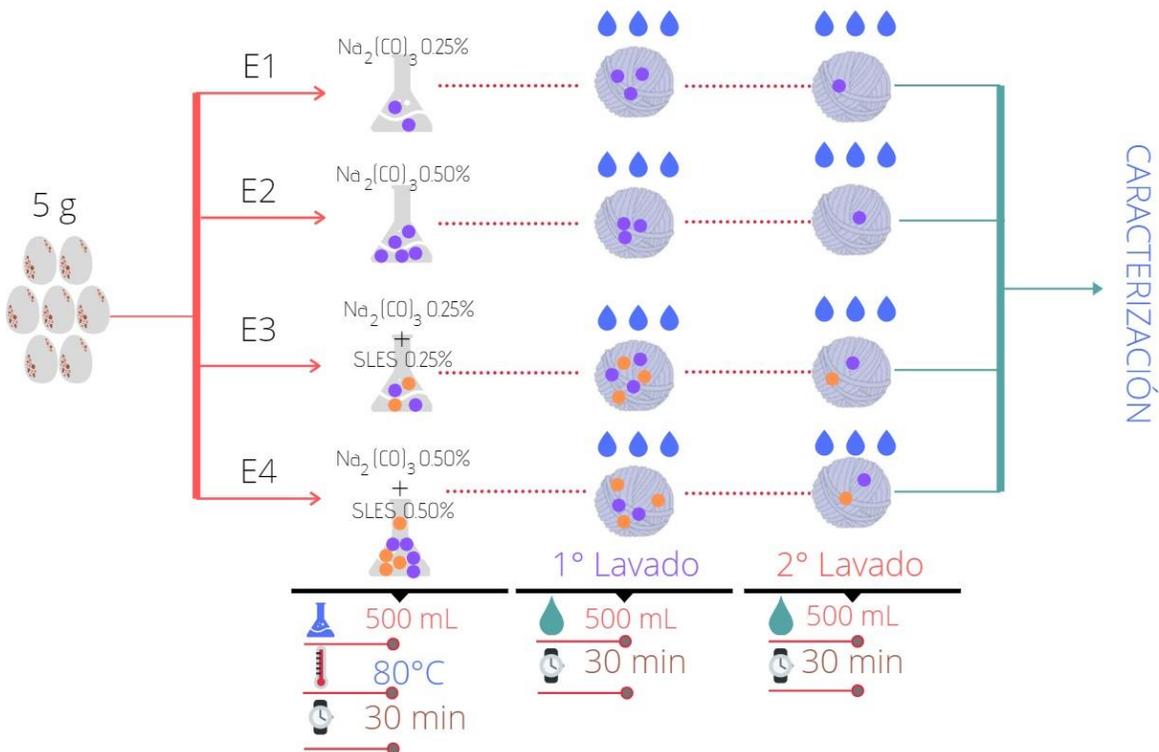


Figura 6. Diagrama del proceso de desgomado para las condiciones establecidas en la tabla 1.

Disolución de la Fibroína

Para la fabricación de andamios de fibroína por el proceso de electrohilado, es necesario disolver la proteína fibroína. Se probaron diferentes solventes, de acuerdo con la tabla 2.

Tabla 2. Solventes para las pruebas de solubilidad.

Muestra	Solvente	
1	Acetona	(≥ 95 %)
2	THF	(99 %)
3	TFA/Acetona	(50:50 %vol)
4	TFA	(99 %)
5	TFE	(99 %)
6	TFE/Agua	90:10 (%v/v)
7	TFE/Agua	80:20 (%v/v)
8	TFE/Agua	50:50 (%v/v)
9	Ácido Fórmico	(88 %)
10	Ácido Acético	(99.7 %)
11	DMF	(99.8 %)
12	DMSO	(99.9 %)
13	HFIP	(99 %)

La cantidad de muestra para todas las soluciones fue de aproximadamente 0.01 g de fibroína de seda obtenida por desgomado (FS) y el volumen de solvente fue de 3 mL para cada una de las muestras con concentración peso/volumen de 0.33 % p/v. Se realizó la prueba de solubilidad con este exceso de solvente, a baja concentración, para garantizar que la FS pueda disolverse rápidamente. Cada experimento se realizó en 2 etapas.

En la etapa 1, se pesaron 0.01 g de FS. La muestra se colocó dentro de un tubo de ensayo de 20 mL. Se adicionaron 3 mL de solvente (se tapa el tubo de ensayo para evitar que el solvente se evapore rápidamente y la concentración cambie durante la agitación). Posterior a la adición del solvente, se agitó la muestra durante 5 minutos. Si la FS se disuelve, no es necesario continuar con la segunda etapa. Si la FS no se disolvía, el tubo de ensayo se calentó con agitación durante 20 minutos a una temperatura menor a la de ebullición del solvente (segunda etapa). Se repitió el procedimiento con todos los solventes de la tabla 2 (Figura 7).



Figura 7. Proceso para las pruebas de solubilidad.

Electrohilado

Para el proceso de electrohilado las soluciones de la FS son transferidas a jeringas de plástico de 1 mL de capacidad, con agujas calibre 22 (0.7 mm diámetro exterior y 0.460 mm de diámetro interior). El equipo y la orientación para generar las fibras se muestran en la figura 6. Se fijó la jeringa en la bomba de inyección (New Era Pump Systems, Inc NE4000), se programó el flujo 0.3 mL/h y el volumen de la solución polimérica, 1 mL.

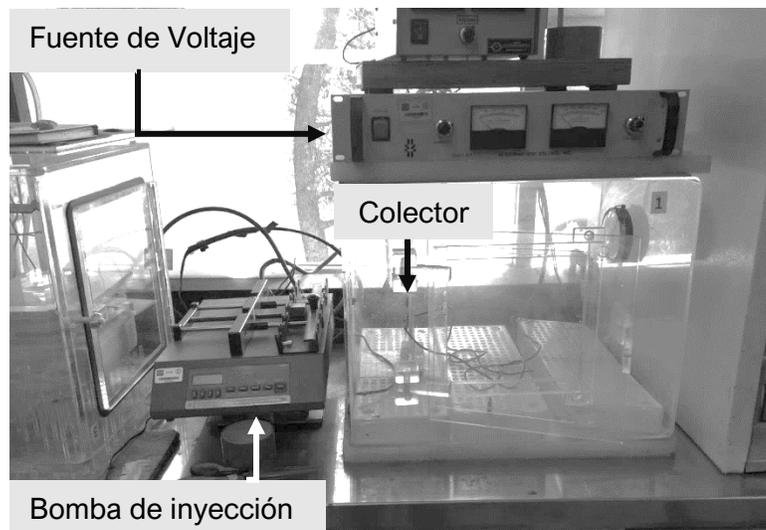


Figura 8. Equipo de electrohilado, Laboratorio de nanofibras para ingeniería de tejidos-IIM, UNAM.

Se colocó una placa colectora de aluminio repujado de 1 mm de espesor y de 8 cm x 8 cm, a una distancia aguja-colector establecida de 15 cm. Posteriormente, se conectó un electrodo a la aguja y el otro al colector. La diferencia de potencial se estableció en 15 kV (GLASSMAN HIGH VOLTAGE, INC). Se encendió la fuente de poder y la bomba para iniciar con el proceso de electrohilado.

Cultivo y sembrado celular de fibroblastos

Como primera prueba para la viabilidad celular en los andamios producidos mediante el proceso de electrohilado es necesario el aislamiento de fibroblastos. Se realizó a partir de biopsias de piel humana con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina, UNAM (CONBIOETICA09CEI06620140212). La separación de la epidermis y dermis se llevó a cabo mediante dispasa 2.4 unidades/mL (Gibco) durante 16 horas a 4°C y colagenasa 0.3 % durante 3 horas a 37°C en agitación para la obtención de los fibroblastos.

Al final de la primera digestión con dispasa, se separó la epidermis, de la dermis con unas pinzas. La dermis es colocada en un tubo de 50 mL con una solución de colagenasa en agitación a 37°C. Después de la digestión de la dermis, se filtró la suspensión obtenida con un colador de 70 µm y después se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos.

El pellet obtenido se resuspende en medio de DMEM, se pudo determinar el rendimiento por cm² y la viabilidad celular a través de un conteo de azul de tripano. Los fibroblastos obtenidos del aislamiento se congelaron en una solución de suero bovino fetal (SBF) al 90 % y DMSO al 10 %, se mantuvieron criopreservados para ser utilizados en el sembrado de los andamios.

Para el cultivo se descongelaron los fibroblastos en cultivo primario para su expansión. Los cultivos celulares se mantuvieron en medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10 % SBF y 1 % de antibiótico en incubación a condiciones estándar de cultivo 37°C y 0.5 % CO₂. El cambio de medio de cultivo se realizó cada tercer día, hasta llegar al 90 % de confluencia. Los fibroblastos adherentes se obtuvieron de las cajas de cultivo utilizando Tripsina-EDTA 0.05 %.

Los andamios de FSE son sembrados a una densidad de 35,000 células y se mantienen en cultivo durante 7 días en las condiciones antes descritas. Los ensayos de viabilidad se realizaron mediante un kit citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD®. Los andamios sembrados fueron incubados con calceína y homodímero de etidio durante una hora y posteriormente se lavaron 2 veces con PBS para retirar los residuos del kit citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD®. Posteriormente se realizaron las observaciones en un microscopio Olympus Eclipse.

Cultivo y sembrado celular de astrocitos

Se sacrificaron dos neonatos de rata (D1-D2) por decapitación. Se roció con etanol al 70 % la superficie del cráneo y realizó un corte a la altura de la sutura sagital y la línea aural de ambos lados con cuidado de no dañar el tejido bajo el cráneo. El cerebro se expuso con ayuda de pinzas. Se retiró el cerebro y se colocó en una caja Petri (60 x 15 mm) con HBSS frío. Los cerebros se llevaron a la campana de flujo laminar. El cerebelo y mesencéfalo se retiraron cuidadosamente y se cortaron en pedazos pequeños las cortezas. Se colocó todo el tejido en un tubo de 15 mL con 5 mL de tripsina 0.25 % para incubar por 25 minutos a 37 °C. Se centrifugó durante 3 minutos a 1000 rpm. Dentro de

la campana, se aspiró el sobrenadante y resuspendieron las células en 600 μ L de medio de cultivo Gibco DMEM/F-12, GlutaMAX. La suspensión de células se filtró por el *cell strainer* para recuperar la fracción filtrada. Se completó la solución filtrada a un volumen final de 4 mL de medio para sembrar en frascos de cultivo con medio precalentado. El contenido se revisó con el microscopio. Las células alcanzaron confluencia en aproximadamente 15 días. El medio de cultivo se cambió cada tercer día.

Posteriormente los andamios de FSE fueron sembrados a una densidad de 35,000 células y se mantuvieron en cultivo durante 7 días en las condiciones antes descritas con medio de cultivo Gibco DMEM/F-12, GlutaMAX suplementado con 10 % SBF y 1 % de antibiótico. Los ensayos de viabilidad se realizaron mediante un kit citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD[®]. Los andamios sembrados son incubados con calceína y homodímero de etidio durante una hora y posteriormente se lavaron 2 veces con PBS para retirar los residuos del kit citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD[®]. Posteriormente se realizaron las observaciones en un microscopio Olympus Eclipse.

Métodos de análisis y caracterización

Los métodos experimentales para la caracterización de los andamios de fibroína son los siguientes:

Análisis termogravimétrico (TGA)

Un instrumento TGA comprende una balanza térmica, un controlador de temperatura y un colector de datos. Las muestras se colocan sobre un crisol y se calentó a través de un programa de temperatura. Se utilizó una balanza térmica para medir el cambio de masa con la temperatura. Se utilizó una muestra de 10-20 mg. TGA puede alcanzar la temperatura máxima de 900–1000°C. Por lo tanto, los crisoles deben ser resistentes a altas temperaturas, así como inertes a las muestras, productos intermedios, productos finales y el gas de purga. Comúnmente, se utilizan crisoles de platino y alúmina [33].

Las muestras de FS, de FSE y de los capullos enteros se cortaron en pedazos muy pequeños para ser analizadas. El análisis se realizó en un Analizador Termogravimétrico TGA Q5000IR (TA Instruments). La prueba se realizó con una rampa de 10°C/min en una atmósfera de N₂ en un intervalo de 0-600°C. Para el análisis de los resultados se utiliza el programa TA Universal Analysis[®].

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Dos crisoles, uno con una muestra y otro con una referencia, se colocaron en el compartimiento de la muestra y se sometieron al mismo programa de temperatura. Debido a las diferentes capacidades térmicas, sus respuestas a la temperatura ambiente y, por lo tanto, a sus temperaturas, son diferentes. Un calentador en el sistema DSC calienta el crisol cuya temperatura es menor que la del otro crisol para garantizar que ambos crisoles estén a la misma temperatura. Se obtuvieron una curva DSC al trazar el flujo de calor (dH/dt o dQ/dt), medido como el eje vertical, en función de la temperatura (o tiempo) durante el experimento como el eje horizontal [33].

Las muestras de FS, de FSE y de los capullos enteros se cortaron en pedazos muy pequeños para ser analizadas. El análisis se realizó en un Calorímetro diferencial de barrido Q2000 (TA Instruments), con una rampa de 10 °C/min en una atmósfera de N₂ en un intervalo de 0-600°C, con tres ciclos. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa TA Universal Analysis©.

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia IR implica el estudio de las interacciones entre las moléculas y la luz IR. Cuando una muestra se irradia con luz IR, la luz de una cierta longitud de onda se absorbe para estimular las transiciones de energía de vibración y de rotación; Por lo tanto, las intensidades de luz transmitida de esta longitud de onda disminuyen. Varias estructuras moleculares exhiben sus propias diferencias de energía, correspondientes a diferentes longitudes de onda IR. Por lo tanto, la espectroscopia IR es adecuada para investigar estructuras moleculares. Se obtuvo un espectro de IR trazando la transmitancia o la absorbancia frente a la longitud de onda de la luz IR. Un espectrómetro IR, similar a un espectrómetro UV-Vis, contiene una fuente de luz IR, un monocromador, un compartimiento de muestra y un detector [33].

Las muestras de FS, de FSE y de los capullos enteros se cortaron en pedazos muy pequeños. Posteriormente se compactaron para ser analizadas. El análisis se realizó con un equipo Espectrómetro Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), acoplado con el accesorio de diamante para reflexión total atenuada (ATR) Smart Orbit, a temperatura y presión ambiente.

Resonancia magnética nuclear (RMN)

En un campo magnético externo, el núcleo de un átomo puede existir en varios estados de espín; por lo tanto, puede tener diferentes energías. Cuando este núcleo se irradia con las ondas electromagnéticas de una frecuencia apropiada, absorbe la energía y salta del estado fundamental al estado excitado, produciendo una señal de resonancia magnética nuclear (RMN). Similar a la espectroscopia de luz ultravioleta visible (UV-Vis) e infrarroja (IR), la espectroscopia de RMN es también un tipo de espectroscopia de absorción. La única diferencia es que en la espectroscopia de RMN, los núcleos absorben la energía de radiofrecuencia (RF) y muestran transiciones de espín; en la espectroscopia UV-Vis, los electrones absorben la luz en el rango de UV-Vis y exhiben transiciones electrónicas; mientras que en la espectroscopia infrarroja (IR), las moléculas absorben la luz IR y exhiben transiciones vibracionales y rotacionales [33].

Angulo mágico de giro (MAS)

La interacción entre los núcleos se relaciona con la expresión $3\cos^2\beta - 1$, donde β es el ángulo entre el campo magnético β_0 y el eje de rotación de las muestras sólidas. Cuando una muestra gira a $\beta = 54.74^\circ$ con alta velocidad (típicamente 30 kHz), $3\cos^2\beta - 1 = 0$; por lo tanto, la interacción del dipolo entre los núcleos y la anisotropía de los cambios químicos desaparecen, y se registran los espectros de RMN en estado sólido de alta resolución.

Las muestras de FS, de FSE y de los capullos enteros se cortaron en pedazos muy pequeños para ser analizadas. El análisis se realizó en un Espectrómetro Bruker Avance III HD de 400 MHz, a dos velocidades de giro 5 y 7 kHz para el átomo de ¹³C (los cambios químicos ¹⁵N y ¹H dependientes de

la conformación también pueden usarse de manera similar, aunque no son tan efectivos), con una sonda especial para realizar un análisis de materiales sólidos a ángulo mágico de giro (MAS), de tal forma que se pueda observar la estructura de la proteína fibroína. Se corren dos análisis a diferente velocidad para eliminar las señales satélite, se busca el traslape entre las señales a velocidades diferentes para confirmar las señales verdaderas. Los datos se analizaron con el programa MestReNova©, para detectar las señales de los materiales analizados.

En la figura 12 se muestra el espectro ^{13}C RMN a ángulo mágico del capullo de gusano de seda a una velocidad rotación de 7 Hz, sin señales satélite, suavizado y se trazó una nueva línea de base. De esta manera se eliminó el ruido y señales que pueden interferir con el correcto análisis del espectro. Se utilizó el mismo procedimiento en los demás espectros RMN.

Angulo de contacto

De forma general, se define el ángulo de contacto como el ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con una superficie sólida. El valor de este ángulo depende principalmente de la relación existente entre las fuerzas adhesivas del líquido y del sólido y las fuerzas cohesivas del propio líquido. Cuando una fase líquida y una fase sólida entran en contacto, forman una interfaz común. La mojabilidad de un determinado sólido por un líquido viene determinada por el ángulo de contacto θ . El perfil que adopta la gota es el resultado del balance entre las fuerzas de la superficie y de la interfase, que tienden a minimizar la energía superficial libre del sistema.

Por convenio general, cuando $\theta=90^\circ$; es decir, el líquido no moja al sólido. Un caso extremo ocurre cuando θ se aproxima a cero; entonces el líquido se expande sobre el sólido y se dice que el mojado es perfecto.

El método más común y conveniente para medir el ángulo de contacto es el método de la gota fija. Este método involucra colocar una gota del líquido, aproximadamente $5\ \mu\text{L}$, en la superficie sólida y se mide el ángulo entre la base de la gota y la tangente de la frontera de la gota mediante análisis de imagen. Por lo tanto, este método se llama ángulo de contacto estático, el cual es ideal para sólidos que tienen diferentes propiedades en diferentes superficies y se puede medir el promedio de θ en función del tiempo y la temperatura. En el método de ángulo de contacto dinámico, el volumen de la gota se va incrementando en pasos mientras θ se va midiendo hasta que la meseta llamada “ángulo de contacto en avance” (θ_A) se alcanza. De forma similar, el “ángulo de contacto en retroceso” (θ_B) se determina inmediatamente por la medición de θ equivalente al volumen del líquido retirado de la gota. La histéresis del ángulo de contacto es la diferencia de $\theta_A - \theta_B$ donde el ángulo de contacto de avance es significativamente más grande que el de retroceso. Debido al ángulo de contacto de histéresis, una gota de líquido puede permanecer sujeta en un plano inclinado, a pesar de la gravedad.

Para la prueba se recortaron tres secciones de $1\ \text{cm}^2$ como muestras para analizar. Se utilizó un goniómetro Ramehart, inc. Modelo 100-07-00, adaptado con un sistema óptico para observar la interacción de la gota de agua con la superficie del andamio, el análisis de imágenes se realiza mediante el programa ImageJ© para determinar el ángulo de contacto.

Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es una herramienta de investigación extremadamente útil; se utiliza para medir las características microscópicas, la clasificación de las fracturas, los estudios de microestructura, las evaluaciones del recubrimiento de poco espesor, el examen de la contaminación de la superficie y el análisis de fallas en los materiales. En contraposición a la microscopia óptica, en la cual la superficie es expuesta a la luz visible incidente, el microscopio electrónico de barrido dirige un haz de electrones enfocado a un punto de la superficie de una muestra y recoge las señales electrónicas emitidas por la muestra.

El análisis se realizó para observar la morfología, la distribución del diámetro de fibras y para obtener una aproximación de la superficie porosa. Para este análisis, se preparó un andamio de 4x3 mm, sobre un portamuestras de acero inoxidable. Posteriormente se recubrió la muestra con oro mediante un equipo JEOL JPC-1100 y se observó en el microscopio JEOL Field Emission JSM-7600F. La medición del diámetro de fibras se realizó con el programa ImageJ©

Para el cálculo del diámetro de las fibras y los histogramas se usaron los programas ImageJ y RStudio, a dos puntos x5000 aumentos de cada uno de los experimentos del tercer diseño experimental.

Difracción de rayos X

La técnica de difracción de rayos X sobre un sólido cristalino consiste en hacer incidir un haz de rayos X sobre la superficie de un material. Puesto que algunas de las longitudes de onda de los rayos X son aproximadamente similares a la distancia interplanar en sólidos cristalinos, se producen picos de difracción de intensidades variables asociados, debido al arreglo periódico de los átomos en el cristal y su simetría. Este proceso tiende a aumentar la intensidad de la radiación dispersada en ciertas direcciones debido a la interferencia constructiva que se controla por la periodicidad, simetría y la interferencia destructiva en todas las otras direcciones. Las mediciones de las direcciones donde existe interacción constructiva permiten la determinación de las propiedades fundamentales del estado cristalino, la magnitud de la celda unitaria del cristal y su simetría. En forma general, los polímeros se pueden clasificar en amorfos y semicristalinos. Los polímeros amorfos incluyen polímeros vítreos con cadenas estéricamente impedidas como el policarbonato o polímeros entrecruzados como los termoestables (epóxidos) y elastómeros (caucho). Los polímeros semicristalinos incluyen los termoplásticos (polietileno), elastómeros termoplásticos (acetato de etileno y vinilo) que tienen enmarañamientos físicos y no enlaces, y cristales líquidos (como algunas poliamidas aromáticas, Kevlar en solución).

Se cortaron pedazos en forma cuadrada de los andamios electrohilados de Fibroína de aproximadamente 1 cm², los cuales se analizaron en un equipo XRD (Siemens D-500, Cu K_α radiación; $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$).

Pruebas mecánicas

Tensión uniaxial

La tensión uniaxial, determina la fuerza y la deformación por medio del estiramiento de una probeta estandarizada. La tensión uniaxial se define como la relación de la fuerza (F) que se aplica sobre una probeta con un área (A), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

La prueba de tracción uniaxial consiste en deformar de manera controlada a una probeta y registrar la fuerza y desplazamiento resultantes. Se aplica una carga en dirección longitudinal y se registran los desplazamientos del actuador, así como la respuesta en fuerza de una celda de carga.

Para obtener la curva de esfuerzo contra deformación se midió el ancho y espesor de la probeta previo a la prueba, con los cuales se calculó el área transversal y posteriormente el esfuerzo normal a la dirección de la carga. Adicional a esto, se midió la longitud inicial de la probeta, así como su cambio a lo largo de la prueba para obtener la deformación.

Para este trabajo se utilizó un probador de tracción uniaxial (figura 9), el cual realizó la prueba a velocidad constante de 0.16 mm/s y con una precarga en la muestra de 111N. Además, la adquisición de los datos se llevó a cabo de un instrumento virtual programado en LabView y su procesamiento en el software Mathematica. Se estudiaron diez probetas de los andamios de fibroína y su comportamiento fue analizado con el modelo de Mooney Rivlin [34], con el cual se obtuvieron las propiedades mecánicas de las muestras.



Figura 9. Probador de tracción uniaxial, Laboratorio de mecánica y micro-mecánica de sólidos-IIM, UNAM.

Resultados

Caracterización de la fibroína de seda

Posterior al proceso de desgomado, cada una de las muestras obtenidas de los experimentos de desgomado descritos en la tabla 1, se analizaron mediante espectroscopías FTIR y MAS-RMN de ^{13}C así como análisis térmicos por DSC y TGA, con el objetivo de corroborar el correcto proceso de desgomado y, por lo tanto, la eliminación de la SS que cubre a la FS.

Caracterización mediante FTIR

La espectroscopia de infrarrojo FTIR se utilizó para detectar las señales de los grupos funcionales de los polímeros existentes en el capullo, así como de la FS obtenida mediante el proceso de desgomado. Las tablas 3 y 4 muestran las asignaciones de las bandas de los grupos funcionales mostradas en las Figuras 10 y 11.

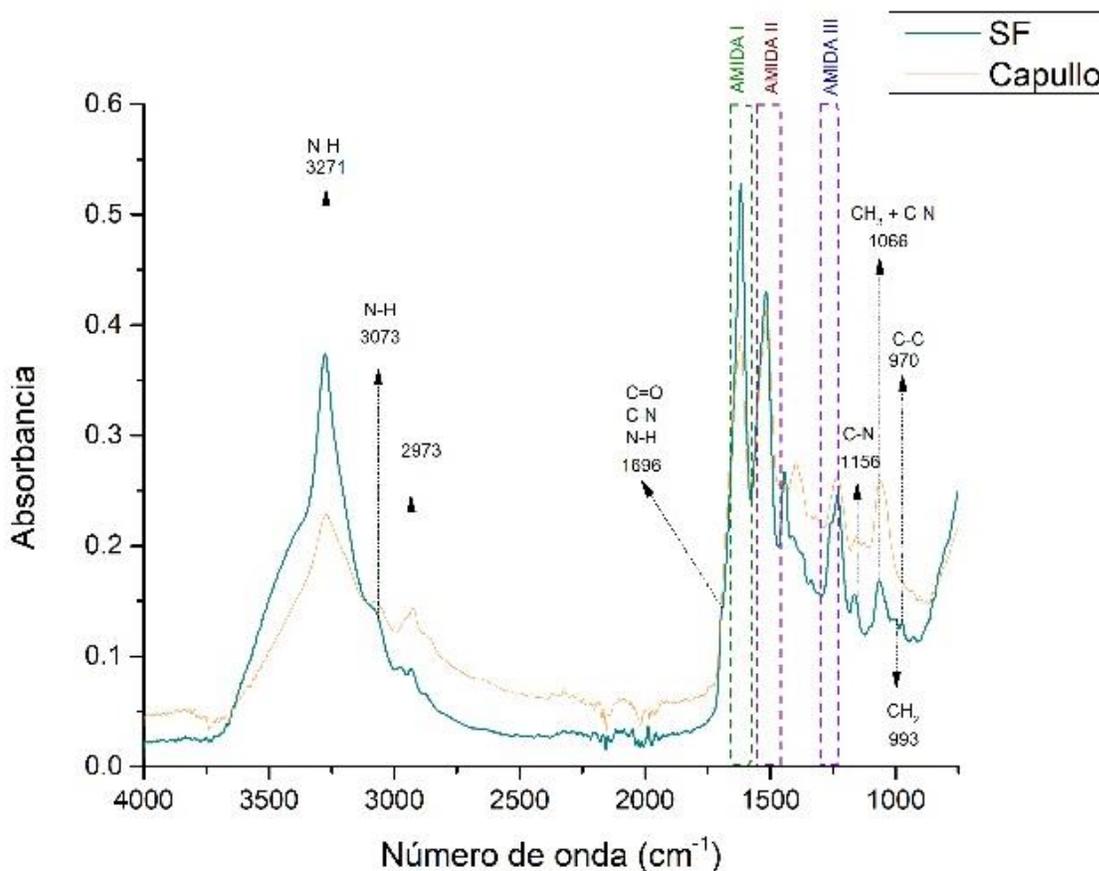


Figura 10. Espectro FTIR de absorbancia de la fibra de seda del capullo *Bombix Mori* (en verde) y la SF (en rosa) en la región de 4000 cm^{-1} - 750 cm^{-1} .

Ambos espectros muestran bandas características de las amidas; A (3300 cm^{-1}), B (3070 cm^{-1}), I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$), II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$), III ($1400\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$). Las bandas en 1696 cm^{-1} , 1441 cm^{-1} , 1339 cm^{-1} , 993 cm^{-1} y 970 cm^{-1} muestran la presencia de la FS debido al proceso de desgomado.

La primera banda (1696 cm^{-1}), se origina principalmente a la tensión del enlace C=O de amida de los enlaces peptídicos de la cadena de la proteína en conformación lámina- β antiparalela, la FS se caracteriza por formar este tipo de estructuras secundarias. La segunda banda (1441 cm^{-1}), debido a la flexión del grupo metilo ($-\text{CH}_3$) de alanina, uno de los aminoácidos de mayor abundancia de la FS. La tercera banda (1339 cm^{-1}), dada la flexión del metileno ($-\text{CH}_2-$) en la cadena $-\text{Gly-Ala}-$, cadena principal de la FS. Las bandas pequeñas en 993 cm^{-1} y 970 cm^{-1} surgen debido a la presencia de las láminas- β que están principalmente compuestas por segmentos de los aminoácidos alanina y glicina ($-\text{Gly-Ala}-$).

La banda alrededor de 1400 cm^{-1} (1396 cm^{-1} , en tabla 3) y una banda mucho más pronunciada alrededor de 1070 cm^{-1} (1066 cm^{-1} , en tabla 3), muestran un alto contenido de grupos ácido carboxílico e hidroxilo ligado a grupos alquilo, grupos laterales de los aminoácidos ácido aspártico y serina, principales constituyentes de la SS [35]. La banda alrededor de 1400 cm^{-1} , no se observa en el espectro de la FS, lo que implicaría que se redujo el contenido de SS.

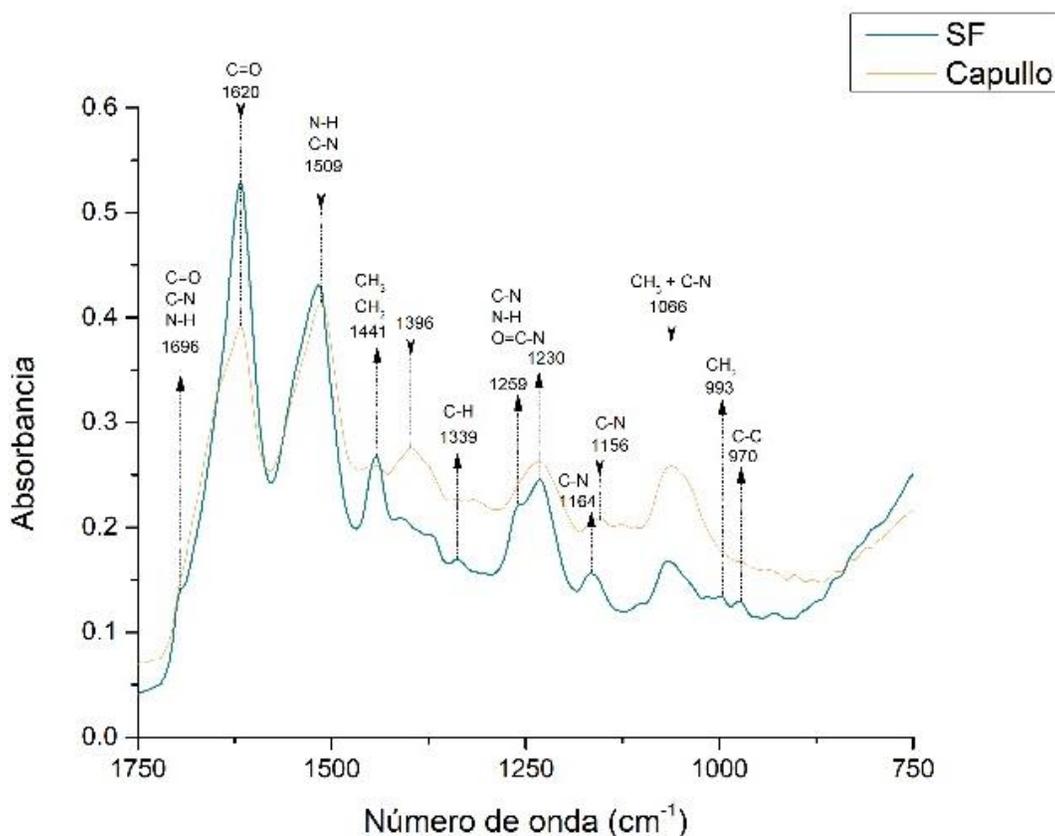


Figura 11. Ampliación del Espectro FTIR de la fibra de seda del capullo *Bombyx Mori* y la SF en la región 1750 cm^{-1} - 750 cm^{-1} .

Tabla 3. Identificación de las bandas del FTIR de la fibra del capullo de gusano de seda, *Bombix mori*.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación	Referencias
3271	Tensión del enlace N-H (Amida A)	[36]
3073	Tensión del enlace N-H (Amida B)	[36]
2973	Tensión del enlace C-H (aminoácidos libres)	[37]
1620	Tensión del enlace C=O y contribuciones menores de los enlaces C-N y N-H. (Amida I, conformación lámina β)	[37], [38]
1509	Flexión del enlace N-H junto con flexión del enlace C-N. (Amida II, conformación lámina β)	[39]
1396	Flexión del grupo CH ₂ -OH (Aminoácido serina) y/o Tensión simétrica en el enlace C=O	[39], [40], [41]
1230	Amida III en conformación espiral al azar	[36], [38]
1156	Tensión del enlace C-N	[38]
1066	Tensión del enlace C-O junto con tensión en el enlace N-C (Aminoácido serina)	[39]

La presencia de una capa de SS sobre las fibras de FS obtenidas después del proceso de desgomado enmascararía dos bandas distintivas de la FS a un bajo número de onda. Estas bandas, 993 cm⁻¹ y 970 cm⁻¹, características de la cadena -Gly-Gly- y -Gly-Ala-, respectivamente, sugieren una presencia pequeña de la capa de SS [35].

Tabla 4. Identificación de las bandas del FTIR de la FS.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación	Referencias
3273	Tensión del enlace N-H (Amida A)	[36]
3063	Tensión del enlace N-H (Amida B)	[36]
2937	Tensión del enlace C-H (aminoácido Glicina)	[37]
1696	Tensión del enlace C=O y contribuciones menores de los enlaces C-N y N-H (Amida I, conformación lámina β antiparalela)	[38], [39]
1620	Amida I en conformación lámina β antiparalela	[38]
1517	Flexión del enlace N-H junto con flexión del enlace C-N. (Amida II, conformación lámina β)	[38]
1441	Flexión del grupo CH ₃ (aminoácido alanina)	[38]
1339	Flexión del -CH ₂ - de la cadena -Gly-Ala-	[39]
1231	Amida III conformación espiral al azar	[38]
1164	Tensión del enlace C-N (Aminoácido tirosina)	[38]
1032	Tensión del grupo CH ₃ (flexión balanceo en plano) junto con tensión del enlace C-N	[38]
993	Flexión balanceo en plano del -CH ₂ - de la cadena -Gly-Ala-	[38], [39]
970	Tensión del enlace -C-C- en las cadenas -Gly-Gly- y -Gly-Ala-	[38]

Caracterización mediante RMN-Ángulo Mágico

La espectroscopía de ¹³C RMN en estado sólido a ángulo mágico se utilizó para determinar los desplazamientos químicos de los átomos de carbono de la cadena principal de los polímeros que conforman al capullo de gusano de seda y a la FS obtenida mediante desgomado. La cadena principal del capullo de gusano coincide con la cadena de la SS, dado que la SS rodea a las fibras de fibroína. La SS está compuesta principalmente por los aminoácidos Serina, Glicina y Ácido Aspártico, Treonina y Ácido Glutámico. Para este estudio se consideró al péptido Ser-Gly-Asp-Thr como la cadena principal, dada la abundancia de esta secuencia de aminoácidos en la SS [42]. Para la FS se consideró al péptido Gly-Ala-Ser como la cadena principal.

Secuencia de grupos en la Sericina:

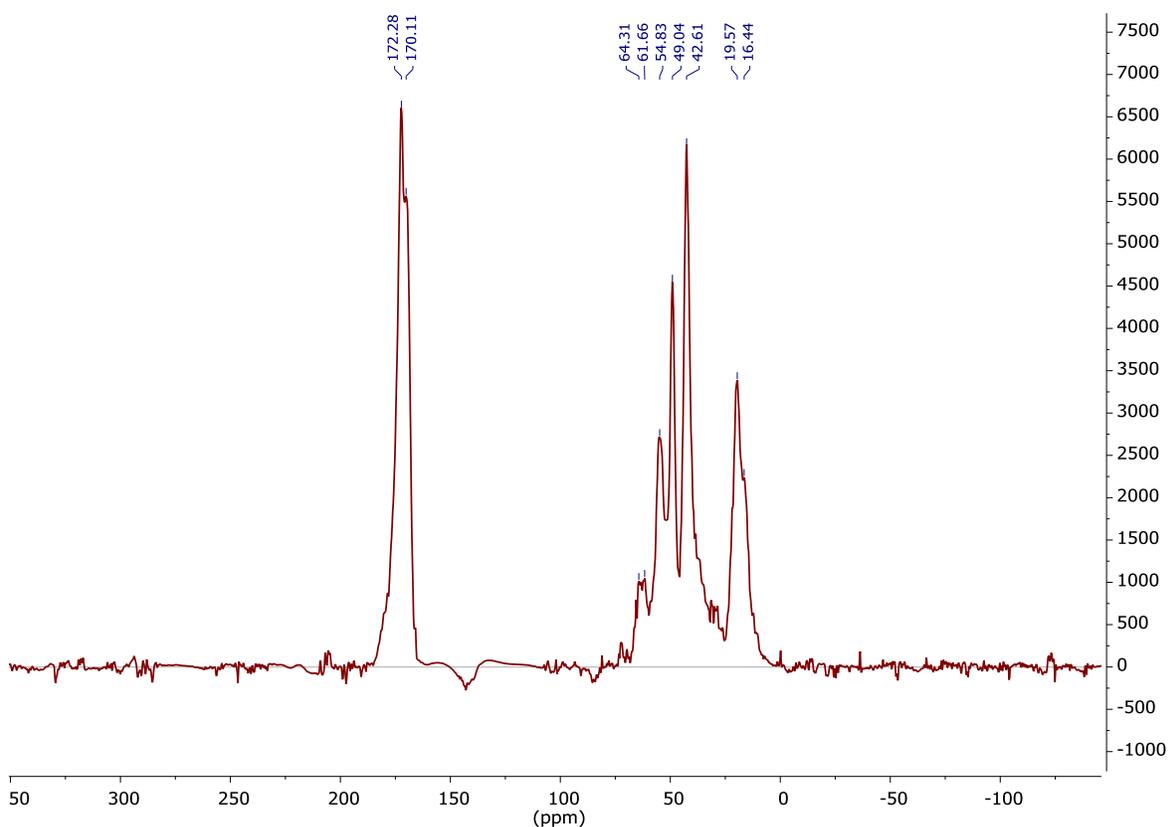
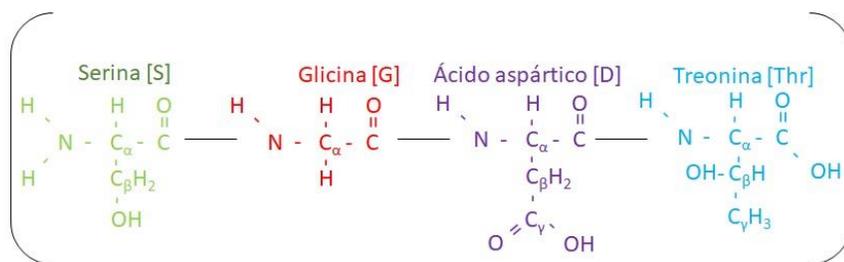


Figura 12. Espectro ^{13}C RMN a ángulo mágico de la fibra del capullo de gusano de seda, *Bombix mori*.

La tabla 5 muestra los desplazamientos químicos para los aminoácidos de la cadena de SS en conformaciones lámina- β , hélice- α y ovillo aleatorio, obtenidos de la tabla 7 de la referencia [43], a la cual se extrajo 2.5 ppm [44] para poder tomar los datos correctos de los desplazamientos químicos.

De acuerdo con la tabla 6 y tomando como referencia la tabla 5, las primeras dos señales a campo bajo alrededor de 170 ppm corresponden a la señal del grupo C=O de los aminoácidos Gly, Ser y Thr en conformación lámina- β y ovillo aleatorio. La señal en 61.66 ppm corresponde al C_β de Ser en

conformación ovillo aleatorio. La señal en 54.83 ppm corresponde al C_{α} de Ser en conformación Lamina- β y Asp en Hélice- α . La señal en 49.04 ppm podría deberse al C_{α} de Asp en conformación Lamina- β y Ovillo aleatorio. La señal en 42.61 ppm corresponde al C_{α} de Gly en conformación Lamina- β . También, se asignó la señal en 64.31 ppm al C_{β} de Ser [45]. No está claro asignar al C_{β} de Ser dado que las dos señales en el intervalo de 61-64 ppm parecen ser parte de un mismo pico. Las Señales en 19.57 y 16.44 ppm podrían asignarse a Ala, de acuerdo con la tabla 7, pero este aminoácido se encuentra en una muy pequeña cantidad dentro de SS.

Tabla 5. Desplazamientos químicos de los principales aminoácidos de la SS [43], [44].

	C=O			C_{α}			C_{β}		
	Hélice- α	Lamina- β	Ovillo aleatorio	Hélice- α	Lamina- β	Ovillo aleatorio	Hélice- α	Lamina- β	Ovillo aleatorio
Gly	173.0	170.1	171.4	44.4	42.7	43.0	-	-	-
Ser	173.4	171.1	172.0	58.4	55.0	55.9	60.6	62.7	61.5
Asp	175.5	173.0	173.8	54.2	51.4	51.7	38.0	39.8	38.4
Thr	173.4	171.2	172.2	66.4	68.3	67.6	63.1	58.6	59.1

Tabla 6. Desplazamientos químicos de las señales del capullo de gusano de seda del espectro de la figura 7.

Desplazamiento Químico (ppm)	Asignación
172.28	Ser, Gly y Thr C=O
170.11	Ser, Gly y Thr C=O
64.31	-
61.66	Ser C_{β}
54.83	Ser y Asp C_{α}
49.04	Asp C_{α}
42.61	Gly C_{α}
19.57	-
16.44	-

La figura 13 muestra el espectro de MAS-RMN de ^{13}C en de la FS obtenida mediante el proceso de desgomado con las asignaciones de los carbonos de los principales aminoácidos que la componen (alanina, glicina, sericina). Las señales de los aminoácidos principales coinciden con lo reportado por Saito y colaboradores [45], la FS toma diferentes tipos de conformaciones dependiendo de la especie de gusano, así como de las condiciones de preparación de la muestra. En particular, para la FS a partir de *Bombix mori*, adopta dos formas; Seda I (conformaciones estructurales: giros β tipo II y posible ovillo aleatorio) y Seda II (conformación estructural Lámina- β antiparalela). Las señales del espectro RMN se asignaron a una conformación lamina- β antiparalela dado que los desplazamientos químicos de los aminoácidos principales (-Gly-Ala-) se asemejan a la forma Seda II, tabla 7.

Secuencia de grupos en la Fibroína:

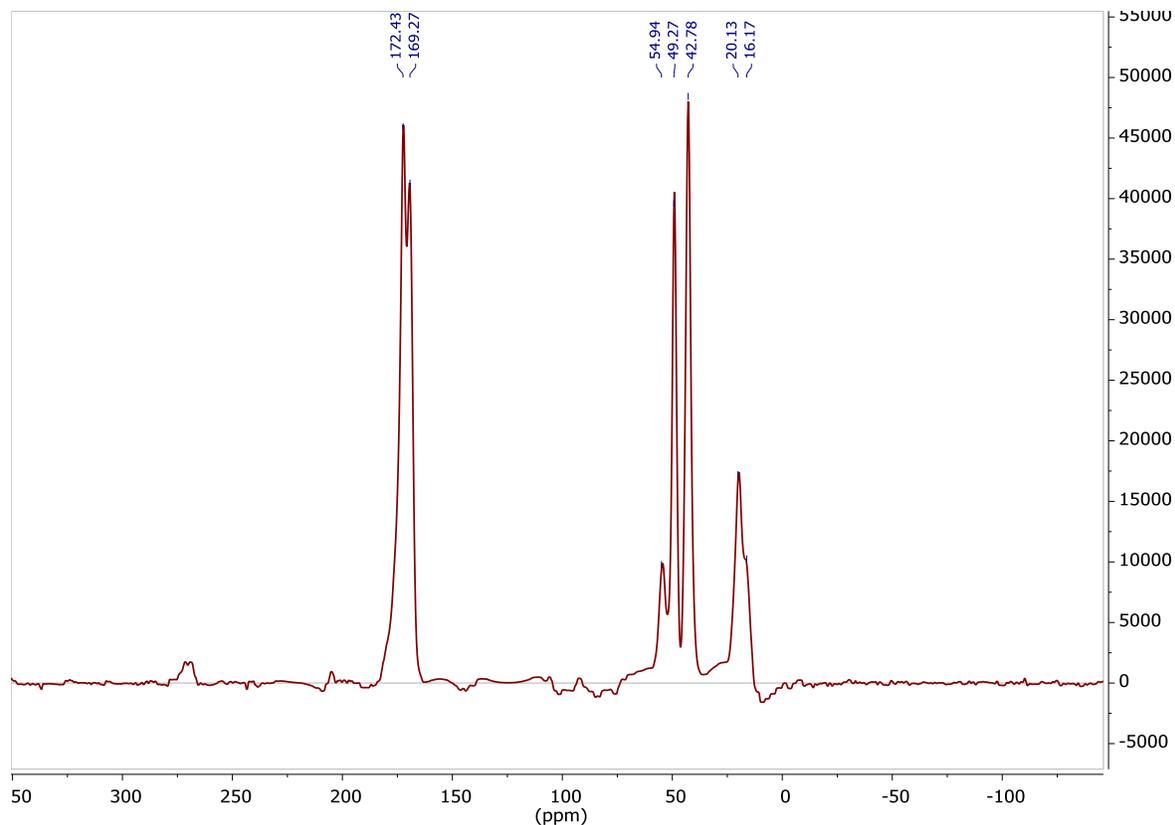
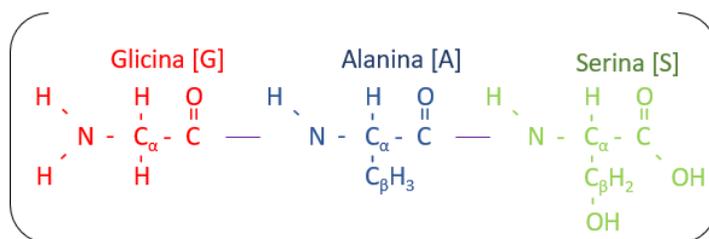


Figura 13. Espectro ^{13}C RMN ángulo mágico de la Fibroína obtenida por desgomado del capullo de gusano de seda, *Bombix mori*.

El pequeño hombro a la derecha de la señal de Ala C_β en 16.17 ppm, se asigna a la conformación hélice- α [45].

Tabla 7. Desplazamientos químicos de los principales aminoácidos de la FS [22], [23].

	C=O			C α			C β		
	Hélice- α	Lamina- β	ovillo aleatorio	Hélice- α	Lamina- β	ovillo aleatorio	Hélice- α	Lamina- β	ovillo aleatorio
ala	176.9	173.6	175.2	52.3	49.0	50.3	15.8	18.6	16.6
gly	173.0	170.1	171.4	44.4	42.7	43.0	-	-	-
ser	173.4	171.1	172.0	58.4	55.0	55.9	60.6	62.7	61.5

Tabla 8. Desplazamientos químicos de las señales del capullo de gusano de seda.

Desplazamiento Químico (ppm)	Asignación
172.43	Ala C=O
169.27	Gly C=O
63.93	Ser C _β
55.08	Ser C _α
49.22	Ala C _α
42.90	Gly C _α
20.31	Ala C _β

Caracterización térmica

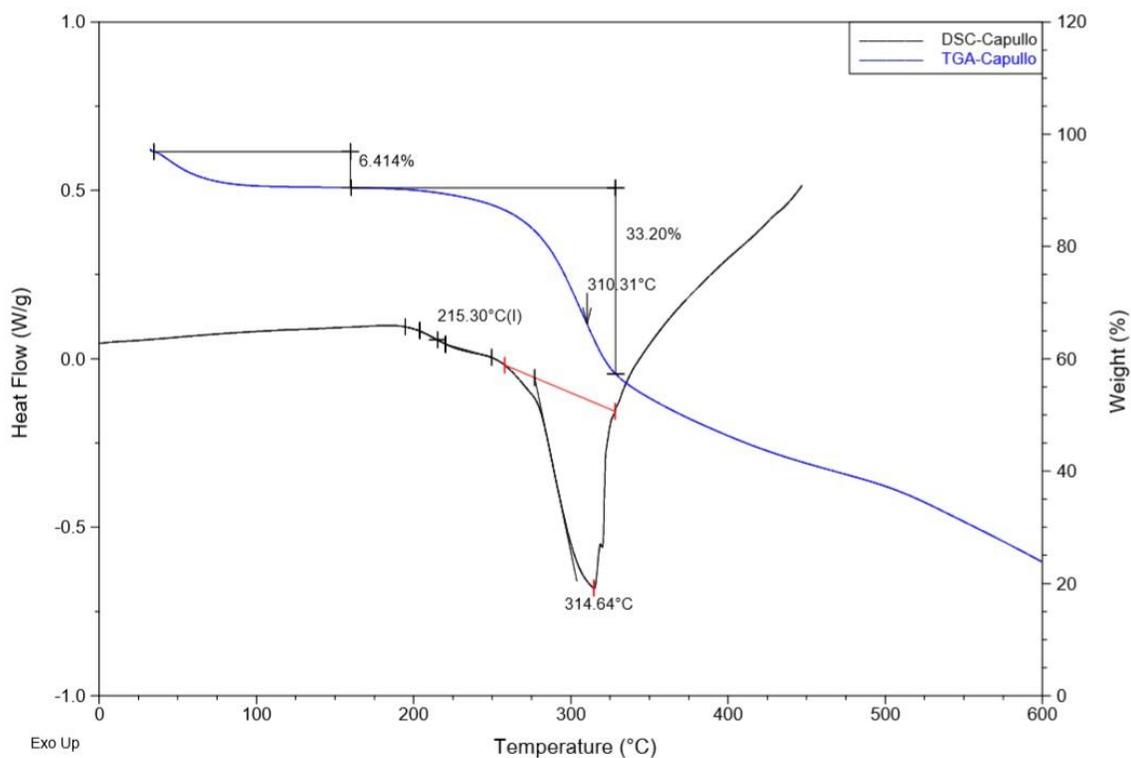


Figura 14. DSC y TGA del capullo de gusano de seda, *Bombix mori*.

La Figura 14 muestra las curvas DSC y TGA de la muestra del capullo de gusano de seda. En la línea azul (TGA) observamos el comportamiento de la degradación del capullo al aumentar la temperatura de 0-600 °C y la pérdida de masa. En la primera etapa de degradación se elimina el agua residual remanente dentro de los capullos de 0-150°C [46], la cual representa el 6% aproximadamente de la masa total, hasta alcanzar un pequeño escalón, donde la muestra es más

estable, en el intervalo de 125-175°C. En la segunda etapa observamos la descomposición gradual del capullo, esta descomposición inicia aproximadamente en 188°C y termina en 330°C aproximadamente, representando el 33% de la masa total de la muestra. En esta etapa encontramos un pico endotérmico a 215.30°C. Sin embargo, esta temperatura podría corresponder a la descomposición o degradación de la SS en conformación lámina-β, la SS en la conformación lámina-β genera un pico endotérmico a 212 °C [11]. Lo anterior debido a que la SS cubre a las fibras de FS en la fibra del capullo de gusano de seda. Otros autores se refieren a esta temperatura como una temperatura de transición vítrea (Tg), pero no está claro el origen de esta Tg [47] [48]. Posteriormente se observa la temperatura de degradación (Tdeg) a 314.64 °C de las fibras del capullo. La última etapa es llamada la parte de los residuos, materia carbonizada [46].

Cada una de las etapas tendrá una repercusión en la forma y el color del capullo, se ha reportado que, mediante el aumento de la temperatura, el capullo pasa de una coloración blanca a amarilla, continuando a negro. También su forma y tamaño se ven afectadas por el aumento de temperatura [46].

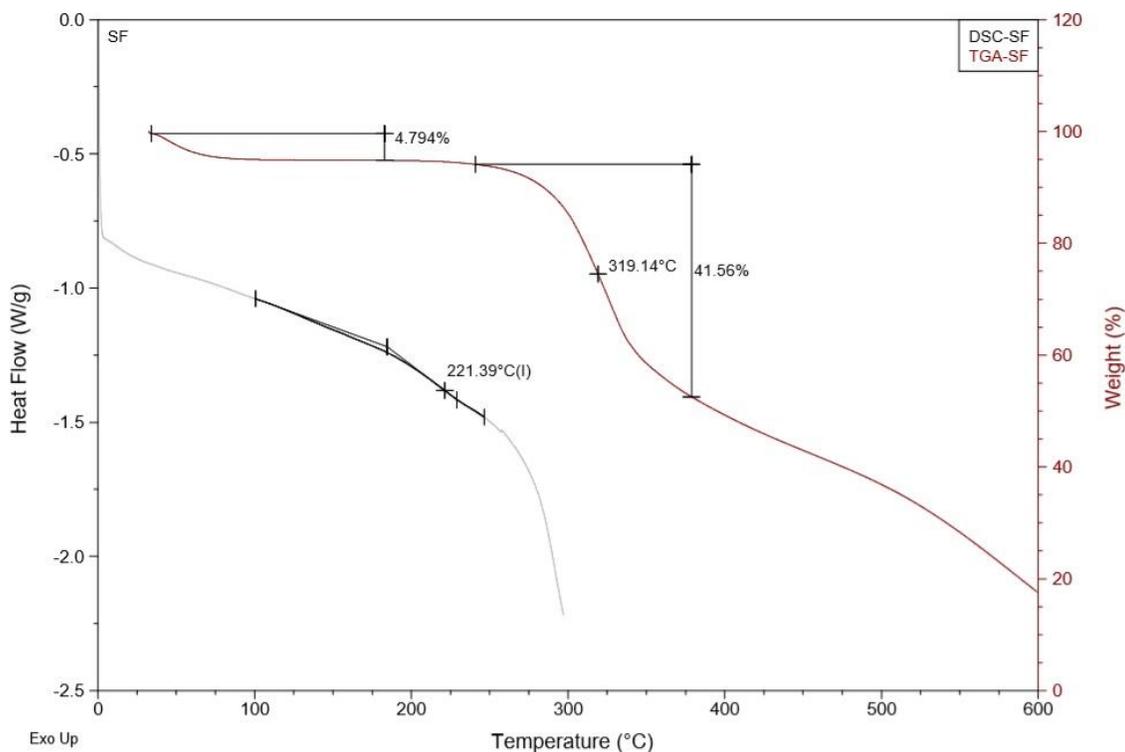


Figura 15. DSC y TGA de la FS obtenida mediante desgomado del Capullo de Gusano de Seda, *Bombix mori*.

En la Figura 15 observamos las curvas del DSC y TGA de la muestra de FS. La línea roja (TGA) muestra el comportamiento de la degradación de la proteína FS al aumentar la temperatura de 0-600 °C y la pérdida de su masa. En la primera etapa se elimina el agua residual remanente posterior al proceso de desgomado de la muestra, entre 0-125 °C, que representa el 8 % aproximadamente de la masa total, hasta alcanzar un pequeño escalón, alrededor de 100-175 °C. En la segunda etapa observamos

la descomposición gradual de la FS, esta descomposición representa aproximadamente el 42 % de la masa total de la muestra. En esta etapa encontramos la temperatura de transición vítrea (T_g) a 221.39 °C y temperatura de degradación (T_{deg}) a 319 °C de la FS. La última etapa es llamada la parte de los residuos, materia carbonizada.

La fibroína de seda muestra una notable estabilidad térmica en DSC (línea gris en figura 15), perdiendo solo agua ligada al calentar antes de la temperatura de T_g . Lo anterior se explica dado que, a la temperatura de 177°C, la movilidad de las cadenas, particularmente en las regiones amorfas, aumenta antes de un evento de cristalización. Se da un aflojamiento de las interacciones intra e intermoleculares antes de la transición vítrea a partir de 150°C, donde la movilidad de las cadenas en regiones amorfas y lámina- β aumentan, y fluyen durante la transición vítrea [11]. Esta relajación estructural permite una breve reorganización de las cadenas antes de la recristalización de las hojas beta alrededor de 215°C [11]. Sin embargo, en el análisis DSC de la figura 14, no se observa un pico exotérmico, correspondiente de la cristalización entre 212–220 °C. Además, la T_g de la figura 15 se encuentra alrededor de 221°C, un valor mucho más alto que lo encontrado por otros autores en el intervalo de 175-179°C [11]. La mayor estabilidad de las fibras de FS pudo haber sido generada dado el proceso desgomado. Al retirar a la SS se inició la reorganización de las regiones amorfas de la SF, generando más regiones cristalinas resistentes a altas temperaturas.

Pruebas de solubilidad de la fibroína

Una gran cantidad de estudios reportan diversos pasos para poder llegar a solubilizar la proteína; iniciando con una etapa de hidrólisis básica mediante el uso de soluciones básicas de LiBr a una alta concentración 9M, después se pasa por una etapa de eliminación de las sales mediante un proceso de diálisis contra agua desionizada y por último se obtienen esponjas o películas tras un proceso de liofilización [49]. Sin embargo, para evitar todos estos pasos, se realizaron pruebas de disolución de la proteína con solventes que son capaces de disolver polímeros de estructura similar, tal es el caso del nylon.

Tabla 9. Resultados para la disolución de la fibroína en diferentes solventes.

Solvente		Temperatura de ebullición (°C)	1ª Etapa ¿Disuelve?	2ª Etapa ¿Disuelve?	
1	Acetona	56	no	~51	no
2	THF	56	no	~55	no
3	TFA/Acetona	~66	no	~65	no
4	TFA	72	si	-	-
5	TFE	78	no	~76-78	no
6	TFE/Agua	~78	no	~76-78	no
7	TFE/Agua	~78	no	~76-78	no
8	TFE/Agua	~78	no	~76-78	no
9	Ácido Fórmico	101	parcial	-	-
10	Ácido Acético	118	no	~115	no
11	DMF	153	no	~140	no
12	DMSO	189	no	~150	no
13	HFIP	58.2	no	~55	no

Las figuras 16, 17 y 18 muestran algunos de los resultados de la prueba de solubilidad, los demás resultados no se agregan dado que muestran resultados similares a los observados.



Figura 18. Prueba de solubilidad con TFA



Figura 17. Prueba de solubilidad con TFE/Agua [10%].



Figura 16. Prueba de solubilidad con Acetona.

Como tal se observaron tres resultados en general; ligero hinchamiento de la FS, mayor hinchamiento de la FS y la solución amarilla. Los solventes 2, 3, 10, 12 y 13 mostraron resultados similares a 1 (Figura 16). Los solventes 7, 8, 9, 11 mostraron resultados similares que el número 6 (Figura 7). Por último, el TFA es el único solvente capaz de disolver a la FS rápidamente. La FS se disuelve al instante, formando una solución ligeramente amarilla a la concentración de 0.33%. Otros autores observaron disolución de la FS en medio ácido, utilizando ácido fórmico junto a CaCl_2 después de 12 horas de agitación [50]. El ácido fórmico no es capaz de disolver a la FS por la

presencia de muchos enlaces de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, pero la presencia de CaCl_2 tiene una propiedad caotrópica que interrumpe la estabilidad de los puentes de hidrógeno en la estructura de la FS [50]. TFA es capaz de disolver a la proteína sin el uso de una sal extra como es el caso del cloruro de calcio y la disolución sólo necesita un par de horas en agitación para asegurar que el solvente elimine los puentes de hidrógeno dentro de la estructura de la proteína (Figura 18).

Experimentos de electrohilado.

La tabla 10 muestra diferentes parámetros de electrohilado para la FS [11]:

Tabla 10. Diversos parámetros de electrohilado.

Proteína	Solvente	Concentración de la solución (wt%)	Diámetro de la fibra (nm)	Voltaje (kV)/Campo eléctrico (kV cm^{-1})	Distancia inyector colector (cm)	Razón de flujo (mL min^{-1})	Referencia
Fibroína	FA	7.5	484	24 kV	10	0.05	[51]
Fibroína	FA	6-15	30-120	15 kV	7	0.025	[52]
Fibroína	FA	3-15	30-120	15 kV	7	-	[53]
Fibroína	HFIP	7	250-530	2 kV cm^{-1}	8	2	[54]
Fibroína	Water	17-39	100-900	10-40 kV	11	-	[55]
Fibroína	FA	9-15	2-400	2-3 kV cm^{-1}	5-10	-	[56]
Fibroína	HFIP	7	250-550	2 kV cm^{-1}	8	2	[49]
Fibroína	PEO/H ₂ O	8	460	12 kV	-	0.02	[57]
Fibroína	Ác Cítrico- NaOH- HCl	30-38	1500-2500	20-40 kV	-	0.033	[47]
Fibroína	FA	12	170-250	12 kV	10	-	[58]
Fibroína	FA	12	140-590	21 kV	10	0.005	[59]
Fibroína	HFA	3-7	100-1000	1-1.6 kV cm^{-1}	10-15	-	[60]
Fibroína	FA	10-40	183-810	1-2 kV cm^{-1}	10	-	[61]

Los resultados de los autores marcados en azul, en la tabla 10, se usaron como base para generar las siguientes tablas de experimentos:

Tabla 11. Primera tabla de experimentos

Experimento	Distancia (cm)	Razón de flujo (mL/h)	Concentración (% p/v)	Diferencia de potencial (kV)
1	9	0.1	7	10
2	9	0.1	10	15
3	9	0.5	7	15
4	9	0.5	10	10
5	15	0.1	7	15
6	15	0.1	10	10
7	15	0.5	7	10
8	15	0.5	10	15

Tabla 12. Segunda tabla de experimentos.

Experimento	Flujo (mL/h)	Distancia (cm)	Concentración (% p/v)	Diferencia de potencial (kV)
9	0.3	9	14	15
10	0.3	9	20	20
11	0.5	9	14	20
12	0.5	9	20	15
13	0.3	15	14	20
14	0.3	15	20	15
15	0.5	15	14	15
16	0.5	15	20	20

Tabla 13. Tercera tabla de experimentos.

Experimento	Flujo (mL/h)	Distancia (cm)	Concentración (% p/v)	Diferencia de potencial (kV)
17	0.3	9	7	15
18	0.3	9	10	20
19	0.5	9	7	20
20	0.5	9	10	15
21	0.3	15	7	20
22	0.3	15	10	15
23	0.5	15	7	15
24	0.5	15	10	20

Dados los experimentos anteriores y teniendo presente la selección de las condiciones de electrohilado más adecuados para la solución de TFA-FS, los primeros 8 experimentos presentaron fallas durante la formación de las fibras; el tiempo de fabricación de los andamios era bastante largo, las fibras no se formaban adecuadamente formando cúmulos y la solución goteaba por el inyector generando pérdidas de la solución. Los experimentos 9-16 generaron condiciones que no eran posibles de electrohilar, el cono de Taylor no se formaba a diferencias de potencial de 15 y 20 kV. A partir de estos experimentos se obtuvieron las siguientes observaciones:

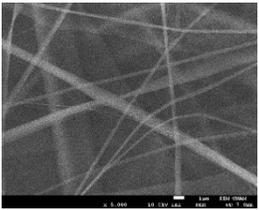
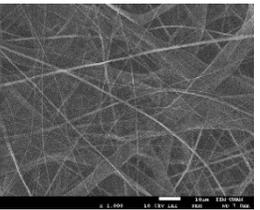
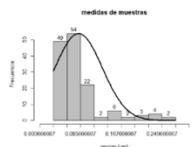
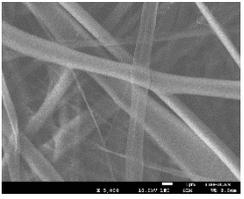
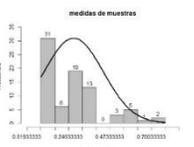
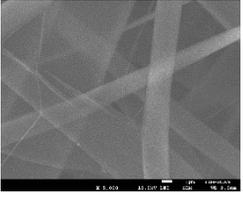
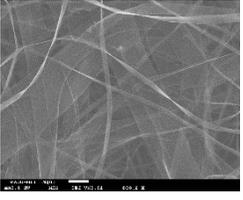
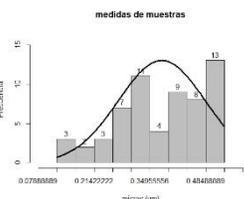
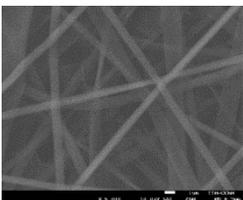
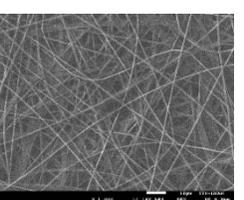
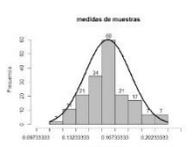
- Concentraciones mayores de 10% p/v no son posibles de electrohilar ya que no se logró la formación del cono de Taylor. Concentraciones menores a 7% p/v generan goteo en el inyector, lo que provoca pérdidas.
- Razones de flujo menores a 0.3 mL/h son de larga duración, lo que implica acumulación de solución a la salida del inyector (para soluciones a altas concentraciones).
- Distancias menores a 9 cm generan acumulación de fibras en una zona muy pequeña del colector, distancias mayores a 15 cm generan goteo de la solución.

Sin embargo, los resultados de la tercera tabla permitieron el análisis de las fibras que se formaron sobre los colectores.

Resultados de Micrografías obtenidas por SEM

Las micrografías obtenidas por SEM de los experimentos realizados con base en la tercera tabla de experimentos se muestran en la tabla 14, a 5000 y 1000 aumentos, además de los histogramas para el diámetro de las fibras.

Tabla 14. Micrografías obtenidas por SEM a partir de la tercera tabla de experimentos. Se muestran las micrografías de los experimentos 17, 21, 22 y 23 a x5000 y x1000 así como el histograma de las medidas del diámetro de las fibras.

Experimento	Aumentos		Histograma
	x5000	x1000	
17			<p>0.08 ±0.05 μm</p> 
21			<p>0.27±0.16 μm</p> 
22			<p>0.38±0.11 μm</p> 
23			<p>0.16±0.02 μm</p> 

Tras la revisión de los experimentos 17 a 24, se observaron diferentes fallas en la producción de las fibras; no hay homogeneidad en el tamaño de la fibra, existen fibras ramificadas, las fibras están rasgadas, la FS no forma fibras como tal sino otras estructuras en forma de listones. De la micrografía x1000 aumentos del experimento 23, se observaron fibras continuas con tamaño de diámetro de

fibra homogénea inmersas en fibras de mayor tamaño, pero existe un mayor número de fibras bien definidas respecto a las de mayor tamaño. Hay presencia de fibras con forma de listones, fibras ramificadas y rasgamiento de las fibras.

Sin embargo, después de los resultados obtenidos usando las condiciones de los experimentos anteriores, se presentaron problemas con el uso de los equipos de electrohilado, debido al uso de una diferencia de potencial a 20 kV. Se producía un sonido extraño, ya que se producía un arco eléctrico entre el inyector (aguja) y la bomba.

Se procedió a seleccionar los mejores resultados con a una diferencia de potencial más baja, las condiciones y el diámetro de fibra se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 15. Tabla de experimentos de electrohilado a 15 kV.

Experimento	Distancia (cm)	Flujo (mL/h)	Concentración (%p/v)
25	9	0.3	7
26	9	0.5	10
27	15	0.3	10
28	15	0.5	7

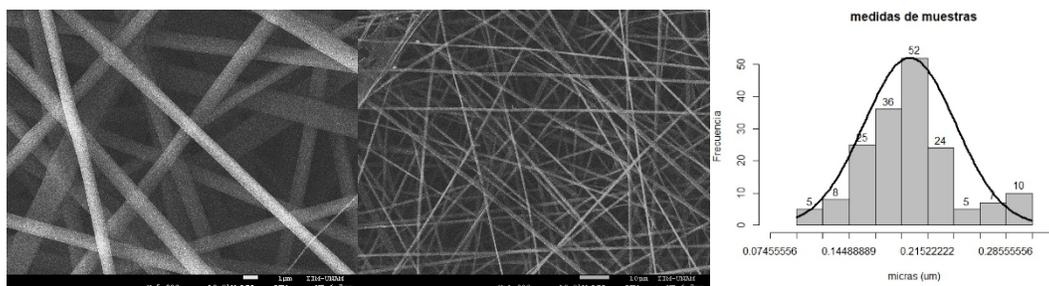


Figura 19. Micrografías obtenidas de SEM a x5000 y x1000 del experimento 27. A la derecha el histograma del diámetro de fibras.

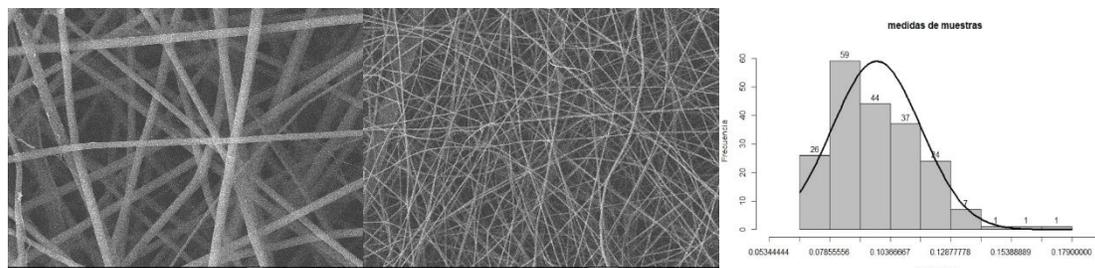


Figura 20. Micrografías obtenidas de SEM a x5000 y x1000 del experimento 25. A la derecha el histograma del diámetro de fibras.

Electrohilado de fibras paralelas

Para la fabricación de las fibras paralelas se utilizaron las mismas condiciones seleccionadas (mencionadas anteriormente) para los andamios al azar y se realizó la fabricación de un nuevo diseño de colector.

El diseño del nuevo colector de fibras paralelas se realizó tras diversas observaciones durante la fabricación del andamio de fibras al azar. La configuración de los electrodos sobre el colector permitió que una pequeña cantidad de fibras se establecieran sobre ellos. Estas fibras se encontraban orientadas de manera paralela. Se procedió a tomar una muestra de las fibras para su análisis en el microscopio óptico y posteriormente a SEM. Los resultados fueron positivos. Como resultado se diseñó el colector mostrado en la figura 22.

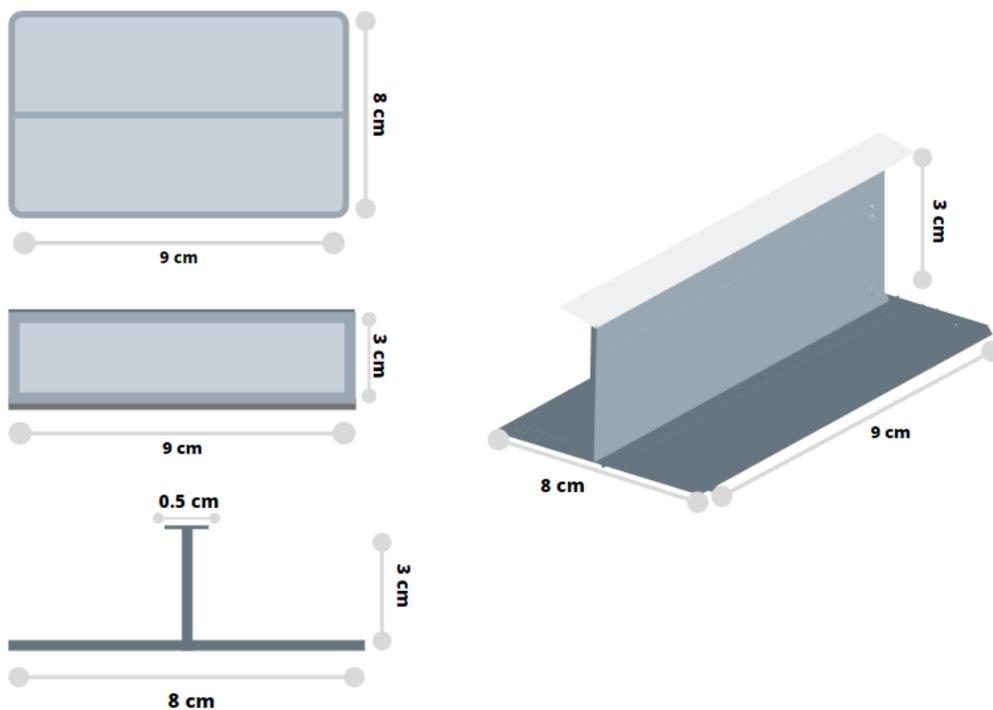


Figura 22. Colector para fibras paralelas. a) perspectiva desde la vista superior del colector, b) perspectiva desde la vista lateral del colector, c) perspectiva desde el frente del colector, d) perspectiva desde un ángulo de inclinación del colector.

Las fibras se depositaron entre a los costados del colector de aluminio de manera paralela como se muestra en la figura 22. La altura se puede modular para la fabricación de las fibras paralelas, la figura 23 muestra fibras paralelas con una longitud de 5 cm.

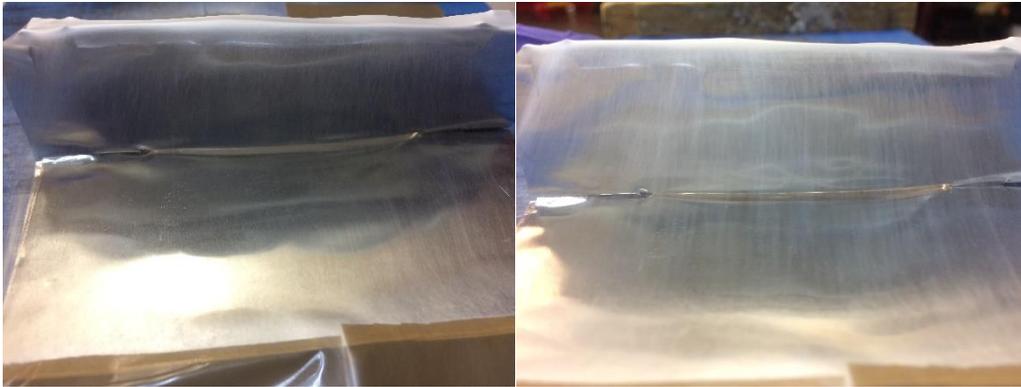


Figura 23. Fibras paralelas sobre los costados del colector.

Las fibras fueron observadas por SEM para corroborar que existía orientación paralela, homogeneidad en la formación de las fibras, sin defectos en las fibras, sin cuentas, ni formaciones extrañas. La figura 24 muestra las microfotografías de las fibras paralelas obtenidas sobre el colector diseñado. Es evidente la alineación de las fibras, así como un diámetro homogéneo de las fibras. También es posible observar la formación de fibras perpendiculares a la orientación de ellas, esto se explica ya que de alguna manera las fibras necesitan soportar a las fibras que van colocándose en capas superiores. De esta manera con la formación de estas extensiones se forma una red capaz de sostener a las fibras orientadas paralelamente.

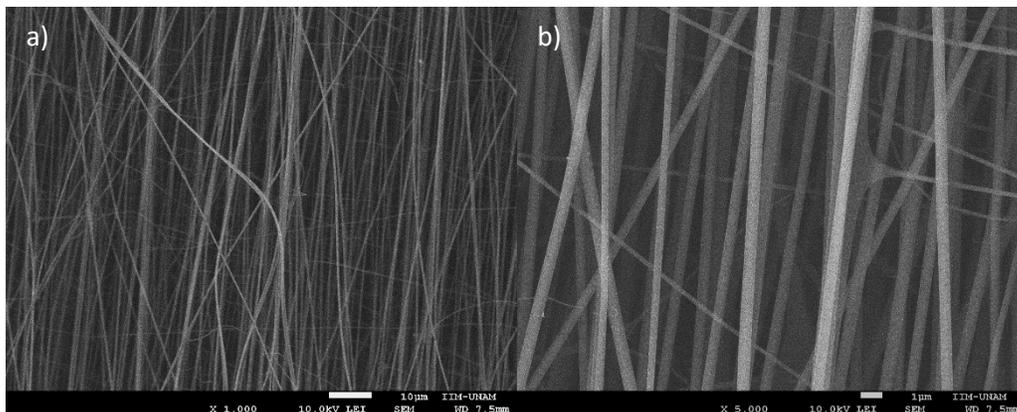


Figura 24. Micrografías de SEM de las fibras paralelas obtenidas sobre el colector diseñado. a) x1000 y b) x5000

Caracterización de los andamios

Caracterización por FTIR

La espectroscopia de infrarrojo FTIR se utilizó para comparar las señales de los grupos funcionales de la FS obtenidas mediante el proceso de desgomado, así como de las fibras electrohiladas de fibroína desgomada (FSE). La Tabla 17 muestra las asignaciones de las bandas de los grupos funcionales mostradas en las Figuras 25 y 26.

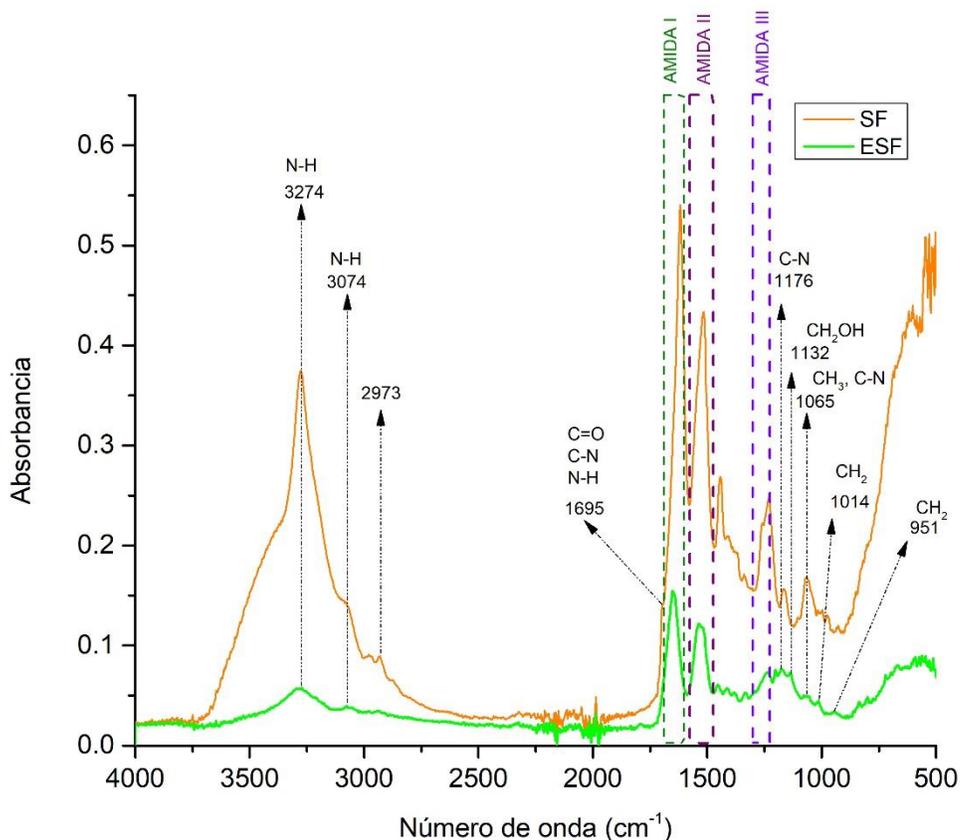


Figura 25. Comparación entre el espectro FTIR de FS y la FSE en la región de 4000 cm^{-1} -500 cm^{-1} .

Ambos espectros muestran bandas características de las amidas; A (3300 cm^{-1}), B (3070 cm^{-1}), I ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$), II ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$), III ($1400\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$) tal como en los espectros FTIR anteriores. Las flechas muestran las señales características del espectro verde de la FSE, con excepción de las señales en 2973 y 1695 cm^{-1} de la FS (La primera banda se origina debido a la tensión del enlace C-H de los aminoácidos libres y la segunda banda se originó principalmente a la tensión del enlace C=O de los enlaces peptídicos de la cadena de la FS en conformación lámina- β antiparalela). Sin embargo, la señal en 2973 cm^{-1} es prácticamente nula en el espectro FSE posterior al proceso de electrohilado, esta señal corresponde a la tensión del enlace C-H de los aminoácidos libres,

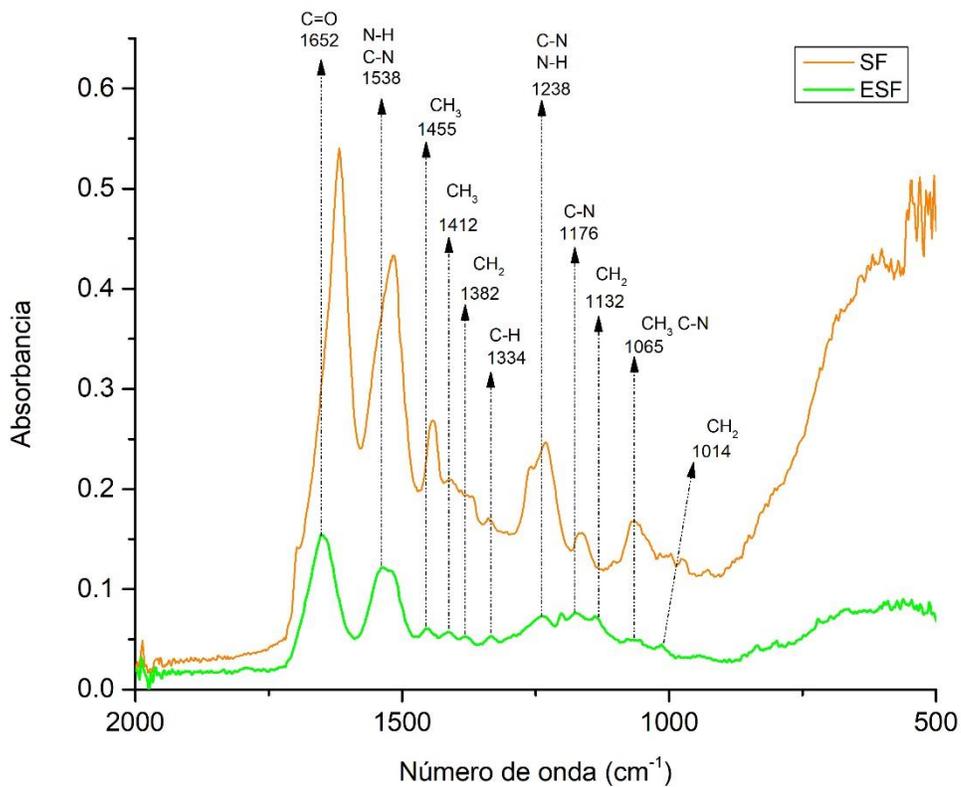


Figura 26. Comparación entre el espectro FTIR de la FS y la FSE en la región de 2000 cm^{-1} -500 cm^{-1} .

Las señales de las amidas I y II se recorrieron ligeramente hacia la izquierda, no es el caso de la amida III. Las amidas I y II se muestran en la conformación ovillo aleatorio y hélice- α . Cuando existe un cambio de las bandas en 1620 cm^{-1} y 1510 cm^{-1} a 1640 cm^{-1} y 1530 cm^{-1} , hay bajo contenido de estructuras cristalinas [62]. Sin embargo, la señal en 2973 cm^{-1} es prácticamente nula en el espectro FSE posterior al proceso de electrohilado.

Tabla 17. Identificación de las bandas del FTIR de la FSE.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación	Referencias
3274	Tensión del enlace N-H (Amida A)	[36]
3074	Tensión del enlace N-H (Amida B)	[36]
1652	Amida I en conformación ovillo aleatorio y hélice- α	[38]
1538	Flexión del enlace N-H junto con flexión del enlace C-N. (Amida II, sin alguna conformación)*	[39]
1455	Flexión asimétrica del grupo CH ₃ (aminoácidos alanina y valina)	[39]
1412	Flexión simétrica del grupo CH ₃ (aminoácidos alanina y valina)	[39]
1382	Flexión del grupo CH ₂ (cadena alanina-glicina)	[39]
1334	Flexión del C-H del aminoácido fenilalanina	[38]
1238	Amida III conformación ovillo aleatorio	[38]
1176	Tensión del enlace C-N (Aminoácido tirosina)	[38]
1132	CH ₂ OH debido a polifenoles	[39]
1065	Tensión del grupo CH ₃ (flexión balanceo en plano) junto con tensión del enlace C-N	[38]
1014	Tensión del grupo CH ₂ (flexión balanceo en plano)	[39]

Al comparar las señales de los espectros notamos que desaparece la banda en 1696 cm⁻¹ (amida I), característica de una conformación lámina- β antiparalela. También desaparecen las bandas en 1339 cm⁻¹, 993 cm⁻¹ y 970 cm⁻¹, todas estas representan señales características de las cadenas -Gly-Ala- y -Gly-Gly-, componentes principales de la estructura lámina- β . Se sugiere que el proceso de electrohilado provocó la disminución de las estructuras más ordenadas (estructuras en conformación lámina- β antiparalela). A pesar de esta situación, la formación de fibras de FS sí se logró.

Caracterización por RMN en estado sólido

La espectroscopía de ^{13}C RMN en estado sólido a ángulo mágico se utilizó para determinar los desplazamientos químicos de los átomos de carbono de la cadena principal de los polímeros que conforman al capullo de gusano de seda y a la FS obtenida mediante desgomado.

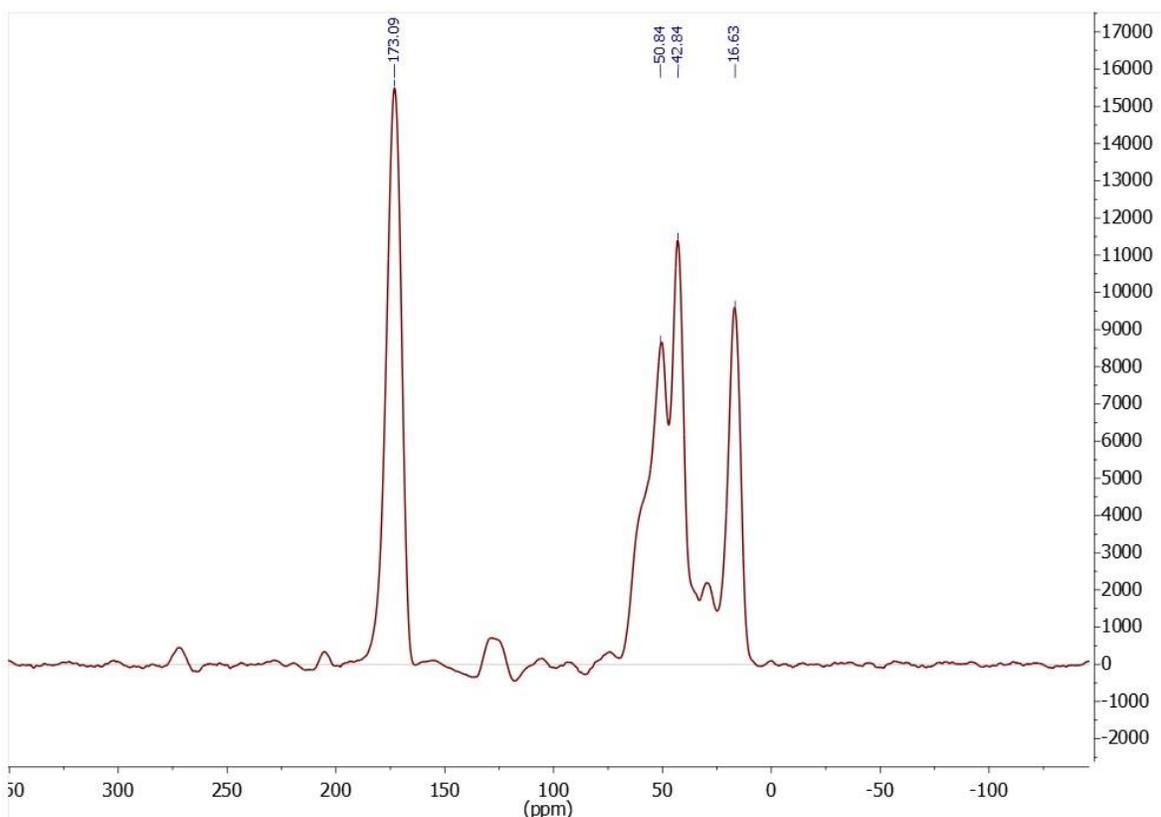


Figura 27. Espectro de ^{13}C RMN-MAS de la proteína FS electrohilada.

Tabla 18. Desplazamientos químicos de los principales aminoácidos de la FS [22], [23].

	C=O			C α			C β		
	Hélice- α	Lamina- β	ovillo aleatorio	Hélice- α	Lamina- β	ovillo aleatorio	Hélice- α	Lamina- β	ovillo aleatorio
ala	176.9	173.6	175.2	52.3	49.0	50.3	15.8	18.6	16.6
gly	173.0	170.1	171.4	44.4	42.7	43.0	-	-	-
ser	173.4	171.1	172.0	58.4	55.0	55.9	60.6	62.7	61.5

Tabla 19. Desplazamientos químicos de las señales del capullo de gusano de seda.

Desplazamiento Químico (ppm)	Asignación
173.09	Ala C=O, Gly C=O
50.84	Ala C _α
42.84	Gly C _α
16.63	Ala C _β

La figura 27 muestra el espectro de MAS-RMN de ¹³C de la FSE con las asignaciones de los carbonos de los principales aminoácidos que la componen (alanina, glicina y sericina). Después del proceso de electrohilado, las señales de los carbonos C_α y C_β de Alanina corresponden a una conformación en ovillo aleatorio. La señal del carbono C=O de alanina corresponde a una conformación lámina-β. Para glicina las asignaciones de los desplazamientos químicos muestran una conformación hélice-α del C=O y el C_α en conformación ovillo aleatorio. Sin embargo, las señales de los C_α y C_β de Serina disminuyen de tal manera que forman un ligero hombro del lado izquierdo de la señal del C_α de alanina. Diversos autores también identificaron una conformación ovillo aleatorio para la FSE [60] [49] [54].

Caracterización Térmica (TGA y DSC)

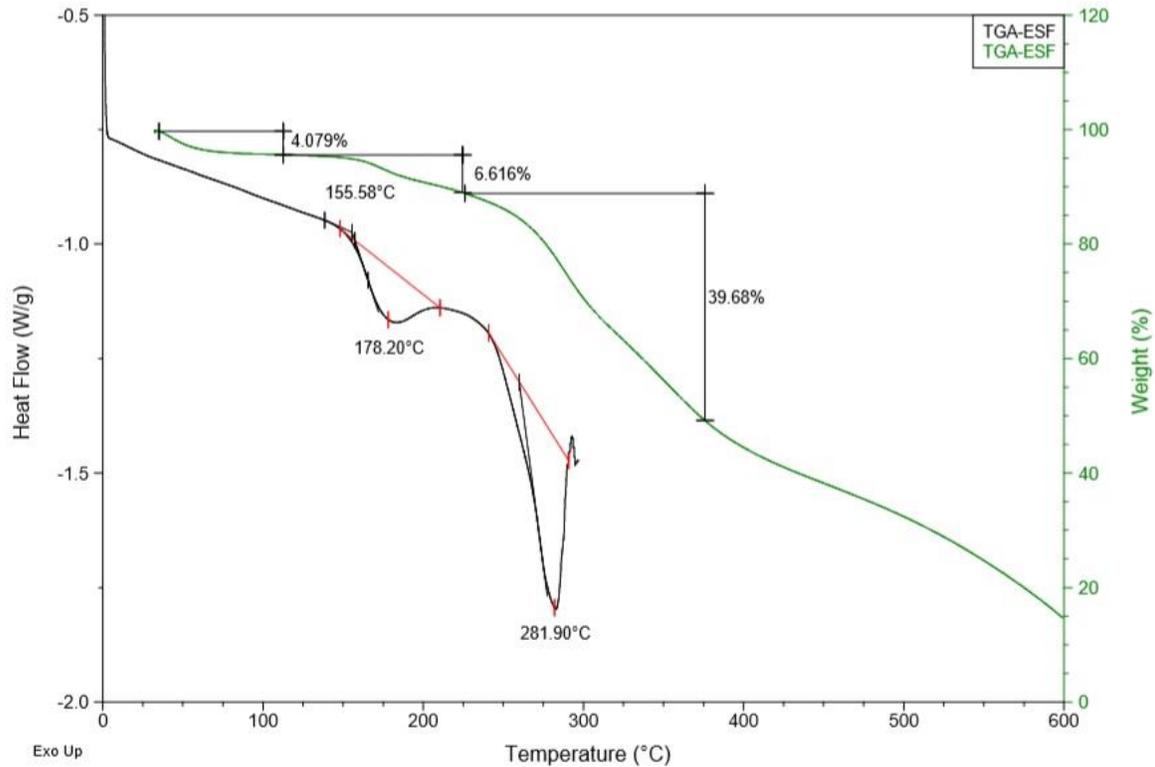


Figura 28. DSC y TGA de la FSE.

En la figura 28 observamos las gráficas TGA y DSC. La línea verde muestra la degradación de la FSE. La primera etapa representa la evaporación de agua y/o de trazas de solvente. Posteriormente tenemos un pequeño escalón que corresponde a un pico endotérmico mostrado en la línea negra del DSC en 178°C. Este pico endotérmico correspondería a la degradación de cadenas más cortas que surgieron del proceso de electrohilado. También hay que considerar el efecto de la Tg que ocurre en el intervalo de 175-179°C. Posteriormente tenemos otro pico endotérmico en 281.9°C que corresponde a la degradación del polímero.

Caracterización por DRX

La difracción por rayos X es una técnica que se utilizó para determinar la cristalinidad del polímero. La figura 29 muestra el espectro de DRX de la FSE.

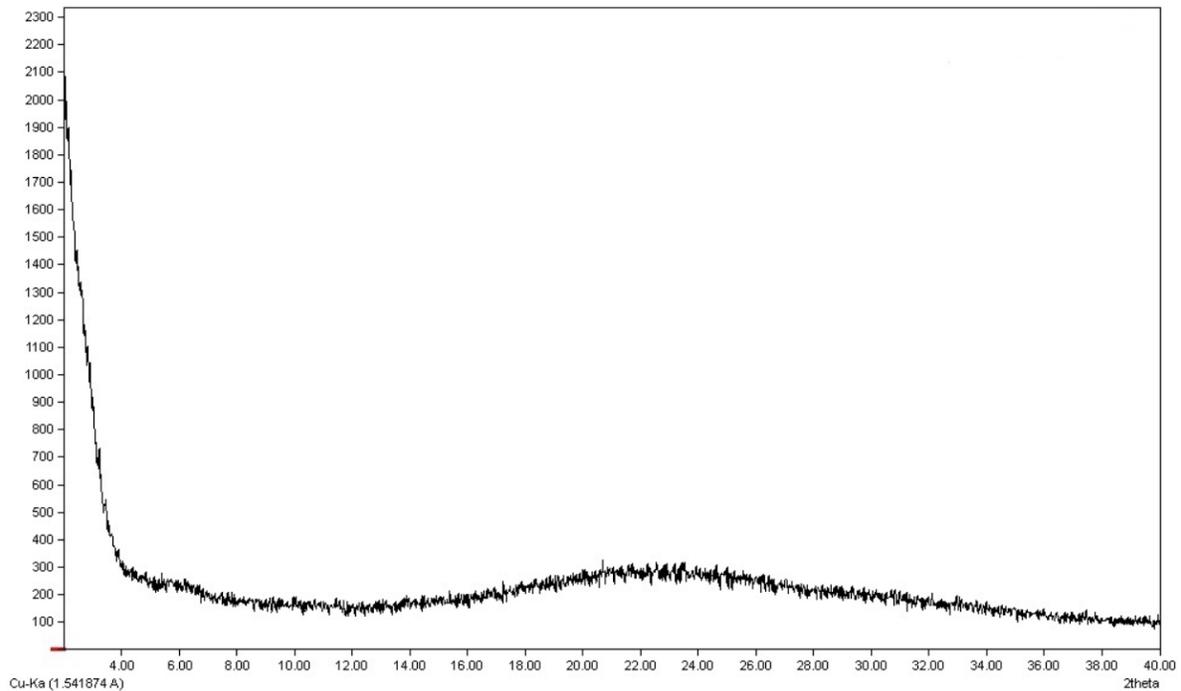


Figura 29. Espectro DRX de la ESF.

Las fibras electrohiladas no mostraron picos de difracción. Estas están formadas principalmente por regiones no cristalinas (en conformación ovillo aleatorio). Otros autores observaron que la FSE no mostraba cristalinidad, pero es posible inducir transiciones entre regiones amorfas a más ordenadas o cristalinas (Seda I a Seda II) en la FSE a través de tratamiento con metanol [52] [47]. Es posible determinar la cristalinidad de la FS en conformación lámina- β por DRX, la cual presenta picos característicos en 8.7°, 19.6° y 23.3°.

Caracterización por Ángulo de Contacto

La respuesta biológica del biomaterial es afectada por varios parámetros como la mojabilidad (o humectabilidad). Para la determinación de la mojabilidad del material se midió el ángulo de contacto para 3 muestras de FSE con gotas de 4 μL de PBS. El resultado inicial fue un material hidrófobo con un ángulo de contacto promedio de $116.96 \pm 2.69^\circ$. El material tiende a ser muy hidrofóbico debido a la gran cantidad de grupos no polares en la cadena de la FS (Alanina), figura 30. Sin embargo, al dejar la gota de PBS sobre la superficie de la muestra de FSE, tiende a reducirse el ángulo de contacto hasta volverse cero o hasta que la gota ha sido absorbida por el material.

En la figura 31, podemos observar la tendencia del ángulo de contacto a reducirse con el paso del tiempo. Los grupos hidrófobos de la FSE están orientados hacia la superficie de las fibras por lo que el ángulo de contacto de la gota del agua es superior a los 90. Estas interacciones hidrofóbicas estabilizan la estructura de la proteína, pero tras el proceso de electrohilado, la estructura de la proteína no es tan ordenada, debido a las conformaciones hélice- α y ovillo aleatorio que predominan, lo que provoca que algunos grupos hidrofílicos queden expuestos, por lo que después de unos minutos las moléculas de agua penetran en los espacios de las zonas desordenadas produciendo mojado de la proteína y después un hinchamiento. Cabe mencionar que no se observó diferencia entre la mojabilidad de las fibras alineadas y no alineadas

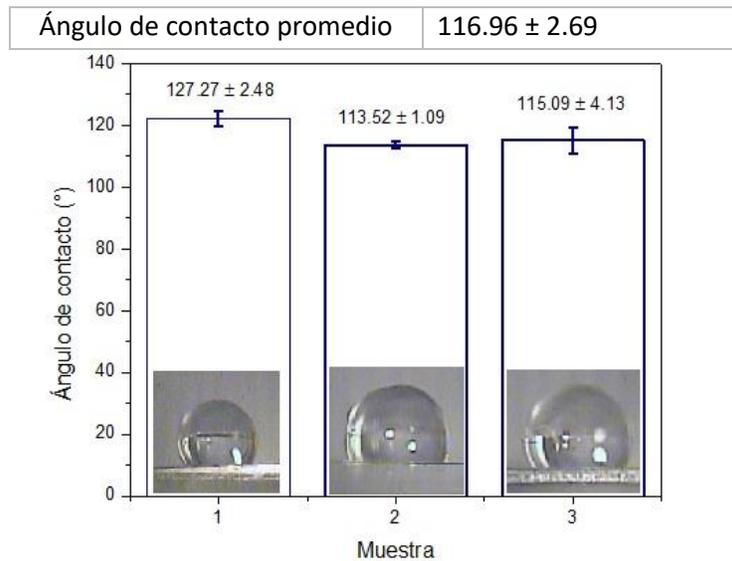


Figura 30. Medición del ángulo de contacto para 3 muestras de ESF.

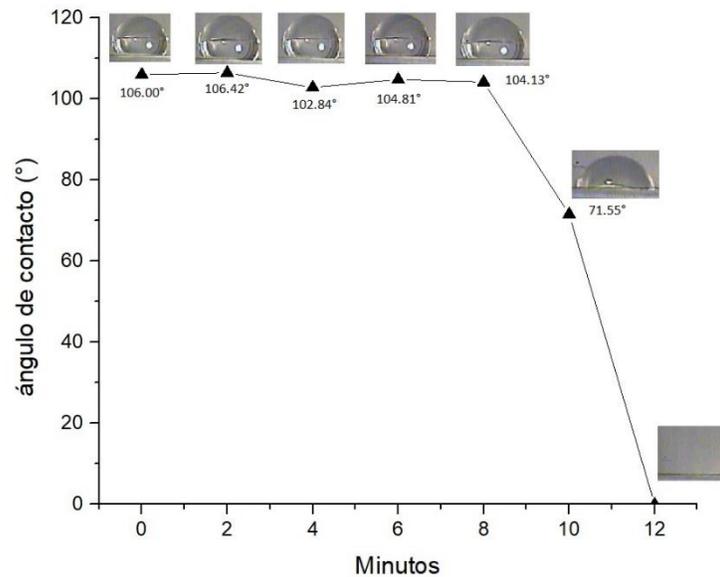


Figura 31. Medición del ángulo de contacto de la ESF durante 12 minutos.

Pruebas mecánicas

La resistencia mecánica y la rigidez de la seda están íntimamente relacionadas con la estructura cristalina de la lámina- β . Por otro lado, la habilidad para extenderse y la tenacidad, están ligadas a las regiones semi amorfas.

Las propiedades mecánicas tienen una gran importancia ya que juegan un rol esencial para la biocompatibilidad del material cuando sea implantado. Las propiedades mecánicas afectan directamente en la transmisión y distribución de las fuerzas que estarán actuando sobre el material. También se debe de tener en consideración que podrían afectar directamente el destino de la célula. Las células son capaces de sentir mecánicamente el ambiente que las rodea y modificar su comportamiento acorde a las características mecánicas del material [3].

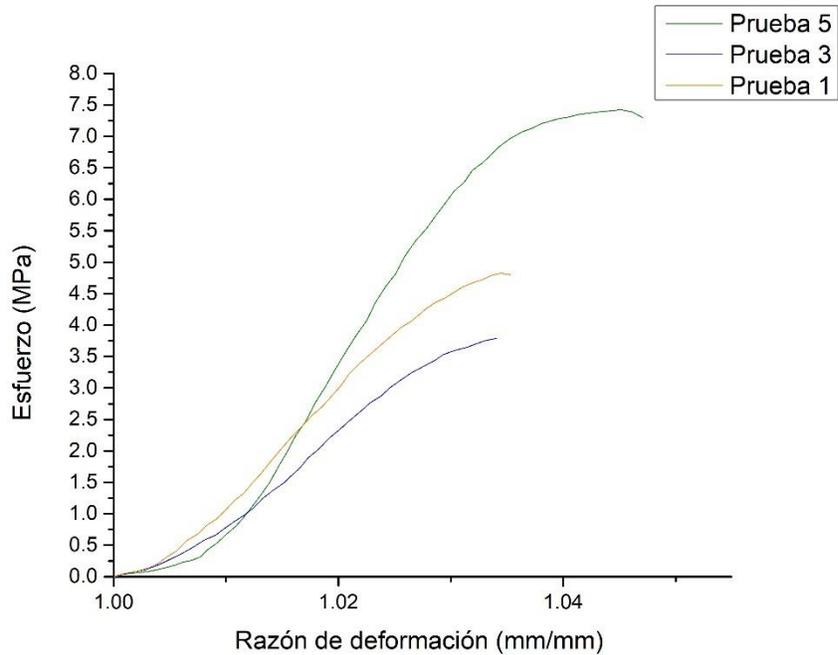


Figura 32. Gráfica esfuerzo vs Razón de elongación para el ajuste del modelo de Mooney–Rivlin (MR) de las probetas 1, 3 y 5.

En la figura 32 se muestran las gráficas de las pruebas mecánicas para las probetas o muestras 1, 3 y 5 de los andamios con fibras al azar (10 probetas fueron en total). La razón de deformación inicia en 1 y corresponde al estiramiento de la probeta [34]. La gráfica tiene 3 secciones principales: la primera corresponde a una orientación de las fibras que no están alineadas en dirección del esfuerzo aplicado, en la segunda sección las fibras se empiezan a deformar elásticamente de manera lineal y por último, las fibras comienzan a deformarse plásticamente antes de romperse. Esta deformación plástica se explica dado que las regiones semi-amorfas comienzan a desenrollarse transfiriendo la carga hacia los cristales de la estructura lámina- β , que subsecuentemente tenderá al punto de fractura [3]. La tabla 20 muestra el promedio del porcentaje de elongación máxima de las probetas que se sometieron a la prueba uniaxial con un valor de 2.66%, antes de la ruptura.

Tabla 20. Porcentaje de Elongación máxima promedio.

% de Elongación máxima promedio
2.66

Los resultados nos muestran un módulo de Young de 26.06 ± 9.08 MPa, lo que contrasta con lo sugerido por Hopkins y colaboradores [1], donde sugieren que los andamios que requieran mejorar la longitud de los axones, la adhesión de las células del SNC y la supervivencia de las mismas tendrán

que tener un módulo de Young menor a 1 kPa, que imite correctamente la rigidez o blandura del tejido cerebral.

Pruebas de viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular se realizó para estudiar el comportamiento de los fibroblastos y los astrocitos sembrados sobre los andamios electrohilados de fibroína.

La figura 33 muestra los fibroblastos sembrados sobre los andamios electrohilados de fibroína al tercer día de cultivo. Hay una mezcla de células vivas (tinción de color verde) y células muertas (tinción de color rojo). Es evidente como las células siguen la orientación de las fibras del andamio. En la imagen 33a, se observan células que se encuentran sobre la superficie de un ramillete de fibras, lo que implicaría que las células también son capaces de extenderse en fibras más grandes y de seguir la dirección que dicta el ramillete (marcadas con flechas).

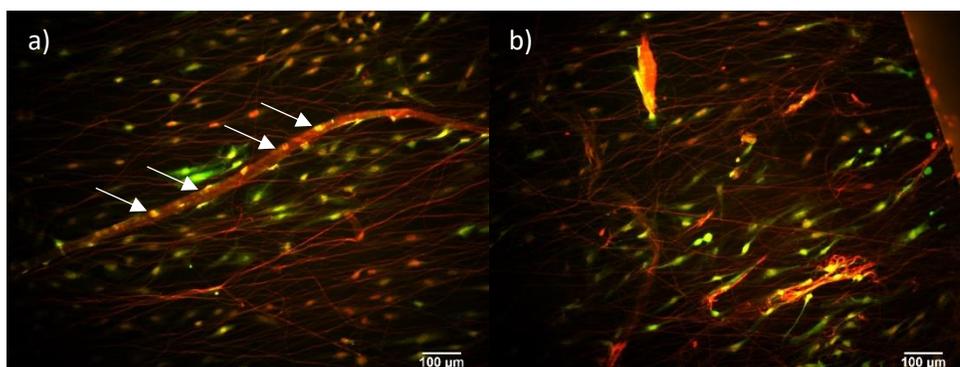


Figura 33. Micrografía de fibroblastos sobre los Andamios de fibras alienadas. Las flechas blancas indican a las células establecidas sobre las fibras. Ampliación 10X.

Posterior al cultivo de fibroblastos, se siguió con el cultivo de astrocitos. Las figuras 34 a 36 muestran a los astrocitos sobre los andamios electrohilados de fibroína al tercer día de cultivo. En la figura 34 muestra células con una marcada orientación de las extensiones de acuerdo con la alineación de las fibras del andamio. Diversos autores observaron anteriormente la orientación de las células y sus extensiones de acuerdo con la dirección de las fibras sobre andamios de polímeros sintéticos como PCL y PLA [4] [7].

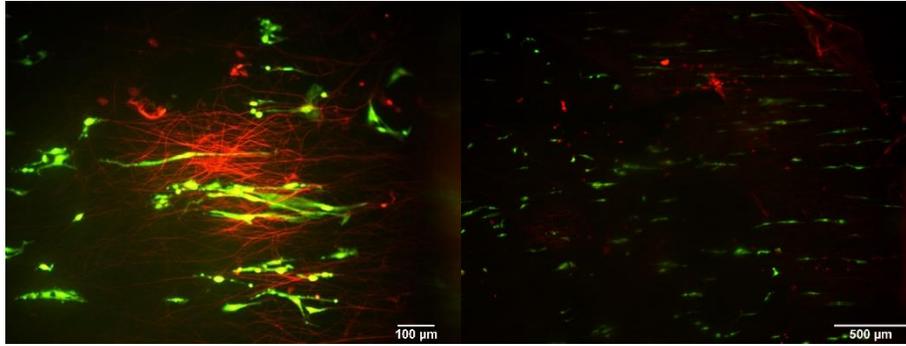


Figura 34. Micrografía de astrocitos sobre el andamio de fibras alineadas después de 3 días en cultivo in vitro. a) Ampliación 10X y b) ampliación 4X

Tal como ocurrió en el caso de los fibroblastos, los astrocitos fueron capaces de establecerse sobre el contorno de las fibras. Además, sus extensiones fueron capaces de extenderse sobre diferentes fibras, pasando de una fibra a otra (marcadas con flechas), figura 35.

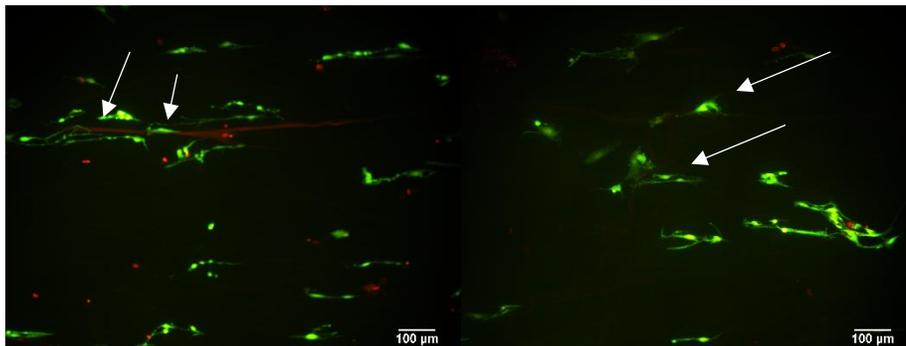


Figura 35. Micrografías de astrocitos con su soma sobre las fibras y extensiones que cruzan entre fibras marcadas con flechas.

En la figura 36 se observan conjuntos de células que crecieron en una zona donde no existía mucha orientación de las fibras, lo que provocó que las células se extiendan en forma de estrella.

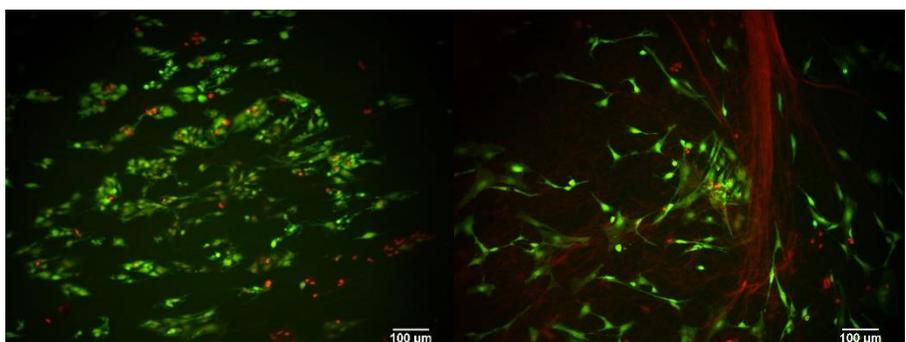


Figura 36. Micrografías de astrocitos en forma de estrella sobre una zona de poca orientación del andamio de SFE. Ampliación 10X

Análisis de resultados

Para la fabricación de andamios de fibroína por el proceso de electrohilado, es necesaria la obtención de la proteína fibroína a partir de los capullos de gusano de seda. Mediante el proceso de desgomado se realizó la eliminación de la proteína sericina que cubre a la fibroína. Este proceso se realizó mediante diferentes experimentos mencionados en la tabla 1. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre los resultados de las caracterizaciones FTIR, RMN, TGA y DSC. La proteína fibroína obtenida del experimento número 2 (concentración de Na_2CO_3 al 0.5%) se evaluó para verificar la parcial o completa eliminación de la SS.

La caracterización por FTIR mostró que las señales características de la SS en 1400 cm^{-1} y 1070 cm^{-1} desaparecieron después del proceso de desgomado. Además, las señales en 1699 cm^{-1} , 1441 cm^{-1} , 1339 cm^{-1} , 993 cm^{-1} y 970 cm^{-1} son las evidencias de la eliminación de la SS. Las señales de las amidas I, II y III, no muestran una gran diferencia entre el capullo y la FS debido a que las dos proteínas se encuentran en estructura lámina- β , pero para el caso de la FS, la señal en 1699 cm^{-1} es una característica principal de la estructura lámina- β antiparalela. Posteriormente, mediante RMN se corroboró la información brindada por el FTIR, fue posible determinar la estructura en la cual se muestran los carbonos que componen la cadena principal de las proteínas SS y FS. En las dos proteínas predomina la estructura lámina- β , más una pequeña presencia de estructuras ovillo aleatorio. Ambos análisis confirmaron la presencia de este tipo de estructuras.

El análisis termogravimétrico muestra la degradación de los dos materiales, así como su comportamiento en función de la temperatura. Los análisis por DSC mostraron que el valor de la Tg para los dos materiales ocurre a diferentes temperaturas; 215°C para el capullo y 221°C para la FS, aproximadamente. Lo que implica que la FS tiene una mayor estabilidad frente a aumentos de temperatura dado que la FS está compuesta principalmente por estructuras lámina- β antiparalela. La influencia de SS residual sobre las fibras de FS provoca un aumento en el valor de la Tg a bajo contenido de SS ($\sim 0.6\%$) ya que se produce un incremento en la cantidad de cristales de FS, formados principalmente por estructuras láminas- β [62]. Por otro lado, mientras haya mayor contenido de SS, la SS es capaz de formar sus propias estructuras cristalinas. Lo que genera una competencia para formar cristales, interrumpiendo los arreglos intermoleculares, por lo tanto, un decremento en la cristalinidad total del conjunto FS y SS [62]. El TGA del capullo no muestra etapas en las que puedan ocurrir transiciones vítreas independientes de las dos proteínas que lo componen, lo que sugiere que las estructuras ordenadas del conjunto de las dos proteínas comienzan a moverse o a fluir a la misma temperatura, no son eventos independientes sino un fenómeno en conjunto. Um y colaboradores [63] también observaron una Tg alrededor de 200°C para la FS, pero el análisis térmico que realizó fue a través de DTMA. La descomposición de los dos materiales se da dentro del intervalo de 310°C - 320°C , lo que resulta interesante dado que las cadenas que componen al capullo tienen la misma resistencia a la degradación que las estructuras ordenadas de la FS.

Después de las caracterizaciones anteriores es posible decir que existe eliminación parcial de la SS que cubre a la FS, dados el análisis anterior. No se determinó la cantidad exacta de SS eliminada, pero es posible trabajar con la FS obtenida por el proceso de desgomado propuesto.

Posteriormente fue necesario disolver la proteína fibroína para someterla al proceso de electrohilado. Para simplificar la disolución de la FS se realizaron pruebas de disolución de la proteína con solventes que son capaces de disolver polímeros de estructura similar, tal es el caso del nylon. Se observó únicamente disolución directa en el caso del TFA, ácido trifluoroacético, lo que provoca una solución de color ligeramente amarilla a una muy baja concentración (0.33% p/v). Esto se logró debido a que TFA es capaz de romper las fuerzas intra-moleculares, tales como: de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas que caracterizan a las estructuras de las proteínas. TFA es capaz de disolver a la proteína sin la necesidad de realizar las etapas de: hidrólisis básica, diálisis y liofilización. La disolución sólo necesita agitación para asegurar que el solvente penetre en su totalidad dentro de la estructura de la proteína.

Después de realizar la disolución de la proteína, la solución se introduce en la jeringa de 1 mL para comenzar con el proceso de electrohilado. En este proceso se realizaron varios cambios en los parámetros experimentales, debido a que era imposible electrohilar a las condiciones establecidas en los primeros intentos. Dentro de las principales causas: concentraciones altas o mayores a 10% p/v generan una solución muy viscosa la cual se vuelve aún más viscosa ya que el solvente se volatiliza rápidamente, el flujo y la diferencia de potencial no se encontraban en las condiciones necesarias para establecer un cono de Taylor adecuado para la formación de fibras con las características requeridas. La tercera tabla experimental mostró como resultado el experimento 23, las fibras tenían una morfología homogénea y continua. Las fibras tienen un diámetro promedio de 160 nm. Sin embargo, tomando como referencia el resultado del experimento 23, se siguió buscando las mejores condiciones, ya que se presentaron problemas durante el proceso de electrohilado. Se procedió a la reducción del valor de la diferencia de potencial hasta 15 kV, ya que al electrohilar a 20 kV se daba la formación de arco eléctrico entre la bomba y la jeringa. Se probaron nuevas condiciones hasta encontrar las siguientes condiciones para la formación de fibras: flujo de 0.3 mL/h, distancia de 15 cm, concentración de 7 % p/v y diferencia de potencial de 15 kV. Bajo estas condiciones no se observaron problemas durante la fabricación de los andamios tal como ocurrió en experimentos anteriores.

Con las condiciones ideales se procedió a la fabricación de las fibras paralelas sobre el colector diseñado en la figura 22. Las fibras formadas sobre el colector no muestran defectos, formación de cuentas, fibras heterogéneas u orientación al azar. Se realizó una inspección a mayores aumentos en SEM, para corroborar que la alineación de las fibras ocurría a escala micro o nano. El diseño de colector permitió la fabricación de fibras paralelas a las mismas condiciones que las establecidas para los andamios con fibras al azar, no requiere el uso de materiales extra o dispositivos sumamente elaborados (colectores rotatorios, electrodos a base de materiales como oro o plata de alto valor).

La caracterización de los andamios producidos por electrohilado inició con los análisis por espectroscopia FTIR y RMN, se compara a la FS y a la FSE. Después de la dilución y el proceso de electrohilado se pudieron observar los cambios que ocurrieron sobre los materiales. Para el caso de FTIR, las Amidas I, II, y III en conformación de lámina- β cambian a estructuras menos ordenadas: hélice- α y ovillo aleatorio en la FSE. También las señales en 993 cm^{-1} y 970 cm^{-1} se han reducido

hasta ser casi despreciables. Lo que implicaría que la cadena también ha sido afectada tras el proceso de electrohilado o por acción del solvente. En el espectro de RMN, las identificaciones de los carbonos de la cadena de FSE también muestran que estos se organizan en estructuras hélice- α y ovillo aleatorio, con una reducción de los picos del aminoácido serina. Las regiones más cristalinas están conformadas por polipéptidos conformados por glicina y alanina, lo que implica que las regiones amorfas tienen cierto contenido del aminoácido sericina, las señales de estas regiones ya no son tan visibles dada una cierta degradación/desnaturalización.

La desnaturalización de la cadena de la FS tras el proceso de disolución, por un alto grado de degradación o por un peso molecular bajo de la cadena de FS obtenida posterior al desgomado, hacen más difícil la formación de estructuras ordenadas (hélice- α y lámina- β) [64]. Pudo haber ocurrido un rompimiento de los enlaces peptídicos de regiones menos ordenadas por acción del solvente, incluso el proceso de electrohilado genera esfuerzos tan altos que es capaz de desnaturalizar a otras proteínas como es el caso del colágeno. De acuerdo con los resultados mostrados por FTIR y RMN, el proceso de electrohilado no se deshace de la estructura secundaria de la fibroína, pero no es capaz de generar estructuras más ordenadas tipo lámina- β . El proceso de electrohilado se completa en microsegundos, este tiempo es insuficiente para realizar el reacomodo de las cadenas de la FS para formar estructuras lámina- β [65]. Sin embargo, es posible la formación de fibras sin un alto contenido de cristalinidad.

El análisis térmico por DSC y TGA de la FS y FSE, se muestran en las figuras 15 y 28, respectivamente. A la temperatura de 178°C se da la formación de un pico endotérmico, que coincide con el evento de transición vítrea para la FS. En la línea del TGA se puede observar un escalón pequeño a 178°C, debido a la suma de los eventos, la Tg de la FS, así como la degradación de cadenas más pequeñas que surgieron después de disolver a la FS y electrohilar. A la temperatura de 281°C se observa la degradación de la FSE.

El análisis por medio de DRX se realizó para observar la cristalinidad de la FSE, pero no se mostraron picos característicos del material. Las estructuras desordenadas deben de estar en una cantidad muy grande con relación a las ordenadas. Las estructuras hélice- α y ovillo aleatorio de la FSE no muestran difracción, siendo un polímero que tiende a ser amorfo. El análisis por FTIR es sensible a ordenamientos de corto alcance mientras que DRX es más sensible a ordenamientos de largo alcance [63]. Es posible determinar la cristalinidad de la FS en conformación lámina- β por DRX, la cual presenta picos característicos en 8.7°, 19.6° y 23.3° [63]. Se han encontrado diversos valores para el tamaño de la cristalita, dados los parámetros a (dirección a lo largo del empacamiento de las láminas- β), b (dirección perpendicular a las tiras de las láminas- β) y c (dirección a lo largo de las tiras de las láminas- β) [66] [67] [68]. Se ha reportado que es posible inducir a la formación de estructuras más cristalinas a la FSE mediante la inmersión de los andamios de FSE en metanol [63].

La organización de la cadena-H de la FS consiste en 12 dominios hidrofóbicos los cuales son separados por 11 dominios hidrofílicos. Los dominios hidrofóbicos poseen secuencias de aminoácidos en una secuencia repetitiva y los dominios hidrofílicos poseen aminoácidos en una secuencia no repetitiva. Las regiones repetitivas formadas por glicina, alanina, serina, tirosina, valina y treonina son capaces de organizarse en estructuras lámina- β a través de fuerzas intra- e inter-

moleculares; puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. En cambio, las regiones no repetitivas están conformadas por ácido glutámico, ácido aspártico, arginina y lisina, formando estructuras no cristalinas (semiamorfas). Dentro de las regiones no cristalinas de la cadena, se encuentran aminoácidos (prolina en su mayoría) que sirven como giros- β , lo que le permite a la cadena doblarse en una lámina- β [3]. Esta estructura tiene los grupos hidrofóbicos orientados hacia la superficie de las fibras, lo que permite que la FS sea hidrofóbica. Al finalizar el proceso de electrohilado, se da el cambio de lámina- β a hélice- α y ovillo aleatorio, las fuerzas intra- e intermoleculares no son iguales, grupos hidrofílicos queden expuestos, lo que provoca que las moléculas de agua, por ejemplo, sean capaces de ingresar dentro de la estructura, hinchar a los andamios de FSE y mojar al material. Por esta razón, el andamio de FSE sufrió un hinchamiento a 10 minutos aproximadamente, al estar en contacto con la gota.

La fuerza y la rigidez de la seda es proporcional a las estructuras cristalinas de lámina- β . Por otro lado, la tenacidad y la elasticidad dependen de las regiones menos cristalinas. Las regiones amorfas se caracterizan por desenrollarse durante el cambio de comportamientos, elástico a plástico, al aplicar una fuerza sobre la FS. En este punto, las regiones amorfas transferirán la carga a las regiones más cristalinas hasta el punto de quiebre o ruptura del material. En la figura 32, corresponde a la primera etapa (amortiguamiento debido a la red entrelazada por el electrohilado) y a la segunda etapa (las regiones amorfas absorben la carga). Por último, se muestra la parte de deformación plástica que es absorbida por las estructuras hélice- α , hasta la ruptura del material (desdoblamiento total y ruptura de las cadenas de la FSE) [3]. El módulo de Young obtenido en este trabajo con un valor de 26.06 ± 9.08 MPa es menor comparado con los encontrados por otros autores 10-17 GPa, 16-18 GPa, 22.6 GPa [3]. Se sugiere que para simular correctamente el módulo de Young del tejido del SNC se deberá tener un valor menor que 1kPa [3].

A pesar de los resultados que se obtuvieron en las pruebas de ángulo de contacto y mecánicas, fue posible el cultivo de dos distintos tipos de células sobre la superficie de los andamios. Es importante resaltar que las pruebas de viabilidad celular se realizaron inicialmente con fibroblastos como prueba de concepto. Los astrocitos mostraron extensiones que siguen la dirección de las fibras, otras extensiones pasaron de una fibra a otra y algunas células se posicionaron sobre las fibras. En ciertas regiones de los andamios los astrocitos mostraron forma de estrella con sus extensiones ramificadas en varias direcciones, no muestran forma bipolar como lo hacen los astrocitos en las regiones más alineadas. Algunas células siguieron la orientación de las fibras y sus ramificaciones se extendieron mucho más respecto a las que intentaron extenderse perpendicularmente a la orientación de las fibras, lo que sugiere que este tipo de andamio favorecería a la migración celular [7]. La tendencia que siguen las células por fibras de tamaño menor (diámetro de 5-30 μm), es un crecimiento mucho mayor de sus extensiones, respecto a fibras de tamaño mayor (arriba de 500 μm de diámetro) [7]. Otra manera de guiar el crecimiento de la célula de forma bipolar con sus extensiones altamente alineadas, es reducir el área donde crecerán las células sobre una superficie de colágeno [69].

Conclusiones

Los resultados de la presente investigación muestran que los andamios de las fibras electrohiladas de fibroína desgomada dispuestas paralelamente, permiten simular a la matriz extracelular neuronal para realizar el cultivo adecuado *in-vitro* de astrocitos protoplasmáticos de neonatos de rata.

Se estableció un proceso eficiente de desgomado del capullo de seda para separar a la fibroína (FS) de la sericina (SS). Por medio de análisis espectroscópicos (FTIR, RMN) y térmicos (TGA, DSC) se corroboró la eliminación de la SS. Se estudió la estructura de la FS que corresponde a Lamina- β . Se estudiaron las transiciones y la estabilidad térmica de la FS por DSC y TGA. Su temperatura de transición vítrea fue de 221° C y su temperatura de degradación de 320° C.

Se optimizaron los parámetros de electrohilado para la fabricación de los andamios de FS con dos configuraciones de fibras al azar y alineadas paralelamente. Las mejores condiciones de proceso fueron: flujo de bombeo 0.3 mL/h, distancia de 15 cm, concentración de 7 %p/v y diferencia de potencial de 15 kV. Se estudió la morfología de las fibras mediante SEM. En ambos casos se obtuvieron fibras homogéneas y continuas con un diámetro promedio de 690 ± 150 nm.

Se diseñó un colector de fibras original que permite formar andamios de fibras alineadas paralelamente de manera reproducible.

Los análisis espectroscópicos por FTIR y RMN mostraron que la FSE tiene una conformación tipo hélice- α y ovillo aleatorio, de acuerdo con los resultados obtenidos de las Amidas I, II y III en el análisis por FTIR, así como por los desplazamientos químicos de los Carbonos en la cadena, obtenidos por RMN.

Se encontró que la temperatura de transición vítrea de FSE de 177°C es menor a la de la FS por la conformación hélice- α y ovillo aleatorio en comparación a la estructura lámina- β . La estabilidad térmica de las fibras de FSE es menor a la de la SF, ya que la degradación de la FSE se da a 281°C.

Se estudió la cristalinidad de los andamios por DRX, encontrándose que las fibras electrohiladas son altamente amorfas ya que no se observaron picos de difracción. Las diferencias estructurales entre la FSE y la FS radican principalmente en el ordenamiento, la FS está constituida principalmente por estructuras tipo lámina- β . Se ha reportado que FS muestra picos de difracción en 8.7°, 19.6° y 23.3° [63].

La FSE resultó ser un material hidrofóbico, con un ángulo de contacto de 116.96 ± 2.69 , debido a que los grupos hidrofílicos laterales de la cadena se orientan hacia la superficie de las fibras. Sin embargo, después de 12 minutos el ángulo de contacto de la FSE se redujo y comenzó a hincharse.

De acuerdo con la prueba uniaxial mecánica se obtuvo un módulo de Young de 26.06 ± 9.08 MPa, que es mayor a lo reportado por otros autores para imitar correctamente la rigidez o blandura del tejido cerebral.

Se analizó la viabilidad celular de andamios con fibras dispuestas aleatoriamente con la de andamios con fibras orientadas paralelamente, encontrándose que los andamios no sólo son capaces promover la viabilidad celular de fibroblastos y astrocitos protoplásmicos, también son capaces de servir como guía para la orientación de las células. En particular, los andamios de fibras alineadas paralelamente permiten direccionar las extensiones de las células en dirección de las fibras electrohiladas.

El diámetro de las fibras resultó ser adecuado para guiar las extensiones de las células, incluso algunas células fueron capaces de establecerse sobre cúmulos de fibras, lo que implicaría que la estructura secundaria en conformación hélice- α /ovillo aleatorio y la composición de aminoácidos Gli-Ala-Ser de la FSE genera interacciones químicas que favorecen al cultivo celular.

Estos resultados sugieren que los andamios de SF tienen cierto potencial para promover el crecimiento de tejido neuronal *in vivo*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las propiedades mecánicas deberán ser mejoradas para ser más acordes a lo necesario para simular correctamente el tejido neuronal. Posteriormente se supondría su utilidad en la regeneración de tejido dañado del sistema neuronal periférico y central.

Referencias

- [1] A. M. Hopkins, E. DeSimone, K. Chwalek, and D. L. Kaplan, "3D in vitro modeling of the central nervous system," *Prog. Neurobiol.*, vol. 125, pp. 1–25, 2015.
- [2] H. Xia *et al.*, "Directed neurite growth of rat dorsal root ganglion neurons and increased colocalization with Schwann cells on aligned poly(methyl methacrylate) electrospun nanofibers," *Brain Res.*, vol. 1565, pp. 18–27, 2014.
- [3] L. D. Koh *et al.*, "Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 46, pp. 86–110, 2015.
- [4] A. Weightman, S. Jenkins, M. Pickard, D. Chari, and Y. Yang, "Alignment of multiple glial cell populations in 3D nanofiber scaffolds: Toward the development of multicellular implantable scaffolds for repair of neural injury," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 10, no. 2, pp. 291–295, 2014.
- [5] T. Guillamón-Vivancos, U. Gómez-Pinedo, and J. Matías-Guiu, "Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): Función y caracterización molecular," *Neurología*, vol. 30, no. 2, pp. 119–129, 2015.
- [6] M. Nieto Sampedro *et al.*, "Trauma en el sistema nervioso central y su reparación," *Rev. Neurol.*, vol. 35, no. 06, p. 534, 2002.
- [7] J. Gerardo-Nava *et al.*, "Human neural cell interactions with orientated electrospun nanofibers in vitro," *Nanomedicine*, vol. 4, no. 1, pp. 11–30, 2009.
- [8] L. J. Villarreal-Gómez, J. M. Cornejo-Bravo, R. Vera-Graziano, and D. Grande, "Electrospinning as a powerful technique for biomedical applications: A critically selected survey," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 27, no. 2, pp. 157–176, 2016.
- [9] M. Farokhi, F. Mottaghitalab, M. A. Shokrgozar, D. L. Kaplan, H. W. Kim, and S. C. Kundu, "Prospects of peripheral nerve tissue engineering using nerve guide conduits based on silk fibroin protein and other biopolymers," *Int. Mater. Rev.*, vol. 62, no. 7, pp. 367–391, 2017.
- [10] L. A. S. Arenas and C. B. de Zurbarán, "La matriz extracelular: El ecosistema de la célula," *Salud Uninorte*, vol. 16, pp. 9–18, 2002.
- [11] S. Kundu, *Silk biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine*. Woodhead Publishing, 2014.
- [12] R. Boni, A. Ali, A. Shavandi, and A. N. Clarkson, "Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering," *J. Biomed. Sci.*, vol. 25, no. 1, pp. 1–21, 2018.
- [13] A. M. Hopkins *et al.*, "Silk hydrogels as soft substrates for neural tissue engineering," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 23, no. 41, pp. 5140–5149, 2013.
- [14] Y. Minoura, Norihiko and Aiba, Sei-Ichi and Higuchi, Masahiro and Gotoh, Yohko and Tsukada, Masuhiro and Imai, "Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin." Elsevier, pp. 511--516, 1995.
- [15] A. M. Ziemba *et al.*, "Coating Topologically Complex Electrospun Fibers with Nanothin Silk Fibroin Enhances Neurite Outgrowth in Vitro," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 6, no. 3, pp.

1321–1332, 2020.

- [16] V. Benfenati *et al.*, “Biofunctional silk/neuron interfaces,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 22, no. 9, pp. 1871–1884, 2012.
- [17] L. W. Tien, F. Wu, M. D. Tang-Schomer, E. Yoon, F. G. Omenetto, and D. L. Kaplan, “Silk as a multifunctional biomaterial substrate for reduced glial scarring around brain-penetrating electrodes,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 23, no. 25, pp. 3185–3193, 2013.
- [18] D. H. Kim *et al.*, “Dissolvable films of silk fibroin for ultrathin conformal bio-integrated electronics,” *Nat. Mater.*, vol. 9, no. 6, pp. 1–7, 2010.
- [19] E. M. Buendia, “Andamios de poli (Ácido láctico) /gelatina electrohilados en colector rotatorio no plano, para el crecimiento de células madre mesenquimales obtenidas de orina.” Universidad Nacional Autónoma de México, 2017.
- [20] J. Y. Bin Ding, *Electrospun Nanofibers for Energy and Environmental Applications*, 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014.
- [21] B. Zaarour, L. Zhu, and X. Jin, “A Review on the Secondary Surface Morphology of Electrospun Nanofibers: Formation Mechanisms, Characterizations, and Applications,” *ChemistrySelect*, vol. 5, no. 4, pp. 1335–1348, 2020.
- [22] J. R. Augustine, *Human Neuroanatomy*, John Wiley., vol. 53, no. 9. Academic Press, 2013.
- [23] D. W. Pfaff and N. D. Volkow, *Neuroscience in the 21st century: From basic to clinical, second edition*. 2016.
- [24] C. S. von Bartheld, J. Bahney, and S. Herculano-Houzel, “The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 524, no. 18, pp. 3865–3895, 2016.
- [25] “View of Drugs Loaded into Electrospun Polymeric Nanofibers for Delivery.pdf.” .
- [26] Y. C. Cárdena-Pérez, R. Vera-Graziano, E. d. J. Muñoz-Prieto, and E. Y. Gómez-Pachón, “Preparation and characterization of scaffold nanofibers by electrospinning, based on chitosan and fibroin from Silkworm (*Bombyx mori*).,” *Obtención y Caracter. andamios electrohilados a base quitosano y fibroína del capullo (Bombyx mori).*, vol. 19, no. 1, pp. 134–146, 2017.
- [27] D. Angius, H. Wang, R. J. Spinner, Y. Gutierrez-Cotto, M. J. Yaszemski, and A. J. Windebank, “A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 32, pp. 8034–8039, 2012.
- [28] D. Hoffman-Kim, J. A. Mitchel, and R. V. Bellamkonda, “Topography, Cell Response, and Nerve Regeneration,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 12, no. 1, pp. 203–231, 2010.
- [29] T. T. Cao and Y. Q. Zhang, “Processing and characterization of silk sericin from *Bombyx mori* and its application in biomaterials and biomedicines,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 61, pp. 940–952, 2016.
- [30] R. F. Weska, W. C. Vieira, G. M. Nogueira, and M. M. Beppu, “Effect of freezing methods on the properties of lyophilized porous silk fibroin membranes,” *Mater. Res.*, vol. 12, no. 2, pp. 233–237, 2009.

- [31] F. Wang and Y. Q. Zhang, *Bioconjugation of silk fibroin nanoparticles with enzyme and Peptide and their characterization*, 1st ed., vol. 98. Elsevier Inc., 2015.
- [32] S. Chopra and M. L. Gulrajani, "Comparative evaluation of the various methods of degumming silk," *Indian J. Fibre Text. Res.*, vol. 19, no. 2, pp. 76–83, 1994.
- [33] R. Yang, *Analytical methods for polymer characterization*. CRC Press, 2018.
- [34] Y. S. Yu and Y. P. Zhao, "Deformation of PDMS membrane and microcantilever by a water droplet: Comparison between Mooney-Rivlin and linear elastic constitutive models," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 332, no. 2, pp. 467–476, 2009.
- [35] X. M. Zhang and P. Wyeth, "Using FTIR spectroscopy to detect sericin on historic silk," *Sci. China Chem.*, vol. 53, no. 3, pp. 626–631, 2010.
- [36] A. Barth, "Infrared spectroscopy of proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1767, no. 9, pp. 1073–1101, 2007.
- [37] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies Contents: Tables and Charts*, 3rd ed. JOHN WILEY & SONS, LTD, 2001.
- [38] M. A. Koperska *et al.*, "Degradation markers of fibroin in silk through infrared spectroscopy," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 105, no. 1, pp. 185–196, 2014.
- [39] M. Boulet-Audet, F. Vollrath, and C. Holland, "Identification and classification of silks using infrared spectroscopy," *J. Exp. Biol.*, vol. 218, no. 19, pp. 3138–3149, 2015.
- [40] J. Saha, M. I. H. Mondal, M. R. Karim Sheikh, and M. A. Habib, "Extraction, Structural and Functional Properties of Silk Sericin Biopolymer from Bombyx mori Silk Cocoon Waste," *J. Text. Sci. Eng.*, vol. 09, no. 01, pp. 1–5, 2019.
- [41] S. Sarovart, B. Sudatis, P. Meesilpa, B. P. Grady, and R. Magaraphan, "The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment," *Rev. Adv. Mater. Sci.*, vol. 5, no. 3, pp. 193–198, 2003.
- [42] A. R. Lalit Jajpura, "The Biopolymer Sericin: Extraction and Applications," *J. Text. Sci. Eng.*, vol. 05, no. 01, pp. 1–5, 2015.
- [43] D. S. Wishart, "Interpreting protein chemical shift data," *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 58, no. 1–2, pp. 62–87, 2011.
- [44] T. Asakura, K. Okushita, and M. P. Williamson, "Analysis of the structure of Bombyx mori silk fibroin by NMR," *Macromolecules*, vol. 48, no. 8, pp. 2345–2357, 2015.
- [45] H. Saitô *et al.*, "High-Resolution ¹³C Nmr Study of Silk Fibroin in the Solid State by the Cross-Polarization-Magic Angle Spinning Method. Conformational Characterization Of Silk i and Silk II Type Forms of Bombyx Mori Fibroin by the Conformation-Dependent ¹³C Chemical Sh," *Macromolecules*, vol. 17, no. 7, pp. 1405–1412, 1984.
- [46] H. Zhang, J. Magoshi, M. Becker, J. Y. Chen, and R. Matsunaga, "Thermal properties of Bombyx mori silk fibers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 86, no. 8, pp. 1817–1820, 2002.
- [47] J. Zhu, H. Shao, and X. Hu, "Morphology and structure of electrospun mats from regenerated silk fibroin aqueous solutions with adjusting pH," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol.

41, no. 4, pp. 469–474, 2007.

- [48] S. Mazzi, E. Zulker, J. Buchicchio, B. Anderson, and X. Hu, “Comparative thermal analysis of Eri, Mori, Muga, and Tussar silk cocoons and fibroin fibers,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 116, no. 3, pp. 1337–1343, 2014.
- [49] L. Jeong, K. Y. Lee, J. W. Liu, and W. H. Park, “Time-resolved structural investigation of regenerated silk fibroin nanofibers treated with solvent vapor,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 38, no. 2, pp. 140–144, 2006.
- [50] N. Sasithorn, R. Mongkholrattanasit, and L. Martinová, “Preparation of Silk Fibroin Nanofibres by Needleless Electrospinning Using Formic Acid-Calcium Chloride as the Solvent,” *Appl. Mech. Mater.*, vol. 848, pp. 203–206, 2016.
- [51] A. Alessandrino, B. Marelli, C. Arosio, S. Fare, M. C. Tanzi, and G. Freddi, “Electrospun silk fibroin mats for tissue engineering,” *Eng. Life Sci.*, vol. 8, no. 3, pp. 219–225, 2008.
- [52] S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee, and W. H. Park, “Silk fibroin nanofiber. Electrospinning, properties, and structure,” *Polym. J.*, vol. 35, no. 2, pp. 185–190, 2003.
- [53] B. M. Min, G. Lee, S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee, and W. H. Park, “Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 7–8, pp. 1289–1297, 2004.
- [54] B. M. Min, L. Jeong, K. Y. Lee, and W. H. Park, “Regenerated silk fibroin nanofibers: Water vapor-induced structural changes and their effects on the behavior of normal human cells,” *Macromol. Biosci.*, vol. 6, no. 4, pp. 285–292, 2006.
- [55] H. Wang, H. Shao, and X. Hu, “Structure of silk fibroin fibers made by an electrospinning process from a silk fibroin aqueous solution,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 101, no. 2, pp. 961–968, 2006.
- [56] J. Ayutsede, M. Gandhi, S. Sukigara, M. Micklus, H. E. Chen, and F. Ko, “Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning. Part 3: Characterization of electrospun nonwoven mat,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 46, no. 5, pp. 1625–1634, 2005.
- [57] M. Kang and H. J. Jin, “Electrically conducting electrospun silk membranes fabricated by adsorption of carbon nanotubes,” *Colloid Polym. Sci.*, vol. 285, no. 10, pp. 1163–1167, 2007.
- [58] H. S. Baek, Y. H. Park, C. S. Ki, J. C. Park, and D. K. Rah, “Enhanced chondrogenic responses of articular chondrocytes onto porous silk fibroin scaffolds treated with microwave-induced argon plasma,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 202, no. 22–23, pp. 5794–5797, 2008.
- [59] S. S. Silva, D. Maniglio, A. Motta, J. F. Mano, R. L. Reis, and C. Migliaresi, “Genipin-modified silk-fibroin nanometric nets,” *Macromol. Biosci.*, vol. 8, no. 8, pp. 766–774, 2008.
- [60] K. Ohgo, C. Zhao, M. Kobayashi, and T. Asakura, “Preparation of non-woven nanofibers of Bombyx mori silk, Samia cynthia ricini silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 44, no. 3, pp. 841–846, 2002.
- [61] C. Meechaisue *et al.*, “Preparation of electrospun silk fibroin fiber mats as bone scaffolds: A preliminary study,” *Biomed. Mater.*, vol. 2, no. 3, pp. 181–188, 2007.

- [62] J. H. Lee, D. W. Song, Y. H. Park, and I. C. Um, "Effect of residual sericin on the structural characteristics and properties of regenerated silk films," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 89, pp. 273–278, 2016.
- [63] I. C. Um, H. Y. Kweon, Y. H. Park, and S. Hudson, "Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 29, no. 2, pp. 91–97, 2001.
- [64] G. Cheng, X. Wang, S. Tao, J. Xia, and S. Xu, "Differences in regenerated silk fibroin prepared with different solvent systems: From structures to conformational changes," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 22, pp. 1–8, 2015.
- [65] M. Wang, H. J. Jin, D. L. Kaplan, and G. C. Rutledge, "Mechanical properties of electrospun silk fibers," *Macromolecules*, vol. 37, no. 18, pp. 6856–6864, 2004.
- [66] L. F. Drummy, B. L. Farmer, and R. R. Naik, "Correlation of the β -sheet crystal size in silk fibers with the protein amino acid sequence," *Soft Matter*, vol. 3, no. 7, pp. 877–882, 2007.
- [67] H. Pan *et al.*, "Nanoconfined crystallites toughen artificial silk," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 10, pp. 1408–1414, 2014.
- [68] X. Y. Liu and N. Du, "C38," vol. 1, no. 19, 2010.
- [69] C. C. Winter *et al.*, "Transplantable living scaffolds comprised of micro-tissue engineered aligned astrocyte networks to facilitate central nervous system regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 38, pp. 44–58, 2016.