

**DESARROLLO DE ANDAMIOS FLEXIBLES DE
POLICAPROLACTONA/NANOTUBOS DE CARBONO PARA SER UTILIZADOS
EN RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN CONTRÁCTIL, ENSAYADOS EN
MÚSCULO ESTRIADO.**

JOSÉ PEÑARANDA ARMBRECHT, M.Sc. Químico

**Tesis Doctoral presentada como requisito parcial para optar al título de
Doctor en Ciencias Biomédicas**

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2023**

**DESARROLLO DE ANDAMIOS FLEXIBLES DE
POLICAPROLACTONA/NANOTUBOS DE CARBONO PARA SER UTILIZADOS
EN RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN CONTRÁCTIL, ENSAYADOS EN
MÚSCULO ESTRIADO.**

JOSÉ PEÑARANDA ARMBRECHT, M.Sc. Químico

**Tesis Doctoral presentada como requisito parcial para optar al título de
Doctor en Ciencias Biomédicas**

**DIRECTOR: JOSE ÓSCAR GUTIERREZ MONTES. MD.
CODIRECTORES: JULIO CESAR CAICEDO ÁNGULO. Ph.D
PAOLA ANDREA NEUTA ARCINIEGAS. Ph.D**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI**

2023

CONTENIDO	Pág
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ESTADO DEL ARTE	7
3. MARCO TEÓRICO	20
3.1. MÚSCULO ESTRIADO - MÚSCULO CARDIACO	20
3.1.1. Estructura y función del musculo estriado cardiaco	21
3.2. EVENTO ISQUÉMICO DEL MÚSCULO ESTRIADO CARDIACO (INFARTO DE MIOCARDIO, IM)	22
3.2.1. Remodelación del músculo estriado cardiaco	22
3.3. TERAPIAS PARA REGENERAR CM EN MÚSCULO ESTRIADO	23
3.3.1. Terapia celular inyectada (TCI)	24
3.3.2. Terapia de células libres con biomateriales	24
3.4. INGENIERÍA DE TEJIDOS (IT)	25
3.4.1. Introducción a los Andamios en IT	25
3.4.2. Utilización de los Andamios en IT	26
3.4.3. Propiedades de los Andamios	26
3.4.3.1. Propiedades biológicas de los andamios	27
3.4.4. Crecimiento de Células en Andamios	28
3.4.5. Técnicas de fabricación de andamios y matrices poliméricas	29
3.4.5.1. Técnica de fabricación de Fundición en solvente y lixiviación de partículas	31
3.5. POLÍMEROS SINTÉTICOS	31
3.5.1. Policaprolactona (PCL)	32
3.5.1.1. Propiedades Fisicoquímicas de la PCL	33
3.6. BIODEGRADACIÓN DE LA PCL	35
3.6.1. Degradación enzimática de la PCL	35
3.7. POLIMERIZACIÓN POR APERTURA DE ANILLO (ROP)	36

3.7.1. Mecanismo por coordinación-inserción	36
3.7.2. Octoato de estaño como iniciador	37
3.8. NANOTUBOS DE CARBONO (CNT)	38
3.8.1. Funcionalización de los MWCNT	39
3.9. PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LOS MWCNT	40
3.9.1. Percolación	41
3.9.2. Conductividad Eléctrica de los MWCNT	43
3.10. CARACTERIZACIÓN TÉRMICA DE MATERIALES COMPUESTOS	45
3.10.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	45
3.10.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)	46
3.11. CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE MATERIALES COMPUESTOS	46
3.11.1. Espectroscopia RAMAN	46
3.11.2. Espectroscopia Infrarroja (FT-IR)	47
3.11.3. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	47
3.11.4. Cristalografía de Rayos-X	48
3.12. POROSIDAD	49
3.13. PRUEBAS DE TRACCIÓN DE MATERIALES COMPUESTOS	50
3.13.1. Ensayo de compresión	50
3.14. PRUEBAS MICROMECAÑICAS DE MATERIALES COMPUESTOS	50
3.14.1. Nanoindentación	50
3.15. PRUEBAS ELÉCTRICAS DE MATERIALES COMPUESTOS	53
3.15.1. Método de Resistividad de Van der Paw (MVP)	53
3.15.2. Impedancia Eléctrica	54
3.15.3. Tomografía de Impedancia Eléctrica (TIE)	54
3.16. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD IN VITRO DE UN BIOCOMPUESTO	55
3.16.1. Citotoxicidad	55

3.16.2.	Cambios morfológicos y de membrana celular	56
3.16.3.	Procedimientos para evaluar la toxicidad	56
3.16.4.	Ensayo colorimétrico in vitro de colorante XTT	57
3.17.	PRUEBAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LOS MATERIALES COMPUESTOS	58
3.17.1.	Electromiografía	58
3.17.2.	Electromiografía invasiva	59
3.17.3.	Electromiografía de superficie	59
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	60
5.	HIPÓTESIS	63
5.1.	Hipótesis nula	63
6.	JUSTIFICACIÓN	64
7.	OBJETIVOS	66
7.1.	Objetivo General	66
7.2.	Objetivos Específicos	66
8.	MATERIALES Y MÉTODOS	67
8.1.	SÍNTESIS DE PCL MEDIANTE ROP	67
8.2.	FUNCIONALIZACIÓN DE LOS NANOTUBOS DE CARBONO A PCL SINTETIZADA Y A PCL COMERCIAL	69
8.3.	CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL MATERIAL COMPUESTO PCL/MWCNT	71
8.3.1.	Espectroscopia RAMAN	71
8.3.2.	Espectroscopia de Infrarrojo (FT-IR).	72
8.4.	MEDICIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA PCL Y EL MATERIAL COMPUESTO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE MASAS	72
8.4.1.	Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) de la malla impresa de PCL/MWCNT	73
8.4.2.	Difracción de Rayos-X (XRD, Alto ángulo)	74
8.5.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL MATERIAL	75

COMPUESTO PCL/MWCNT	
8.5.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	75
8.5.2. Análisis Termo Gravimétrico (TGA)	75
8.6. CARACTERIZACIÓN MECÁNICA	76
8.6.1. Nanoindentación del material compuesto PCL/MWCNT	76
8.6.2. Medida de Porosidad del material compuesto PCL/MWCNT mediante Microscopia electrónica de fluorescencia.	77
8.6.3. Ensayo de Tracción del material compuesto de PCL/MWCNT	79
8.7. CONDUCTIVIDAD DE LOS ANDAMIOS DE PCL/MWCNT	81
8.7.1. Prueba de impedancia eléctrica del material compuesto y de la PCL comercial.	81
8.8. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD IN VITRO DEL ANDAMIO FABRICADO CON FIBROBLASTOS DE LÍNEA CELULAR L929.	82
8.9. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC) A CARDIOMIOCITOS (CM)	85
8.9.1. Siembra de los andamios en las células de CM diferenciadas	87
8.10. IMPLANTACIÓN DEL ANDAMIO DE PCL/MWCNT EN MÚSCULO PERIFÉRICO DE BIOMODELO MURINO.	89
8.11. REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR DE MODELO MURINO.	94
8.11.1. Calibración y configuración de equipo	94
8.11.2. Configuración del software LabChart.	95
8.11.3. Disección músculo Biomodelo.	95
8.11.4. Registro electrofisiológico de la contracción muscular.	95
8.12. DISEÑO DE EXPERIMENTO	98
9. RESULTADOS Y ANÁLISIS	99

9.1. SÍNTESIS DEL PCL MEDIANTE ROP POR MEDIO DEL MECANISMO DE COORDINACIÓN-INSERCIÓN	100
9.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y TÉRMICA DE LA PCL	104
9.2.1. Comprobación de la síntesis de PCL mediante ROP por FT-IR y RAMAN	104
9.2.2. Comprobación de la Síntesis de PCL mediante ROP por RAMAN	105
9.2.3. Espectros de DSC y TGA de la comparación entre la PCL(s) y la PCL(c)	107
9.2.4. Espectros de TGA de la comparación entre la PCL(s) y la PCL(c)	109
9.3. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE MASAS.	111
9.3.1. Espectros de masas de la PCL(s) y la PCL(c)	111
9.4. FUNCIONALIZACIÓN DE PCL(s) Y PCL(c) CON MWCNT (ADICIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO A LA MATRIZ DE CAPROLACTONA)	114
9.5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL, TÉRMICAS, MECÁNICAS Y SUPERFICIALES DE LOS ANDAMIOS DE PCL/MWCNT	116
9.5.1. Verificación del Acoplamiento Químico entre la PCL(s)/MWCNT y PCL(c)/MWCNT mediante ROP por RAMAN	116
9.5.2. Espectro de DSC de la comparación Térmica entre la PCL(S) y el sólido fabricado de PCL(s)/MWCNT	120
9.5.3. Espectro de DSC de la comparación Térmica entre la PCL(c) y los andamios fabricados de PCL(c)/MWCNT	121
9.5.4. Espectros de TGA de la comparación entre la PCL(s) y los Sólidos de PCL(s) /MWCNT y los andamios de PCL(c) y PCL(c)/MWCNT	122

9.5.5. Análisis estadístico de TGA obtenidos para los andamios de PCL/MWCNT	126
9.6. CONSTRUCCIÓN DE LOS ANDAMIOS DE PCL(C)/MWCNT	128
9.7. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA INTERNA DE LOS ANDAMIOS DE PCL(C)/MWCNT MEDIANTE RAYOS XRD	129
9.8. DETERMINACIÓN DE LA POROSIDAD DE LOS ANDAMIOS DE PCL(C)/MWCNT	132
9.8.1. Determinación de la Porosidad de los Andamios de PCL(C)/MWCNT mediante Microscopía Óptica	132
9.8.2. Determinación de la porosidad de los andamios de PCL(C)/MWCNT mediante SEM	137
9.9. ENSAYO DE TRACCIÓN DE LOS ANDAMIOS PCL(C)/MWCNT	140
9.9.1. Cálculo de E y σ_T para los andamios de PCL(C)/MWCNT	140
9.9.2. Análisis estadístico de los datos de Tracción obtenidos para los andamios de PCL/MWCNT	144
9.9.3. Observación de Superficie de Fractura de las probetas de los andamios de PCL(C)/MWCNT mediante SEM	146
9.10. ANÁLISIS MECÁNICO MEDIANTE INDENTACIÓN INSTRUMENTADA (NANOINDENTACIÓN) A LOS ANDAMIOS DE PCL(C)/MWCNT	148
9.11. DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE LOS ANDAMIOS DE PCL(C)/MWCNT MEDIANTE IMPEDANCIA.	154
9.12. DIFERENCIACIÓN CELULAR DE MSC A CM	160
9.13. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD POR MTT DE LOS ANDAMIOS DE PCL(C)/MWCNT	161
9.14. COMPROBACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS ANDAMIOS DE PCL(C)/MWCNT	163
9.15. IMPLANTACIÓN DE LOS ANDAMIOS EN LOS MÚSCULOS	164

DIGITORUM EXTENSOR LONGUS (EDL) DE BIOMODELOS MURINOS.	
9.16. PRUEBAS DE CONTRACCIÓN MUSCULAR CON LOS ANDAMIOS DE PCL(C)/MWCNT	166
9.16.1. Análisis estadístico de los datos de contracción muscular obtenidos para los andamios de PCL/MWCNT	174
10. CONCLUSIONES	177
11. IMPACTOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	180
12. ESTRATEGIAS DE COMUNICACIÓN	181
13. RECURSOS CONTACTOS E INFRAESTRUCTURA	182
14. REFERENCIAS	183

LISTA DE FIGURAS		Pág
Figura 3.1.	Estructura del Músculo Estriado Cardíaco (modificada por: José Peñaranda Armbrecht, tomada de: Shadrin, 2016)	21
Figura 3.2.	Esquema de la remodelación cardíaca (Modificada por: José Peñaranda Armbrecht; tomada de: Shadrin. 2006)	23
Figura 3.3.	Representación estructura de la PCL (realizada por José Peñaranda Armbrecht, 2023)	32
Figura 3.4.	Nanotubo de carbono (imagen, tomada de Martín, 2011)	38
Figura 3.5.	a) nanotubo de carbono de multicapa (MWCNT), b) nanotubo de carbono de capa simple (SWCNT) (imagen, tomada de Dehghani et al., 2019).	39
Figura 3.6.	Estructura de los MWCNT añadiendo grupos funcionales aminos. PCL (realizada por: José Peñaranda Armbrecht, 2020)	40
Figura 3.7.	Conductancia eléctrica de NTC basada en la teoría de la percolación. (Tomada de Doh, 2021)(Modificada por: José Peñaranda Armbrecht, 2021).	42
Figura 3.8.	Movimiento del electrón dentro de un nanotubo de carbono (conducción balística) (tomado de: De la Vega, 2009)	43
Figura 3.9.	Proceso de medición de la estructura cristalina de un material por medio de cristalografía de rayos X (tomada de: .Ryu, 2017; modificada por: José Peñaranda Armbrecht, 2023)	49
Figura 3.10.	Esquema de medida dinámica de la dureza mediante nanoindentación (tomada de Martín, 2003).	51
Figura 3.11.	Curva típica de carga – descarga en procesos de nanoindentación, (tomada de Martín, (2003))	52
Figura 3.12.	Medición del MVP de una muestra de forma arbitraria con	53

	sus cuatro puntos de medición de resistividad (imagen tomada de: Banaszczyk, 2010).	
Figura 3.13.	Gráfica de impedancia (Z) vs Frecuencia (tomada de: Alvero-Cruz, 2011)	55
Figura 3.14.	Esquema de la transformación de la sal tetrazolio a formazan donde hay un cambio de color de amarillo de la sal tetrazolio a un color naranja debido al formazán producido.	58
Figura 4.1.	Gráfico de barras donde se muestra la etiología de falla cardiaca (tomada de: Gómez, 2016)	60
Figura 8.1.	Montaje de la polimerización de la PCL. Se observa el balón inmenso en la arena para mantener homogénea la temperatura.	67
Figura 8.2.	Aspecto del balón con PCL sólida blanca de alto peso molecular.	68
Figura 8.3.	Fotografía del balón con PCL obtenida después del calentamiento a 140°C por 48 h, el reposo hasta temperatura ambiente y la disolución con cloroformo.	68
Figura 8.4.	Fotografía del equipo de ultrasonido empleado para lograr el acople de MWCNT/PCL (Equipo Ubicado en tecnoacademia SENA-ASTIN)	69
Figura 8.5.	Fotografía del equipo de ultrasonido con un Erlenmeyer en su interior, que contiene MWCNT disueltos en cloroformo.	70
Figura 8.6.	Fotografía de dos Erlenmeyer con soluciones de PCL y MWCNT, respectivamente, dentro del equipo de ultrasonido.	70
Figura 8.7.	Fotografía de cuatro cajas de Petri, conteniendo membranas de PCL/MWCNT precipitadas con MeOH antes de ser secadas en campana de extracción.	71
Figura 8.8	Fotografía del equipo de espectroscopia RAMAN marca,	72

	ThermoScientific (Equipo ubicado en Tecnoparque SENA ASTIN).	
Figura 8.9.	Fotografía del equipo de FT-IR marca Perkin Elmer Spectrum IR 10.7.2 (equipo ubicado en el SENA ASTIN)	72
Figura 8.10.	Fotografía del equipo de espectroscopia de masas (Ubicado en la Facultad de ciencias naturales y exactas Universidad del Valle)	73
Figura 8.11.	Fotografia del equipo de SEM marca NeoScope JCM-5000 (ubicado en tecnoparque SENA-ASTIN)	74
Figura 8.12.	Difractómetro de Rayos-X de referencia PANalytical X`pert proTM (ubicado en el departamento de física Universidad del Valle)	74
Figura 8.13.	Equipo de DSC marca Mettler Toledo (ubicado Tecnoparque SENA-ASTIN)	75
Figura 8.14.	Fotografía del equipo de TGA marca Mettler Toledo (ubicado en Tecnoparque SENA-ASTIN)	76
Figura 8.15.	Equipo de nanoindentación utilizado en los andamios de PCL/MWCNT (equipo ubicado en ingeniería de materiales, universidad del Valle)	76
Figura 8.16.	Fotografía del microscopio NIKON ECLIPSE Ni-U90 (Las imágenes resultantes son del Laboratorio de imágenes del postgrado en Ciencias-Biología de la Universidad del Valle por Juan Felipe Ortega Giraldo).	77
Figura 8.17.	Fotografía de la cámara digital NIKON DS-Ri1 U3 (las imágenes resultantes son del Laboratorio de imágenes del postgrado en Ciencias-Biología de la Universidad del Valle-Juan Felipe Ortega Giraldo).	78
Figura 8.18.	Imagen del software NIS ELEMENTS Br (Laboratorio de imágenes del postgrado en Ciencias-Biología de la Universidad del Valle-Juan Felipe Ortega Giraldo).	78
Figura 8.19.	Fotografía de la máquina de Ensayo Universal TINIUS	79

	OLSEN H50Ks (ubicada en Tenoparques SENA-ASTIN).	
Figura 8.20.	Fotografía ilustrando el aspecto de las probetas de PCL/MWCNT de acuerdo con la norma ASTM D638-14.	79
Figura 8.21.	Fotografías de a) ensayo de Tracción a la probeta de PCL/MWCNT 1%, b) ensayo de Tracción a la probeta de PCL/MWCNT 3%, c) ensayo de Tracción a la probeta de PCL/MWCNT 5%.	80
Figura 8.22.	Fotografía del equipo de impedancia Eléctrica (ubicado en el departamento de Física de la Universidad del Valle)	81
Figura 8.23.	Porta muestras para medir la impedancia eléctrica del material (ubicado en el departamento de Física de la Universidad del Valle)	81
Figura 8.24.	Fotografía de uno de los datos de la impedancia eléctrica arrojado por el equipo.	82
Figura 8.25.	Imagen de la siembra de Línea celular L929 de fibroblastos realizada en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, de la Universidad del Valle.	83
Figura 8.26.	Imagen del procedimiento de evaluación del crecimiento de las células mediante microscopio realizado en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, de la U del Valle.	83
Figura 8.27.	Imagen de la placa de 24 pozos con el extracto incubado y sembrado en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, de la U del Valle	84
Figura 8.28.	Fotografía de los andamios con células L929 en placa de 96 pozos. Realizado en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, de la Universidad del Valle	84
Figura 8.29.	Imagen del equipo de ELISA, STAT-FAX 2100 Tomada en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, de la Universidad del Valle	85
Figura 8.30.	Fotografía de las células MSC tomadas en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, de la Universidad del Valle.	85

Figura 8.31.	Ilustración de la preparación del medio de MSC realizado en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, Universidad del Valle	86
Figura 8.32.	Células de CM diferenciados después de los 21 de incubación.	86
Figura 8.33.	Conteo de células con azul de tripán en cámara de Neubauer.	87
Figura 8.34.	Andamios de PCL(c)/MWCNT 1% y PCL(c)/MWCNT 5% puestos en una placa de 24 pozos.	88
Figura 8.35.	Agregación de una gota de SFB a los andamios de PCL(c)/MWCNT en la placa de 24 pozos.	88
Figura 8.36.	Colocación de 2 mL de solución de MSC y CM a los pozos con los andamios de PCL(c)/MWCNT.	89
Figura 8.37.	Solución de MSC y CM agregada a todos los pozos con andamios de PCL(c)/MWCNT	89
Figura 8.38.	Imagen de la rata wistar sedada con isoflurano. Realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle	90
Figura 8.39.	Imagen del corte longitudinal sobre el músculo ELD de la rata Wistar, realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle.	90
Figura 8.40.	Imagen del músculo EDL electrofulgurado de la pata izquierda de la rata wistar, realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle.	91
Figura 8.41.	Imagen del procedimiento de sutura del músculo EDL fulgurado realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle	91
Figura 8.42.	Imagen de los andamios de PCL/MWCNT utilizados en implantación en las ratas, realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle.	92
Figura 8.43.	Imagen del andamio celularizado de PCL/MWCNT	92

	utilizado para la implantación. Realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle	
	Imagen del andamio de PCL/MWCNT implantado en EDL de la rata Wistar realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle	93
Figura 8.44.	Imagen de una rata Wistar un día después de la implantación de los andamios en el área de recuperación de la facultad de Salud de la Universidad del Valle	94
Figura 8.45.	Imagen masa de 50 g especial para la calibración, realizado en el laboratorio de fisiología, de la Universidad del Valle	95
Figura 8.46.	Fotografía del músculo del biomodelo ubicado en el soporte especial realizado en el laboratorio de fisiología de la Universidad del Valle.	96
Figura 8.47.	Ilustración de la posición de los electrodos de estimulación durante el registro fisiológico de la contracción muscular, realizado en el laboratorio de fisiología, de la Universidad del Valle.	96
Figura 8.48.	Imagen de la posición de los electrodos en el músculo realizado en el laboratorio de fisiología, de la Universidad del Valle.	97
Figura 8.49.	Imagen de la señal de contracción muscular reflejada en la pantalla del transductor de Tracción del laboratorio de fisiología de la Universidad del Valle.	97
Figura 8.50.	Síntesis de PCL de alto peso molecular obtenida mediante el mecanismo de coordinación-inserción.	100
Figura 9.1	PCL de alto peso molecular obtenida por el mecanismo de coordinación-inserción siendo macerada en mortero.	100
Figura 9.2.	PCL sintetizada por ROP, empacada en un frasco de vidrio de 1000 mL.	101
Figura 9.3.	Etapas de inserción del alcohol primario 1-octanol al	101

	Sn(Oct) ₂ , para formar una especie activa.	
Figura 9.5.	Fase de Propagación de la polimerización por ROP de la PCL	103
Figura 9.6.	Fase de finalización de la polimerización por ROP de la PCL, donde la incorporación de un grupo hidroxilo a la molécula activa, hace que el complejo activo de estaño se retire de la reacción y quede la PCL de alto peso molecular.	103
Figura 9.7.	Comprobación de la síntesis de PCL mediante FT-IR y su comparación con respecto al monómero de CL.	104
Figura 9.8.	Verificación mediante RAMAN de la polimerización de la PCL mediante ROP y su comparación con la PCL comercial y el monómero de CL.	106
Figura 9.9.	Estructura química de a) Caprolactona (CL), b) Policaprolactona (PCL)	107
Figura 9.10.	Análisis de las temperaturas de fusión, cristalización, y descomposición de la PCL(s) y PCL(c)	109
Figura 9.11.	Espectros de TGA de la PCL(S) y PCL(C)	111
Figura 9.12.	Espectro de masas de la PCL(s) registrando un pico base de 115m/z y un ion molecular de 480 m/z	112
Figura 9.13.	Espectro de masas de la PCL(c) registrando un pico base de 57m/z y un ion molecular de 668 m/z	112
Figura 9.14.	Resultado obtenido del acoplamiento de la PCL(s) con los MWCNT: a) PCL(s)/MWCNT 1% b) PCL(s)/MWCNT 3% y PCL(s)/MWCNT 5%.	114
Figura 9.15.	Andamios obtenidos del acoplamiento de la PCL(c) con los MWCNT: a) PCL(c)/MWCNT 1% b) PCL(c)/MWCNT 3% y c) PCL(c)/MWCNT 5%	115
Figura 9.16.	Espectro RAMAN de MWCNT mostrando la banda D, la banda G y la banda 2D.	116
Figura 9.17.	Comprobación mediante espectrometría RAMAN que el	118

	acoplamiento entre la PCL(s) y los MWCNT se llevó a cabo químicamente.	
Figura 9.18.	Comprobación mediante espectrometría RAMAN que el acoplamiento entre PCL(c) y MWCNT se realizó químicamente para la fabricación de los andamios PCL(c)/MWCNT en todos sus porcentajes	119
Figura 9.19.	Comparación de las temperaturas de fusión, cristalización y degradación entre la PCL(s) y el sólido fabricado de PCL(s)/MWCNT.	121
Figura 9.20.	Comparación de las temperaturas de fusión, cristalización y degradación entre la PCL(c) y los andamios de PCL(c)/MWCNT.	122
Figura 9.21.	Comparación entre los espectros de TGA de la PCL(s) con respecto a los sólidos de PCL(s)/MWCNT.	123
Figura 9.22.	Comparación entre el descenso de la temperatura de degradación con respecto al incremento de los WMCNT en los sólidos fabricados de PCL(s)/MWCNT.	124
Figura 9.23.	Comparación entre los espectros de TGA de la PCL(c) con respecto a los andamios de PCL(c)/MWCNT.	125
Figura 9.24.	Comparación entre el descenso de la temperatura de degradación con respecto al incremento de los WMCNT en los andamios de PCL(c)/MWCNT	125
Figura 9.25.	Material compuesto de PCL(C)/MWCNT antes de ser llevado a campana de flujo laminar para ser secado y obtener los andamios de PCL(C)/MWCNT.	129
Figura 9.26.	Determinación de la estructura interna de los andamios de PCL(C)/MWCNT mediante XRD.	130
Figura 9.27.	Geometría de los máximos de difracción que permiten determinar la estructura de los cristales de los andamios de PCL(C)/MWCNT.	131
Figura 9.28.	Porosidad del PCL(C) observada por microscopio óptico	132

	con un aumento de (4-1.5X)	
Figura 9.29.	Porosidad del andamio de PCL(C)/MWCNT 1%, observado por microscopio óptico con un aumento de (20-2X).	133
Figura 9.30.	Porosidad del andamio de PCL(C)/MWCNT 3%, observado por microscopio óptico con un aumento de (20-2X).	134
Figura 9.31.	Porosidad del andamio de PCL(C)/MWCNT 5%, observado por microscopio óptico con un aumento de (10X).	135
Figura 9.32.	Determinación de la morfología superficial de los poros del andamio de PCL(C)/MWCNT 1%.	137
Figura 9.33.	Determinación de la morfología superficial de los poros del andamio de PCL(C)/MWCNT 3%.	138
Figura 9.34.	Determinación de la morfología superficial de los poros del andamio de PCL(C)/MWCNT 5%.	139
Figura 9.35.	Ensayo de Tracción para los andamios de PCL(C)/MWCNT en función del porcentaje de nanotubos de carbono 1%, 3% y 5%.	140
Figura 9.36.	Incremento del Módulo elástico para los andamios de PCL(c)/MWCNT a medida que se incrementa la cantidad de MWCNT	141
Figura 9.37.	Incremento de la resistencia a la Tracción de los andamios de PCL(c)/MWCNT a medida que se aumenta la cantidad de MWCNT	144
Figura 9.38a	Fractura de la probeta del andamio PCL(C)/MWCNT 1%. La probeta presenta porosidad y se observan hilos en su fractura	146
Figura 9.38b	Fractura de la probeta para ensayo de traccion del andamio PCL(C)/MWCNT 3%.	147
Figura 9.38c	Fractura de la probeta del andamio PCL(C)/MWCNT 5%	147

	(Karen Astudillo, Tecnoparque, Sena)	
Figura 9.39.	Fractura de una probeta del andamio de PCL(c)/MWCNT al 3%, con forma de hilo	148
Figura 9.40.	Desplazamiento de los andamios de PCL(C)/MWCNT obtenida por nanoindentación.	149
Figura 9.41.	Dureza de los andamios de PCL(C)/MWCNT obtenida por nanoindentación.	149
Figura 9.42.	Módulo Elástico de los andamios de PCL(C)/MWCNT calculados por nanoindentación.	151
Figura 9.43.	Resistencia de la deformación plástica de los andamios de PCL(C)/MWCNT	152
Figura 9.44.	Recuperación Plástica de los andamios de PCL(C)/MWCNT.	153
Figura 9.45.	Comprobación de la conducción eléctrica de la PCL(c) mediante la prueba de Impedancia de las 4 puntas.	154
Figura 9.46.	Comprobación de la conducción eléctrica de la PCL(C)/MWCNT 1% mediante la prueba de Impedancia de las 4 puntas.	155
Figura 9.47.	Comprobación de la conducción eléctrica de la PCL(C)/MWCNT 3% mediante la prueba de Impedancia de las 4 puntas.	155
Figura 9.48.	Comprobación de la conducción eléctrica de la PCL(C)/MWCNT 5% mediante la prueba de Impedancia de las 4 puntas.	156
Figura 9.49.	Resultados de Resistividad de los andamios de PCL(C)/MWCNT comparado con PCL(C).	157
Figura 9.50.	Flujo de corriente eléctrica en el corazón (Tomada de Moreno, 2016).	159
Figura 9.51.	MSC sin diferenciar vistas desde un microscopio óptico	160
Figura 9.52.	Células diferenciadas a cardiomiocitos (CM) vistas desde un microscopio óptico	160

Figura 9.53.	Resultado de la prueba de citotoxicidad de los andamios de PCL(C)/MWCNT	162
Figura 9.54.	Viabilidad celular del andamio de PCL(C)/MWCNT 1%	163
Figura 9.55.	Viabilidad celular del andamio de PCL(C)/MWCNT 5%	163
Figura 9.56.	Integración del andamio de PCL(C)/MWCNT 1% al EDL del biomodelo murino.	165
Figura 9.57.	Integración del andamio de PCL(C)/MWCNT 5% al EDL del biomodelo murino.	165
Figura 9.58.	Representación gráfica de la contracción muscular, descrita anteriormente (Carter, 2018).	167
Figura 9.59.	Resultados de la prueba de contracción muscular de los andamios de PCL(c)/MWCNT del músculo EDL de biomodelos murinos	169
Figura 9.60.	Comparación entre la fuerza de contracción muscular de los andamios de PCL(c)/MWCNT al 1% sin células y con células con respecto a la contracción muscular del musculo electrofulgurado y la contracción natural.	170
Figura 9.61.	Comparación entre la fuerza de contracción muscular de los andamios de PCL(c)/MWCNT al 1% sin células y con células.	171
Figura 9.62.	Comparación entre la fuerza de contracción muscular de los andamios de PCL(c)/MWCNT al 5% sin células y con células con respecto a la contracción muscular del musculo electrofulgurado y la contracción natural.	172
Figura 9.63.	Comparación entre la fuerza de contracción muscular de los andamios de PCL(c)/MWCNT al 5% sin células y con células.	172
Figura 9.64.	Comparación entre la fuerza de contracción muscular de los andamios de PCL(c)/MWCNT al 5% con células con respecto a la fuerza de contracción del musculo fulgurado.	173

Comparación entre la fuerza de contracción muscular de
Figura 9.65. los andamios de PCL(c)/MWCNT al 5% con células con 174
respecto a la fuerza de contracción del musculo natural.

LISTA DE TABLAS		Pág
Tabla 3.1.	Características del músculo esquelético y el músculo estriado (tomada de Gómez, 2016)	20
Tabla 3.2.	Técnicas de fabricación de andamios en IT (Tomada de: Eltom, 2019; modificada por José Peñaranda, 2023); (Collins, 2021)	29
Tabla 3.3.	Propiedades Fisicoquímicas y mecánicas de la PCL	34
Tabla 3.4.	Características principales de los MWCNT utilizados en esta investigación	45
Tabla 3.5.	Algunos polímeros sintéticos biodegradables, utilizados en ingeniería de tejidos	48
Tabla 9.1.	Análisis de varianza del Espectro TGA según PCL(c) con MWCNT y Temperatura.	126
Tabla 9.2.	Prueba de contrastes múltiples entre PCL y MWCNT con valores-p ajustados por el método de Bonferroni para los espectros TGA	127
Tabla 9.3.	Cálculo del módulo elástico de los andamios de PCL(C)/MWCNT 1%	141
Tabla 9.4	Estimación de la resistencia máxima de los andamios de PCL(C)/MWCNT 1%	143
Tabla 9.5.	Análisis de varianza del Esfuerzo según PCL con MWCNT y Elongación.	145
Tabla 9.6.	Prueba de contrastes múltiples entre tratamientos con valores-p ajustados por el método de Bonferroni para la variable Esfuerzo.	145
Tabla 9.7.	Valores de resistividad hallados en el ensayo de impedancia	156
Tabla 9.8.	Condiciones experimentales para las pruebas de	168

contracción muscular con los andamios de
PCL(C)/MWCNT

Tabla 9.9. Análisis de varianza de la Fuerza en el tiempo según PCL(c) con MWCNT. 175

Tabla 9.10. Prueba de contrastes múltiples entre tratamientos con valores-p ajustados por el método de Bonferroni para la variable Fuerza. 176

ABREVIATURAS

ECV	Enfermedades Cardiovasculares
MEC	Matriz extracelular
PCL	Policaprolactona
MWCNT	Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple
EDL	Extensor Digitorum Longus
CM	Cardiomiocitos
MSC	Células Mesenquimales
PLLA	ácido poli L-Láctico
PGA	ácido poliglicólico
PGLA	ácido poliglicólico-co-lacturo
IM	Infarto de Miocardio
FC	Falla Cardíaca
CL	ϵ -caprolactona
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
TGA	Análisis Termogravimétrico
RMN-1H	Resonancia Magnética Nuclear
XRD	Difracción de Rayos X
ROP	Polimerización por apertura de anillo
GPC	cromatografía permeable de Gel
CNT	Nanotubos de Carbono
3D	Tercera Dimensión
SEM	microscopía electrónica de Barrido
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
DMDFs	Damaged Miofibers Derived Factors
TGF-β1	Tumor Growth Factor
TCI	Terapia celular inyectada
IT	Ingeniería de Tejidos
T_g	Temperatura de Transición Vítrea
T_m	Temperatura de Fusión

THF	tetrahidrofurano
FDA	Food and Drugs Administration
SWCNT	nanotubo de carbono de pared simple
Φ	fracción de volumen
Φ_c	umbral de percolación
σ_c	conductividad eléctrica
SPM	microscopio de sonda de barrido
G_0	cuanto de conductancia
h	Constante de Planck (6.626×10^{-34} J.S)
e	Carga del electrón (1.602×10^{-19} C)

Dedicatoria

Esta tesis Doctoral está dedicada a mi esposa Liz Solange Correa Martínez y a mis hijos Juan José Peñaranda Correa y Arturo Peñaranda Correa, porque me brindaron todo su apoyo, comprensión y cedieron su tiempo para que “papá estudie”. Pero ante todo por su infinita paciencia y tolerancia en tiempos difíciles. Para ellos mi infinito amor y gratitud.

Agradecimientos

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a:

- A mis padres Gerardo Peñaranda e Inge Ambrecht, por su apoyo y solidaridad durante todo el Doctorado.
- A mi director de Tesis Doctor José Óscar Gutiérrez Montes, porque desde que inicié con el Doctorado, me estuvo acompañando en todos los procesos y etapas, nunca me dejó a un lado, siempre me escuchó y soportó mi terquedad.
- A mi codirector Julio César Caicedo Angulo por su apoyo en la escritura de mi tesis y por sus valiosos aportes en las pruebas de caracterización de los materiales.
- A mi codirectora Paola Andrea Neuta Arciniegas por su apoyo en la escritura de la mi tesis y por sus valiosos aportes en la diferenciación de células mesenquimales a cardiomiocitos y cultivo celular.
- A los jurados de tesis, que se tomaron el trabajo de leer y comprender este trabajo de investigación de Tesis Doctoral.
- A Mario Correa, por sus valiosos consejos, amistad y aportes.
- A Carlos Arango por la realización de las pruebas de impedancia eléctrica de los andamios.
- A Yerson Diaz por la realización de las pruebas de tracción, DSC y TGA a los andamios.
- A Felipe Navia por la realización de las pruebas de contracción muscular de las ratas Wistar.

- A José Lara por la realización de las pruebas de Van der Pauw para calcular la resistividad eléctrica de los andamios.
- A Colfuturo en conjunto con vicerrectoría de investigaciones por el apoyo recibido en la Beca Bicentenario Cohorte I.
- Al departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad del Valle en cabeza del profesor Julio Cesar Montoya, del cual siempre recibí el acompañamiento para realizar en feliz término esta tesis Doctoral.
- Al grupo de Farmacología Universidad del Valle, por los valiosos aportes teóricos en el campo de los biomateriales en las reuniones de grupo.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen un problema creciente en el mundo, con 523 millones de personas afectadas por esta enfermedad prevenible en el año 2019. El número de muertes se incrementó de 12.1 millones en 1990 a 18.6 millones de personas en el año 2019. El número de personas discapacitadas por ECV ha aumentado de 17.7 millones a 34.4 millones de 1991 a 2019. Se incluye los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica post infarto del miocardio que pasaron de un 4% en los años de 1992 a 1996 a un 13% entre los años 2001 a 2011. Uno de los avances más promisorios en investigación, es la utilización de biomateriales (andamios) que sirvan como soporte a células musculares estriadas para que puedan ejercer sus funciones de recuperación de la matriz extracelular (MEC) que ha sido destruida por alguna enfermedad o lesión y que estos andamios no produzcan respuesta inmune. Un componente fundamental es la creación de biomateriales que puedan mejorar la salud y la calidad de vida. Estos biomateriales deben tener propiedades de biocompatibilidad con el organismo humano (no generar rechazo), no ser citotóxicos, y además presentar una buena elasticidad, flexibilidad y resistencia mecánica. También deben garantizar la posibilidad de crecimiento celular en ellos. El desarrollo de estos nuevos materiales, tales como bloques porosos, específicamente andamios fabricados de policaprolactona (PCL), aportarán posibilidades de solución a problemas reconstructivos mediante su implante en el organismo.

En esta tesis se sintetizó PCL de alto peso molecular, el cual tuvo propiedades similares a la PCL comercial. Se logró la funcionalización de las PCL comercial y sintética con los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT), resultando en materiales compuestos y membranas cuyo acoplamiento químico fue verificado mediante RAMAN. Los acoplamientos más adecuados fueron al 1%, 3% y 5% de MWCNT respecto a la PCL. En general, las durezas encontradas para los andamios mediante nanoindentación fueron muy elevadas (10-12 GPa), significando que son estables al momento de ser implantados. El andamio de PCL_(C)/MWCNT 5%, fue el

más flexible y menos resistente. En las fracturas, los andamios presentaron hilos, posiblemente porque los MWCNT actuaron como refuerzo ante una posible ruptura. Además, este PCL_(C)/MWCNT 5% tuvo una porosidad con tamaño de poro e interconectividad adecuada para el anclaje de las células musculares, además presentó una conductividad también adecuada para la posible recomposición del tejido. Es más, el mencionado andamio tuvo baja citotoxicidad, con una viabilidad celular de 90% aunque todos los andamios mostraron viabilidad hasta por 15 días de haber implantado las células diferenciadas. En suma, en este trabajo se desarrollaron andamios flexibles de PCL/MWCNT que permitieron servir como soporte a células de músculo estriado, comprobando su respuesta mecánica y eléctrica, y con una flexibilidad, elasticidad similar al tejido circundante. Finalmente, en la implantación de los andamios en músculo Extensor Digitorum Longus EDL de biomodelos murinos se evidenció integración al tejido sin respuesta inflamatoria después de 10 días; en las pruebas de contracción muscular los andamios PCL_(C)/MWCNT 5% con células diferenciadas a cardiomiocitos (CM) mostraron una fuerza de contracción muscular superior a la fuerza de contracción natural en un 11.15% y de 21.16% con respecto a la fuerza de contracción del músculo electrofulgurado. Por lo anterior, se considera que existe una posibilidad importante de pasar hacia una etapa subsecuente para poner a prueba los andamios aquí desarrollados en biomodelos porcinos y escalarlo a seres humanos.

Palabras clave: Policaprolactona, Nanotubos de carbono de pared múltiple, andamio
Fuerza de contracción muscular

1. INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano tiene dos tipos de músculos estriados: el músculo esquelético y el músculo cardíaco. Este último, el músculo estriado cardíaco puede ser categorizado dependiendo de su fenotipo como altamente oxidativo/tipo II o como bajamente oxidativo/tipo I (Shadrin et al., 2016). Estos tejidos pueden ser debilitados o dañados como producto del envejecimiento, la actividad física, accidentes o pérdidas, además de ser susceptibles a eventos isquémicos. Las células muertas no suelen ser capaces de regenerarse nuevamente para el caso del músculo estriado cardíaco, para el caso del músculo estriado esquelético existen células como los fibroblastos que reparan la zona dañada con la producción de cicatrices que no poseen propiedades contráctiles. El proceso de cicatrización es un mecanismo que depende de la inflamación inicial que ocurre en el tejido lesionado (fase aguda). Posterior a la inflamación inicial, al llegar las células endoteliales y fibroblastos se genera un tejido de granulación inicial, conllevando a una neovascularización (factor de crecimiento endotelial) que estimula la proliferación y la actividad quimiotáctica de células como fibroblastos (encargadas de generar matriz de colágeno nueva fase de inflamación tardía) iniciando el proceso de cicatrización (Porras-Reyes y Mustoe, 1992; Valencia-Basto, 2010).

El concepto que las células cardíacas no pueden regenerarse está en revisión pues estudios recientes han demostrado la existencia de células cardíacas con capacidad de proliferar, aunque no se sabe aún si estas células están en el corazón o si provienen de médula ósea (Prosper-Cardozo et al., 2003; Bursac, 2009, Shadrin, 2016). Por otra parte, las células provenientes de la médula ósea han mostrado una gran habilidad de diferenciación hacia células cardíacas o células endoteliales, contribuyendo a la vascularización del corazón. Esta regeneración cardíaca proveniente de este tipo de células viene acompañada por el mejoramiento de la función de eyección cardíaca y en consecuencia un mejoramiento de la capacidad contráctil del corazón (Neuta, 2013). Uno de los tipos de células de médula ósea

que ha venido ganando importancia en investigación son las células mesenquimales (MSC) (células madre adultas multipotentes); este tipo de células tiene la capacidad de diferenciarse a cardiomiocitos tanto *in vitro* como *in vivo* (Ohnishi et al., 2007; Prosper-Cardozo, et al. 2003). Su importancia reside en que, no solamente tienen la capacidad de actuar como injerto, sino que también adquieren características contráctiles de los cardiomiocitos y lo que es más relevante, incrementan la función cardíaca (Masumoto et al., 2014).

Existen diferentes tipos de células madre que están siendo estudiadas por su potencial en regeneración cardíaca. Algunos estudios en animales sugieren que las células madre musculares (mioblastos), células madre de médula ósea (mesenquimales, endoteliales o hematopoyéticas) o incluso las mismas células cardíacas, pueden contribuir *in vivo* a producir regeneración cardíaca y mejorar la contractilidad cardíaca (Prosper-Cardozo et al., 2003). Las células madre embrionarias son un tipo de células pluripotenciales capaces de diferenciarse en diversos tejidos completamente funcionales como células de hígado, células nerviosas, células musculares y para este caso en células cardíacas (Prosper-Cardozo et al., 2003; Donghui et al., 2008). Pese a que estas células se han utilizado ampliamente en investigación, su origen, potencial inmunogénico y la posibilidad de generar tumores *in vivo* ha generado muchas implicaciones éticas, por lo que en la actualidad están en varios países restringidos o su uso es limitado.

En relación con lo anterior, se están buscando alternativas para la regeneración del tejido muscular estriado. Una de estas alternativas es el uso de biomateriales. Los biomateriales que están siendo utilizados en regeneración cardíaca (o de otros músculos estriados) deben cumplir con requisitos como: ser reabsorbibles, ser biocompatibles con el tejido cardíaco (que no generen rechazo), reducir a la mínima expresión la hostilidad del microambiente local, perdurar el tiempo lo suficiente como para que las células que transportan se integren al biomaterial, tener una adecuada porosidad para que pueda haber intercambio de nutrientes, tener la

capacidad para anclarse al tejido y actuar como reservorio natural para que las biomoléculas interactúen con las células cardíacas (Cui et al., 2016).

Los biomateriales empleados pueden ser naturales o sintéticos: los de origen natural, más utilizados en regeneración cardíaca como gelatinas, colágeno, alginato, quitosano y fibrina; mientras que los sintéticos son en su mayoría ésteres alifáticos como, ácido poli L-Láctico (PLLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliglicólico-co-lacturo (PGLA), o la Policaprolactona (PCL), siendo éste último el polímero utilizado en la presente tesis, en conjunto con MWCNT funcionalizado (Cui et al., 2016; Albertsson & Varma, 2003; Choi & Park, 2012). Debido a su estructura semicristalina compuesta de enlaces éster, la PCL es susceptible a la degradación hidrolítica por rompimiento de estos enlaces o por degradación enzimática, esta última es útil en la ingeniería de tejidos ya que su cinética de degradación es considerablemente menor que la de otros polímeros poliésteres por su hidrofobicidad, lo que permite diseñar andamios más duraderos, una mejor adherencia, proliferación y diferenciación celular (Atzet et al., 2008; Anwaar-Nazeer et al., 2019).

La superficie de los andamios antes descritos, especialmente de la PCL, debe proporcionar sitios de anclaje celular, por lo que es necesaria la combinación con otros compuestos como los nanotubos de carbono que poseen excelentes propiedades, térmicas, mecánicas, eléctricas. De gran importancia es que estos andamios, cuando están funcionalizados con otro tipo de materiales como los nanotubos de carbono (MWCNT), son biocompatibles y contribuyen con la proliferación celular y con la diferenciación osteogénica (Huang et al., 2019). En este trabajo de investigación, los nanotubos de multicapa se están funcionalizando con grupos amino (MWCNT-NH₂). Esta combinación no solo le brinda estabilidad, sino que estos grupos amino dan hidrofiliidad para que las células puedan colonizar el andamio.

Es necesario mencionar que una porosidad adecuada promueve la difusión de gases, nutrientes y la vascularización del andamio. El control de poros es muy difícil de lograr, pero en la actualidad hay técnicas como la impresión 3D que permiten que la porosidad sea controlada (Anwaar-Nazeer et al., 2019; Cui et al., 2016). La porosidad juega un papel fundamental en el anclaje celular, ya que, si un material contiene una porosidad adecuada con interconectividad, las células crecerán, intercambiarán nutrientes con el medio y se terminarán integrando al tejido dañado.

Aunque se han realizado numerosos estudios utilizando PCL para aplicaciones cardíacas, a la fecha, no se han encontrado referencias específicas sobre el uso combinado de PCL anclada químicamente con MWCNT-NH₂ en el diseño de andamios para la regeneración muscular incluyendo la cardíaca por lo cual este estudio es una primera aproximación.

2. ESTADO DEL ARTE

Desde tiempos atrás la ciencia, con sus medios disponibles, ha investigado y estudiado el infarto de miocardio (IM) y la falla cardiaca (FC) que se produce después de este evento, siendo uno de los principales problemas de salud a nivel mundial y que causa innumerables muertes. Por estos motivos, se han realizado experimentos en laboratorios y ensayos clínicos, para comprender cuáles son sus causas y consecuencias con el fin de reducir el riesgo del IM y cuáles para prevenir la FC.

Para el año 1988 L. Julian Haywood (Haywood, 1988) realizó una investigación donde trató de identificar los factores (raza, sexo, sociedad) que influyen para que una población o subgrupo sea más susceptible a presentar IM. Unos años más tarde, en 1996, se empiezan los primeros estudios con medicamentos para la reducción del riesgo del IM en pacientes con niveles de colesterol elevado. Frank M. Sacks y colegas (Sacks et al. 1996) utilizaron la pravastatina para este fin demostrando que el tratamiento con este medicamento reduce los niveles de colesterol y por tanto el riesgo de enfermedad cardiovascular. Este estudio fue importante en cuanto a la reducción significativa en la incidencia de eventos coronarios en pacientes con niveles de colesterol de menos de 240 mg/dL.

En el año 2000, la sociedad Europea de Cardiología en conjunto con American College of Cardiology Committee se reunieron para crear un documento de redefinición del IM, este documento tiene como temáticas principales, el concepto y la definición del IM, la presentación clínica, detección de necrosis de las células miocárdicas, cirugía cardiaca y las implicaciones de la evolución del IM en pacientes individuales. Con este documento se sentaron las bases para una mejor comprensión del IM y se abren las puertas para futuras investigaciones en esta área del conocimiento.

En el año 2001 Toma y colaboradores enfocaron su investigación en la diferenciación de MSC de médula ósea de humanos y las injertaron en el ventrículo izquierdo del miocardio de biomodelos murinos, estas células mostraron diferenciación a cardiomiocitos y mediante inmunohistoquímica se determinó la presencia de cadena pesada de miosina-actina, troponina T cardiaca y fosfolamban en cantidades comparables a los de los CM del tejido huésped, también se observó la presencia de proteínas contráctiles, confirmando la diferenciación de éstas células MSC a CM, abriendo la puerta hacia la diferenciación de MSC a CM mediante inyección celular.

Una de estas investigaciones involucra la utilización de PCL para la construcción de andamios para la regeneración de células del miocardio. La PCL ha sido ampliamente sintetizada desde los años 30, pero la comprensión de esa síntesis no se dio hasta el año 2002 donde Storey & Sherman reportaron la cinética y el mecanismo de la polimerización de la ϵ -caprolactona (CL) utilizando como iniciador el octoato de estaño debido a su bajo costo, baja toxicidad y alta eficiencia. Además, fueron los primeros en comprobar que, si a esta polimerización se le agrega un alcohol primario, se formaría un etóxido con el iniciador y generaría una PCL de mayor peso molecular con mayor flexibilidad haciéndola ideal para múltiples aplicaciones. Al experimentar con varios alcoholes encontraron que la presencia de ellos potencia las propiedades de la PCL. En ese mismo año, Pack et al. (2002) realizaron un estudio de las propiedades térmicas de la copolimerización con octoato de estaño del ácido glicólico (PGA) y la CL, comprobando que la temperatura ideal para esta polimerización es de 140°C con un tiempo de reacción de 48 horas corroborado con varias pruebas de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN-1H). La cristalinidad de estos copolímeros fue analizada por medio de difracción de rayos-X (XRD), encontrando que la cristalinidad y las propiedades térmicas de este material están relacionadas estrechamente con la distribución de los monómeros en el polímero. Continuando con los estudios realizados la época, Dong y coautores (Dong et al. 2001) fueron más allá

sintetizando un polímero ramificado tipo estrella de PCL/PGA/PLA a una temperatura de 115°C e introdujeron el concepto de polimerización por apertura de anillo (ROP) mediante el método de “coordinación-inserción” el cual involucra un anclaje selectivo del grupo acilo al monómero.

En el año 2003 las investigaciones con PCL se vuelven aún más relevantes. Albertsson & Varma (2003) realizaron una revisión de la Polimerización por apertura de anillo ROP de lactonas para aplicaciones biomédicas, dirigiendo todas estas investigaciones hacia este campo de la salud. Establecieron, según sus estudios, que los poliésteres alifáticos como PCL, PGA y PLLA sean utilizados ampliamente como dispositivos reabsorbibles como de ortopedia, suturas, stents, ingeniería de tejidos y en farmacología como hidrogeles para la liberación controlada de fármacos. Realizaron un estudio detallado de varios tipos de mecanismos de polimerización con catalizadores de los ésteres alifáticos, destacando que el mecanismo ROP de coordinación-inserción es limpio, se hace con ausencia de solventes minimizando cualquier tipo de toxicidad que se pudiese presentar, aunque se puede realizar con varios iniciadores. En la síntesis de L-Lacturo con PCL mediante ROP utilizando catalizadores de zinc realizada por Darensbourg & Karroonnirun (2010) donde se reportó que estos catalizadores son efectivos para ROP, dando polímeros con excelentes propiedades mecánicas, aunque advierten que estos catalizadores están siendo probados para uso clínicos, ya que durante la polimerización se requiere la utilización de solventes como el benceno que pueden ser tóxicos al utilizarse en regeneración tisular. Por esta razón, el octoato de estaño, que no requiere solventes, se debería utilizar ya que es estable a la temperatura óptima de 140 °C y en la última etapa del mecanismo de polimerización se obtiene como producto principal el poliéster alifático y como subproducto el catalizador aumentando la eficiencia de la reacción y produciendo polímeros no citotóxicos. De manera simultánea, en este mismo año, Rangappa y colaboradores realizaron la transformación de MSC adultas aisladas de tejido graso en conejos blancos (New Zealand) a CM. En esta investigación, ellos confirmaron que estas MSC pueden ser transformados de manera química a CM,

por lo que proponen que estas células pueden ser una fuente de células autólogas a implantar en reparación de la función contráctil del corazón.

Además de las investigaciones que se hicieron para la redefinición del IM y de la síntesis y utilización del PCL, en el año 2004, los investigadores se enfocaron en los riesgos asociados a los IM a nivel mundial. Yusuf (2004), realizó un estudio de los posibles riesgos asociados a IM en 52 países, encontrando que hay nueve factores de riesgos (tabaco, alcohol, predisposición genética, estrés, entre otros), asociados con el 90% de los casos de IM en hombres y mujeres de todas las edades a nivel mundial. Concluye que la modificación de estos riesgos es la mejor prevención que se pueda tener, para un IM prematuramente. Sin embargo, estos estudios aún no solucionan el problema de FC, sino que se basan aún en el entendimiento y prevención del IM.

Volviendo a los posibles polímeros aplicables al problema cardiaco, una vez entendido a cabalidad el mecanismo de ROP por el método de coordinación-inserción, a partir del año 2005, se exploraron varios tipos de síntesis de PCL con otros polímeros mediante emulsión. Dong et al. (2005) utilizaron microesferas cargadas de suero bovino a partir de PLA, PCL y PGA, éstas fueron caracterizadas mediante resonancia magnética nuclear (RMN-1H) y cromatografía permeable de Gel (GPC) para comprobar que hubo un acoplamiento químico de estos polímeros. Los estudios se incrementaron aceleradamente en el campo de la salud e ingeniería de tejidos enfocados al entendimiento de la estructura de la PCL. Por lo anterior, Huang y colegas (2005) encontraron que, pese a que la PCL tiene excelentes propiedades térmicas y mecánicas, no es biodegradable en el cuerpo humano porque éste carece de enzimas apropiadas para este fin, por lo que plantea como alternativa el uso de otros materiales que le aporten la degradabilidad en el cuerpo humano como lo son los polímeros en bloque de PLA-PCL-PLA sintetizados por ROP, además, encontraron que el PLA potencia las propiedades térmicas y mecánicas, pero no obtuvieron resultados promisorios en cuanto a la degradación enzimática del material. En este mismo año se marcó un

hito en la diferenciación celular con la investigación de Moscoso y colaboradores, donde se realizó una diferenciación *In Vitro* de MSC primarias e inmortales de biomodelo porcino a CM para trasplante celular y las diferenciaron químicamente con 5-azacitidina (compuesto empleado en la investigación de Rangappa, 2003) . Estas MSC se obtuvieron de la aspiración de la médula ósea de costilla y fémur de cerdos blancos; encontrando que las MSC inmortalizadas son herramientas valiosas para estudiar “*in vitro*” la capacidad de estas células para diferenciarse en células multilíneas para la terapia celular, además, su diferenciación a CM puede ser útil para analizar si su implantación en tejido da como resultado un injerto sostenido y una función mejorada en un biomodelo porcino, que para esta investigación se pudo comprobar de manera efectiva.

En el 2006 se reportaron los primeros trabajos de investigación en nanotubos de carbono. Saeed et al. (2006) que prepararon nanofibras de nanotubos de carbono (CNT)/PCL mediante electrohilado, encontrando que hay un anclaje químico entre los CNT y la PCL lo que conlleva a una mejor interacción reforzante-matriz y por ende a unas mejores propiedades mecánicas. Con la prueba que la PCL se podría anclar químicamente con los CNT, las investigaciones en este año giraron en torno a la degradabilidad de los CNT, debido a su naturaleza hidrofóbica por sus grupos alifáticos (-CH). Dicho esto, Zeng et al. (2006) funcionalizaron PCL/MWCNT y estudiaron sus propiedades de degradación encontrando que el material compuesto de PCL/MWCNT es completamente degradado en un periodo de cuatro días en una solución buffer de fosfato en presencia de enzimas de *Pseudomonas lipasas*, comprobando la viabilidad de este material compuesto para usos en salud.

En este mismo año surge un estudio muy importante realizado por Berry et al. (2006), quienes inyectaron células madre mesenquimales (MSC) directamente en el sitio infartado, comprobando que estas células mejoran el alargamiento del miocardio y conlleva a una mejor fracción de eyección cardiaca. No obstante,

estos autores también manifestaron que este es apenas el comienzo en remodelación cardíaca y que aún hay muchos interrogantes por resolver.

Posteriormente, Lu y colegas (2007) comprobaron que efectivamente los polímeros en bloque de PGA-PCL y PLLA pueden ser utilizados en aplicaciones de salud, en liberación controlada de fármacos o como biodispositivos en ingeniería de tejidos, pero su estudio va más allá y logra comprobar que estos polímeros en bloque tienen degradabilidades enzimáticas por escala, donde primero se degrada el PGA, posteriormente el PLA y por último la PCL. Estas propiedades potenciaron el uso de estos biomateriales en regeneración de tejidos, por lo que Atzet y colegas (2008) realizaron la síntesis de hidrogeles reabsorbibles a partir de polimetilmetacrilato (PMMA) y PCL. Estos hidrogeles mostraron ser apropiados para ser utilizados en regeneración cardíaca como andamios, ya que mostraron una degradabilidad enzimática de 16 semanas, tiempo suficiente para que las células cardíacas puedan cumplir todas sus funciones a cabalidad.

En el 2008 el estudio sobre el rechazo de cuerpo extraño también cobró mucha relevancia a nivel mundial. Anderson y coautores (2008), en su revisión, enfatizan que el rechazo de cuerpo extraño se compone por una respuesta inflamatoria una vez es implantado un biodispositivo médico y se enfocan en los factores que modulan la interacción (adsorción de proteínas, monocitos) de los macrófagos y células gigantes con las superficies sintéticas de los materiales implantados. Todo esto sin omitir el hecho que el rechazo en gran medida depende del biomaterial a implantar y de su superficie. Más adelante, Wang et al. (2009) refuerzan lo presentado por Berry et al. (2006) y Atzet et al. (2008) en lo concerniente al uso de PCL como biopolímero esencial en regeneración cardíaca. Ellos inyectaron intramiocárdicamente en conejos MSC con un hidrogel de α -CD/MPEG-PCL-MPEG, encontrando que este puede incrementar el tiempo de supervivencia y de retención de las células trasplantadas dentro del músculo cardíaco, comparadas con MSC solas. En un estudio simultáneo, pero ya con la implantación de un andamio de PCL, Jin y colegas (2009) realizaron el trasplante de MSC embebidas en un

andamio de PLLA-PCL en ratas wistar con IM inducido, encontrando que este andamio atenúa la dilatación del ventrículo izquierdo (VI) incrementando su función. También este andamio permitió que las MSC sobrevivieran y se diferenciaron a CM, regenerando el miocardio e incrementando su función cardíaca. Por lo que plantean que este tipo de andamios de PLLA-PCL deben ser considerados como una alternativa terapéutica para la remodelación cardíaca.

En 2010, Lipik & Abadie realizaron la optimización de los parámetros para la polimerización de la PCL mediante ROP, sentando las bases de esta polimerización. De esta investigación se resalta que el peso molecular de la PCL depende en gran medida de la relación molar entre el monómero/iniciador, pues a mayor concentración de monómero menor cantidad de iniciador haciendo la polimerización más limpia. También se resalta la importancia de mantener la temperatura constante a 140°C para evitar degradación térmica del polímero y conlleve a una disminución en el peso molecular final. En ese mismo año, Meng et al. (2010) realizaron la fabricación de una membrana con nanofibras de PCL-MWCNT utilizando la técnica de electrohilado. Ellos resaltan que los MWCNT poseen propiedades estructurales, mecánicas, físicas únicas y que anclados químicamente con un polímero para formar un material compuesto hace que este material mejore sus propiedades mecánicas y eléctricas en la matriz. Además, estas membranas fabricadas, presentaron una alta porosidad, que depende de la cantidad de MWCNT, presenta una buena degradación, biocompatibilidad y hemocompatibilidad haciendo de estas membranas candidatas para ser utilizadas en aplicaciones biomédicas. La investigación mencionada dejó la puerta abierta para futuros estudios como es el caso del presente trabajo.

El 2010 fue el año del resurgimiento de las investigaciones que se enfocaban al estudio de PCL y entre ellos el realizado por Woodruff & Hutmacher (2010) titulado "The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century". Los autores resaltan la importancia de este polímero en aplicaciones médicas enfatizando en las bondades que éste presenta en términos de propiedades y de

degradabilidad, pero también resaltan el problema de anclaje celular, siendo esta la razón principal por la cual la PCL no se emplea por sí sola, sino acompañada de otros materiales.

Después del año 2010 empieza el auge de la nanociencia y todas las investigaciones empiezan a girar en este sentido. Sin embargo, la PCL no deja de ser protagonista. Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Yeong et al. (2010) donde fabrican, por impresión 3D, utilizando la técnica de sinterización selectiva por láser, un andamio poroso de PCL susceptible a ser utilizado en ingeniería de tejido cardíaco. En este estudio se sembraron células líneas C2C12 en el andamio y después de once días de implantación se formaron miotubos mononucleados, comprobando que la PCL pese a sus propiedades hidrofóbicas si puede realizar un anclaje y diferenciación celular adecuada. Mostrando una vez más la versatilidad de este biopolímero.

La revisión de Nazario Martín (2011) contribuye a comprender mejor la nanotecnología enfatizando en las propiedades mecánicas, térmicas y de conductividad de los fullerenos, grafeno y los nanotubos de carbono. Dicha revisión abre la puerta para un gran número de investigaciones en este campo como la de Kong y colegas (2012) quienes fabricaron, mediante la técnica de electrohilado, fibras de PCL con CNT alineados a través del eje de la fibra, comprobados mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) e infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR). También realizaron la optimización de parámetros de distancia de los electrodos a 3 cm, obteniendo las mejores fibras a esa distancia. Esto conllevó a que estos biomateriales fueran utilizados para regeneración de hueso como lo hicieron Pan y coautores (2012), que comprobaron que los materiales compuestos de 5% (95 %PCL y 5% MWCNT) PCL/MWCNT promueven la proliferación y diferenciación de células madre mesenquimales de hueso (BMSC) más que el grupo control compuesto de PCL e instan a que este material compuesto sea utilizado en regeneración de otros tejidos como el cardíaco, objeto de este estudio.

Las investigaciones hasta este año se habían limitado únicamente al entendimiento de la PCL, los CNT y sus materiales compuestos y no de las propiedades eléctricas de ellos, hasta que, en el 2014, Bello y colegas realizaron un estudio detallado de la conductividad eléctrica del material compuesto PCL/MWCNT encontrando que los CNT al 0.3% forman una red conductora tridimensional óptima para iniciar la percolación de los potenciadores de carga. Sugieren que se debe trabajar a bajas concentraciones de CNT debido a los altos costos de estos. No fue sino hasta el año 2015 que Flores-Cedillo y coinvestigadores (2015) comprobaron experimentalmente que los materiales compuestos de PCL/MWCNT son no citotóxicos y pueden ser utilizados como en este caso para implantes dentales, debido a sus excelentes propiedades térmicas y mecánicas del material. Sin embargo, estos mismos autores reportaron también que pese a que el material es conductor esta se ve afectada en gran medida a la aglomeración de los CNT. Otro impacto investigativo que ocurrió en la época fue la inyección de células madre, muchos estudios en ingeniería de tejidos se dirigieron hacia este tipo de terapias en especial la cardíaca. Un estudio que se resalta en este campo es el de Nelson et al. (2011) en el cual dejaron en claro que las propiedades mecánicas de los biomateriales en especial la degradación hidrolítica, módulo elástico, proveen al material bondades para que puedan ser utilizados en estas aplicaciones y sugieren que estos materiales sean acoplados con otros materiales que puedan ser conductores como los MWCNT.

En el 2012, Feng y coautores comprobaron que las nanopartículas encapsuladas en un copolímero tribloque de PCL-PEG-PCL podrían ser inyectadas vía intravenosa en biomodelos murinos y así mejorar la liberación controlada de fármacos. A partir del año 2014, la nanociencia se empezó a unir con la ingeniería de tejidos, específicamente en la regeneración tisular, donde la regeneración cardíaca empezó a ganar gran importancia. Uno de los estudios de este tipo fue realizado por Wickham et al., quienes desarrollaron un parche (membranas) de PCL-tiofeno conjugado mediante electrohilado que sirvió como reservorio natural

de células madre/progenitoras cardíacas en el proceso de remodelación cardíaca y a su vez, este parche sirvió como un reforzante en la cicatrización evitando un adelgazamiento en el miocardio. Continuando con las investigaciones en falla cardíaca encontramos un estudio realizado en el año 2016 por Liu y coinvestigadores, donde se desarrolló una película con nanofibras de colágeno/elastina/PCL para mejorar la reparación cardíaca después de un IM y así prevenir la falla cardíaca, ellos demostraron que este material compuesto mejora la reparación cardíaca hasta en un 80% comparado con la reparación natural.

Otro estudio de revisión importante en IM fue el realizado por Johnson y Christman (2011) encontrando que los hidrogeles inyectables brindan un enfoque mínimamente invasivo para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Los hidrogeles han sido fabricados con diversos materiales naturales y sintéticos que incluyen: alginato, quitosano, colágeno, tejidos descelularizados, fibrina, hidroxiapatita, queratina, matrigel y polímeros tales como: PLA, PCL, PGA, PEG y PNIPAAm termosensible, siendo inyectados vía epicardio o intracoronario. Estos brindan soporte estructural, creando un andamio para la infiltración celular con la ventaja que pueden producir productos de degradación bioactivos que pueden reclutar células madre endógenas.

En el 2015 se continúa con la exploración de cuáles son los materiales idóneos para la reparación cardíaca y entre ellos los parches de PCL ganan importancia. Por esto, Alteköester y Harvey realizan una revisión de los parches empleados en regeneración cardíaca que puedan recuperar la función cardíaca después de un IM. Continuando con esta revisión de parches cardíacos, Han y coautores (2015) se enfocaron hacia la integración de MSC con nanomateriales para la reparación en IM, ellos concluyeron que la utilización de nanomateriales ayuda a mejorar la eficacia terapéutica de más MSC debido a su versatilidad. Estos nanomateriales pueden actuar como liberadores controlados de fármacos, biomimetizadores, agentes centinelas (agentes autorreparadores), conductores eléctricos y

potenciadores de las propiedades mecánicas de los biomateriales con que estos estén acoplados, todas estas características útiles para aplicaciones cardíacas.

En el 2016 Wang y Christman realizaron un estudio con hidrogeles miocárdicos decelularizados para ser empleados en estudios preclínicos. Estos hidrogeles en combinación con otros materiales producirían una mejoría en la función cardíaca. Estos hidrogeles poseen numerosas ventajas las que se resaltan su rápida fabricación y menor costo de fabricación. Vale la pena resaltar la investigación publicada por Ghaziof y Nahrkhalaji (2017), quienes prepararon nanocompuestos de PCL/MWCNT y evaluaron sus propiedades mecánicas y de conductividad, encontraron que la presencia de MWCNT potenciaban las propiedades de este material compuesto haciéndolos candidatos de estudio en ingeniería de tejidos cardíacos, incrementando el interés en este campo.

En el 2018 empieza la comprensión de las condiciones de siembra de miocitos in vitro. Esta comprensión se debe en gran parte a las pautas dadas por Lindsey y coinvestigadores (2018), que en su estudio de revisión especifican las condiciones de cultivo, los materiales a utilizar junto con los factores diferenciadores de MSC hacia cardiomiocitos. Ellos resaltaron también los riesgos asociados a rechazo o posibles consecuencias que se pudiesen presentar en el miocardio. Como complemento, Peña y colegas (2018) realizaron una revisión exhaustiva de todos los materiales tanto naturales como sintéticos que se han venido utilizando como hidrogeles en regeneración cardíaca. El 90% de estos hidrogeles han sido inyectados directamente en el tejido cardíaco. Entre estos hidrogeles aparecen aquellos fabricados con PCL, como se mencionó previamente. En el 2019, Ashtari y coautores realizaron una revisión de los nanomateriales conductores eléctricos susceptibles a ser utilizados en ingeniería de tejidos cardíacos, resaltando principalmente los CNT, nanofibras de carbono (en estas se incluyen las de PCL), grafeno y sus derivados, nanomateriales de oro, polímeros electroactivos y los polipirroles.

Investigaciones más recientes se han enfocado en la fabricación de membranas (parches) de PCL/MWCNT, en las que se resalta el estudio por Hudecki et al. 2019. Ellos realizaron nanofibras que contienen MWCNT como membranas biodegradables en medicina reconstructiva, encontrando que estas pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer, ya que algunas con óxido de titanio (TiO_2) o con PCL reducen, según este estudio, los tumores hasta en un 30%. Pero sigue la discusión sobre el rechazo de estos biomateriales, ya que se ha encontrado que estos materiales de titanio pueden causar rechazo en el organismo. Por lo anterior, Maraini y colegas (2019), abren la discusión sobre este tema realizando la siguiente pregunta en su investigación: ¿será que los biomateriales pueden ser considerados como cuerpos extraños o son precursores de una respuesta inmune? La respuesta a este interrogante, según los investigadores, es que el fracaso o el éxito de estos biomateriales ante un rechazo de cuerpo extraño está determinado por la capacidad de negociación que tiene éste para compartir el cuerpo (con todo lo que ocurre dentro de éste). Esta discusión sobre el rechazo de materiales no termina aquí, en 2020 Zhang et al. (2020) realizaron una revisión sobre qué estrategias y que biomateriales se deben utilizar para no tener que lidiar con el rechazo de biomateriales. Entre los muchos biomateriales mencionados, se resaltan aquellos que son fabricados con PCL y sus derivados con nanocompuestos funcionalizados, como los que son el objeto de estudio en esta investigación.

En el 2020, Chandika y coinvestigadores (2020) realizaron una revisión de los avances recientes en materiales compuestos utilizados en regeneración cardíaca, comenzando primero con el entendimiento de la fisiología cardíaca, la mecánica cardíaca, y qué cambios morfológicos ocurren en el miocardio cuando se produce un IM. También profundizan en los cambios que ocurren durante la remodelación cardíaca, explicando porqué, cuando se regenera, se producen fibras rígidas no contráctiles de colágeno. Posteriormente, hacen alusión del porqué la ingeniería de tejidos es el mecanismo más probable para dar solución a la problemática de la falla cardíaca y luego pasan a definir los polímeros naturales y sintéticos

utilizados para este fin y terminan con las terapias más utilizadas. En 2020 también se han desarrollado grandes avances en las investigaciones que tienen que ver con la regeneración de músculo estriado por medio de células satélites, por este motivo, Tsuchiya y coautores (2020) encontraron que, efectivamente, estas miofibras activan la producción de células satélites mediante unos factores derivados de miofibras llamados Damaged Miofibers Derived Factors (DMDFs). Concluyen estos autores que los DMDFs inducen a las células satélites a ingresar justo en la fase G1 del ciclo celular (justo en la división celular), con el objetivo de regenerar el tejido dañado. Esto concuerda con una investigación publicada por la Universidad de Kumamoto, este mismo año 2020, donde se comprueba lo investigado por Tsuchiya, pues que efectivamente las células satélites participan activamente en la regeneración de tejidos cuando un músculo sufre alguna lesión.

Con base en todo lo anterior, se hace importante la incorporación de biomateriales como parches que puedan ser integrados a los pacientes con alguna clase de lesión muscular (p.ej. cardíaca), con el objetivo de introducir un tipo de soporte mecánico que ayude en la regeneración de estos tejidos. McMahan y colegas (2019) realizaron una revisión sistemática de estos biodispositivos y encontraron que los polímeros sintéticos poseen características adecuadas para ser utilizados en parches cardíacos mencionando que la policaprolactona como un biopolímero con mucho potencial en este tipo de aplicaciones.

Pese a que hay investigaciones enfocadas a la fabricación de andamios de PCL/MWCNT, no se encontraron investigaciones enfocadas en los MWCNT con la funcionalización con grupos amino y carboxílicos reportados en este tesis Doctoral. Por este motivo, esta tesis doctoral se centró en la fabricación de andamios de PCL/MWCNT para la aplicación en los tejidos musculares que se quieren regenerar.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. MÚSCULO ESTRIADO - MÚSCULO CARDIACO

El cuerpo humano posee dos clases de músculos estriados, el esquelético y el cardiaco. Estos tipos de músculo son utilizados por el cuerpo para suplir su necesidad de oxígeno, su balance metabólico y su locomoción. Este proyecto de investigación se enfocó en el músculo estriado, con miras al cardiaco, que es altamente organizado y tiene como función principal generar fuerzas de contracción para bombear sangre por todo el cuerpo y así apoyar la respiración para proveer el oxígeno necesario. (Gómez, 2016). En la tabla 3.1 se presentan las características principales de estos dos músculos.

Tabla 3.1. Características del músculo esquelético y el músculo estriado (tomada de Gómez, 2016)

Músculo Esquelético	Músculo Cardiaco
Células multinucleares, cilíndricas, estriadas, largas y paralelas	Células de 1 o 2 núcleos, cilíndricas, estriadas y cortas
Velocidad de contracción rápida	Velocidad de contracción intermedia
Se encuentran relacionado con los huesos y en la lengua	Se encuentran en el corazón y venas pulmonares
Son estriadas	Son estriadas
Posee movimiento voluntario	Posee movimiento involuntario
Diámetro de 10-100 μm	Diámetro de 15-80 μm
Poseen túbulos T pequeños	Poseen túbulos T grandes

Como se aprecia en la tabla 3.1, estos dos músculos poseen similitudes y diferencias.

3.1.1. Estructura y función del músculo estriado cardíaco

El músculo estriado cardíaco representado en la figura 3.1 tiene una excelente organización el cual convierte la energía química en trabajo físico. La principal función de este músculo estriado es generar la fuerza suficiente para contraerse y apoyar el bombeo de sangre hacia todos los tejidos del cuerpo (Shadrin, 2016).

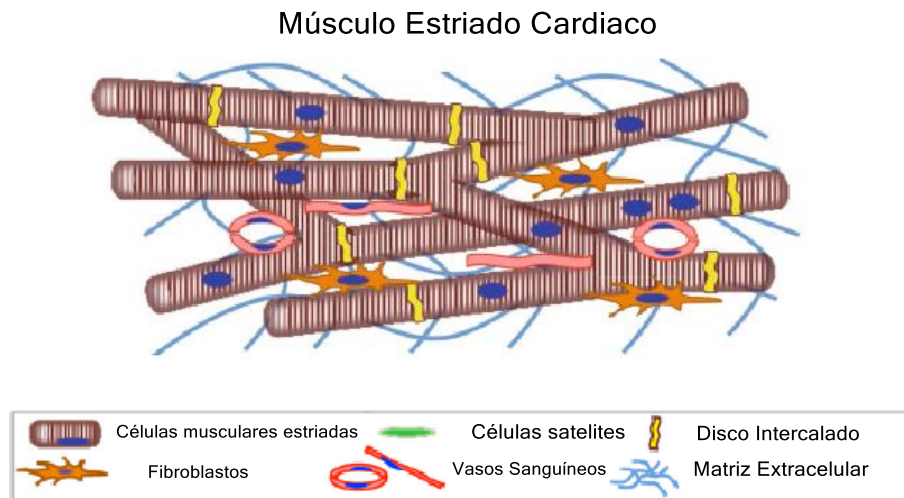


Figura 3.1. Estructura del Músculo Estriado Cardíaco (modificada por: José Peñaranda Armbrrecht, tomada de: Shadrin, 2016).

Como se observa en la figura 3.1, el músculo cardíaco consta de células con varios núcleos resultantes de la fusión de varias células. Estas presentan interconexiones eléctricas a través de los discos intercalados, que poseen uniones gap que permiten la propagación de impulsos eléctricos, resultando en una despolarización de todo el componente celular. Los cardiomiocitos de longitud de 120 μm permanecen la mayor parte del tiempo mononucleares en todas las etapas del desarrollo cardíaco (Fredericks, 2001; Shadrin, 2016).

3.2. EVENTO ISQUÉMICO DEL MÚSCULO ESTRIADO CARDIACO (INFARTO DE MIOCARDIO, IM)

El IM no tiene una sola definición sino varias, dependiendo de las perspectivas relacionadas con las características clínicas (electrocardiográficas, bioquímicas y patológicas) de cada paciente. Una de las definiciones del IM se basa en tres características principales: la primera es mediante los síntomas (i.e. compresión y dolor en el pecho y brazo derecho), la segunda está relacionada con el incremento de las enzimas cardíacas (anginas de pecho) y la tercera con el patrón del electrocardiograma (ECG) involucrando el desarrollo de ondas Q (Thygesen, 2000; 2007). Vale la pena resaltar que la práctica clínica, así como los estudios epidemiológicos han demostrado que el IM puede ser distinto a lo definido en este documento. Otra definición del IM es la presentada por el Comité Americano de Cardiología en una reunión sostenida en el año 2000, que involucra tres factores fundamentales, el primero es el tamaño del IM (la cantidad de células cardíacas perdidas), el segundo tiene que ver con las circunstancias que conllevan al IM y la tercera tiene que ver con la evolución y el tiempo de recuperación (incidencia en la parte social, afectiva y psicológica de las personas que lo padecen). En la actualidad el IM se define como la muerte del miocardio debido a la ausencia de oxígeno y a la disminución de la demanda de nutrientes (isquemia cardíaca) (Revista Colombiana de Cardiología, 2008; Jin et al., 2009; Yeong, 2010; Nelson 2011). Después de un IM la capacidad del corazón para autorepararse está limitada debido a que los CM presentes no poseen la capacidad de autoregenerarse. Por esto, el miocardio lesionado es reemplazado por tejido cicatricial, lo cual genera un deterioro progresivo en la función cardíaca y a largo plazo a un estado de “Insuficiencia Cardíaca Crónica” (Bicknell et al., 2007; Kumar et al., 2014; Jenča, 2021).

3.2.1. Remodelación del músculo Estriado Cardíaco

Una vez ocurre un evento isquémico, el proceso de remodelación cardíaca inicia infiltrando neutrófilos, activando las metaloproteinasas y degradando la matriz

extracelular, conduciendo a un adelgazamiento del miocardio y a una dilatación ventricular (Figura 3.2).

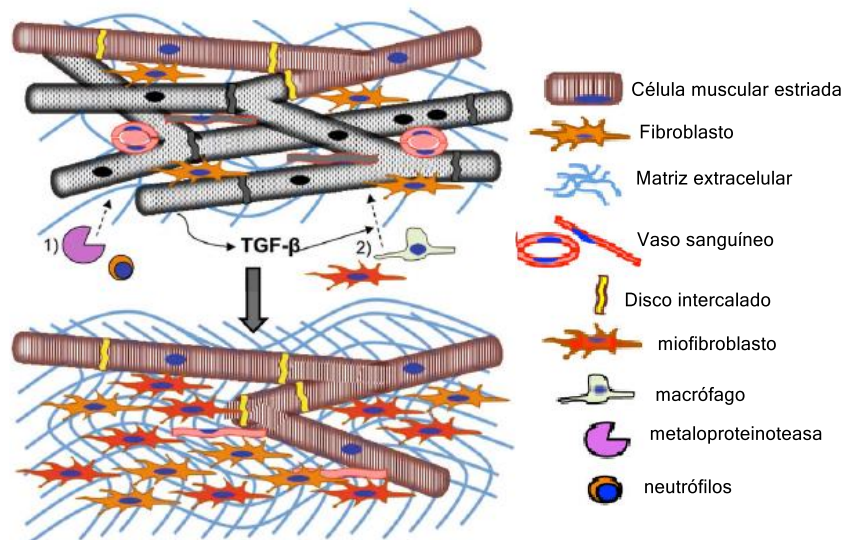


Figura 3.2. Esquema de la remodelación cardíaca (Modificada por: José Peñaranda Armbrrecht; tomada de: Shandrin. 2006)

Posteriormente, los cardiomiocitos (CM) muertos empiezan a liberar Tumor Growth Factor ($\text{TGF-}\beta 1$), son orientados a lo largo del gradiente de concentración induciendo a la migración de macrófagos y fibroblastos que se diferencian en miofibroblastos para poder secretar colágeno tipo I y III para producir una cicatriz (American College of cardiology Committiee, 2000, Shadrin, 2016, Leoni, 2018).

3.3. TERAPIAS PARA REGENERAR CM EN MÚSCULO ESTRIADO

Debido a esta incapacidad de los CM en regenerarse, es necesario buscar terapias alternativas para tratar de solucionar este problema. Hay dos rutas para hacerlo: una es la ruta de inyección celular, en donde se le inyecta directamente mediante una jeringa las células miocárdicas al corazón infartado y se busca que éstas mejoren la fracción de eyección de corazones infartados (Neuta, 2013), esto se explica más detenidamente en el apartado 3.3.1. El segundo enfoque es la implantación de un biomaterial como PCL/MWCNT dentro del órgano con el objetivo

que las células se anclen, puedan proliferar y regenerar tejido; esta terapia también se menciona con mayor detalle en el apartado 3.3.2.

3.3.1. Terapia celular inyectada (TCI)

Esta terapia tiene como objetivo principal mejorar la función de músculos estriados lesionados mediante la inyección celular de células madre en el sitio de lesión (Leoni, 2018). En los últimos años ha vuelto a ganar importancia debido al mayor conocimiento en la regeneración de los músculos estriados a partir de células satélites (Peña, 2018).

Características de las células madre inyectadas previamente:

1. Deben estar inmunoprivilegiadas previamente para que no haya inmunosupresión a largo plazo.
2. Que tengan la capacidad de sobrevivir en el tejido y puedan proliferarse.
3. Deben presentar una integración estructural y funcional con el músculo lesionado.
4. Puede mejorar o restituir la función inicial del músculo lesionado.

La TCI en corazón ha venido ganando importancia en investigación debido a que se han realizado ensayos clínicos utilizando mioblastos esqueléticos, células derivadas de médula ósea como las MSC, células de tejido adiposo, células cardíacas progenitoras y células derivadas de la cardiosfera. Pero también poseen desventajas se debe de realizar en la mayoría de los casos una cirugía en corazón abierto para inyectar las células en el tejido lesionado, y éstas no se integran en el tejido (Han, 2015; Yao, 2015; Wang; 2016).

3.3.2. Terapia de células libres con biomateriales

La terapia de células libres con biomateriales tiene como ventaja la reabsorción in situ que ayudan a que las células se anclen, proliferen en él y puedan exhibir sus

propiedades dentro del tejido, regenerando la funcionalidad del músculo lesionado. Una de las principales desventajas radica en la escasez de biomateriales adecuados y el tipo de células a implantar; muchos de los biomateriales escogidos no son biodegradables o son muy hidrofílicos y se degradan fácilmente no permitiendo el correcto anclaje celular (Mattioli-Belmonte, 2012; Pan, 2012).

3.4. INGENIERÍA DE TEJIDOS (IT)

Es una terapia que ha venido ganando importancia en los últimos años debido al desarrollo de la impresión 3D y al desarrollo de biomateriales con buenas propiedades mecánicas y con características que mimeticen el sitio a implantar para ser funcionales al momento de su implantación (Hutmacher, 2001).

Para la TCI cardíaca se han empleado una gran variedad de células angiogénicas y miogénicas como los mioblastos esqueléticos, células mononucleares, y mesenquimales de médula ósea (MSC), células endoteliales progenitoras, endoteliales circulantes, células derivadas del estroma de la grasa o del endometrio, células mesoteliales y pluripotenciales (Herreros, 2011).

3.4.1. Introducción a los Andamios en IT

Los andamios han sido utilizados desde el desarrollo de la IT introducida en 1988 por el profesor Nerem, generalmente se han utilizado para dar soporte a cultivos celulares, para que estas células puedan crecer y realizar sus funciones básicas de reparación de tejidos u órganos dañados, produciendo un nuevo tejido con la forma y propiedades deseadas. Un componente importante que deben contener estos andamios es su biodegradación gradual durante el proceso de regeneración ya que esto evita la necesidad de retirarlos eliminando así los efectos secundarios resultantes que se podrían acarrear con la implantación de estos andamios como cuerpo extraño; representando un gasto económico mucho más elevado al sistema de salud. Por lo tanto, el andamio utilizado debe cumplir requisitos químicos,

mecánicos y físicos específicos para lograr la difusión celular y la formación de tejidos 3D (Eltom, 2019).

Otro aspecto para tener en cuenta para la fabricación de andamios es la selección cuidadosa de los materiales que los conforman, éstos deben tener propiedades químicas y físicas aptas para la interacción con las proteínas y compuestos de la matriz extracelular (ECM) del tejido a reparar con el fin de mejorar la adhesión celular, reticulación y biodegradabilidad para crear un microambiente similar al *in vivo* que imite entidades biológicas y estimule respuestas específicas de células para conducir a la regeneración y reparación de tejidos (Hutmacher2001; Eltom, 2019).

3.4.2. Utilización de los Andamios en IT

Los andamios en IT se utilizan como sistemas celulares o como vehículos de entrega de células y fármacos en la regeneración de células y tejidos, por lo que este vehículo debe contener la estructura adecuada para satisfacer las necesidades de reparación del tejido sin presentar propiedades citotóxicas. Otra forma de utilizar los andamios en IT se basa en su combinación con varios tipos de células que puedan mejorar la formación de tejidos *in vivo* por linaje osteogénico o liberación de moléculas específicas para tal fin. Estas células deben ser expandidas anteriormente *ex vivo* antes de ser ancladas en el andamio e implantadas en el tejido (Eltom, 2019).

3.4.3. Propiedades de los Andamios

Las propiedades de los andamios dependen del tipo de tejidos que se requiere reparar, como son los tejidos duros como los huesos o los blandos como los del corazón y los neurales; pero esta reparación del tejido dañado requiere de unos andamios con propiedades específicas como el tamaño, la forma, el grosor, la interconectividad de poros, porosidad, tasa de degradación, estabilidad mecánica y

lo más importante, la cinética de absorción. También se debe tener en cuenta al elegir el tipo de andamio a implantar en el tejido, su aplicación específica, dependiendo de los factores, como la ubicación del tejido en el cuerpo, la edad de la persona a que se le va a implantar el andamio, que tan grave es la lesión y otras condiciones patológicas del paciente que se deben tener en cuenta (Eltom, 2019; Collins, 2021).

Uno de los grandes problemas que se han presentado en casi todos los estudios a nivel mundial acerca de los andamios, es que, si no se elige bien el material a implantar, se puede afectar enormemente la interacción de los andamios con los tejidos y órganos, debido a la baja capacidad del material biológico para adaptarse al medio circundante (Eltom, 2019; Collins, 2021). Dicho lo anterior, en esta tesis doctoral se pretende incorporar andamios bioactivos de PCL/MWCNT que promuevan la migración o diferenciación celular adecuada para la formación de tejidos y su incorporación en el huésped, para que este pueda ejercer su función de manera adecuada.

3.4.3.1. Propiedades biológicas de los andamios

Las propiedades biológicas de los andamios tienen que ver con dos aspectos fundamentales: el primer aspecto es su biocompatibilidad con el tejido y el segundo con su citotoxicidad, esto quiere decir que las células cultivadas en los andamios deben poder reproducirse y diferenciarse libremente sin ningún tipo de interferencias para producir una nueva matriz del tejido nuevo (Eltom, 2019). De acuerdo con lo anterior, se puede decir que un andamio ideal para aplicaciones en IT es aquel que pueda imitar las propiedades de la ECM de los tejidos conllevando a una regeneración de tejido perfecta y completa.

La biocompatibilidad de los andamios juega un rol fundamental en IT debido a que permite la formación de nuevos tejidos simultáneamente con la degradación de la

matriz y a su vez éste no debe ser citotóxico para que el sistema pueda disponer de él sin causar molestias en el cuerpo (Collins, 2021).

3.4.4. Crecimiento de Células en Andamios

La estructura porosa y la orientación isotrópica de la fibra en dos dimensiones, obtenidas utilizando la técnica de impresión 3D, se asemeja físicamente a la distribución natural que se presenta en la matriz extracelular (ECM). Imitando esta estructura, se tendrá un candidato prometedor para la regeneración del tejido cardíaco. Tres factores son importantes en cuanto al comportamiento *in vitro* de células, estos son: la química de las matrices, las propiedades arquitectónicas y la arquitectura. La ECM natural, se compone de varias proteínas y azúcares dentro de una red tridimensional. Esta mezcla de materiales proporciona las propiedades mecánicas que son ideales para el apoyo a nivel celular y de tejidos, promoviendo la actividad específica, evitando citostasis entre las células (Liang et al., 2007).

Los materiales pueden ser diseñados para imitar la resistencia a la tracción y propiedades de compresión en ciertos tejidos, así como recubrimientos que puedan impartir una superficie adecuada. Uno de los más grandes desafíos en la actualidad es la creación de la arquitectura adecuada, prestando especial atención tanto a la porosidad (el porcentaje de andamio para el crecimiento celular) como al tamaño del poro. Hasta ahora, se han desarrollado diferentes tipos de matrices, con diversos materiales y con tamaño del orden de micras, sin embargo, los investigadores han concluido que tejidos humanos como la sangre, vasos, cartílagos, huesos, nervios y piel, consisten en formas de nanofibras de origen biológico. Este hallazgo, llamó la atención de los investigadores de matrices nano estructuradas, por eso se observa bastante potencial a la utilización de nano fibras de polímeros electrohiladas con el fin de reparar tejido humano dañado (Liang et al., 2007).

3.4.5. Técnicas de fabricación de andamios y matrices poliméricas

Existen varias técnicas para fabricar andamios (ver tabla 3.2), la gran mayoría de ellas se caracterizan por tener una baja eficiencia debido a todas las características mencionadas anteriormente que se deben tener en cuenta para su fabricación (Collins, 2021).

Tabla 3.2. Técnicas de fabricación de andamios en IT (Tomada de: Eltom, 2019; modificada por José Peñaranda, 2023); (Collins, 2021)

Técnicas de fabricación		Ventajas	Desventajas
Técnicas de fabricación convencionales	Secado al frío	1. Se utiliza en múltiples aplicaciones 2. Se puede controlar el formado del material a altas temperaturas 3. El tamaño de poros se controla mediante el cambio del método de congelación del material.	1. Se consume una alta energía durante el proceso. 2. El tiempo de fabricación es bastante prolongado. 3. Se utilizan solventes que generalmente son citotóxicos. 4. Se generan poros de tamaño muy pequeño (15-35 μm). 5. No se controla la forma de los poros, esto quiere decir que se forman poros irregulares.
	Fundición en solvente y lixiviación de partículas	1. Se pueden fabricar membranas porosas tridimensionales delgadas y/o de pared delgada. 2. Se fabrican compuestos con alta porosidad (50-90%) 3. Es una técnica de fabricación de bajo costo.	1. Se requiere mucho tiempo de fabricación. 2. Se utilizan solventes que generalmente son citotóxicos

	Espuma de gas	1. Se fabrican compuestos con una porosidad hasta de un 85%	1. Si el método de fabricación no sufre modificaciones, se obtienen andamios sin porosidad o sin interconectividad de poros.
	Electrohilado	1. Es una de las técnicas más empleadas en IT. 2. Se pueden fabricar nanofibras. 3. Se pueden realizar andamios con una alta resistencia a la tracción.	1. Se utilizan solventes que generalmente son citotóxicos. 2. Se tienen problemas de fabricación de las fibras (creación de gotas). 3. Problemas en la creación de poros de tamaño específico. 4. El proceso de fabricación requiere validación de muchas variables.
	Separación de fases termoinducida	1. Se construyen andamios con polímeros termoplásticos cristalinos 2. Se puede utilizar bajas temperaturas para la integración de moléculas bioactivas. 3. Se crean andamios con una porosidad superior al 98%	1. Esta técnica se utiliza únicamente para materiales termoplásticos

La técnica de fabricación de andamios más conveniente para esta tesis doctoral es fundición de solventes y lixiviación de partículas.

3.4.5.1. Técnica de fabricación de Fundición en solvente y lixiviación de partículas

En esta técnica, el material compuesto con que se pretende fabricar el andamio es disuelto en la mínima cantidad de solvente junto con partículas de sal; el solvente se evapora dejando un andamio con el material y sal en su estructura. Posteriormente, este material se sumerge en agua para disolver las partículas de sal. Quedando como resultado un andamio con alta porosidad. Vale la pena resaltar, que este método de fabricación solo puede ser utilizado si se pretende fabricar membranas delgadas tridimensionales, de lo contrario si se tiene un andamio muy grueso o con paredes muy gruesas el solvente no se evaporará completamente o quedan remanentes de sal en el andamio (Eltom, 2019).

Los andamios desarrollados por esta técnica tienen una alta porosidad entre un 50-90%, por lo que la hace una técnica excelente en IT, por otra parte, esta técnica es de bajo costo y relativamente fácil de realizar. Una de las ventajas principales de este método de fabricación, además de que el andamio producido es de alta porosidad, es la capacidad que tiene el investigador de ajustar el tamaño de poro mediante el tamizado de partículas de sal. Una de las principales desventajas es que se deben utilizar solventes volátiles ya que si se utilizan solventes no volátiles el tiempo de evaporación puede tomar mucho tiempo (semanas o meses) (Eltom,2019).

3.5. POLÍMEROS SINTÉTICOS

A diferencia de los polímeros naturales, los polímeros sintéticos como el PCL exhiben buenas propiedades mecánicas, estabilidad térmica, con una temperatura de degradación de 350 °C y su impacto en el ambiente es bajo, sus características de moldeabilidad permiten la elaboración de estructuras tridimensionales (Carrasco, 2010) que asemejan la macro y microestructura del tejido óseo (Guillén-Girón,

2018). Los más utilizados son PLLA, PGA, y PCL debido a que tienen la ventaja de ser versátiles.

3.5.1. Policaprolactona (PCL)

PCL es un poliéster alifático semicristalino de unidades repetidas de hexanoato (Figura 3.3) (Anwaar-Nazeer et al., 2019). Sus propiedades físicas, térmicas y mecánicas dependen de su peso molecular y su grado de cristalinidad tiende a decrecer con el incremento del peso molecular; posee alta solubilidad, un bajo punto de fusión (59-64 °C) y una excelente capacidad de mezcla haciendo de éste un polímero adecuado para la investigación en el campo biomédico (Woodruff & Hutmacher, 2010; Guarino 2017). Está aprobado por la Food and Drugs Administration (FDA) para ser utilizado como biomaterial (Suwantong, 2016; Pan, 2012).

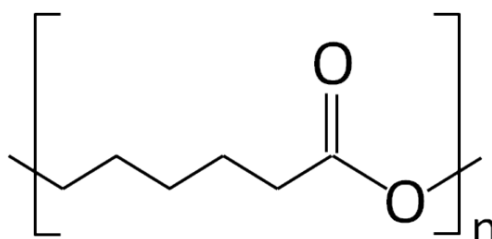


Figura 3.3. Representación estructura de la PCL (realizada por José Peñaranda Armbrecht, 2023)

Éste puede ser sintetizado mediante dos rutas; la primera es mediante la polimerización por apertura de anillo (ROP). La segunda ruta es la ROP del 2-metilen-1,3-dioxepano (Woodruff & Hutmacher, 2010; Guarino 2017; Anwaar Nazeer, 2019).

La PCL es uno de los polímeros más utilizados a nivel mundial en aplicaciones médicas y farmacológicas debido a sus excelentes propiedades físicas como su alta cristalinidad, excelente biocompatibilidad, alta degradación, baja citotoxicidad y sus excelentes fuerzas mecánicas (Darensbourg, 2010; Anwaar-Nazeer et al., 2019).

Estas propiedades hacen del PCL un buen candidato para ser utilizado en aplicaciones biomédicas tales como liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejidos y materiales de empaques (Oledzka & Narine, 2011).

Sin embargo, la PCL posee ciertas desventajas como, por ejemplo, poseer una superficie altamente hidrofóbica, la cual resulta en una baja adhesión celular, baja migración, proliferación y diferenciación celular. Para la aplicación de este trabajo de investigación, la principal desventaja radica en que este carácter hidrofóbico reduce la afinidad celular y por ende la interacción celular conllevando a un crecimiento de tejido lento. Esta desventaja se puede solucionar mediante el mejoramiento de la hidrofiliidad de la PCL, esto se realiza mediante el incorporamiento de polímeros hidrofílicos como el PLLA) o el PGA mediante la síntesis de copolímeros (Anwaar-Nazeer et al., 2019; Huang, 2019).

Los andamios de PCL han sido investigados en una gran variedad de aplicaciones biomédicas (Peñaranda-Armbrecht et al. 2016) como las cardíacas, hueso, nervios, piel y de liberación controlada de fármacos debido a su baja velocidad de degradación lo que lo hace beneficioso para la fabricación de andamios de larga vida, por lo que es muy importante en aplicaciones cardíacas porque le provee el tiempo suficiente a las células de producir matriz extracelular (ECM) que garantiza las propiedades mecánicas apropiadas con una baja respuesta inflamatoria del musculo estriado (Chandika, 2020).

3.5.1.1. Propiedades Fisicoquímicas de la PCL

Entre las propiedades fisicoquímicas de la PCL están tener un relativo alto peso molecular, temperatura de fusión alta (con respecto a las temperaturas corporales) y solubilidad en solventes no polares (Tabla 3.3), todo lo cual favorece su posible uso en medicina.

Tabla 3.3. Propiedades Fisicoquímicas y mecánicas de la PCL

Temperatura de transición vítrea (T_g) (°C)	Temperatura de Fusión (T_m) (°C)	Peso molecular (g/mol)	Método de procesamiento	Solubilidad	Tiempo de degradación aproximado (meses)
-60	59-64	3000-80000	Extrusión, moldeo por Inyección, moldeo por compresión, electrohilado, impresión 3D	Cloroformo, diclorometano, tetracloruro de carbono, benceno, tolueno, ciclohexanona, 2-nitropropano	>24

Lo que se pretende con la PCL es que sea un polímero altamente cristalino, este alto grado de cristalinidad se logra si hay un buen empaquetamiento de las cadenas poliméricas, por lo que en muchas ocasiones no se logra y la PCL adquiriría la propiedad de semicristalino. Por lo anterior, muchos polímeros poseen dos temperaturas de transición (a diferencia de las moléculas pequeñas que tienen un punto de fusión definido), las cuales se describen a continuación:

- *Temperatura de fusión (T_m):* Temperatura en la cual un material pasa de estado sólido a líquido, puede ser viscoso o gomoso; esta temperatura no está definida en un rango corto de valores.
- *Temperatura de transición vítrea (T_g):* Temperatura por debajo de la cual el material adquiere las características de un vidrio, se vuelve frágil y quebradizo.

Estas dos temperaturas se determinan experimentalmente a través de la técnica de DCS, técnica en la cual la diferencia en la cantidad de calor requerida para incrementar la temperatura de una muestra es medida en función de la temperatura (Zuluaga,1998).

3.6 BIODEGRADACIÓN DE LA PCL

La biodegradación en general se lleva a cabo mediante la acción enzimática o la partición química que realizan diversos microorganismos. La biodegradación se realiza en una etapa fundamental que consiste en fragmentación de polímeros de alto peso molecular en oligómeros de peso más bajo mediante reacciones de hidrólisis o de oxidación que producen los microorganismos. Para que la biodegradación de un polímero se lleve a cabo, el proceso depende del origen en síntesis del polímero, pero también de su estructura química (si es hidrofílico o hidrofóbico), de sus condiciones ambientales de humedad y de porcentaje de absorción de agua (Vroman & Tighzert, 2009; Pack, 2002).

Para el caso de la PCL, ésta es susceptible a biodegradación bajo condiciones muy particulares ya que posee enlaces ésteres que son hidrolizables y se van fraccionando en unidades mas pequeñas hasta que puedan ser procesados por microorganismos o reabsorbidos por el cuerpo (Vroman & Tighzert, 2009; Woodruff & Hutmacher, 2010). Otra forma de biodegradación de la PCL es cuando ésta es muy cristalina y con peso molecular bajo (menor a 3000 g/mol), en este caso se produce una degradación intracelular, ya que se han observado fragmentos muy pequeños en fagosomas, macrófagos y fibroblastos (Woodruff & Hutmacher, 2010).

3.6.1. Degradación enzimática de la PCL

Debido a que la degradación hidrolítica de la PCL es muy lenta con una duración de varios años, es conveniente realizar degradación enzimática con presencia de enzimas tipo lipasas que dura aproximadamente 4 días. Hay tres tipos de lipasas que significativamente hacen que la degradación de la PCL se acelere, la *Rhizopus delemer Lipasa*, *Rhizopus arrhizus lipasa* y la *Pseudomona lipasa* (Castilla-Cortázar, 2012; Blackwell, 2018), pero la *Pseudomona lipasa* es la que degrada la PCL en este tiempo mencionado.

La degradación enzimática de la PCL depende del grado de su cristalinidad, ya que ésta se incrementa durante la primera etapa de la degradación, lo que indica que la parte amorfa es la primera que se degrada. Gracias a esto, la degradación enzimática se da en los extremos y en los pliegues de las cadenas, así como en el borde, donde la movilidad de la cadena es mayor (Blackwell, 2018).

3.7. POLIMERIZACIÓN POR APERTURA DE ANILLO (ROP)

Este tipo de polimerización generalmente es llevado a cabo en solución con solventes orgánicos como tetrahidrofurano (THF), dioxano, tolueno, (entre otros) o por emulsión o dispersión. La ROP en masa se realiza con un rango de temperaturas de 100 a 150 °C en polimerización en solución o a temperaturas bajas (0 a 25 °C) para minimizar las reacciones secundarias como las reacciones de inter, intra, trans-esterificación (Albertsson & Varma, 2003).

La cantidad de polímero utilizable que se obtenga va a depender de la cantidad utilizada de lactona. Dado que muy pocos de estos polímeros se obtienen espontáneamente en reposo o calentándolos, es necesario utilizar catalizadores para acelerar su producción. De ahí que la ROP se debe hacer en presencia de catalizadores o iniciadores. Estos iniciadores son moléculas organometálicas como óxidos, carboxilatos y alcóxidos, muy efectivos para la síntesis de poliésteres de lactonas. El mecanismo de ROP depende del tipo de iniciador, dando lugar a tres mecanismos de reacción, el aniónico, el catiónico y el de coordinación-inserción. El interés en esta investigación es el de coordinación-inserción ya que con este método se obtienen polímeros de alto peso molecular (Albertsson & Varma, 2003).

3.7.1. Mecanismo por coordinación-inserción

El mecanismo de ROP mediante coordinación-inserción se utiliza para la síntesis de poliésteres alifáticos de alto peso molecular con estructuras definidas. Una de

las principales ventajas de este método es que utiliza iniciadores de alcóxidos de aluminio, estaño y cinc. Estos alcóxidos tienen la particularidad de tener orbitales “d” vacíos y éstos reaccionan mediante iniciadores de coordinación-inserción (Albertsson & Varma, 2003).

El mecanismo de coordinación-inserción se divide en tres etapas fundamentales: etapa de iniciación, etapa de propagación y etapa de finalización.

3.7.2. Octoato de estaño como iniciador

El octoato de estaño es el iniciador más utilizado en la síntesis de poliésteres alifáticos como el PLLA, el PGA y la PCL. Una de las razones para su mayor utilización es su bajo costo comparado con otros iniciadores como los de cinc y otra razón es su baja toxicidad. Este iniciador en cantidades bajas es aprobado por la Food and Drugs Administration (FDA) y en la polimerización de PCL se utiliza una relación 725:1 con respecto al iniciador, por lo cual hace que su toxicidad sea baja (Kricheldorf et al., 1995; Kricheldorf, 2001; Chisholm et al., 2007). La no toxicidad de este iniciador se pudo comprobar en el trabajo de investigación donde se sintetizó al PLLA de alto peso molecular utilizando el método de coordinación-inserción, comprobando mediante pruebas de citotoxicidad que los andamios fabricados no eran citotóxicos y pueden ser implantados en biomodelos (Peñaranda-Armbrrecht 2016).

Otra razón importante para su uso es su alta eficiencia en la participación de la reacción, separándose al final de la polimerización y obteniéndose como producto principal el polímero. (Storey & Sherman, 2002). Una ventaja del $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ es el fácil control del peso molecular vía monómero/iniciador. Así mismo, el riesgo de reacciones inesperadas es mucho menor comparado a iniciadores iónicos generando polímeros de mayor peso molecular (Chisholm et al., 2007). Además, la naturaleza covalente de este iniciador reduce el riesgo de racemización incluso a

altas temperaturas. Este aspecto es importante para la producción en masa del PCL.

3.8. NANOTUBOS DE CARBONO (CNT)

Los CNT mostrados en la Figura 3.4, están siendo utilizados, desde hace varios años, en aplicaciones biomédicas y biológicas como imagenología, medicina regenerativa, aplicaciones farmacéuticas (liberación controlada de fármacos), biología celular y en una amplia gama de materiales para la industria. (Ashtari, et al. 2019).

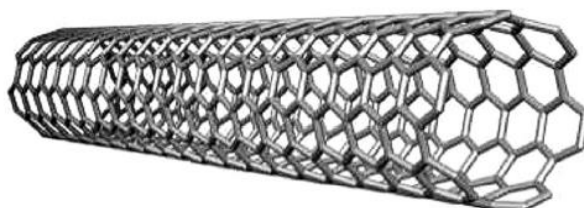


Figura 3.4. Nanotubo de carbono (imagen, tomada de Martín, 2011)

Todas estas aplicaciones son debidas a que los CNT tienen una gran área de superficie, alta fuerza de tracción, alta permeabilidad, buena estabilidad térmica y mecánica, son altamente flexibles y poseen una baja densidad. Además, los CNT tienen propiedades mecánicas excelentes, poseen un Módulo de Young de 1TPa, es decir, son unas 100 veces más fuertes que el acero, su conductividad térmica es la más alta conocida hasta ahora, por lo cual son muy utilizadas en aplicaciones electrónicas como emisión de efecto de campo y como nano dispositivos electrónicos (Saeed et al., 2006; Martín, 2011; Mattioli-Belmonte et al., 2012; Dehghani et al., 2019; Wang et al., 2019).

El CNT de la Figura 3.4 está basado en el número de cilindros de grafeno hexagonales que posee, como en este caso, un solo cilindro se le llama CNT de capa simple (SWCNT). Estos son curvos y cerrados, con tamaño aproximado de 1-

2 nm en diámetro (Martín, 2011; Ashtari et al., 2019). Los CNT que se van a trabajar en esta investigación poseen varios cilindros de grafeno concéntricos, por lo que se les llama CNT de múltiple capa o MWCNT, con tamaño aproximado de (10-100 nm). La diferencia entre un MWCNT y un SWCNT se muestra en la Figura 3.5.

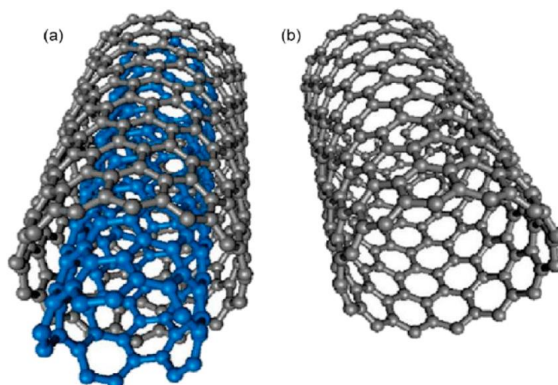


Figura 3.5. a) nanotubo de carbono de multicapa (MWCNT), b) nanotubo de carbono de pared simple (SWCNT) (imagen, tomada de Dehghani et al., 2019).

Estos MWCNT se componen de tubos de diferente diámetro, por lo cual, cada uno de los tubos que conforman los MWCHT puede tener una longitud y diámetro diferentes a las de los otros, y pueden presentar defectos en los extremos como en las paredes. Existen tres tipos: (1) los de tipos sillón, que tienen la particularidad de poseer un carácter metálico y aquiral; (2) los de tipo quiral, que son semiconductores; y (3) los del tipo zigzag que poseen un carácter aquiral (Martín, 2011). Estos CNT tienen la particularidad de que pueden ser integrados a materiales con el objetivo de incrementar sus propiedades mecánicas como su fuerza de Tracción y su módulo de Young (Ashtari et al., 2019).

3.8.1. Funcionalización de los MWCNT

Los MWCNT por su estructura con base en átomos de carbono no son biodegradables y por ende muy citotóxicos. Por esta razón, se están incorporando grupos funcionales que les confieren propiedades de hidrofiliidad, aumento de

solubilidad y una menor citotoxicidad. Estos grupos funcionales incorporados poseen tres aproximaciones que son las siguientes (Martín, 2011; Pan, 2012):

1. La incorporación de estos grupos funcionales mediante enlace covalentes sobre las paredes internas o externas, así como las paredes laterales o extremos de los CNT, como se va a realizar en esta investigación, donde se tienen nanotubos de carbonos de multicapas funcionalizado con grupos aminos (MWCNT) (Figura 3.6).

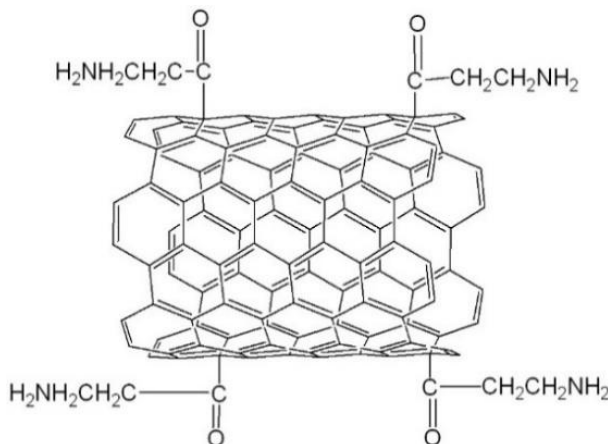


Figura 3.6. Estructura de los MWCNT añadiendo grupos funcionales aminos. PCL (realizada por: José Peñaranda Armbrrecht, 2020).

2. La incorporación de estos grupos mediante interacciones no covalentes como las fuerzas de Van der Waals.
3. La inclusión de otras moléculas como grafenos, fullerenos u otros nanotubos en el interior.

3.9. PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LOS MWCNT

Las propiedades eléctricas de los MWCNT se ven influenciadas por la orientación y del envolvimiento de los enlaces de las estructuras ciclo hexagonales de los CNT y ésta puede ser transferida a través del andamio a las matrices de los andamios mediante el establecimiento de una red llena filtrada (Ashtari et al., 2019; Potschke et al., 2013).

Para regenerar nervios, corazón o para reparar el daño de la espina dorsal se requieren biomateriales que sean altamente conductores o que posean propiedades eléctricas deseables para este fin. Para lograr esto se requiere que estos biomateriales sean polimerizados con MWCNT ya que estos le dan esta propiedad tan importante, normalmente mediante ultrasonido se logra la unión química de estos MWCNT a los biomateriales (Jecg Chin et al., 2015; Ates, 2017).

3.9.1. Percolación

Los CNT poseen excelentes propiedades mecánicas, térmicas y eléctricas que le permiten ser acoplados con materiales poliméricos para obtener materiales compuestos con propiedades mecánicas y eléctricas mejoradas. Pero a veces estos CNT son difíciles de manipular y por ende ser acoplados debido a sus elevadas atracciones de fuerzas de Van der Waals, formándose aglomerados. Una forma de contrarrestar estas aglomeraciones es la utilización de agentes surfactantes que permitan la modificación de la estructura de los CNT, pero esto puede ser riesgoso ya que pueden dañar las propiedades eléctricas de estos compuestos (Kazemi, 2021). La conductividad de los CNT es gobernada por una conducción balística (conducción de transición de fase) descrita dentro la teoría de la percolación, manifiesta que si hay una nucleación probabilística entre dos caminos que están interconectados eléctricamente entre sí por medio de dos electrodos, permiten un flujo de electrones por todo el CNT (corriente eléctrica), dando lugar a la percolación eléctrica. Por esta razón, la teoría de la percolación describe la conectividad de objetos dentro de una red (Mutiso, 2012; Haghgoo, 2019; Gbaguidi, 2019; Doh, 2021).

La conductividad en la percolación depende de la fracción de volumen de los CNT, como se aprecia en la figura 3.7.

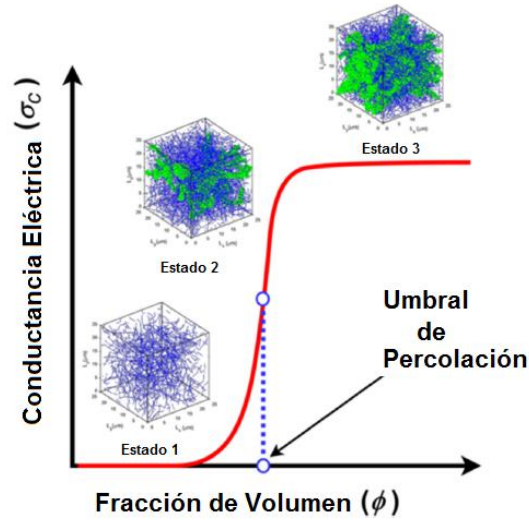


Figura 3.7. Conductancia eléctrica de CNT basada en la teoría de la percolación. (Tomada de Doh, 2021)(Modificada por: José Peñaranda Armbricht, 2021).

De acuerdo con la figura 3.7, se puede decir que en un valor inicial de fracción de volumen (Φ), la conductividad permanece constante (estado 1), pero a medida que Φ va aumentando y se aproxima al estado 2, acercándose a una Φ específica, la conductancia eléctrica aumenta drásticamente en varios órdenes de magnitud hasta llegar al umbral de percolación (Φ_c); en este punto, el crecimiento de la conductividad eléctrica (σ_c) es prácticamente constante, llegando a un punto de equilibrio. Si se sigue incrementando Φ hasta llegar al estado 3 se llega a saturación y los valores de σ_c y Φ son prácticamente constantes (Doh, 2021).

Esta percolación eléctrica se rige por la ecuación 3.1 que relaciona la σ_c con la fracción de volumen de los NTC

$$\sigma_c = \sigma_0 (\Phi - \Phi_c)^t \quad \text{ecuación 3.1}$$

Donde:

σ_c = conductividad eléctrica

σ_0 = parámetro relacionado con la conductividad eléctrica de los NTC

Φ = fracción de volumen de los NTC

Φ_c = Umbral de percolación

t = Exponente crítico que describe el valor físico relativo a las transiciones de fase casi continuas.

Vale la pena resaltar que estos valores se pueden hallar experimentalmente.

3.9.2. Conductividad Eléctrica de los MWCNT

Los MWCNT electrónicamente se comportan como metálicos, semimetálicos o aislantes dependiendo de su diámetro, de la manera de enrollamiento y el número de capas concéntricas, por lo que son muy sensibles a su estructura geométrica. Debido a esto, sus características electrónicas se deben al confinamiento de la cantidad de electrones normales al eje, por lo que estos electrones se propagan a través de dos niveles disponibles (Berger, 2003).

Stephan Frank en el año de 1998 comprobó que los nanotubos de carbono se comportan como un conductor eléctrico balístico usando un microscopio de sonda de barrido (SPM) donde unió todas las fibras de nanotubos de carbono en una superficie de mercurio. Por lo que, a baja temperatura y bajos voltajes los electrones se mueven libremente sin estrellarse con defectos, vibraciones de la red o con otros electrones; este tipo de conducción se muestra en la figura 3.8 (Collins, 2001; Berger, 2003; De la Vega, 2009, Doh, 2021).

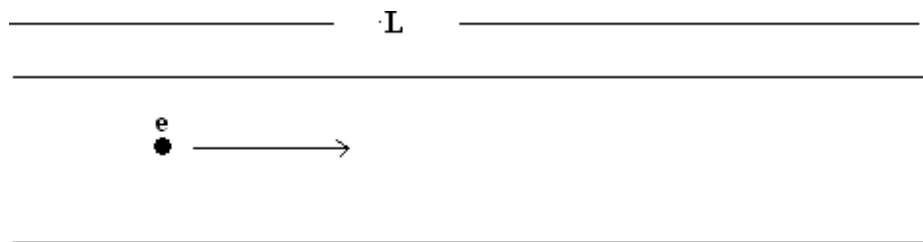


Figura 3.8. Movimiento del electrón dentro de un nanotubo de carbono (conducción balística) (tomado de: De la Vega, 2009)

Lo que la figura 3.8 muestra es que los electrones pueden ir de un extremo a otro del nanotubo sin sufrir dispersión, dando lugar al fenómeno de que la resistencia de un nanotubo es independiente de la longitud de este.

Ahora bien, la resistencia de un nanotubo es la mínima permitida por la mecánica cuántica y se ilustra en la ecuación 3.2 (Balint,2014):

$$G = \frac{1}{2} G_o \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde:

G_o = es el cuanto de conductancia ($G_o = \frac{2e^2}{h} = 13K\Omega^{-1}$)

h = Constante de Planck (6.626×10^{-34} J.S)

e = Carga del electrón (1.602×10^{-19} C)

Factor $\frac{1}{2}$ indica que los nanotubos tienen dos canales de conducción paralelos a lo largo de su eje y cada canal presenta una resistencia ideal G_o

Si el nanotubo no se comporta de una forma ideal su resistencia aumenta, por lo que, en este caso, la resistencia no depende de la longitud del nanotubo sino de su idealidad. Además, para MWCNT se encontró que la corriente es distribuida de manera no uniforme debido a las reacciones entre paredes, la funcionalización que hay en ellas y a los grupos funcionales que los conforman (Roche, 2001, Doh,2021).

En la tabla 3.4 se ilustran algunas de las características principales de los MWCNT empleados en esta investigación.

Tabla 3.4. Características principales de los MWCNT utilizados en esta investigación.

Características	Valores
Diámetro externo	13-18 nm
Longitud	3-30 μm
Pureza	>99%
Contenido funcional	7.0 +/- 1.5%

De acuerdo con la tabla 3.4, se puede apreciar que estos nanotubos permiten una conductividad balística. Además, el contenido funcional de grupos aminos ($-\text{NH}_2$) es del 7.0 % por lo que proporciona aún más conductividad debido a que estos grupos aminos son aceptores de electrones lo que permite que estos no tengan que pasar por grandes distancias, mientras que, los grupos carbonilos presentan orbitales p que se solapan entre sí, lo que les permite a los electrones deslocalizarse más fácilmente.

3.10. CARACTERIZACIÓN TÉRMICA DE MATERIALES COMPUESTOS

3.10.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que mide el flujo de calor con respecto a la temperatura aplicada a la muestra que se encuentra en una atmósfera de N_2 , lo que permite encontrar diferencias en el comportamiento termodinámico de los diferentes materiales utilizados en esta investigación. Las propiedades térmicas que se analizaron en los diferentes materiales fueron la temperatura de transición Vítrea (T_g) y la Temperatura de fusión (T_m).

La transición vítrea en la mayoría de los polímeros es casi imperceptible, esto se debe al grado de cristalinidad de los polímeros, cuando el polímero es amorfo, la transición vítrea se puede observar con facilidad, pero a medida que el grado de cristalinidad aumenta, los movimientos de los segmentos decrecen y la transición vítrea llega a hacerse casi indetectable como el PCL que está a -60°C .

3.10.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)

La técnica de análisis por termogravimetría sirve para caracterizar un material compuesto midiendo los cambios en su peso molecular con respecto a la función aumento de la temperatura. Pero no proporciona información sobre transiciones, fusiones y aquellas propiedades que ocurren sin un cambio de peso, siendo esta su principal desventaja (Coats, 1968). Para esta investigación se realizó un TGA a la PCL sintetizada y a la PCL con las diferentes cantidades de nanotubos, con el objetivo de visualizar que tanto afecta la adición de los nanotubos en el cambio del peso molecular.

3.11. CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE MATERIALES COMPUESTOS

3.11.1. Espectroscopia RAMAN

La espectroscopia Raman es una técnica que dispersa la luz en un rango de longitud de onda de 750 a 850 nm, lo que hace excitar las moléculas presentes, proporcionando en poco tiempo información estructural de un material permitiendo así su identificación, además sirve para caracterizar en gran medida conformaciones de cadena y cristalinidad en polímeros semicristalinos con gran precisión y claridad, su gran ventaja radica en que es una técnica no destructiva lo que permite tener una mayor resolución de los espectros obtenidos de los compuestos a analizar (Kotula, 2017).

Para la PCL la espectroscopia Raman es útil si se quiere identificar los picos que ocurren en un estado semicristalino y se compara con una PCL cristalina. Esto es importante ya que un material compuesto cristalino obtendrá mejores propiedades mecánicas (Kotula, 2017).

3.11.2. Espectroscopia Infrarroja (FT-IR)

La FT-IR estudia las vibraciones que las moléculas experimentan, ya que estas poseen frecuencias en las que rotan y vibran. Estas frecuencias están relacionadas con la fuerza del enlace y la masa de los átomos unidos a cada lado de este (Mc Murry, 2000). A su vez las frecuencias están asociadas con el tipo particular de enlace; en el caso de PCL se destacan los enlaces en los grupos funcionales carbonilo (-C=O), alifáticos cíclicos (-CH_2) y el grupo (C-O), los cuales tienen diferentes frecuencias. Para el caso de los nanotubos de pared múltiple acoplados con grupos aminos se destacan los grupos funcionales de (-NH_2), el grupo Carbonilo (C=O), grupos alifáticos (-CH_2). El espectro electromagnético infrarrojo se divide en tres regiones: cercano, medio y lejano. En investigación, para el propósito de identificación, se utilizó la región del infrarrojo medio ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) (Hiemenz, 2007)

3.11.3. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Mediante esta microscopia se aplica un haz de electrones sobre la superficie de la muestra, produciendo imágenes de alta resolución caracterizando su estructura y grado de cristalinidad. El haz de electrones interactúa con los átomos de la muestra en este caso con el material compuesto PCL/MWCNT, produciendo varias señales sobre la topografía de la superficie y la composición del material compuesto señalado. Para producir la imagen, el haz de electrones es combinado con la posición de la señal detectada y con su intensidad (Stokes, 2008).

En este trabajo de investigación se pretende visualizar la superficie y la composición del material compuesto PCL/MWCNT con el objetivo de ver la interacción refuerzo-matriz.

Las mallas porosas elaboradas para aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos están hechas de materiales poliméricos biodegradables (ver tabla 3.5) donde

la PCL es uno de estos materiales poliméricos más importantes debido a sus excelentes propiedades mecánicas (Mano, 2008).

Tabla 3.5. Algunos polímeros sintéticos biodegradables, utilizados en ingeniería de tejidos

Polímero	Aplicaciones
PLA-Quitano	Hueso, Cartílago
Polianhídridos	Hueso, liberación controlada de fármacos
Poliortoéster	Liberación controlada de fármacos
Policaprolactona	Dispositivos biodegradables de fijación
Policarbonato	Hueso, dispositivos de fijación, liberación controlada de fármacos
Polifumarato	Hueso

Aunque estas mallas porosas de PCL se pueden obtener por diferentes métodos como moldeo por fusión, electrohilado, acoplamiento mediante gel, separación de fases y liberación de partículas, hay una técnica de elaboración que les confiere a estas mallas características estructurales diferentes a las mencionadas anteriormente, esta técnica es la impresión tridimensional.

3.11.4. Cristalografía de Rayos-X (XRD)

Es una técnica experimental que se usa en el análisis de la estructura cristalina de diferentes materiales basada en el fenómeno de la difracción. Los rayos X (radiación electromagnética con longitudes de onda λ entre 10 a 1×10^{-2} nm) se difractan por los electrones que rodean a los átomos irradiados, produciendo una dispersión elástica en ciertas direcciones y se amplifican por interferencia constructiva, lo que origina un patrón de difracción de rayos X; estos patrones son detectados por varios equipos con detectores especiales que permiten observar y medir la intensidad y posición de estos rayos; finalizando en una ecuación matemática que permite

obtener una representación a escala atómica de los átomos y moléculas del material estudiado (Ryu, 2017). Este proceso se muestra en la figura 3.9.

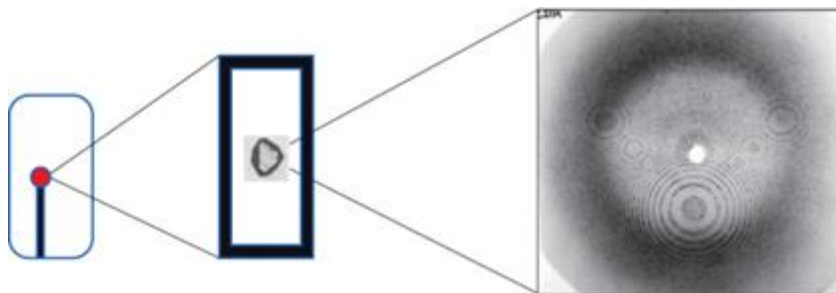


Figura 3.9. Proceso de medición de la estructura cristalina de un material por medio de cristalografía de rayos X (tomada de: .Ryu, 2017; modificada por: José Peñaranda Armbrrecht, 2023)

3.12. POROSIDAD

La porosidad es la fracción del volumen de una muestra que es ocupada por poro o espacio vacío. La porosidad no es una medida de la fracción del vacío sino del tamaño del vacío.

Los tipos de espacios son importantes para distinguir entre dos tipos de poros o vacíos, uno es el que forma fases continuas con el medio poroso llamados **espacios interconectados** o **efectivos** y el otro tipo de materiales consisten en poros no **interconectados** o **aislados** sobre un medio dispersivo. Los vacíos no interconectados no pueden contribuir al transporte a través del medio poroso, solo los interconectados o efectivos.

3.13. PRUEBAS DE TRACCIÓN DE MATERIALES COMPUESTOS

3.13.1. Ensayo de compresión

Este ensayo sirve para medir módulo de elasticidad, límite de elasticidad, deformación y resistencia a compresión de la PCL obtenida por medio de la síntesis. Se realiza en una máquina de ensayos universal.

3.14. PRUEBAS MICROMECAÑICAS DE MATERIALES COMPUESTOS

3.14.1. Nanoindentación

La nanoindentación es una técnica rápida y fácil que sirve para medir la dureza o rigidez la deformación plástica (huella) producida en la superficie del recubrimiento después de la aplicación de una carga sobre el indentador (normalmente una punta de diamante). La dureza esta determina por el cociente entre la fuerza aplicada (F) y el área geométrica (no la proyección) de la huella y, por lo tanto, la unidad de medida es el pascal, aunque también se utiliza el Kg/mm^2 . Se han desarrollado formulas aproximadas que permiten calcular la dureza directamente a partir de la profundidad de penetración, una vez se conoce la geometría de la cabeza del indentador. Dependiendo de la dureza y de las aplicaciones, existen diferentes tipos de indentadores, que no siempre arrojan el mismo resultado de dureza para un mismo material, como son los convencionales (Naughton-Duszová, 2019).

Cuando se trabaja en baja dimensionalidad, se busca separar la influencia del sustrato en la medida de la dureza de las capas delgadas; usualmente se admite que la profundidad de indentación no debe superar el 10% del espesor de la capa depositada. Este criterio tiene ciertos inconvenientes en películas de espesor pequeño, por debajo de $01\ \mu\text{m}$, ya que la profundidad máxima de penetración no debe superar $10\ \text{nm}$, lo que equivale a una carga de indentación en el rango de mN , para obtener valores de dureza de capas delgadas en la zona de $1\ \text{GPa}$ a $100\ \text{GPa}$

(Li, 2002). En la actualidad el equipo diseñado para trabajar en estos rangos de cargas se conoce como nanoindentador. Este equipo permite hacer una mediad dinámica de la profundidad de penetración para diferentes cargas en rangos muy bajos (*curvas carga – descarga*). En este mecanismo la carga se aplica mediante un solenoide cuyo núcleo magnético es solidario con el vástago de indentación como se muestra en la Figura 3.10, el desplazamiento del indentador (penetración) se obtiene a través de un circuito resonante tipo LC en el cual el vástago forma parte del condensador del circuito. En este caso, la dureza se obtiene mediante un análisis de los datos obtenidos de la profundidad de la huella o penetración para las fuerzas aplicadas crecientes y decrecientes (*Carga – descarga*).

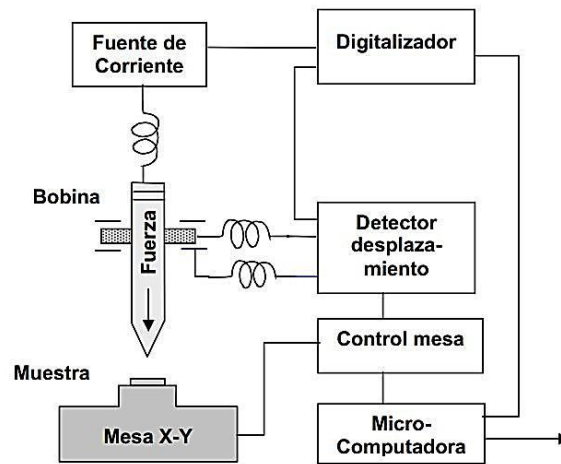


Figura 3.10. Esquema de medida dinámica de la dureza mediante nanoindentación (tomada de martín, 2003).

Un ejemplo típico de las curvas de carga-descarga se muestra en la Figura 3.10, en esta se observa que una vez alcanzado el calor máximo en la curva de carga (punto A, con profundidad h_{max}), la curva de descarga (AB) no regresa por el mismo camino debido a la deformación plástica permanente o residual que retiene la muestra (con profundidad h_r), así la dureza se calcula directamente a partir de la profundidad y mediante la expresión que se observa en la Figura 3.11.

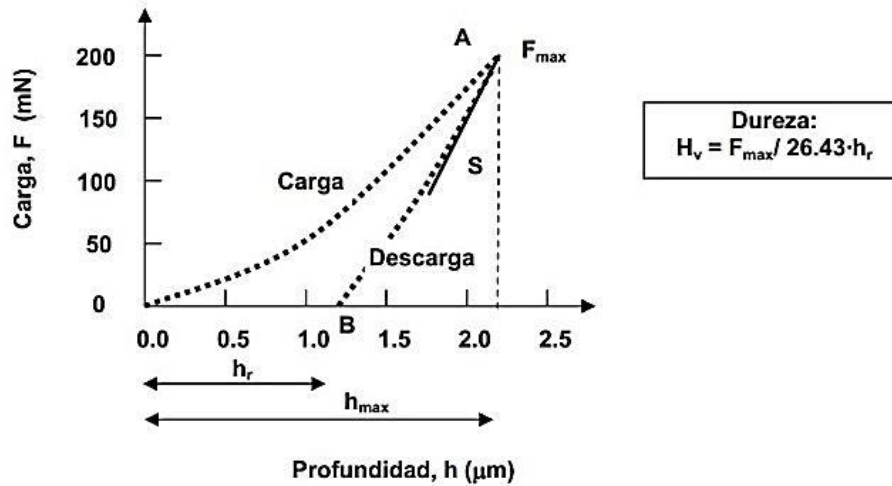


Figura ¡Error! No hay texto con el estilo especificado en el documento..**11.** Curva típica de carga – descarga en procesos de nanoindentación, (tomada de Martín, (2003)).

Adicional a la dureza, las curvas de nanoindentación nos permiten obtener otros parámetros elásticos de la muestra, tales como: porcentaje de recuperación elástica (ER) (ecuación 3.3), h_{max} es el desplazamiento máximo, rigidez del contacto (S) a través de la pendiente de la parte superior de la curva descarga (ecuación 3.4) y mediante el análisis de los datos se puede obtener el módulo de elasticidad (E), el cual está relacionado con la rigidez de contacto (S) y donde A es el área proyectada de la huella de indentación (ecuación 3.5) y ν es la relación de Poisson.

$$ER = \left[\frac{h_{max} - h_r}{h_{max}} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación. 3.3}$$

$$S = \left| \frac{dF}{dh} \right|_{w, max.} \quad \text{Ecuación. 3.4}$$

$$S = 2 \sqrt{A/\pi} \times E / (1 - \nu^2) \quad \text{Ecuación. 3.5}$$

En esta investigación la caracterización mecánica se realizó en un nanoindentador. Mediante esta técnica se obtuvieron las curvas carga – descarga, a partir de esta información se determinó las durezas y módulos de elasticidad (Li, 2002; Ho 2016).

3.15. PRUEBAS ELÉCTRICAS DE MATERIALES COMPUESTOS

3.15.1. Método de Resistividad de Van der Paw (MVP)

Este método, para medir la resistividad, consiste tener una lámina conductora eléctrica homogénea (para el caso de este proyecto de investigación es el andamio fabricado con PCL/MWCNT), la cual se le asignan cuatro puntos de medición a lo largo de su área como se muestra en la figura 3.12 (Rolin, 2016).

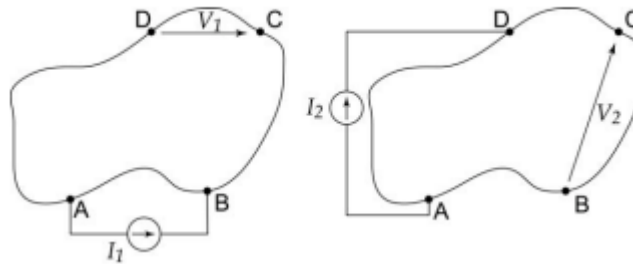


Figura 3.12. Medición del MVP de una muestra de forma arbitraria con sus cuatro puntos de medición de resistividad (imagen tomada de: Banaszczyk, 2010).

Como se muestra en la figura 3.12, a la muestra se le suministra una corriente I_1 a través de los contactos A y B y se mide la caída de voltaje a través de los contactos C y D. Posteriormente esto se invierte, ahora la corriente I_2 se suministra a través de los contactos A y D y se mide el voltaje a través de los contactos B y C (Banaszczyk, 2010). El MVP se rige mediante la ecuación 3.6:

$$\exp \left[-\pi \frac{V_1}{I_1 R_S} \right] + \exp \left[-\pi \frac{V_2}{I_2 R_S} \right] \quad \text{Ecuación 3.6}$$

Se despeja R_S y nos da la resistencia del material de estudio. La principal ventaja del método de Van der Paw es que la resistividad se puede calcular a materiales que no tienen forma definida; pero también tiene como desventaja que el material

debe contar con una superficie plana para que esta medición se pueda realizar con éxito (Banaszczyk, 2010).

3.15.2. Impedancia Eléctrica

La impedancia eléctrica (Z) puede ser definida como una medida de oposición que presenta un circuito cuando se le aplica una corriente alterna (CA), por lo que Z posee tanto magnitud como fase a diferencia de la resistencia que posee únicamente magnitud y trabaja con corriente directa (CD). Matemáticamente, la Z se define como la relación entre el voltaje fasorial (V) y la Corriente fasorial (I) (Ver ecuación 3.7) que fluye a través de un terminal dado en un dispositivo a unas frecuencias determinadas que oscilan entre 50 Hz y 20 kHz (Callegaro, 2009).

$$I = \frac{V}{Z} \text{ Ecuación 3.7}$$

Donde: Z es la impedancia, V es el fasor de voltaje e I corresponde al factor de corriente.

Para aplicaciones biomédicas se utiliza el concepto de bioimpedancia la cual se define con base en la composición específica de electrolitos, grasas y agua que hay en los tejidos de los seres vivos. Si un ser vivo, tiene un alto contenido de agua extracelular, un alto contenido de electrolitos y un alto número de conexiones celulares su impedancia va a ser baja; pero si el ser vivo tiene acumulación de grasas, bajo contenido de agua intracelular, su impedancia va a ser alta, esto es de suma importancia saberlo, porque un ser vivo con una alta o baja impedancia puede ser objeto de cambios patológicos en su composición celular como derrame pleural, fibrosis pulmonar, líquido alveolar etc (Lobo, 2018).

3.15.3. Tomografía de Impedancia Eléctrica (TIE)

La TIE tiene como objetivo principal obtener una imagen de la distribución de la conductividad dentro de un volumen de prueba realizando mediciones eléctricas en

la superficie del material, la gráfica que sale de esta tomografía está representada en la figura 3.13.

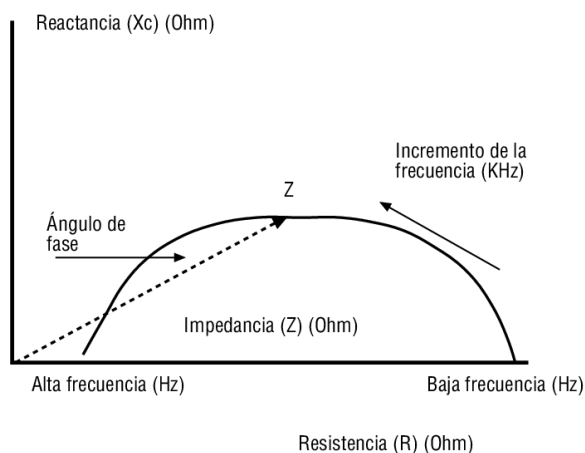


Figura 3.13. Gráfica de impedancia (Z) vs Frecuencia (tomada de: Alvero-Cruz, 2011)

La TIE tiene ventajas sobre otras técnicas de medición de Z , ya que es más económica, rápida, portátil e inofensiva para la salud humana. La principal desventaja de la TIE radica en que las muestras deben tener superficies planas y no ser porosas, esto quiere decir que funciona muy bien para muestras con superficie homogénea (Paulson, 1993).

3.16. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DE UN BIOCOMPUESTO

3.16.1. Citotoxicidad

La citotoxicidad origina un daño celular inducido por un agente externo, el cual consiste en alteración de los procesos bioquímicos normales de la célula, que induce a su vez, cambios morfológicos, celulares y la muerte celular inducida o la programada “apoptosis”. Por consiguiente, estos cambios celulares son los efectos que se producen en la célula por la acción de un tóxico y se pueden manifestar produciendo cambios a diferentes niveles en la morfología celular, en la membrana plasmática y la proliferación celular (Kit Roche, 2004). Esta citotoxicidad se puede

dar en células de miocitos, hepatocitos, musculares estriado y liso o también se determina con líneas celulares estables.

3.16.2. Cambios morfológicos y de membrana celular

La microscopía es una técnica utilizada para la observación de la morfología celular. Los cambios en la membrana celular por el efecto que ha inducido una sustancia tóxica sobre las células son observables tanto si se produce necrosis como si se produce apoptosis. En la necrosis se produce una pérdida de la selectividad de membrana. Las enzimas citoplasmáticas, como la Lactato deshidrogenasa (LDH), son liberadas al medio extracelular. Mientras que en la apoptosis se mantiene la preservación de la membrana plasmática, a este nivel se producen una serie de cambios en la asimetría de los fosfolípidos de la membrana celular, no dando origen a la liberación de este tipo de enzimas. La apoptosis produce un encogimiento celular, formación de cuerpos apoptóticos, condensación de la cromatina, entre otros efectos. La necrosis sin embargo está caracterizada por la pérdida de la integridad de la membrana (Kit Roche, 2004). Estos sucesos pueden visualizarse por microscopía mediante el empleo de diferentes tinciones (e.g. May-Grunwald-Giensa, Hoescht, bromuro de etidio, yoduro de propidio, naranja de acridina).

3.16.3. Procedimientos para evaluar la toxicidad

La toxicidad o citotoxicidad de un material utilizado en salud se evalúa generalmente mediante dos pasos:

- Ensayos de citotoxicidad *in vitro*, utilizando cultivos celulares primarios (como: cultivos de linfocitos humanos, fibroblastos, de pulmón, piel, gingivales o periodontales, igualmente células endoteliales de arterias coronarias o células epiteliales de riñón, mucosa oral, retina o cultivos de hepatocitos), o con líneas celulares estables (riñón de Mono Verde Africano-MA104-, Pulmón Humano-MRC5, Linfoma Humano-RAJI-L-929, entre otros).

- Citotoxicidad *in vivo*, por medio de su implantación en el tejido subcutáneo o en el músculo de animales de laboratorio como hámster, ratones y ratas, en este tipo de ensayos se evalúa la reacción tisular local.

La reacción *in vivo* del tejido blanco versus el material de prueba se debe evaluar primero en biomodelos antes de su utilización en humanos. Los resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* pueden no correlacionarse altamente con los obtenidos *in vivo*. Sin embargo, se puede asegurar que, si un material de prueba induce constantemente una fuerte reacción citotóxica en las pruebas de cultivos celulares, es muy probable que también ejerza toxicidad en el tejido vivo (Criollo, 2013).

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* son las más comúnmente usadas para evaluar la biocompatibilidad de materiales empleados en salud. Son rápidas, sencillas, que proporciona un abordaje cuantificable para determinar cuál material debe ser descartado o cuál material debe ser sujeto a evaluaciones posteriores. Muchos métodos han sido usados para determinar la citotoxicidad de diferentes materiales biomédicos. Estos métodos involucran la observación de la inhibición del crecimiento celular, pruebas de permeabilidad de membrana, pruebas de actividad enzimática o el registro de daño y/o muerte celular.

Las pruebas de permeabilidad de membranas y de crecimiento celular evalúan viabilidades celulares medidas por el halo de inhibición de crecimiento o al grado de penetración de colorantes vitales y no vitales o isótopos radioactivos. Estas se ven afectadas de acuerdo con el material que se analice, pues existen materiales o biomateriales que pueden reaccionar por mecanismos de disociación iónica, provocando la entrada inequívoca de iones y la apertura de los canales de membrana alterando posiblemente los resultados (Criollo, 2013).

3.16.4. Ensayo colorimétrico *in vitro* de colorante XTT

Un ensayo importante de citotoxicidad *in vitro* es el ensayo con colorante XTT. Éste se basa en la división de la sal tetrazolio (de color amarillo) XXT para formar el

producto formazán (anaranjado) compuesto soluble en agua debido a la actividad de la hidrogenasa en las mitocondrias activas. Por lo que una disminución en el número de células vivas resulta en una disminución en la actividad general de las deshidrogenasas mitocondriales en la muestra conllevando a una coloración naranja del formazán (figura 3.14).

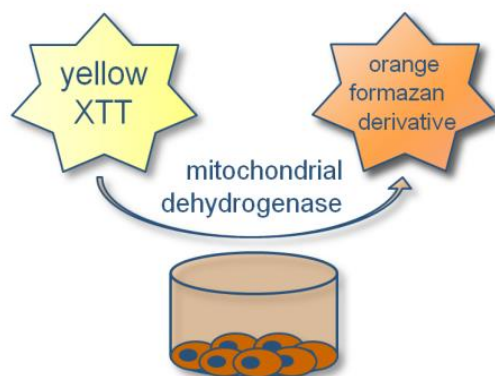


Figura 3.14. Esquema de la transformación de la sal tetrazolio a formazan donde hay un cambio de color de amarillo de la sal tetrazolio a un color naranja debido al formazán producido.

Con este tratamiento se comprueba la proliferación y la viabilidad celular después de haber sido cultivadas en el andamio.

3.17. PRUEBAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LOS MATERIALES COMPUESTOS

3.17.1. Electromiografía

La electromiografía sirve como detección de una señal eléctrica que se genera cuando un músculo se contrae; esta señal permite construir un electromiograma que es la suma de los potenciales de acción de las unidades motoras durante la contracción, lo que permite cuantificar con gran precisión el comportamiento bioeléctrico muscular (Guzmán-Muñoz, 2018).

Existen dos tipos de electromiografías:

1. La Electromiografía invasiva
2. La Electromiografía de superficie

3.17.2. Electromiografía invasiva

Esta técnica obtiene un registro del potencial de acción generado por el músculo estriado, este potencial es medido mediante la inserción de agujas intramuscularmente y es conocido como Fine Wire. Una de las principales ventajas de esta técnica radica en la evaluación de músculos profundos, los cuales superficialmente, serían imposibles de medir debido a las interferencias de señales emitidas por otros músculos más superficiales. Otra ventaja es que detecta la actividad eléctrica en zonas específicas de los músculos debido a que las agujas empleadas poseen un perímetro pequeño. Este método también posee desventajas y una de ella es que la inserción de las agujas puede provocar molestias durante la contracción muscular lo cual afecta el gesto motor evaluado, también este método tiene poca repetibilidad ya que por ser intramuscular es muy poco probable colocar las agujas en el mismo lugar (Guzmán-Muñoz, 2018).

3.17.3. Electromiografía de superficie

Con esta técnica se estudia la actividad bioeléctrica del músculo mediante el registro de las diferencias de potencial registradas en piel. Por lo anterior, utiliza electrodos que son ubicados sobre la piel del músculo que se quiere evaluar. Su importancia radica en que se puede estudiar el comportamiento promedio de un músculo, por este motivo es muy útil en evaluar gestos motores ya que no provoca molestias musculares por lo que es altamente reproducible. Las desventajas es que las señales emitidas por los electrodos pueden ser contaminadas por la señal de otros músculos adyacentes (Guzmán-Muñoz, 2018).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) siguen siendo la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, incluido Colombia. Según Gómez, (2016), Colombia tiene una población de 47.704.472 personas; aunque no hay un registro adecuado sobre la prevalencia de la falla cardíaca, se calcula que esta es del 2.3%, es decir que alrededor de 1.100.000 personas presentan falla cardíaca en Colombia. El 38.7% de la población presenta una falla isquémica (Figura 4.1).

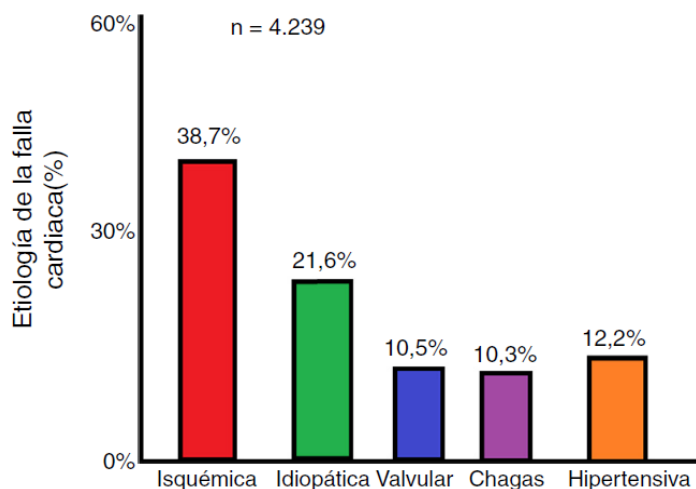


Figura 4.1. Gráfico de barras donde se muestra la etiología de falla cardíaca (tomada de: Gómez, 2016)

En estudios realizados se encontró que 20,1% de los pacientes fueron admitidos con diagnóstico de falla cardíaca, con edad promedio de 68 años; de este grupo 51,6% fueron de género masculino y 48,4% pertenecían al femenino; la mortalidad durante la hospitalización fue de 16% y durante el seguimiento a tres meses de 31%; a los seis meses fue de 37,6% y 45,2% al año (Ministerio de Salud, 2020).

En el Valle del Cauca en 2020 la tasa de mortalidad por falla cardíaca en población mayor de 20 años fue de 116.5 por cada 100.000 habitantes (Ministerio de Salud, 2020), mientras que en otros departamentos esta tasa es menor.

Algunas investigaciones establecieron que en el año 2021 las enfermedades cardíacas aumentaron a un 43%. Se calcula que para el año 2050 habrán 14.1 millones de personas sufriendo esta patología (misión Colombia envejece, 2015), haciendo de esta enfermedad una de las más letales en este siglo (Revista colombiana de cardiología, 2008).

El corazón se desarrolla durante los primeros meses de embarazo en la etapa embrionaria. Durante su formación, hay un equilibrio entre el crecimiento de miocitos y la muerte de estos. Estos miocitos están presentes desde que se nace hasta la edad adulta, pero su crecimiento celular decrece exponencialmente durante esta etapa (Che et al., 2011). En estudios realizados por Carvalho (2012), Safaeijavan (2014), Leor (2006), entre muchos otros; se ha demostrado que los cardiomiocitos se encuentran en constante renovación producto de la mitosis, pero esta mitosis es insuficiente para reparar las pérdidas de cardiomiocitos. En otras palabras, durante su vida, un ser humano renueva la tercera parte de sus cardiomiocitos, pero desafortunadamente, estas divisiones celulares no son suficientes para reparar el corazón infartado, por lo que el corazón no posee la capacidad de regenerar el tejido perdido y reemplazarlo por tejido funcional contráctil durante su cicatrización. Cuando se presenta una insuficiencia cardíaca isquémica, se observan daños secuenciales evidenciados fisiológica y bioquímicamente, haciendo que una parte del corazón muera perdiendo capacidad contráctil producto de la muerte celular de los miocitos conllevando a la cicatrización con tejido fibroso no contráctil que reemplaza a los cardiomiocitos, los cuales se pierden irreversiblemente. Esta situación se agrava dado que la capacidad contráctil del corazón disminuye notablemente durante toda la vida del paciente, conduciendo a una insuficiencia cardíaca crónica.

Por las razones expuestas anteriormente, cada día se desarrollan materiales compuestos biodegradables que puedan ser utilizados como injertos en ingeniería de tejidos. Estos andamios, hechos de poliésteres alifáticos como la PCL, PLLA y

PGA, entre otros, poseen algunas limitaciones que se deben ser tomadas en cuenta a la hora de ser utilizadas en corazón, en especial cuando se trata de remodelación cardíaca. Debido a su gran rigidez, estos polímeros no son elastoméricos (no son muy flexibles) y por lo tanto no son compatibles con el tejido blando cardíaco. Además, durante su degradación estos polímeros se parten en productos ácidos, los cuales son incompatibles con el crecimiento celular dentro del andamio. Estos productos ácidos se auto catalizan creando reacciones secundarias que producen residuos con mayor peso molecular que pueden ser difícilmente degradados, dejando grandes masas del andamio o del polímero en el tejido cardíaco (Atzet et al., 2008). También, poseen propiedades hidrófobas, en especial la PCL (este carácter hidrofóbico hace que la adherencia y migración celular al andamio no sea la ideal), debido a que las células no poseen los suficientes nutrientes para proliferar dentro del andamio poroso ni encuentran puntos de anclaje que le permitan colonizar el andamio. Por estos motivos generalmente se tienen que emplear hidrogeles o copolímeros que le incrementen la hidrofilicidad (Atzet et al., 2008; Anwaar-Nazeer et al., 2019; Huang, 2019). Por último, si no fueran por los polímeros de alto peso molecular, las propiedades químicas serían débiles y tendría andamio quebradizo o frágil.

Hasta el momento no se ha dado solución total, sino que los tratamientos se han limitado, en muchos casos, a terapias de inyección de células, pero con resultados parciales porque las células no duran lo suficiente como para seguir su diferenciación por tiempo prolongado. También, se han usado polímeros sintéticos como el PLLA en la fabricación de andamios, pero sin éxito debido a su rigidez. Finalmente, no existe suficiente evidencia del acople de nanotubos de carbonos con PCL en regeneración cardíaca. Es importante buscar solución a este problema y obtener un material compuesto de PCL combinada con MWCNT-NH₂ que posea las propiedades y funcionalidad adecuadas.

5. HIPÓTESIS

El material compuesto de PCL soportado con MWCNT-NH₂ sirve como andamio para crecimiento de células de músculo estriado incluyendo cardiomiocitos, que permiten la recuperación de la capacidad contráctil perdida.

5.1. Hipótesis nula

El material compuesto de PCL soportado con MWCNT-NH₂ no sirve como andamio para crecimiento de células de músculo estriado, y no permite la recuperación de la capacidad contráctil perdida.

6. JUSTIFICACIÓN

El problema de falla cardiaca se está convirtiendo en la principal causa de morbilidad a nivel mundial. Esto obedece a que una cantidad importante de pacientes sobreviven a infartos, sólo en Estados Unidos los pacientes con falla cardiaca remitidos en clínica pasaron de un 4% en 1996 a 13% para el año 2011, prolongando su esperanza de vida, pero no en condiciones óptimas, si el músculo cardiaco no se recupera (Gómez, 2016; Roth, 2017; Jenca; 2021). Las personas que experimentan un IM y se logran recuperar, experimentan otro IM en un plazo de un año. Esto es debido a la FC, producto del adelgazamiento del miocardio y del sobreesfuerzo de las células cardiacas circundantes a la cicatriz producida por el IM. Además, los pacientes después del evento isquémico pueden experimentar complicaciones como anemia, enfermedades renales crónicas y enfermedades pulmonares, lo cual hace que estos pacientes deban enfrentar terapias respiratorias, ejercicios específicos, cambio de dieta y tratamientos farmacológicos complejos, su familia también debe estar en tratamiento psicológico (Revista Colombiana de cardiología 2008; Teo, 2017; Jenca; 2021).

Por lo anterior, se hace necesario que los médicos puedan identificar a los pacientes que sean propensos a desarrollar una insuficiencia cardiaca después de un IM y el inicio de las terapias dirigidas a este tipo de pacientes incrementando los costos de hospitalización, por ejemplo, un paciente con FC le cuesta al país en el primer mes un promedio de \$18.442.956 COP; del total de este dinero el 62.86% (11.593.242 COP) se debe al costo de los dispositivos médicos y el procedimiento quirúrgico, seguido de la hospitalización con un 15.81% (2.915.831 COP) y el 21.33% (3.933.883 COP) restante se debe a los costos de medicamentos (8.74%), exámenes de laboratorio (5.18%), imágenes (3.91%) y Salas, traslados y otros servicios (2.35%) (Revista Colombiana de cardiología 2018).

Además de los gastos económicos, los pacientes deben enfrentar la etapa de rehabilitación cardiaca durante su hospitalización como en casa. En la rehabilitación

hospitalaria, el paciente dependiendo si su infarto es complicado su estadía en una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) es de 15 días y deben de enfrentar una rehabilitación en la clínica por unas dos a cuatro semanas, finalizando con un monitoreo constante y tratamiento psicológico. Mientras que para la un paciente con un IM no complicado su estadía en UCI es de cinco a siete días con monitoreo cardiaco, pero con una rehabilitación ambulatoria en casa con monitoreo cardiaco por unas cuatro a seis semanas, aunado con un cambio de dieta y tratamiento psicológico (Teo, 2017).

Lo anterior se pretende solucionar desarrollando materiales compuestos biocompatibles y bioabsorbibles, no citotóxicos, que puedan ser utilizados como injertos en ingeniería de tejidos. Una de las bondades de estos materiales compuestos es que pueden promover el crecimiento celular, con las características necesarias para que sean biocompatibles. La fortaleza y flexibilidad del material debe ser escogida dependiendo del sitio a implantar ya que el corazón, por ser un tejido blando en continua contracción, requiere un material compuesto flexible y elástico, con una buena porosidad, para que los cardiomiocitos puedan intercambiar nutrientes con el medio sin que haya rechazo y permitiendo regeneración de tejido nuevo. Por las razones anteriores se desarrolló un andamio de PCL/MWCNT que se probó implantándolo inicialmente en un músculo periférico estriado como EDS para evaluar su adaptabilidad, tolerancia, integración al intersticio muscular (absorbabilidad) y respuesta a estímulo eléctrico midiendo su viabilidad y funcionalidad.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo General

- Desarrollar un andamio de PCL/nanotubos de carbono, elástico, flexible, conductor eléctrico y absorbible, que permita la adherencia de células musculares estriadas cultivadas como cardiomiocitos.

7.2. Objetivos Específicos

- Elaborar un andamio PLC/nanotubos de carbono
- Evaluar la citotoxicidad del andamio de PCL/ MWCNT-NH₂
- Demostrar la elasticidad, flexibilidad y conducción eléctrica necesarias para ser implantado en músculo.
- Observar por histología el efecto del implante sobre la arquitectura del músculo estriado receptor

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Introducción:

En esta sección se presenta toda la parte experimental iniciando con la síntesis de los materiales compuestos que constituyen el andamio, junto con sus respectivas caracterizaciones y finalizando con las pruebas fisiológicas de músculo estriado en biomodelos murinos.

8.1. SÍNTESIS DE PCL MEDIANTE ROP

En un balón de fondo redondo de 100 mL se vertieron 20 mL de ϵ -caprolactona con 138 μ L de $\text{Sn}(\text{oct})_2$ en ausencia de solventes, se puso bajo agitación constante con un magneto a 120 rpm a temperatura ambiente (25°C). Este balón, con la mezcla descrita anteriormente, se ubicó en un baño de arena y se tapó completamente con la arena para que la temperatura estuviera homogénea todo el tiempo (Figura 8.1).



Figura 8.1. Montaje de la polimerización de la PCL. Se observa el balón inmerso en la arena para mantener homogénea la temperatura.

Se inició el calentamiento hasta 140°C , manteniendo la reacción continua durante 48 h, tiempo en el cual la PCL de alto peso molecular obtenida debió adquirir una

consistencia sólida y fuerte. Se dio por terminada la reacción y se dejó en reposo hasta alcanzar temperatura ambiente (Figura 8.2).



Figura 8.2. Aspecto del balón con PCL sólida blanca de alto peso molecular.

La PCL obtenida se disolvió en la menor cantidad de cloroformo posible y con agitación constante, se formó una solución amarilla transparente (Figura 8.3).



Figura 8.3. Fotografía del balón con PCL obtenida después del calentamiento a 140°C por 48 h, el reposo hasta temperatura ambiente y la disolución con cloroformo.

Posteriormente se agregó el doble de volumen de metanol (MeOH), con lo cual se formó una suspensión lechosa, de la que se precipitó PCL de alto peso molecular,

en estado sólido y de color blanco. Se dejó reposar, se filtró al vacío en embudo Büchner y se secó con el mismo vacío durante un tiempo de 15 minutos. Acto seguido, se llevó a campana de extracción donde se dejó secando dos días. Una vez seca, la PCL se empacó para su posterior caracterización.

8.2. FUNCIONALIZACIÓN DE LOS NANOTUBOS DE CARBONO A PCL SINTETIZADA Y A PCL COMERCIAL

Se pesaron 5 g de PCL comercial ($PCL_{(c)}$) y 5 g de PCL sintetizada ($PCL_{(s)}$). Por separado, se agregaron a un Erlenmeyer de 250 mL que contenía 60 mL de cloroformo. La mezcla se sometió a agitación constante a 600 rpm durante 1h, a temperatura ambiente 27 °C. Una vez pasado el tiempo de agitación y observando que la PCL se hubiera disuelto completamente, se procedió a pesar 1%, 3% y 5% de nanotubos de pared múltiple (MWCNT) respectivamente. Éstos se dejaron en agitación constante a 600 rpm durante una hora, se les agregó 60 mL de cloroformo y se llevaron a un equipo de Ultrasonido de marca Lab-Companion UCP-10, durante un tiempo de 30 minutos (Figuras 8.4 y 8.5).



Figura 8.4. Fotografía del equipo de ultrasonido empleado para lograr el acople de MWCNT/PCL (Equipo Ubicado en tecnoacademia SENA-ASTIN)



Figura 8.5. Fotografía del equipo de ultrasonido con un Erlenmeyer en su interior, que contiene MWCNT disueltos en cloroformo.

Una vez terminado este procedimiento, las soluciones de PCL/cloroformo y MWCNT/cloroformo por separado, se llevaron al equipo de ultrasonido por 1h adicional (Figura 8.6).



Figura 8.6. Fotografía de dos Erlenmeyer con soluciones de PCL y MWCNT, respectivamente, dentro del equipo de ultrasonido.

Una vez finalizada la hora, la PCL se mezcló con los MWCNT con los siguientes porcentajes:

- 1% PCL/MWCNT
- 3% PCL/MWCNT
- 5% PCL/MWCNT

Se dejaron en ultrasonido a temperatura de 47 °C bajo pulsaciones cortas cada tres segundos durante 2 h. Pasado este tiempo, se precipitaron con 50 mL de meOH (Figura 8.7).

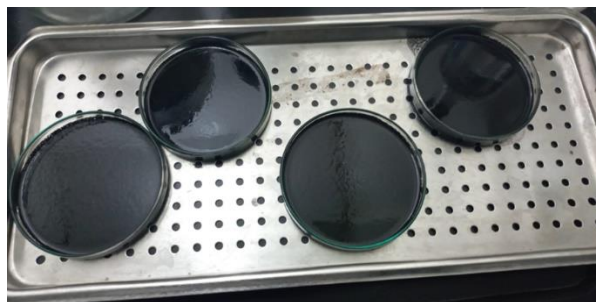


Figura 8.7. Fotografía de cuatro cajas de Petri, conteniendo membranas de PCL/MWCNT precipitadas con MeOH antes de ser secadas en campana de extracción.

Finalmente, se dejó evaporar el cloroformo en campana hasta obtener los andamios deseados. Vale la pena resaltar que con la PCL sintetizada no hubo formación de membranas por lo que la parte experimental se realizó con la PCL comercial.

8.3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL MATERIAL COMPUESTO PCL/MWCNT

La caracterización estructural del material compuesto de PCL/MWCNT se realizó mediante dos técnicas complementarias, RAMAN y FT-IR:

8.3.1. Espectroscopia RAMAN

Las mediciones y los espectros RAMAN se procesaron mediante una geometría de retrodispersión por un equipo marca Thermoscientific DXR (Figura 8.8), con una fuente de excitación de Ar^+ de una longitud de onda 514 nm. Este equipo está acoplado con un microscopio marca LEICA invia RAMAN. Los espectros fueron corridos desde 1000 cm^{-1} hasta 2000 cm^{-1} , este rango es lo que se conoce como la huella digital de la PCL (donde están las bandas principales).



Figura 8.8 Fotografía del equipo de espectroscopia RAMAN marca, ThermoScientific (Equipo ubicado en Tecnoparque SENA ASTIN).

8.3.2. Espectroscopia de Infrarrojo (FT-IR).

Las mediciones de las principales bandas de la $PCL_{(c)}$, $PCL_{(s)}$ y del material compuesto de $PCL/MWCNT$ se llevaron a cabo en un equipo marca Perkin Elmer Spectrum IR 10.7.2 (Figura 8.9), en el rango de infrarrojo medio con longitudes de onda desde 400 cm^{-1} hasta 4000 cm^{-1} .



Figura 8.9. Fotografía del equipo de FT-IR marca Perkin Elmer Spectrum IR 10.7.2 (equipo ubicado en el SENA ASTIN)

8.4. MEDICIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA PCL Y EL MATERIAL COMPUESTO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE MASAS

Las espectros de masas de la $PCL_{(c)}$, $PCL_{(s)}$ y del material compuesto de $PCL/MWCNT$ se llevaron a cabo en un equipo marca Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra (Gas Chromatograph Mass Spectrometer) (Figura 8.10).



Figura 8.10. Fotografía del equipo de espectroscopia de masas (Ubicado en la Facultad de ciencias naturales y exactas Universidad del Valle)

El método empleado para el escaneo de las masas del material compuesto se llevó a cabo por impacto electrónico a una temperatura de 240°C hasta 200°C , con un voltaje aplicado a cada filamento de 0.72kV . El tiempo de escaneo de la muestra fue de 35 minutos, con una relación de masa carga desde 35 uma hasta 1000 uma. Los espectros de masas obtenidos fueron graficados a intensidad de pico vs. masa carga.

8.4.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) de la malla impresa de PCL/MWCNT

Se tomaron todos los porcentajes del material compuesto de PCL/MWCNT y se acondicionaron con un recubrimiento de oro mediante un sistema de Sputtering Cressington Sputter Coater 108 auto para incrementar su conductividad eléctrica, una vez realizado esto, se llevaron al SEM de marca NeoScope JCM-5000 (Figura 8.11), bajo condiciones de voltaje de 4 a 10 kV y a alto vacío con condiciones criogénicas. Las imágenes de la superficie se tomaron a unas resoluciones de 50, 100 y 200X.



Figura 8.11. Fotografía del equipo de SEM marca NeoScope JCM-5000 (ubicado en tecnoparque SENA-ASTIN)

8.4.2. Difracción de Rayos-X (XRD, Alto ángulo)

El equipo utilizado para la determinación de la estructura cristalográfica de los andamios de PCL/MWCNT, corresponde al difractómetro de Rayos-X de referencia PANalytical X'pert proTM (ver figura 8.12), con fuente de radiación Cu K α con longitud de onda $\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$, voltaje acelerador de 40 kV y corriente de 50 mA.



Figura 8.12. Difractómetro de Rayos-X de referencia PANalytical X'pert proTM (ubicado en el departamento de física Universidad del Valle)

El equipo cuenta con un monocromador secundario que elimina la radiación K β y la fluorescencia, las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente.

8.5. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL MATERIAL COMPUESTO PCL/MWCNT

Las pruebas de caracterización estructural y térmica se llevaron a cabo para la elucidación de la estructura primaria y comportamiento térmico del material. Pruebas de DSC y TGA son útiles en la determinación del comportamiento térmico del material, lo cual sirve para dilucidar si el material se comporta como un elastómero y cuán estable es a temperaturas.

8.5.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El análisis térmico de la PCL_(c), PCL_(s) y del material compuesto de PCL/MWCNT se hicieron mediante la técnica de DSC, con un equipo marca Mettler Toledo (Figura 8.13) a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en una atmósfera de nitrógeno con un flujo de 80 mL/min desde 20 °C hasta 400 °C.

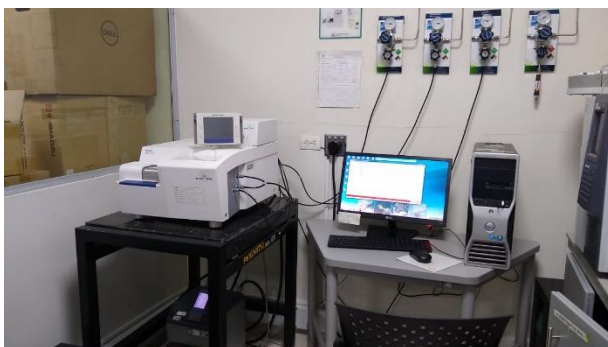


Figura 8.13. Equipo de DSC marca Mettler Toledo (ubicado Tecnoparque SENA-ASTIN)

8.5.2. Análisis Termo Gravimétrico (TGA)

Los análisis térmicos de la PCL y del PCL/MWCNT se realizaron mediante la técnica de TGA (Figura 8.14) a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en una atmósfera de nitrógeno con un flujo de 80 mL/min desde 20 °C hasta 400 °C (Ho, 2016).



Figura 8.14. Fotografía del equipo de TGA marca Mettler Toledo (ubicado en Tecnoparque SENA-ASTIN)

8.6. CARACTERIZACIÓN MECÁNICA

8.6.1. Nanoindentación del material compuesto PCL/MWCNT

Este ensayo se usó para determinar la dureza del material compuesto y se realizó con la selección de tres muestras para cada uno de los porcentajes de MWCNT/PCL (1%, 3%, 5%) usando un equipo nanoindentador marca Ubil-Hysitrom que tiene una punta piramidal Berkovich de 150 nm, como se muestra en la figura 8.15.



Figura 8.15. Equipo de nanoindentación utilizado en los andamios de PCL/MWCNT (equipo ubicado en ingeniería de materiales, universidad del Valle)

Para obtener el módulo elástico, la carga máxima y la dureza, cada muestra se indentó cinco veces en diferentes partes de su superficie separadas por unos milímetros.

8.6.2. Medida de Porosidad del material compuesto PCL/MWCNT mediante Microscopia electrónica de fluorescencia.

La porosidad del material compuesto es determinante a la hora de la siembra celular, ya que, sin una adecuada porosidad ni una debida interconexión de poros, las células no van a poder intercambiar nutrientes con el medio y no van a poder sobrevivir. Una de las técnicas empleadas para ver el diámetro de poro y su interconexión es la microscopia de fluorescencia.

Se les determinó la porosidad por duplicado a las muestras de PCL_(C), PCL/MWCNT 1%, PCL/MWCNT 3% y PCL/MWCNT 5% en un microscopio triocular con epifluorescencia intensilight con objetivos de 20X, 40X y 100X con un tubo de aumento intermedio de 1.25X, 1.5X y 2.0X, de marca NIKON ECLIPSE Ni-U90 (Figura 8.16).



Figura 8.16. Fotografía del microscopio NIKON ECLIPSE Ni-U90 (Las imágenes resultantes son del Laboratorio de imágenes del postgrado en Ciencias-Biología de la Universidad del Valle por Juan Felipe Ortega Giraldo).

Las fotos de porosidad de los andamios de PCL pura y los materiales compuestos fueron tomadas con una cámara digital marca NIKON DS-Ri1 U3, acoplada encima del microscopio de fluorescencia (Figura 8.17).



Figura 8.17. Fotografía de la cámara digital NIKON DS-Ri1 U3 (las imágenes resultantes son del Laboratorio de imágenes del postgrado en Ciencias-Biología de la Universidad del Valle-Juan Felipe Ortega Giraldo).

Las fotos obtenidas fueron procesadas por un Software NIS ELEMENTS Br, básico para investigación, el cual combina imágenes enfocadas en diferentes planos en una imagen 2D (Figura 8.18).



Figura 8.18. Imagen del software NIS ELEMENTS Br (Laboratorio de imágenes del postgrado en Ciencias-Biología de la Universidad del Valle-Juan Felipe Ortega Giraldo).

8.6.3. Ensayo de Tracción del material compuesto de PCL/MWCNT

Este ensayo se realizó de acuerdo con la norma ASTM 3822-07, mediante la cual se seleccionaron tres muestras para cada uno de los porcentajes de MWCNT/PCL (1%, 3%, 5%). La prueba se llevó a cabo mediante el uso de una máquina universal de ensayos TINIUS OLSEN H50Ks con una celda de carga de 500 N (Figura 8.19) con mordazas neumáticas especiales.



Figura 8.19. Fotografía de la máquina de Ensayo Universal TINIUS OLSEN H50Ks (ubicada en Tenoparques SENA-ASTIN).

Se fabricaron probetas de tracción tipo V de acuerdo con la norma ASTM D638-14 (Figura 8.20).



Figura 8.20. Fotografía ilustrando el aspecto de las probetas de PCL/MWCNT de acuerdo con la norma ASTM D638-14.

Se empleó una velocidad de desplazamiento de mordazas igual al 5 mm/min de la longitud del ensayo por unidad de tiempo (mm/min); con una distancia entre mordazas de 300 mm, con el objetivo de determinar la resistencia máxima a

Tracción, módulo de elasticidad y deformación porcentual en la carga máxima del material compuesto.

Las medidas de las muestras en la sección de falla antes de iniciar el ensayo son las siguientes:

PCL/MWCNT 1%: espesor 1 mm y ancho 3.22 mm

PCL/MWCNT 3%: espesor 0.22 mm y ancho 3 mm

PCL/MWCNT 5%: espesor 0.45 mm y 3.3 ancho

La falla (momento en que se fracturan) de las probetas del material compuesto antes mencionado se muestra en las figuras 8.21a, 8.21b y 8.21c

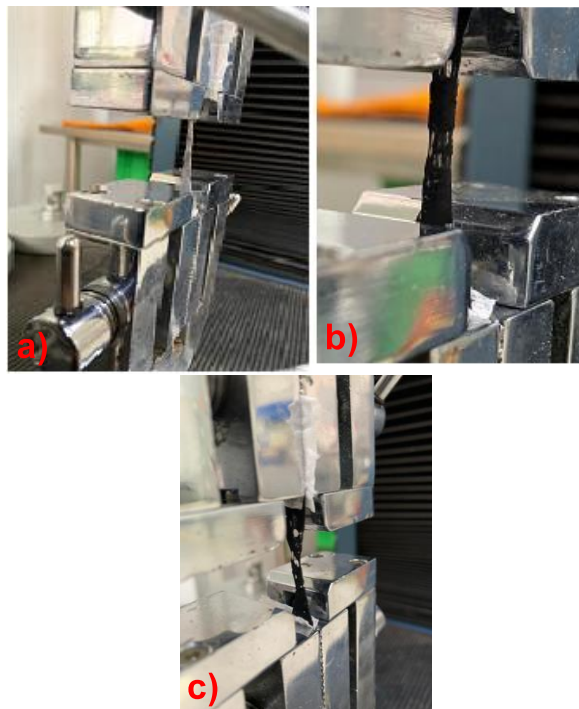


Figura 8.21. Fotografías de a) ensayo de Tracción a la probeta de PCL/MWCNT 1%, b) ensayo de Tracción a la probeta de PCL/MWCNT 3%, c) ensayo de Tracción a la probeta de PCL/MWCNT 5%.

8.7. CONDUCTIVIDAD DE LOS ANDAMIOS DE PCL/MWCNT

8.7.1. Prueba de impedancia eléctrica del material compuesto y de la PCL comercial.

Las pruebas de impedancia eléctrica de la PCL_(C) y de los porcentajes del material compuesto PCL/MWCNT al 1%, 3% y 5% se realizaron en un equipo de marca Wayne Kerr precisión Impedance Analyzer 6420 (Figura 8.22).

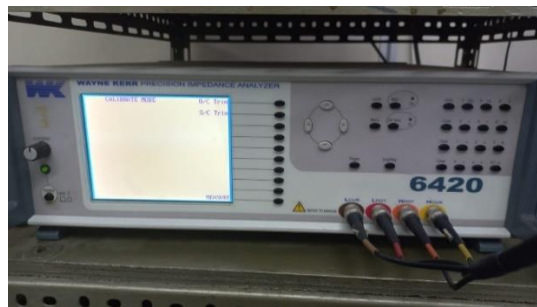


Figura 8.22. Fotografía del equipo de impedancia Eléctrica (ubicado en el departamento de Física de la Universidad del Valle)

Las muestras fueron compactadas usando una portamuestras de técnica de cuatro puntas (Figura 8.23).



Figura 8.23. Porta muestras para medir la impedancia eléctrica del material (ubicado en el departamento de Física de la Universidad del Valle)

Los andamios se sometieron a impedancia eléctrica a diferentes rangos de frecuencias, mostrando el resultado en pantalla (Figura 8.24).

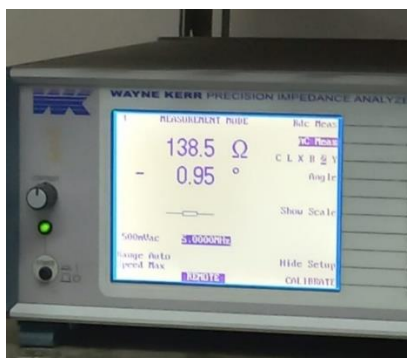


Figura 8.24. Fotografía de uno de los datos de la impedancia eléctrica arrojado por el equipo.

Finalmente, los resultados de impedancia capacitiva, resistiva e inductiva (CRI) se procesaron en un computador, dando una gráfica impedancia (Z) vs rango de frecuencias.

8.8. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DEL ANDAMIO FABRICADO CON FIBROBLASTOS DE LÍNEA CELULAR L929.

Una vez fabricados los andamios, se realizó la evaluación de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial por el método de extracción y colorante XTT. Este ensayo se realizó de la siguiente manera:

1. En un frasco de cultivo T-75 se sembró la línea celular L 929 de fibroblastos (Thermo Scientific, Mouse fibroblast cell line, ATCC # CCL-1 CCL-1 is NCTC clone 929 of strain L, derived in 1948 from a C3H/An male mouse), se le agregó DMEM complementado con 10% FBS (Cat. No. 14-501F, Lonza) a 37 ± 1 °C (Figura 8.25).



Figura 8.25. Imagen de la siembra de Línea celular L929 de fibroblastos realizada en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, de la Universidad del Valle.

2. Poco antes del final del período de incubación, las células se evaluaron microscópicamente (Figura 8.26) y se añadió el reactivo XTT (CyQUANT™ XTT Cell Viability Assay) y un reactivo de acoplamiento de electrones.



Figura 8.26. Imagen del procedimiento de evaluación del crecimiento de las células mediante microscopio realizado en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, de la U del Valle.

3. Se realizó la siembra de esta línea celular L929 de fibroblastos en placa de 24 pozos (Corning™ 3526); (Figura 8.27) y se dejó cultivando durante 24-48 horas en incubadora a 37°C y 5% de atmósfera de CO₂.

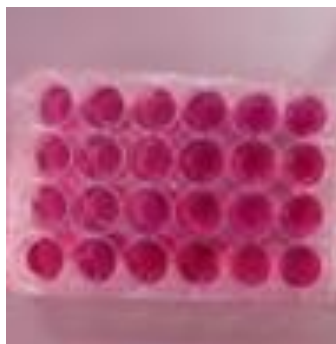


Figura 8.27. Imagen de la placa de 24 pozos con el extracto incubado y sembrado en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, de la U del Valle

Una vez cumplido el tiempo de incubación, se transfirieron 100 μ L del sobrenadante de cada uno de los pozos que contienen las células y cada uno de los materiales analizados antes esterilizados se agregaron a los pozos correspondientes en la placa de 96 pozos (Merck PSHT004R5); (Figura 8.28), se les retiró el medio de cultivo y se volvió a agregar XTT.

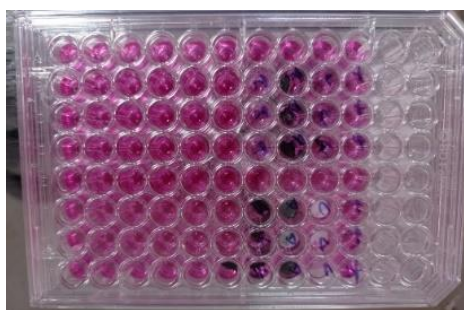


Figura 8.28. Fotografía de los andamios con células L929 en placa de 96 pozos. Realizado en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, de la Universidad del Valle

4. Se incubó la placa a temperatura ambiente protegida de la luz durante tres horas con aluminio. Se volvió a retirar el medio y se agregó 150 μ L de XTT.
5. Para que se pudiera realizar la prueba de citotoxicidad se utilizó un lector de microplacas para ELISA, STAT-FAX 2100, a una longitud de onda de 456 nm con un filtro de referencia de 492 nm (Figura 8.29)



Figura 8.29. Imagen del equipo de ELISA, STAT-FAX 2100 Tomada en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, de la Universidad del Valle

8.9. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC) A CARDIOMIOCITOS (CM)

Se usaron células MSC mantenidas en congelación en el Laboratorio In Vitro de Farmacología de la Universidad del Valle, sede San Fernando. Los viales que contenían las MSC se encontraban preservados en nitrógeno líquido, se retiraron y se descongelaron en un baño serológico hasta que estuvieron a una temperatura de 37 °C (Figura 8.30).

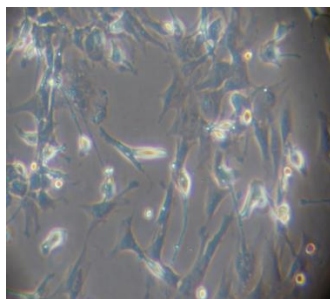


Figura 8.30. Fotografía de las células MSC tomadas en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, de la Universidad del Valle.

Las MSC contenidas en los viales previamente descongelados se vertieron por completo en un frasco de cultivo T-75 (Corning™ 430641U) y se llevaron a una incubadora previamente calentada a 37 °C, con un CO₂ graduado en un 5% durante 24 a 48 horas. A este cultivo celular se le cambió el medio inicial (DMEM al 10% 1x suplementado con suero fetal bovino (SFB) de 10% de concentración (Cat. No. 14-

501F, Lonza), cada tres días con el objetivo de expandirlas (Figura 8.31) hasta que las células tengan una expansión entre el 70-80% de confluencia.



Figura 8.31. Ilustración de la preparación del medio de MSC realizado en el Laboratorio In Vitro, de Farmacología, Universidad del Valle

A las MSC expandidas, se les adicionaron 15 mL de Cardiomyocyte Differentiation Medium (SCM102, Milipore), y se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% durante 21 días, cambiando el medio por medio fresco cada 3 días (Figura 8.32).

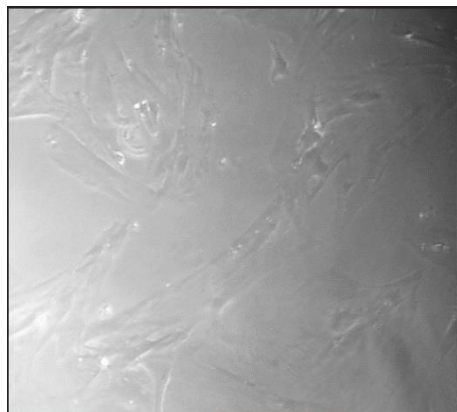


Figura 8.32. Células de CM diferenciados después de los 21 de incubación.

8.9.1. Siembra de los andamios en las células de CM diferenciadas

Para realizar la siembra de los andamios de PCL(c)/MWCNT de 1% y 5%; se lavaron los cardiomiocitos con una solución salina balanceada de Hank (HBSS) 1x

(Gibco™) por triplicado y fueron desprendidos del frasco de cultivo con 5 mL de tripsina 2.5 % (Gibco™ 25300054). Se incubaron a 37 °C con CO₂ a una concentración del 5 % durante diez minutos. Los CM fueron colectados en tubos de 50 mL y se lavaron por triplicado con HBSS 1x, posteriormente, se agregó 6 mL de DMEM 1x suplementado con suero fetal bovino (SFB) de 10% de concentración, para detener el desprendimiento celular. El recuento celular se realizó en una cámara de Neubauer y las células fueron resuspendidas a una concentración de 1×10^6 células/mL en HBSS 1x

Se transfirieron 20.5 mL de células desprendidas para realizar un recuento supra vital con azul de tripán, se realizó una dilución de 1 en 10 y se colocaron 10 μ L en cámara de Neubauer (figura 8.33)



Figura 8.33. Conteo de células con azul de tripán en cámara de Neubauer.

Se comprobó que había en total 3.6 millones de células, por lo que se procedió a sacar 14.4 mL de la suspensión celular y se pusieron en un frasco de 50 mL al que se agregaron 33.6 mL de medio SCM102 y se dejó reposar por 15 minutos. A su vez, también se midió la viabilidad celular por este método dando un resultado de 80%.

Transcurrido ese tiempo, se procedió a alistar los andamios de PCL_(c)/MWCNT 1% y los andamios de PCL_(c)/MWCNT 5%, en una placa de 24 pozos (ver figura 8.34).

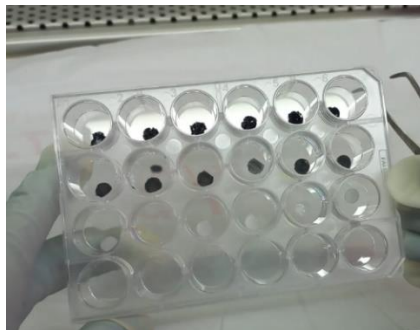


Figura 8.34. Andamios de PCL_(c)/MWCNT 1% y PCL_(c)/MWCNT 5% puestos en una placa de 24 pozos.

A estos andamios, se le agregó una gota de SFB (ver figura 8.35) y se dejan reposar por 10 minutos.

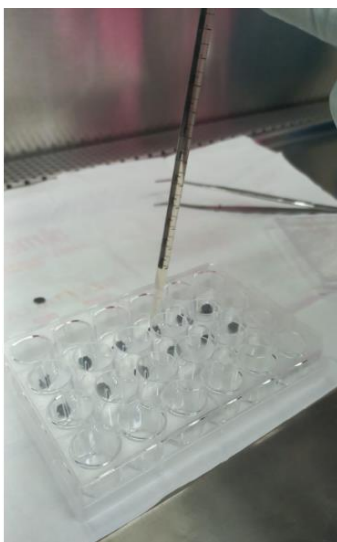


Figura 8.35. Agregación de una gota de SFB a los andamios de PCL_(c)/MWCNT en la placa de 24 pozos.

Se agregaron 2 mL de la suspensión de CM previamente preparada a cada uno de los pozos con los andamios de PCL_(c)/MWCNT ver figura 8.36)



Figura 8.36. Colocación de 2 mL de CM a los pozos con los andamios de PCL_(c)/MWCNT.

Una vez puesto los 2 mL de la de la suspensión de CM en todos los pozos con los andamios de PCL_(c)/MWCNT de la placa de 24 pozos (ver figura 8.37), se continuó cambiando el medio por SCM102 fresco durante 15 días, hasta su implantación.

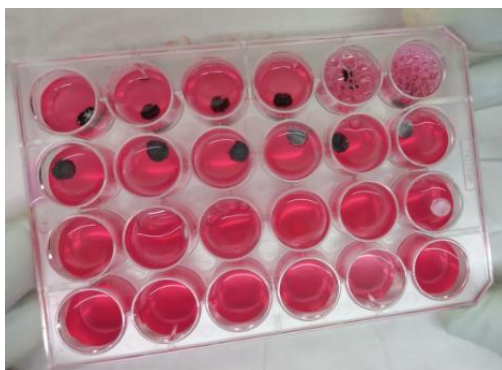


Figura 8.37. Solución de CM agregada a todos los pozos con andamios de PCL_(c)/MWCNT.

8.10. IMPLANTACIÓN DEL ANDAMIO DE PCL/MWCNT EN MÚSCULO PERIFÉRICO DE BIOMODELO MURINO.

La implantación de los andamios de PCL/MWCNT en músculo periférico de biomodelo murino se realizó con base en protocolo PROTOCOLO JOVE (Franco, et al., 2014) de la siguiente manera:

1. Se anestesió profundamente una rata Wistar (hembra adulta de un año y cuatro días de vida, con peso de 250 g) con isoflurano inhalado, usando un veporizador (Storz & Bickel) con 5% de isoflurano con un caudal de oxígeno min 1,5 L y un vaporizador de vidrio (pyrex) con isoflurano algodón empapado en la parte inferior (Figura 8.38)



Figura 8.38. Imagen de la rata wistar sedada con isoflurano. Realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle

2. Se rasuró el EDL de la rata wistar y se realizó un corte longitudinal en la piel sobre músculo extensor largo digital (ELD) de la pata izquierda de la rata con cuchilla 10 (Paramount) (Figura 8.39).

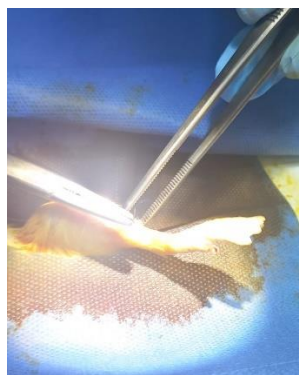


Figura 8.39. Imagen del corte longitudinal sobre el músculo ELD de la rata Wistar, realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle.

Se procedió a realizar la fulguración al músculo con un electrobisturí (Valleylab-Force FXc) (Figura 8.40). El otro músculo de la pata contralateral se usó como control de reparación natural.



Figura 8.40. Imagen del músculo EDL electrofulgurado de la pata izquierda de la rata wistar, realizado en el bioterio de la facultad de Salud de la Universidad del Valle.

Se suturó la piel sobre el músculo previa infiltración con Bupivacaina (Laboratorios Pisa, INVIMA 2011M-0000040-R1) para control del dolor post lesional e implante. Esta pata sin implante de andamio se usará como control de cicatrización "natural" (Figura 8.41).

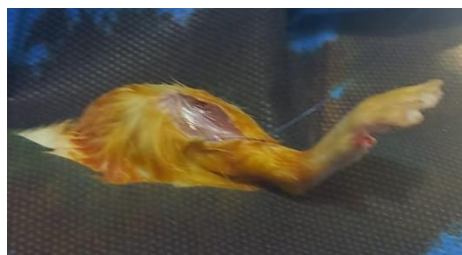


Figura 8.41. Imagen del procedimiento de sutura del músculo EDL fulgurado realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle

3. Los andamios a probar fueron sometidos a pruebas de citotoxicidad *in vitro* mediante el uso del método MTT, corroborando que no es tóxico a las concentraciones de 1 y 5 %, con un diámetro de 3 mm, y desinfectado con alcohol 70% (Figura 8.42).

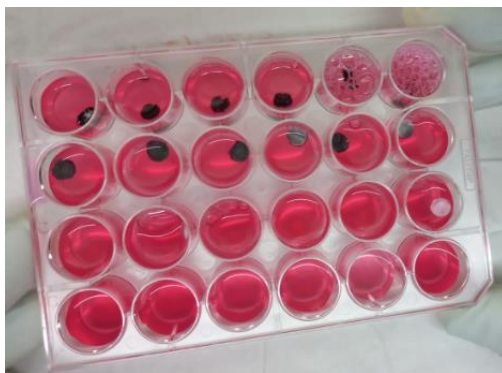


Figura 8.42. Imagen de los andamios de PCL/MWCNT utilizados en implantación en las ratas, realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle.

4. Los andamios de PCL(c)/MWCNT al 1% y 5% sembrados con CM de la sesión 8.9.1. fueron llevados a la sala de cirugía (Figura 8.43)

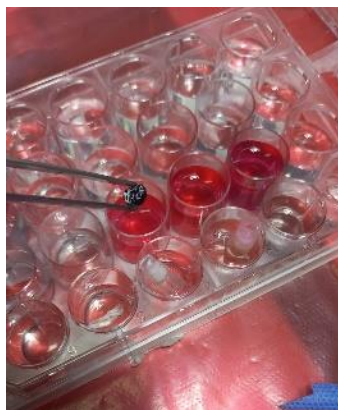


Figura 8.43. Imagen del andamio celularizado de PCL/MWCNT utilizado para la implantación. Realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle

5. Se realizó un corte longitudinal en la piel sobre músculo ELD de las ratas al andamio a implantar y se procedió a realizar la fulguración al muslo con la posterior implantación del andamio. El andamio se adhirió con tres microgotas de metacrilato, una en la parte superior, otra en la inferior y otra a la izquierda. El muslo se cerró con sutura (Figura 8.44).



Figura 8.44. Imagen del andamio de PCL/MWCNT implantado en EDL de la rata Wistar realizado en el quirófano de la facultad de Salud de la Universidad del Valle

El músculo de la otra pata posterior sirvió como control. Este mismo procedimiento se repitió bajo estas cinco condiciones utilizando tres biomodelos para cada caso para un total de 15 ratas wistar:

- Andamio al 1%, sin células diferenciadas.
- Andamio al 1%, con células diferenciadas
- Andamio al 5% sin células diferenciadas.
- Andamio al 5% con células diferenciadas.
- Musculo EDL electrofulgurado sin andamio implantado

6. Las ratas Wistar utilizadas se dejaron en recuperación. Para aliviar el dolor y la inflamación se les administró ibuprofeno 400 mg/kg por vía oral y diclofenaco IP 100 mg/kg peso rata cada ocho horas durante cuatro días (Figura 8.45).



Figura 8.45. Imagen de una rata Wistar un día después de la implantación de los andamios en el área de recuperación de la facultad de Salud de la Universidad del Valle

7. Después de 10 días las ratas fueron sometidas a eutanasia utilizando sobredosis isoflurano. El músculo completo se extrajo y fue llevado a un equipo de Biopack (AD INSTRUMENTS Force Transducer), donde se le realizó estimulación y respuesta al estímulo.

8.11. REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR DE MODELO MURINO.

8.11.1. Calibración y configuración de equipo.

Se realizó la calibración del transductor de Tracción por medio de una masa de 50 g especial para calibración (Figura 8.46), se realizó la respectiva conversión de unidades de voltaje a unidades de fuerza (Newton).



Figura 8.46. Imagen masa de 50 g especial para la calibración, realizado en el laboratorio de fisiología, de la Universidad del Valle

8.11.2. Configuración del software LabChart.

Para el registro de los datos se utilizó el equipo powerlab 4/26 de la empresa *ADInstruments*, utilizando el software *LabChart*. Se seleccionó la configuración para dos canales, un canal de registro y un canal de estimulación, para el canal de estimulación se configuraron los parámetros.

8.11.3. Disección músculo Biomodelo.

La disección del biomodelo murino se llevó a cabo en dos etapas, en la primera etapa, se sedó el biomodelo utilizando exceso isoflurano en cámara de vidrio hasta que fallece. En la segunda etapa se realizó la extracción del músculo. El músculo fue hidratado con solución Ringer permanentemente.

8.11.4. Registro electrofisiológico de la contracción muscular.

Se ubicó el músculo en el soporte especial (Figura 8.47)

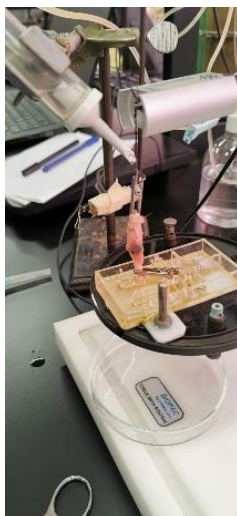


Figura 8.47. Fotografía del músculo del biomodelo ubicado en el soporte especial realizado en el laboratorio de fisiología de la Universidad del Valle.

Como se observa en la figura 8.47, el músculo se fijó firmemente en la parte inferior del montaje, mientras que la parte superior se acopló al transductor de Tracción (previamente calibrado). Acto seguido, se adaptó un sistema de goteo, el cual contenía solución Ringer con el fin de mantener el músculo hidratado y así evitar la pérdida de sus propiedades.

Posteriormente, se posicionaron los electrodos de estimulación (Figura 8.48)

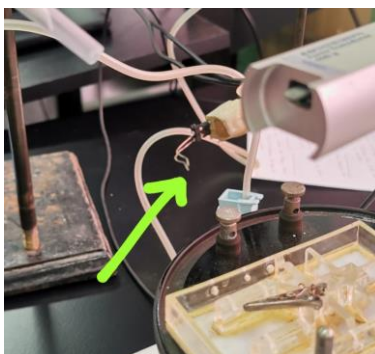


Figura 8.48. Ilustración de la posición de los electrodos de estimulación durante el registro fisiológico de la contracción muscular, realizado en el laboratorio de fisiología, de la Universidad del Valle.

Los electrodos se cloraron previamente con el fin de aumentar sus propiedades conductoras.

Una vez posicionados los electrodos en el músculo (Figura 8.49), se realizaron las mediciones de prueba utilizando un tiempo de 30 segundos de estimulación y medición de fuerza de contracción muscular.



Figura 8.49. Imagen de la posición de los electrodos en el músculo realizado en el laboratorio de fisiología, de la Universidad del Valle.

Una vez encontrada la Tracción óptima del músculo se procedió a realizar los registros de la contracción (Figura 8.50)

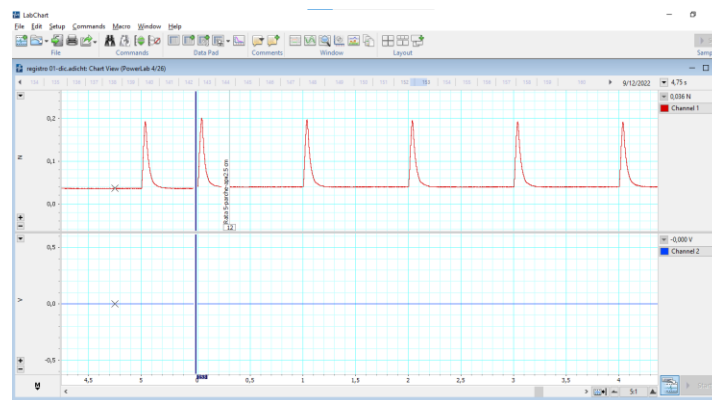


Figura 8.50. Imagen de la señal de contracción muscular reflejada en la pantalla del transductor de Tracción del laboratorio de fisiología de la Universidad del Valle.

Se registró la señal por periodos de máximo cinco segundos para evitar la fatiga muscular.

8.12. DISEÑO DE EXPERIMENTO

Los resultados obtenidos del acople de las $PCL_{(s)}$ y $PCL_{(c)}$ a los MWCNT como los resultados de la implantación del andamio $PCL_{(c)}$ /MWCNT en músculo periférico de biomodelos murino se analizaron descriptivamente mediante gráficos e indicadores estadísticos de tendencia central y dispersión.

Se llevó a cabo un Análisis de Varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) de una vía a partir de modelos estadísticos semiparamétricos asociados a modelos aditivos mixtos (caso especial de un modelo aditivo generalizado mixto – GAMM; Wood, 2017) el cual introduce efectos de suavizamiento debido a la falta de linealidad de los datos (el flujo de calor y la pérdida de peso no presentaron un comportamiento lineal en función de la temperatura, al igual que el esfuerzo en función de la deformación y la fuerza de contracción muscular en el tiempo) e incorpora la estructura de dependencia que tienen los datos (mediciones repetidas sobre cada réplica).

En adición, se realizaron contrastes múltiples para determinar diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales evaluadas a un nivel de significancia del 5%. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el programa de libre distribución R versión 4.2.2 (R Development Core Team, 2022).

9. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En esta tesis doctoral se realizaron dos tipos de resultados, un tipo con respecto a la síntesis de la PCL y su comparación con la PCL comercial, para luego comparar su acoplamiento con MWCNT; y el otro tipo de resultados tienen que ver con la caracterización e implantación de los andamios de PCL comercial con MWCNT.

Dicho lo anterior, no existe en el mundo un biodispositivo implantable que sea bioabsorbido y completamente funcional para recuperar la capacidad contráctil, por condiciones metabólicas, por lo anterior, se han realizado numerosas publicaciones tanto nacionales como internacionales en regeneración de tejidos, abarcando específicamente el área de remodelación cardíaca jugando un papel significativo en el desarrollo de la investigación y conocimiento en este específico tema. Pero no se ha llegado a un andamio de este tipo que tenga en cuenta características como flexibilidad, biodegradabilidad, no citotoxicidad, propiedades eléctricas y conductoras, así como la diferenciación celular de cardiomiocitos. El impacto que se esperaba de esta tesis sería que al fabricar andamios de PCL_(s)/MWCNT y PCL_(c)/MWCNT con todas estas propiedades mencionadas y que los cardiomiocitos implantados sobrevivir lograrán realizar sus funciones. Con la hipótesis que se puso a prueba los objetivos logrados, bajo la premisa de nuevos desarrollos hacia biomodelos porcinos y posteriormente a humanos, se podrá contribuir a bajar la tasa de mortalidad y morbilidad asociada a la insuficiencia cardíaca crónica, posiblemente mejorando la calidad de vida de las personas y disminuyendo los costos de incapacidad causados por esta enfermedad en el sistema de salud y social.

9.1. SÍNTESIS DEL PCL MEDIANTE ROP POR MEDIO DEL MECANISMO DE COORDINACIÓN-INSERCIÓN

En la figura 9.1 se presentan las imágenes de la PCL de alto peso molecular sintetizada mediante el mecanismo de ROP de coordinación-inserción, por medio de la metodología reportada en la sección 8.1.



Figura 9.1. Síntesis de PCL de alto peso molecular obtenida mediante el mecanismo de coordinación-inserción.

Posteriormente, la PCL obtenida en la figura 9.1 fue macerada en un mortero hasta obtener pequeños fragmentos como se observa en la figura 9.2.



Figura 9.2. PCL de alto peso molecular obtenida por el mecanismo de coordinación-inserción siendo macerada en mortero.

El proceso de síntesis mediante este mecanismo de ROP fue realizado de forma sistémica hasta alcanzar las condiciones óptimas que garantizan una reproducibilidad confiable, por lo que se obtuvieron 700 g de PCL sintetizada (Figura 9.3). Con esta PCL_(s) se realizó el acoplamiento con los MWCNT.



Figura 9.3. PCL sintetizada por ROP, empacada en un frasco de vidrio de 1000 mL.

Como se mencionó anteriormente, esta $PCL_{(s)}$ se obtuvo mediante el mecanismo de coordinación-inserción (figura 9.3) el cual se divide en tres etapas fundamentales. En la primera etapa, la de iniciación, el octoato de estaño ($Sn(Oct)_2$) se insertado, en este caso, por un alcohol primario, el 1-octanol formando una especie que se ilustra en la Figura 9.4. Lo que sucede es que el estaño actúa como un centro activo debido a sus orbitales d vacíos, y capta los electrones desapareados del grupo hidroxilo del 1-octanol, una vez captado este grupo hidroxilo, suelta el ácido-2-etilhexanóico, dejando el alcóxido de estaño, la especie activa.

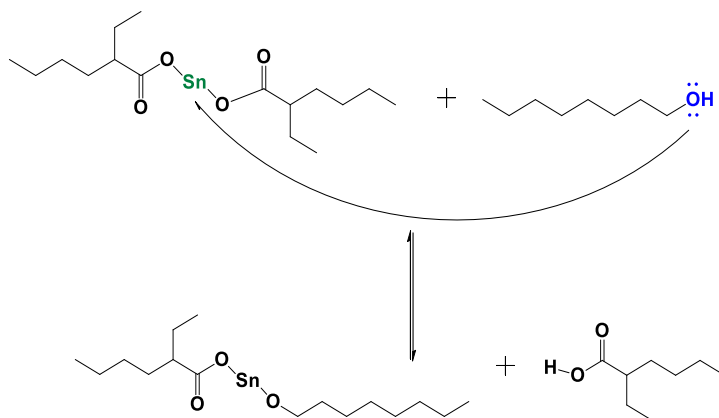


Figura 9.4. Etapa de inserción del alcohol primario 1-octanol al $Sn(Oct)_2$, para formar una especie activa.

Tomando en cuenta los resultados de las figuras 9.1-9.4, se puede observar que, en su estado puro, el $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ no contiene un grupo alcóxido reactivo. Estudios mecanísticos recientes han demostrado que 1-Octanol (coiniador), sustituye por lo menos uno de los grupos octanoato en una reacción rápida, y este alcóxido de estaño formado es el verdadero catalizador para el proceso de iniciación (Kricheldorf et al., 1995; Kricheldorf, 2001; Chisholm et al., 2007). Este coiniador de 1-octanol forma un enlace éster con la CL y por tal motivo este grupo puede ser fácilmente modificado. Este coiniador permite así que se pueda incorporar a la molécula otro tipo de moléculas con grupos terminales como drogas, vitaminas, hormonas y moléculas que contengan por lo menos un grupo hidroxilo.

Una vez obtenida la especie activa en la etapa anterior, se inicia la segunda etapa, la de propagación. Esta etapa de propagación representada en la figura 9.5, es la más importante porque la PCL juega un papel fundamental como un ligando coordinado con el estaño del iniciador, vía oxígeno del carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) de la CL; resultando en un oxígeno de carga positiva reforzando la electrofilicidad del $\text{C}=\text{O}$ y a su vez, la nucleofilicidad de los grupos éster de la CL; haciendo que la “inserción” de la CL hacia el estaño-oxígeno tome lugar (Albertsson, 2003; Peñaranda, 2013). En esta etapa de propagación aún continúa el iniciador $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ haciendo parte del polímero, éste se debe retirar inmediatamente para evitar efectos citotóxicos en el polímero de PCL recién sintetizado.

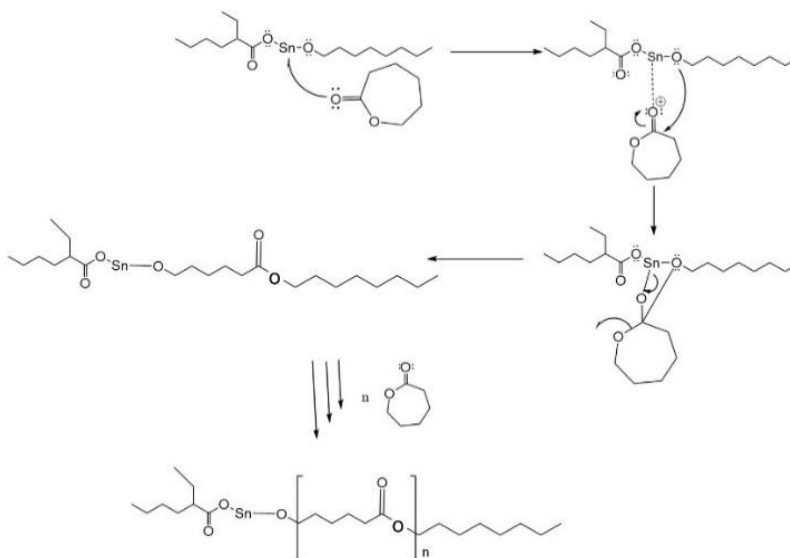


Figura 9.5. Fase de Propagación de la polimerización por ROP de la PCL

En la etapa de finalización, etapa tres, se incorpora en la molécula activa un compuesto monofuncional, en este caso metanol (MeOH), que retire el $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ del polímero y éste pueda ser cerrado con el grupo hidroxilo (-OH) final (Albertsson, 2003; Peñaranda, 2013) (Figura 9.6), quedando así, la PCL de alto peso molecular mostrada en la figura 9.3.

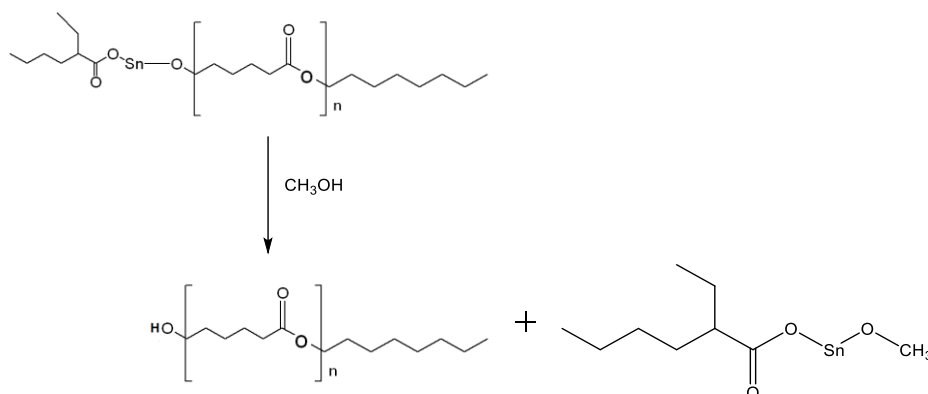


Figura 9.6. Fase de finalización de la polimerización por ROP de la PCL, donde la incorporación de un grupo hidroxilo a la molécula activa, hace que el complejo activo de estaño se retire de la reacción y quede la PCL de alto peso molecular.

9.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y TÉRMICA DE LA PCL

9.2.1. Comprobación de la síntesis de PCL mediante ROP por FT-IR y RAMAN

Con el fin de comprobar si hubo reacción de polimerización se realizaron pruebas de FT-IR, donde se compararon las bandas generadas por el monómero de CL con las bandas generadas de la estructura de PCL sintetizada. (Figura 9.7). Para este caso, esta validación se realizó por medio de una comparación entre las bandas del monómero la ϵ -CL y las bandas que genera la PCL. Si estas bandas son similares en todo el espectro, quiere decir que la polimerización no se llevó a cabo y tendremos oligómeros o un material compuesto de bajo peso molecular. Por lo anterior se realizó el análisis de las bandas de cada una de ellas con base en el espectro (Figura 9.7).

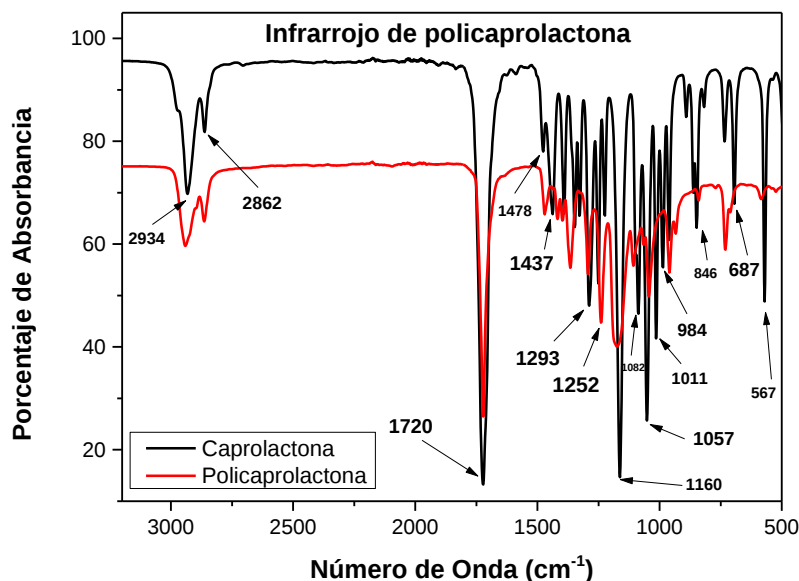


Figura 9.7. Comprobación de la síntesis de PCL mediante FT-IR y su comparación con respecto al monómero de CL.

Por lo tanto, la interpretación de los resultados de FT-IR obtenidos en la figura 9.7, se basan en unas bandas vibracionales asociadas a alargamientos simétricos y asimétricos entre 2934 y 2862 cm^{-1} de los grupos alifáticos ($-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}-$) presentes

tanto en la CL como en la PCL. Posteriormente, se encuentra una banda muy pronunciada en 1720 cm^{-1} característica de la vibración de alargamiento del grupo C=O presente tanto en la CL como en la PCL; seguida de dos bandas entre 1478 y 1437 cm^{-1} características de la vibración de deformación de los grupos alifáticos ($-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}-$) presentes tanto en la CL como en la PCL. En 1293 cm^{-1} aparece la banda característica de la vibración de alargamiento de los grupos C-O y C-C tanto en la CL como en la PCL. Vale la pena resaltar que en la PCL esta banda se corre a campo más bajo debido a su fase cristalina. En 1252 cm^{-1} , encontramos la banda de alargamiento asimétrico característica de los enlaces C-O-C, tanto de la CL como de la PCL. En 1160 cm^{-1} encontramos la banda característica de la vibración alargamiento de los grupos OC-O, característicos tanto de la CL como de la PCL. En 1157 cm^{-1} aparece la banda de vibración de deformación del C-O y de los C-C de la fase cristalina tanto de la CL como de la PCL.

A partir de estas bandas vienen las diferencias de la CL con la PCL que nos comprueban que sí hubo polimerización. Para la CL aparecen dos bandas 1011 cm^{-1} y 984 cm^{-1} características de la vibración de alargamiento de los C-O-C del anillo de la CL, como la PCL no tiene una estructura cíclica (de anillo) estas dos bandas no aparecen en su espectro. Todas estas bandas mencionadas anteriormente coinciden con las reportadas en varios trabajos de investigación en los que se destacan el de Feng (2012), Lang (2012), Elzein (2014), Ghaziof (2017) y Anwaar Nazeer (2019). Todo lo anterior nos ratifica que si se obtuvo PCL de alto peso molecular.

9.2.2. Comprobación de la Síntesis de PCL mediante ROP por RAMAN

Dada la necesidad de identificar diversos grupos funcionales y otras características vibracionales, se realizó la espectroscopia RAMAN, para comparar la ϵ -caprolactona con la PCL_(s) y la PCL_(c). El espectro RAMAN (Figura 9.8) muestra que la ROP de la PCL tuvo lugar y que efectivamente, el sólido blanco obtenido en la sesión 8.1 es PCL de alto peso molecular. La espectroscopía RAMAN tiene la

ventaja de obtener mejores mediciones para vibraciones simétricas de grupos no polares. Como tiene una mayor resolución, se realizó el análisis de las bandas características del monómero la CL, la PCL_(s) y la PCL_(c). Como se aprecia en la (figura 9.8) interpretada a continuación, se observa que el espectro RAMAN de la PCL_(s) y la PCL_(c) poseen las mismas bandas a lo largo del espectro. Se analizan las bandas principales, comenzando por aquellas bandas que están en 2922 cm⁻¹ y 2873 cm⁻¹ características de la vibración de alargamiento de los grupos -CH₂ y -CH, mientras que las bandas de la CL sufren un corrimiento a campo alto, entre 2972 cm⁻¹ y 3032 cm⁻¹, respectivamente.

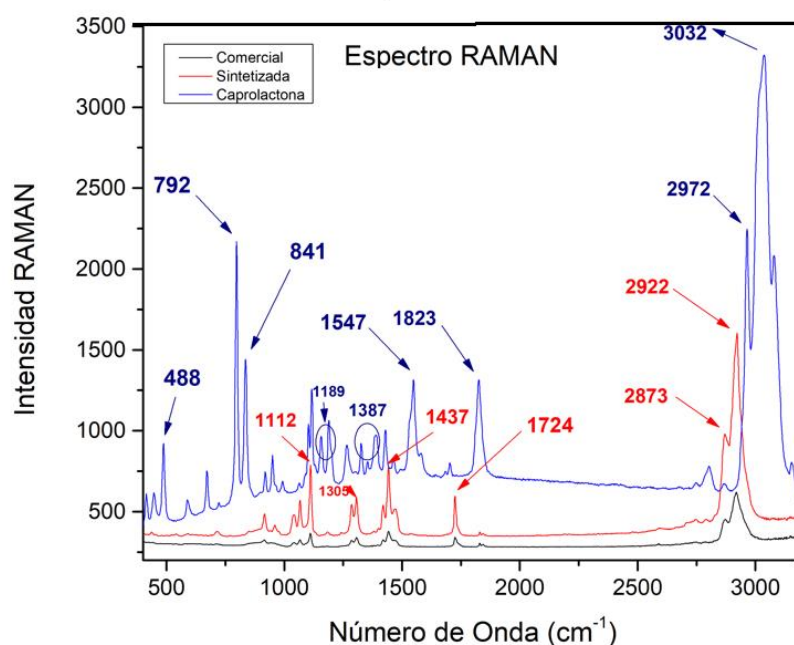


Figura 9.8. Verificación mediante RAMAN de la polimerización de la PCL mediante ROP y su comparación con la PCL comercial y el monómero de CL.

Las vibraciones correspondientes se deben a que los grupos alifáticos de la CL están más tensionados debido a que hacen parte del anillo de la CL (Figura 9.9a), mientras que los grupos alifáticos de la PCL son de cadena abierta (Figura 9.9b), lo que hace que se puedan tener movimientos de torsión, alargamiento y deformación sin tanta Tracción. En los espectros de la PCL_(s) y la PCL_(c), se observa una banda característica de la vibración de alargamiento simétrico del C=O, mientras que esta

banda en la CL se encuentra corrida a campo alto a 1823 cm^{-1} , característica de un $\text{C}=\text{O}$ de una lactona (Zuluaga, 2000). En 1437 cm^{-1} aparece la banda de deformación simétrica de los $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}$ de la $\text{PCL}_{(\text{s})}$ y la $\text{PCL}_{(\text{c})}$, mientras que ésta misma banda aparece corrida a campo alto en la CL a 1547 cm^{-1} . En 1112 cm^{-1} se observa la vibración de alargamiento de los grupos $-\text{O}-\text{C}$ de la $\text{PCL}_{(\text{s})}$ y la $\text{PCL}_{(\text{c})}$, a diferencia de 1189 cm^{-1} de la CL. La gran diferencia entre estos dos espectros se observa en que la CL posee unas bandas en 841 cm^{-1} y 792 cm^{-1} respectivamente características de la vibración de deformación de los grupos $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ del anillo. Estas bandas no se encuentran en el espectro de la $\text{PCL}_{(\text{s})}$ y la $\text{PCL}_{(\text{c})}$, porque éstas son de cadena abierta (Figura 9.9). Todas estas bandas mencionadas anteriormente coinciden con las reportadas por Meng (2020).

De acuerdo con lo anterior, se puede decir, que se logró la polimerización mediante ROP por el método de coordinación-inserción de la PCL. De acuerdo con lo anterior, se decidió realizar una comparación de las propiedades térmicas de la $\text{PCL}_{(\text{s})}$ y la $\text{PCL}_{(\text{c})}$ con el fin de determinar cuál de las dos PCL se va a utilizar para la fabricación del andamio de PCL/MWCNT.

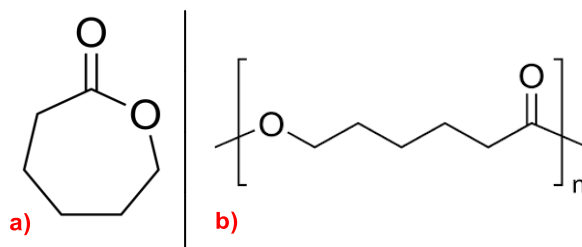


Figura 9.9. Estructura química de a) Caprolactona (CL), b) Policaprolactona (PCL)

9.2.3. Espectros de DSC y TGA de la comparación entre la $\text{PCL}_{(\text{s})}$ y la $\text{PCL}_{(\text{c})}$

La espectroscopia DSC se utiliza principalmente para visualizar la T_c , T_m y T_d de los compuestos químicos, para este caso, se visualizaron estas temperaturas de las dos PCL.

El espectro de DSC representado en la figura 9.10 es muy similar entre las dos PCL cuyas propiedades térmicas son muy parecidas y se corrobora que lo que se obtuvo en la síntesis fue PCL de alto peso molecular. Vale la pena resaltar que la T_g no se observó porque el equipo donde se tomaron las muestras no registra temperaturas tan bajas como -60°C , de manera que los espectros fueron corridos a partir de cero grados. En este espectro, se aprecian tres temperaturas principales, la primera es la temperatura de cristalización T_c ; temperatura a la cual la fase cristalina del polímero se funde; la segunda es la temperatura de fusión T_m y tercera es la temperatura de degradación T_d , temperatura a la cual el material se degrada completamente. Se realizó la comparación de estas temperaturas y del comportamiento térmico de las $\text{PCL}_{(s)}$ y la $\text{PCL}_{(c)}$. Para este caso, la T_g reportadas en la literatura, como en el caso de Pack (2001) son de -12°C , temperatura la cual no fue posible de ser alcanzada por los equipos utilizados para realizar esta medición, por lo que esta temperatura no se registró para la presente investigación. Una evidencia de esta situación ocurrió en el trabajo de Ming Dong (2001), donde se realizaron pruebas de DSC de distintos materiales compuestos de PCL con PLGA y no se pudo reportar la T_g de la PCL pura, por ser demasiado baja, pero se reportaron T_g de los segmentos grandes de PCL/PLGA50 en 27°C . El espectro de DSC, muestra una T_m para la $\text{PCL}_{(s)}$ de 62°C , concordante con las reportadas por Lu (2006), que reportó una T_m para la PCL de 62.4°C . La $\text{PCL}_{(c)}$ tiene una T_m un poco más elevado de 65°C . Esto es atribuible a que ésta posee etilenglicol como plastificante, lo que hace que se incremente esta temperatura. Esta temperatura nos afirma que la $\text{PCL}_{(s)}$ y $\text{PCL}_{(c)}$ pueden ser utilizadas en aplicaciones biológicas ya que presentan una estabilidad en sus propiedades térmicas a una temperatura corporal de 37°C .

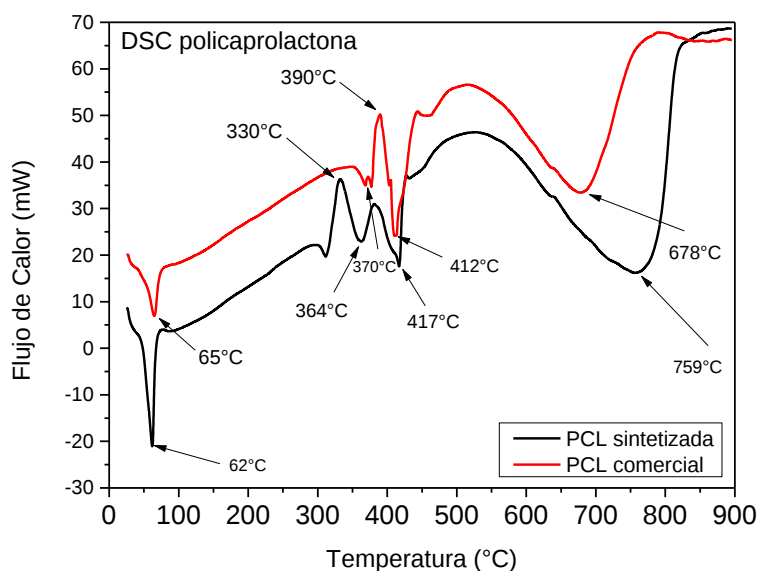


Figura 9.10. Análisis de las temperaturas de fusión, cristalización, y descomposición de la PCL_(s) y PCL_(c)

Continuando con el análisis, se observan dos picos endotérmicos atribuibles a T_c a 364 °C y 417°C, respectivamente. Estos picos endotérmicos se deben a la parte cristalina y amorfa de la PCL_(s), mientras que para la PCL_(c) se observan dos picos endotérmicos atribuibles a T_c a 370°C y a 412°C de la parte cristalina y amorfa de la PCL. Vale la pena resaltar, que la parte cristalina es aquella que les confiere las propiedades térmicas y mecánicas a los polímeros, y lo que se requiere obtener es una PCL altamente cristalina. Por lo anterior, no se usó DSC para calcular la cristalinidad porque se empleó una técnica mucho más precisa que son los XRD. Finalmente, para la PCL_(s), se observa un pico 759°C correspondiente a la T_d y para la PCL_(c) se observa un pico a 678°C correspondiente a la T_d .

9.2.4. Espectros de TGA de la comparación entre la PCL_(s) y la PCL_(c)

Se observaron mediante TGA, las propiedades de pérdida de peso molecular con respecto a la temperatura de las dos PCL, encontrándose un comportamiento en porcentaje de pérdida de peso muy similar entre ambas.

La TGA mide el porcentaje de pérdida de peso con respecto a la temperatura. Los análisis de los espectros TGA de la Figura 9.11, muestran que la PCL_(s) empieza a perder peso a 306°C, donde tiene un 96% del peso inicial. A temperaturas superiores el polímero pierde la gran mayoría de su peso hasta los 430°C, donde queda un 1.22% de su peso original. Esto quiere decir que la PCL_(s) no perderá mucho peso molecular a temperaturas inferiores a la reportada inicialmente, lo que la hace apta para este tipo de aplicaciones cardiacas. Por otra parte, la PCL_(c) empieza a perder peso a una temperatura un poco más elevada con respecto a la PCL_(s), pues a 370°C todavía conserva un 96% de su peso inicial. A partir de esta temperatura, el polímero pierde la mayor parte de su peso hasta llegar a 451°C donde solo queda el 1% de su peso original. Guarino (2017) reportó unas temperaturas de degradación un poco más elevadas, por encima de los 400°C y llegando hasta una degradación de aproximadamente en un 99% de su peso inicial a una temperatura cercana a los 500°C. Sin embargo, Wang (2013) reporta una temperatura de pérdida de peso de la PCL de 330.89°C, temperatura muy cercana a la reportada en este trabajo, lo que comprueba que tanto la PCL_(s) como la PCL_(c) poseen las propiedades térmicas adecuadas para ser utilizados como andamios para regeneración de tejido cardiaco.

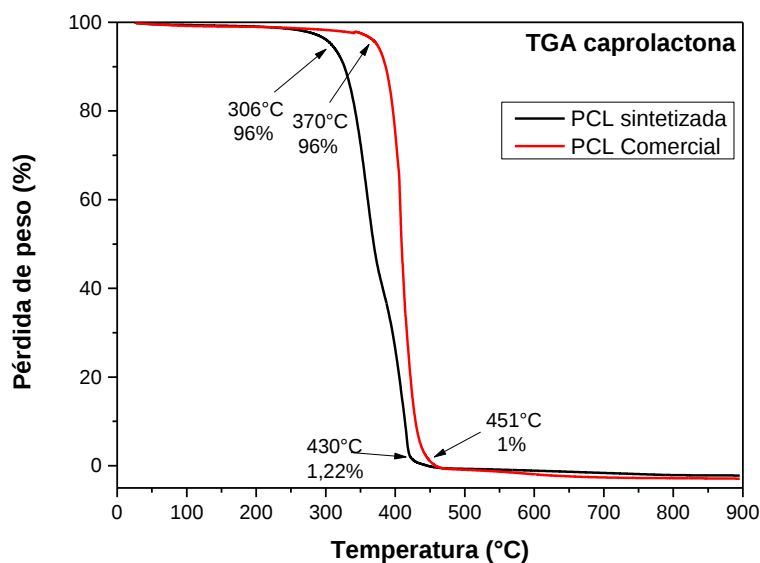


Figura 9.11. Espectros de TGA de la PCL_(s) y PCL_(c)

Con estas caracterizaciones, se comprobó la realización de la síntesis de PCL por ROP y que esta PCL_(s) posee propiedades muy similares a la PCL_(c). Por lo cual mediante espectrometría de masas se determinó el peso molecular de PCL_(s) y la PCL_(c).

9.3. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE MASAS.

9.3.1. Espectros de masas de la PCL_(s) y la PCL_(c)

La espectroscopia de masas tiene como función principal separar fragmentos de las moléculas en relación masa/carga, por lo que se puede saber con gran precisión su peso molecular. Se realizó espectrometría de masas a la PCL_(s) para encontrar su relación carga/masa.

El espectro de masas de PCL_(s) mostrado en la figura 9.12, nos arroja una señal en 480 masa/carga y un pico base de 115. De ahí que la PCL_(s) posee un peso molecular cercano a los 480 g/mol.

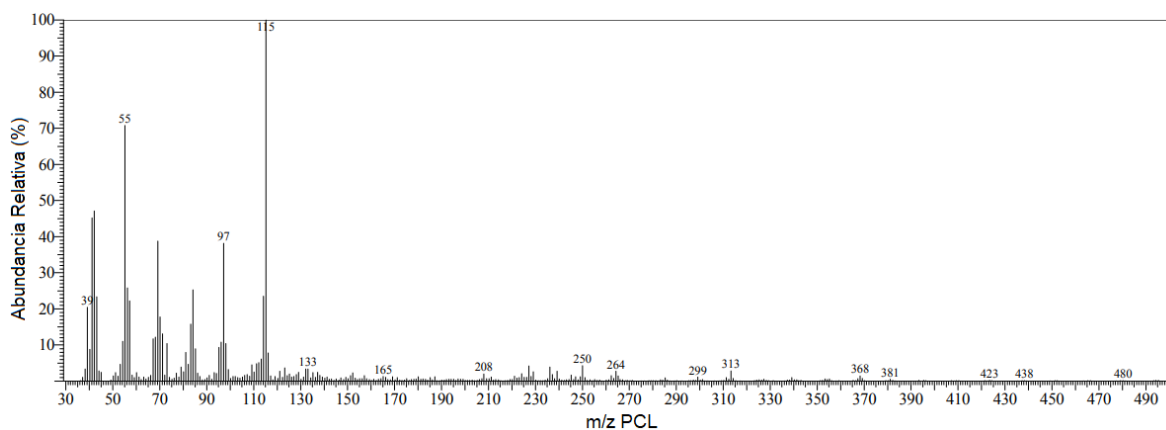


Figura 9.12. Espectro de masas de la PCL_(s) registrando un pico base de 115m/z y un ion molecular de 480 m/z

También se le realizó el espectro de masas a la PCL_(c) para comparar con el espectro de masas de la PCL_(s). Este espectro registrado en la figura 9.13 para la PCL_(c) arrojó una señal en 663 masa/carga y un pico base de 57. De ahí que la PCL_(c) posee un peso molecular cercano a los 663 g/mol.

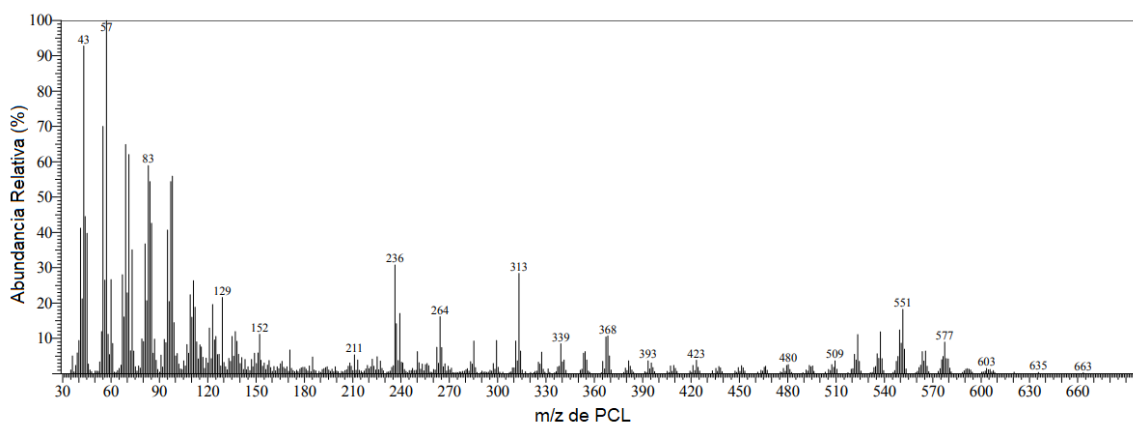


Figura 9.13. Espectro de masas de la PCL_(c) registrando un pico base de 57m/z y un ion molecular de 668 m/z

Realizando la comparación entre la $PCL_{(s)}$ y la $PCL_{(c)}$ se encontró que la $PCL_{(c)}$ posee un peso molecular más elevado. No obstante, dado que la $PCL_{(s)}$ también tiene un peso molecular elevado, esta propiedad la hace apta para ser utilizada en múltiples campos de la química, la ingeniería y la medicina.

Las muestras de PCL fueron ionizadas, y los iones formados fueron analizados en detalle (Figuras 9.12 y 9.13). Este método se considera irreversible porque, una vez formados estos iones, no es posible que sus molecular vuelvan a su estado original. En este sentido, esta técnica se considera destructiva (Zuluaga, 2000). La espectroscopia de masas, entre muchas otras ventajas, se resalta aquella que tiene ver con la dilucidación de la estructura química y la determinación del peso molecular estimado de una molécula (Zuluaga, 2000); para el caso de este trabajo sería de determinación del peso molecular de las $PCL_{(s)}$ y la $PCL_{(c)}$.

El espectro de masas de la $PCL_{(s)}$ (Figura 9.12) muestra un ion molecular en 480 m/z. El ion molecular (M^+) presenta la misma masa de la molécula neutra y es de vital importancia porque es el ion más completo de la molécula ya que únicamente sufre una sola fragmentación. Esto quiere decir que este M^+ representa el peso molecular de la $PCL_{(s)}$. La $PCL_{(s)}$ posee un peso molecular de 480 g/mol. Otro aspecto muy importante para analizar es el pico base. Este pico es la fragmentación molecular de mayor proporción, para el caso de la $PCL_{(s)}$ es de 151 g/mol, y su importancia radica en que, gracias a este pico, es posible determinar qué fragmentos la $PCL_{(s)}$ se van a ir degradando cuando la PCL esté implantada en el sitio de la lesión que se quiere reparar.

El espectro de masas de la $PCL_{(c)}$ (Figura 9.13), reporta un M^+ 663 m/z, por lo que su peso molecular es 663 g/mol y su pico base es de 57 g/mol. Realizando la comparación entre ambos pesos moleculares, se puede decir que la $PCL_{(c)}$ posee un peso molecular más alto que la $PCL_{(s)}$. No obstante, es importante resaltar que la $PCL_{(s)}$ tuvo un tiempo de polimerización de 48 h. Probablemente si se hubiese dejado más tiempo de polimerización, por ejemplo, de aproximadamente 72 o 96 h,

su peso molecular hubiese sido similar al de la PCL_(c). Por esta razón es que se pudo comprobar que la PCL que se sintetizó en el laboratorio es de alto peso molecular y puede ser utilizada en las aplicaciones objeto de este estudio. Otro aspecto para resaltar es que la PCL_(c) posee un pico base muy inferior al pico base de la PCL_(s), por lo que al degradarse en el organismo va a generar fragmentos mucho más pequeños y por ende un menor tiempo de anclaje celular.

Se comprobó mediante todos estos métodos de caracterización que la PCL sintetizada posee propiedades similares a la PCL comercial, lo que la hace óptima para que pueda ser funcionalizada con MWCNT

9.4. FUNCIONALIZACIÓN DE PCL_(s) Y PCL_(c) CON MWCNT (ADICIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO A LA MATRIZ DE CAPROLACTONA)

La funcionalización de la PCL con los MWCNT se llevó a cabo utilizando la PCL_(s) y la PCL_(c). Aplicando la metodología descrita en la sección 8, se elaboraron tres andamios porosos de cada uno de los porcentajes (1%, 3% y 5%) con la PCL_(s) (Figura 9.14).

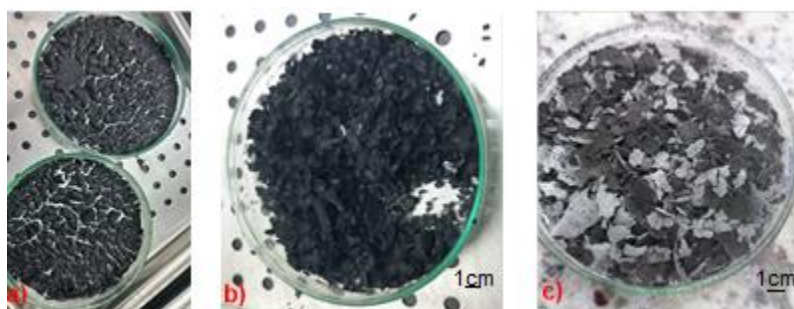


Figura 9.14. Resultado obtenido del acoplamiento de la PCL_(s) con los MWCNT: a) PCL_(s)/MWCNT 1% b) PCL_(s)/MWCNT 3% y PCL_(s)/MWCNT 5%.

Esta funcionalización no generó los andamios de membrana, debido a que la PCL, al ser sintetizada en el laboratorio, no posee los plastificantes requeridos para la formación de estos andamios. Se obtuvo un sólido negro (Figura 9.14) que puede

ser utilizado para síntesis química en trabajos de grado posteriores. Este sólido obtenido de $PCL_{(s)}/MWCNT$ puede ser peletizado, extruido y ser llevado a una impresora 3D para que puedan ser fabricados andamios por esa técnica.

Por lo anterior, se recurrió a la fabricación de andamios de $PCL_{(c)}/MWCNT$ al 1%, 3% y 5%. Como resultado del acoplamiento se obtuvieron andamios porosos de $PCL_{(c)}/MWCNT$ (Figura 9.15). Este proceso se refinó varias veces hasta obtener andamios de mejor calidad, los cuales fueron utilizados para realizar esta investigación.

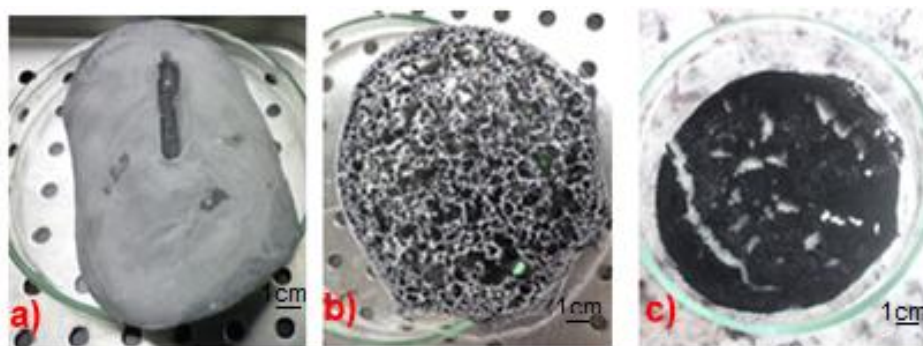


Figura 9.15. Andamios obtenidos del acoplamiento de la $PCL_{(c)}$ con los MWCNT:
a) $PCL_{(c)}/MWCNT$ 1% b) $PCL_{(c)}/MWCNT$ 3% y c) $PCL_{(c)}/MWCNT$ 5%

El acoplamiento de los MWCNT con la $PCL_{(c)}$ sí generó andamios en forma de membranas (Figura 9.15). Esto se debe a que la $PCL_{(c)}$ posee plastificantes (generalmente PEG) que hacen que se produzca la formación de estos andamios en forma de membrana. Un aspecto importante es que, a medida que se fue incrementando la cantidad de MWCNT a la $PCL_{(c)}$, se generaron andamios mucho más porosos. Esto se debe a que los MWCNT generan aglomerados que permiten la formación de esos poros.

A pesar de que no se obtuvieron andamios con la $PCL_{(s)}$ se realizó la verificación para determinar si el acoplamiento de la $PCL_{(s)}$ y la $PCL_{(c)}$ se establece químicamente (de manera que potencia la interacción fibra/matriz) o físicamente, donde únicamente los MWCNT están adheridos en la superficie de la PCL sin

ningún tipo de enlace, lo que hace una débil interacción entre las partes y por ende los andamios terminan teniendo bajas propiedades mecánicas. Se procedió a verificar, mediante espectroscopia RAMAN si hubo acoplamiento químico entre la PCL/MWCNT tanto para la PCL_(s) como para la PCL_(c).

9.5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL, TÉRMICAS, MECÁNICAS Y SUPERFICIALES DE LOS ANDAMIOS DE PCL/MWCNT

9.5.1. Verificación del Acoplamiento Químico entre la PCL_(s)/MWCNT y PCL_(c)/MWCNT mediante ROP por RAMAN

Una vez se funcionalizaron los MWCNT con la PCL_(s) y la PCL_(c), se debió comprobar si este acoplamiento se realizó: (1) de forma física donde la interacción fibra-matriz no era buena (llámese fibra a los MWCNT y matriz a la PCL) y por consiguiente sus propiedades térmicas y mecánicas no serían las mejores, o por el contrario, (2) si este acoplamiento se realizó de forma química donde habría formación de enlaces químicos entre ellos y su interacción fibra matriz sería fuerte y se obtendrían propiedades térmicas y mecánicas óptimas. Antes de realizar esta comprobación fue necesario realizar el espectro RAMAN de los MWCNT puros para conocer sus bandas principales y así poder determinar si hubo dicho acoplamiento físico o químico. Dicho lo anterior, el espectro RAMAN de los MWCNT (Figura 16) muestra que hay tres bandas principales: la banda G, la banda D y la banda 2D. La banda G está presente a 1586 cm^{-1} , y representa el movimiento de flexión en el plano del nanotubo de los átomos de carbono con hibridación sp^2 . Los MWCNT reportados en esta investigación son altamente cristalinos, debido a que esta banda G es muy nítida y altamente definida. La banda D en los MWCNT aparece en 1347 cm^{-1} y representa la medida del desorden dentro de los MWCNT y del movimiento de Tracción de las fuerzas de Van der Waals (respiración del anillo) de los carbonos con hibridación sp^2 . Se encontró que estas bandas son bastantes parecidas a las reportadas por Zeng (2006) en 1322.2 cm^{-1} para la banda D y 1574 cm^{-1} para la banda G de un material compuesto de PCL/MWCNT prístinos. Kong (2012), reportó

la banda G a 1550 cm^{-1} en nanotubos de carbono. Por su parte, Flores-Cedillo (2015) reportó las bandas D en 1610 cm^{-1} y la banda G de los MWCNT en 1590 cm^{-1} .¹ Todas las bandas reportadas anteriormente, concuerdan con las reportadas en esta tesis.

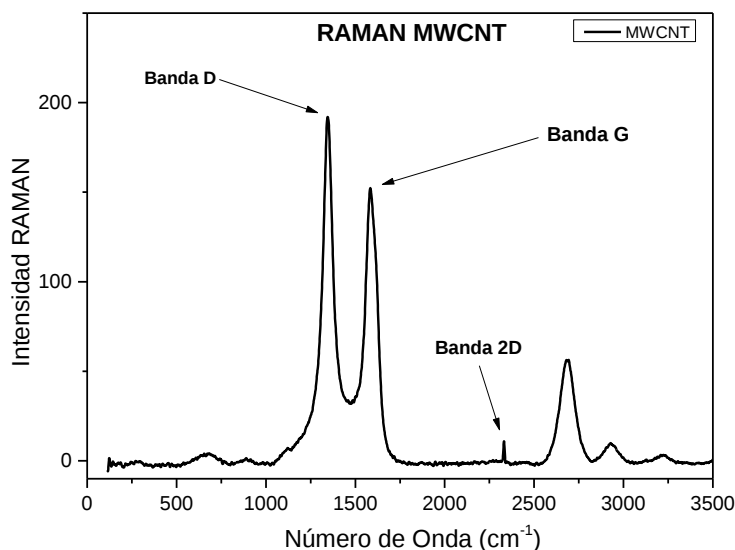


Figura 9.16. Espectro RAMAN de MWCNT mostrando la banda D, la banda G y la banda 2D.

El valor de la banda 2D es de 2410 cm^{-1} . Esta banda tiene importancia porque provee información sobre el grosor de las capas de grafeno que conforman los nanotubos de carbono.

Una vez analizado el espectro RAMAN de los MWCNT, se realizó la verificación del acoplamiento químico de los MWCNT a la $\text{PCL}_{(s)}$ y a la $\text{PCL}_{(c)}$ mediante RAMAN (Figura 9.17 y Figura 9.18) donde se aprecia que a medida que se va aumentando la cantidad de MWCNT en los andamios, las bandas de la $\text{PCL}_{(c)}$ y $\text{PCL}_{(s)}$ van disminuyendo de intensidad. El espectro RAMAN de los andamios de $\text{PCL}_{(c)}/\text{MWCNT}$ 1% y $\text{PCL}_{(s)}/\text{MWCNT}$ 5% muestran una banda en 1744 cm^{-1} y 1748 cm^{-1} , respectivamente de vibración de elongación simétrica característica del grupo C=O de la $\text{PCL}_{(c)}$ y $\text{PCL}_{(s)}$. Además, a 1639 cm^{-1} se observa una banda de vibración

de elongación atribuida al acoplamiento químico del grupo C=O de la PCL_(c) y PCL_(s) con el grupo amino (-NH₂) de los MWCNT. La banda G de los MWCNT se observa a 1531 cm⁻¹ sufriendo un corrimiento hacia campo bajo de 55 cm⁻¹ con respecto a la banda G de los MWCNT puros. La banda D de este andamio se solapa con la banda de la PCL_(c) y PCL_(s) registrada a 1357 cm⁻¹ atribuibles a la vibración de deformación asimétrica de los grupos -C-H de la molécula de PCL_(c) y PCL_(s) y de los MWCNT. Este corrimiento de las bandas D y G de los MWCNT, producto del enlace con el material compuesto, fue reportado por Zeng (2006) que registró un corrimiento de bandas de 11 cm⁻¹ del material compuesto con respecto a los MWCNT originales.

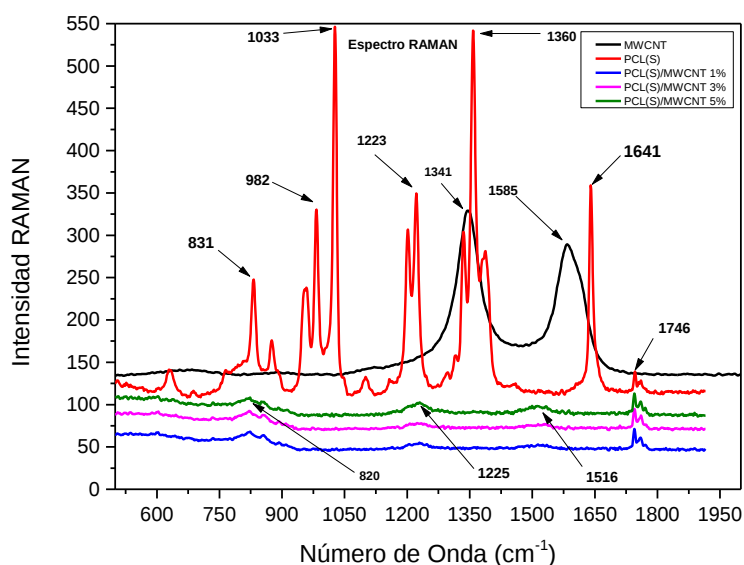


Figura 9.17. Comprobación mediante espectrometría RAMAN que el acoplamiento entre la PCL_(s) y los MWCNT se llevó a cabo químicamente.

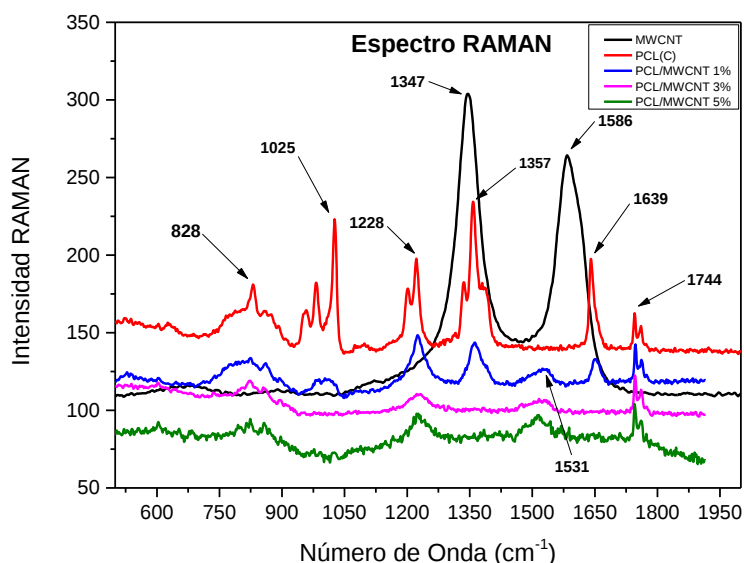


Figura 9.18. Comprobación mediante espectrometría RAMAN que el acoplamiento entre PCL_(c) y MWCNT se realizó químicamente para la fabricación de los andamios PCL_(c)/MWCNT en todos sus porcentajes

En los andamios de PCL_(c)/MWCNT 1%, PCL_(c)/MWCNT 3% y PCL_(c)/MWCNT 5% se conserva la banda en 1744 cm⁻¹, pero ya no aparece la banda en 1639 cm⁻¹, registrando las bandas D y G de los MWCNT corridas hacia campo bajo con mayor intensidad. De acuerdo con lo anterior, se pudo comprobar mediante RAMAN que el acoplamiento entre los MWCNT y PCL_(c), PCL_(s) se realizó de manera química. Además, se comprobó que, a medida que se aumenta la cantidad de MWCNT en los andamios, éstos ejercen una mayor influencia en su estructura.

Una vez realizada la verificación del acoplamiento químico entre los dos materiales utilizados para fabricar el andamio, se realizaron pruebas térmicas de DSC y TGA de los andamios de PCL_(s)/MWCNT y PCL_(c)/MWCNT con el fin de comprobar si estas propiedades térmicas fueron potenciadas por la adición de los MWCNT

9.5.2. Espectro de DSC de la comparación Térmica entre la PCL_(s) y el sólido fabricado de PCL_(s)/MWCNT

Se realizó una comparación entre el DSC de la PCL_(s) con respecto al sólido fabricado de PCL_(s)/MWCNT, con el fin de comparar si la temperatura de fusión T_m sufre algún tipo de cambio y si esto lo afecta positiva o negativamente. Este espectro de DSC (Figura 9.19) mostró que la PCL_(s) tiene una T_m de 61°C y a medida que se va incrementando la cantidad de MWCNT esta temperatura sufre algunos cambios que se expondrán a continuación. La T_m del sólido de PCL_(s)/MWCNT 1% es de 57°C, comparada con la T_m de la PCL_(s) presenta una disminución de 4°C, influenciados por los MWCNT que hacen que esta temperatura disminuya. La T_m del sólido de PCL_(s)/MWCNT 3% fue de 55 °C, presentando una mayor disminución producto del incremento de los nanotubos de carbono en el andamio. La T_m del andamio de PCL_(s)/MWCNT 5% fue de 53 °C, confirmando que a medida que se incrementa la cantidad de MWCNT en los andamios su T_m disminuye. No hay un artículo para referenciar comparativamente estos resultados porque todos se han realizado con PCL comercial. Se puede observar la misma tendencia de disminución de T_c , tanto para la parte cristalina como para la parte amorfa; y esta misma tendencia ocurre con la T_d para todos los porcentajes de los sólidos fabricados de PCL_(s)/MWCNT. Lo anterior quiere decir que los nanotubos de carbono bajan las temperaturas globales de los andamios. Sin embargo, no influyen en el comportamiento térmico de los andamios, por lo que los sólidos fabricados de PCL_(s)/MWCNT conservan las propiedades térmicas iniciales, haciéndolos muy estables para trabajar a temperaturas de 37°C necesarias para aplicaciones cardiacas.

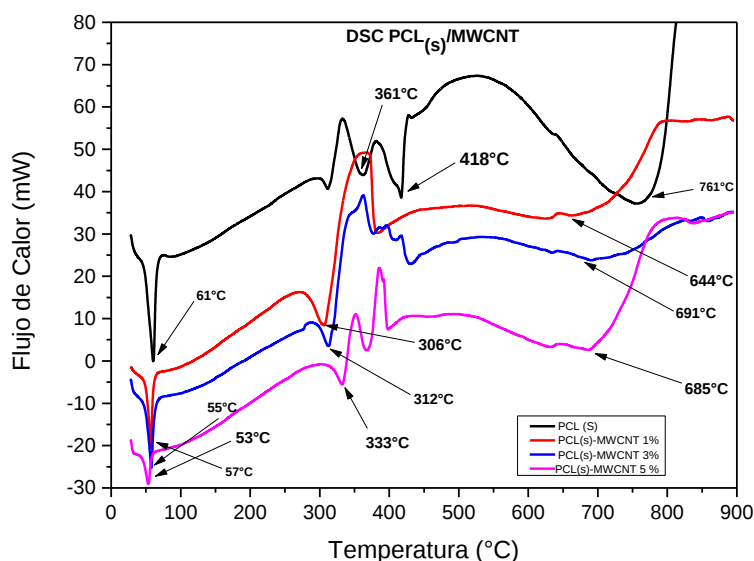


Figura 9.19. Comparación de las temperaturas de fusión, cristalización y degradación entre la PCL_(s) y el sólido fabricado de PCL_(s)/MWCNT.

9.5.3. Espectro de DSC de la comparación Térmica entre la PCL_(c) y los andamios fabricados de PCL_(c)/MWCNT

También se realizó la comparación entre el DSC de la PCL_(c) con respecto al PCL_(c)/MWCNT (Figura 9.20). Este espectro de DSC mostró que la PCL_(c) tiene una T_m de 64°C, comparando con los andamios de PCL_(c)/MWCNT 1%, se encuentra que poseen la misma T_m , por lo que los MWCNT no ejercieron ningún efecto de alteración. Este resultado es corroborado por Jecg Chin (2015), que reportó una T_m para la PCL de 62°C y no reportó cambios de T_m para sus andamios de PCL/MWCNT 0.05%, PCL/MWCNT 0.1%, PCL/MWCNT 0.3%, PCL/MWCNT 0.5% y PCL/MWCNT 1%, sino hasta sus andamios de PCL/MWCNT 3%, en donde registró una T_m superior de 63°C. Los andamios de PCL_(c)/MWCNT 3% registraron una T_m de 62°C, menor que la de los andamios de PCL_(c)/MWCNT 1%, consistente con lo reportado en esta tesis con los andamios de PCL_(s), pero contradictorio con lo reportado por Jecg Chin (2015). Para los andamios de PCL_(c)/MWCNT 5% de esta tesis, se registra una T_m de 61°C, mucho menor que la PCL_(c), con 3°C de diferencia,

pero esta T_m coincide exactamente con la reportada por Jecg Chin (2015) de 61°C . Con respecto a las T_c de la parte cristalina y amorfa, estas aumentan su temperatura en los andamios de $\text{PCL}_{(c)}/\text{MWCNT}$ 3% y $\text{PCL}_{(c)}/\text{MWCNT}$ 5%, debido a la influencia del plastificante y a la interacción con los MWCNT, lo mismo ocurre para la T_d .

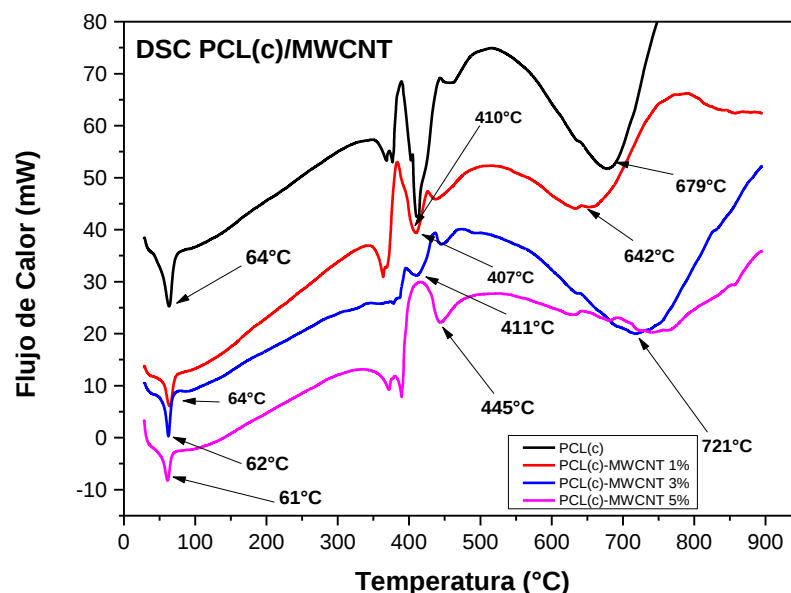


Figura 9.20. Comparación de las temperaturas de fusión, cristalización y degradación entre la $\text{PCL}_{(c)}$ y los andamios de $\text{PCL}_{(c)}/\text{MWCNT}$.

Finalmente, vale la pena resaltar que estos andamios de $\text{PCL}_{(c)}/\text{MWCNT}$ y los sólidos fabricados de $\text{PCL}_{(s)}/\text{MWCNT}$ tienen propiedades térmicas de polímeros semicristalinos, que es lo que se busca para este tipo de aplicaciones cardiacas.

9.5.4. Espectros de TGA de la comparación entre la $\text{PCL}_{(s)}$ y los Sólidos de $\text{PCL}_{(s)}/\text{MWCNT}$ y los andamios de $\text{PCL}_{(c)}$ y $\text{PCL}_{(c)}/\text{MWCNT}$

Una vez comprobada la estabilidad térmica de los andamios fabricados, se procedió a verificar su pérdida de peso molecular con respecto a la temperatura. El espectro de TGA para la comparación de los sólidos de $\text{PCL}_{(s)}/\text{MWCNT}$ (Figura 9.21) muestra que la pérdida de peso de los sólidos de $\text{PCL}_{(s)}/\text{MWCNT}$ 1% y de la $\text{PCL}_{(s)}$ son muy

parecidos, del orden del 4 %, donde la mayor pérdida de peso está en el rango de los 320°C hasta los 480°C en donde se registra una pérdida de un 99%. Este rango de temperatura está ligeramente por debajo del rango registrado de la PCL_(s) pura. Esta tendencia a la baja se aprecia también en los sólidos de PCL_(s)/MWCNT 3% y de PCL_(s)/MWCNT 5%. Vale la pena resaltar, que estos andamios son los que registran una menor temperatura de pérdida de peso a los 327°C en comparación con respecto a los otros sólidos.

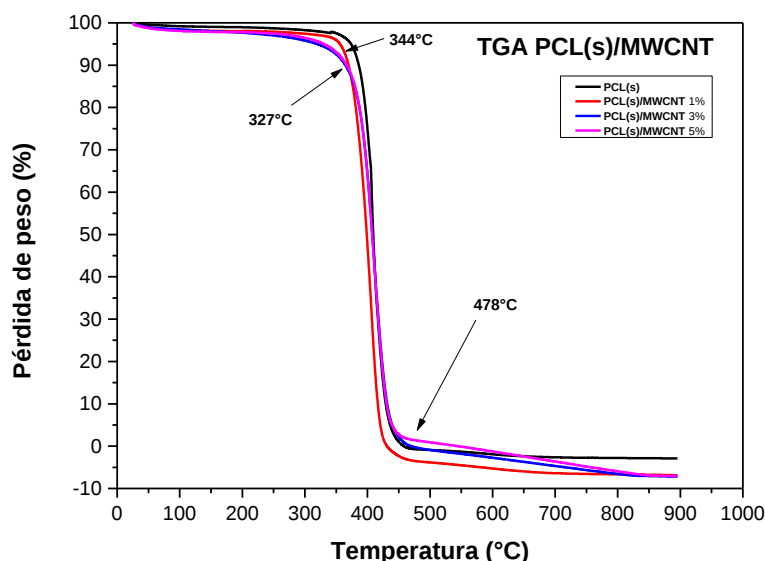


Figura 9.21. Comparación entre los espectros de TGA de la PCL_(s) con respecto a los sólidos de PCL_(s)/MWCNT.

A medida que se va incrementando el porcentaje de MWCNT en los sólidos de PCL_(s)/MWCNT su temperatura de degradación disminuye (Figura 9.22). Esto es debido a que los MWCNT le confieren al material compuesto una mayor rigidez que causa el descenso de esta temperatura de degradación. Esta disminución de temperatura no es tan marcada en los sólidos fabricados de PCL_(s)/MWCNT al 3% y 5%, por lo que la adición de los MWCNT a la PCL_(s) no tiene incidencia en la estabilidad térmica.

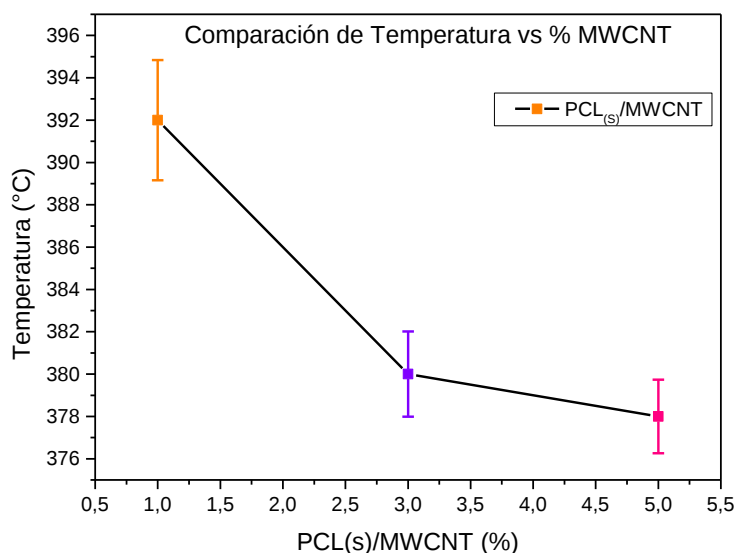


Figura 9.22. Comparación entre el descenso de la temperatura de degradación con respecto al incremento de los MWCNT en los sólidos fabricados de PCL_(s)/MWCNT.

Con respecto a los andamios de PCL_(c)/MWCNT (Figura 9.23) estos pierden peso a temperaturas muy similares en todos sus porcentajes, que van desde 377°C (pérdida de peso 4%) hasta una temperatura de 450°C (pérdida de peso del 99%). Estas temperaturas son muy parecidas a las reportadas por George (2019) que, para su andamio de PCL/MWCNT 1%, registró una temperatura inicial de degradación de 338°C hasta una temperatura final de 412°C con una pérdida de peso del 75%.

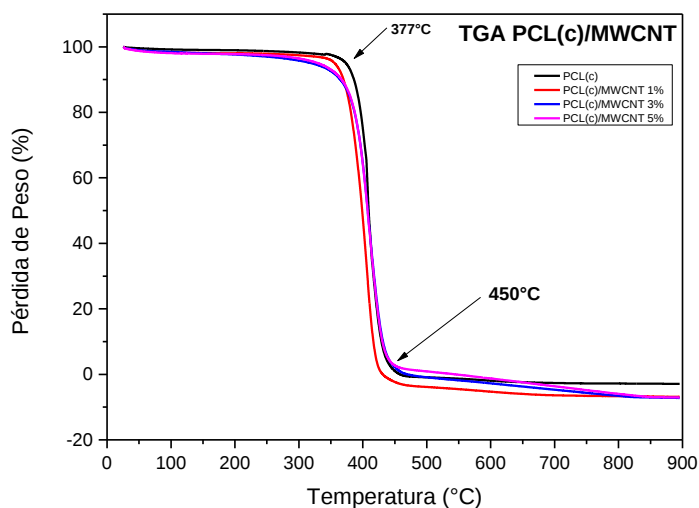


Figura 9.23. Comparación entre los espectros de TGA de la PCL_(c) con respecto a los andamios de PCL_(c)/MWCNT.

Esta pérdida de peso molecular tan parecida en todos los andamios de PCL_(c)/MWCNT con respecto a la PCL_(c) indica que la adición de los MWCNT a los andamios no tiene incidencia en la estabilidad térmica de la PCL_(c) (George, 2019; Jecg Chin, 2015) (Figura 9.24).

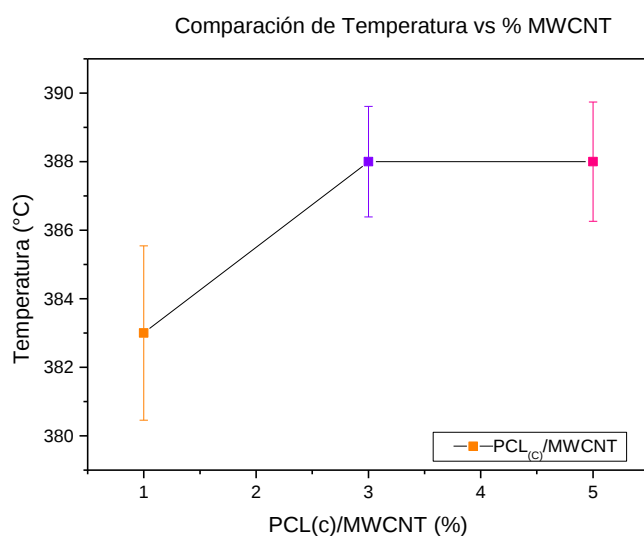


Figura 9.24. Comparación entre el descenso de la temperatura de degradación con respecto al incremento de los WMCNT en los andamios de PCL_(c)/MWCNT.

Lo anterior permite aseverar que los andamios son adecuados para este tipo de aplicaciones cardiacas ya que permiten mantener estabilidad térmica una vez implantados en el miocardio.

9.5.5. Análisis estadístico de TGA obtenidos para los andamios de PCL/MWCNT

En la tabla 9.1 se presentan los resultados del análisis de varianza para el modelo GAMM ajustado, donde se sugiere mediante los términos suavizados que los espectros de TGA cambian en función de la Temperatura (Términos suavizados: valor-p < 0.05).

Tabla 9.1. Análisis de varianza del Espectro TGA según PCL_(c) con MWCNT y Temperatura.

Términos	Estadístico F	Valor-p	Resultado
Paramétricos:			
Tratamiento	13078	<2.0E-16	Significante
PCL	3128	<2.0E-16	Significante
Tratamiento:PCL	9994	<2.0E-16	Significante
Suavizados:			
s(Temperatura): 1% - Comercial	100403	<2.0E-16	Significante
s(Temperatura): 3% - Comercial	86108	<2.0E-16	Significante
s(Temperatura): 5% - Comercial	75591	<2.0E-16	Significante
s(Temperatura): PCL Comercial	55868	<2.0E-16	Significante

s(Temperatura): 1% - Sintética	62605	<2.0E-16	Significante
s(Temperatura): 3% - Sintética	42235	<2.0E-16	Significante
s(Temperatura): 5% - Sintética	76301	<2.0E-16	Significante
s(Temperatura): PCL Sintética	49303	<2.0E-16	Significante

Los términos paramétricos del modelo GAMM ajustado de la Tabla 9.1 sugieren un efecto significativo de interacción entre el tipo de PCL y el porcentaje de MWCNT (Valor- $p < 0.05$), indicando que el espectro TGA presenta un comportamiento que depende conjuntamente de ambos factores. Las pruebas de contrastes múltiples (Tabla 9.2) indican que hay diferencias significativas entre todas las condiciones experimentales evaluadas (entre $PCL_{(c)}$ y $PCL_{(c)}/MWCNT$, entre $PCL_{(s)}$ y $PCL_{(s)}/MWCNT$, y entre $PCL_{(c)}$ y $PCL_{(s)}$ para cada porcentaje de MWCNT)

Tabla 9.2. Prueba de contrastes múltiples entre PCL y MWCNT con valores- p ajustados por el método de Bonferroni para los espectros TGA.

Factor		Media	Desviación	Agrupación*
Comercial	MWCNT 1%	39.07	49.98	a
	MWCNT 3%	40.67	48.77	b
	MWCNT 5%	41.25	48.35	c
	PCL(c)	42.67	49.00	d
Sintética	MWCNT 1%	33.26	46.95	a
	MWCNT 3%	38.83	45.58	b
	MWCNT 5%	33.46	45.95	c

	PCL(s)	38.81	46.89	d
MWCNT 1%	PCL(c)	39.07	49.98	a
	PCL(s)	33.26	46.95	b
MWCNT 3%	PCL(c)	40.67	48.77	a
	PCL(s)	38.83	45.58	b
MWCNT 5%	PCL(c)	41.25	48.35	a
	PCL(s)	33.46	45.95	b
PCL	Comercial	42.67	49.00	a
	Sintética	38.81	46.89	b

Vale la pena resaltar que al NO OBTENERSE ANDAMIOS con la PCL_(s) la tesis se llevó a cabo con los andamios de PCL_(c)/MWCNT.

9.6. CONSTRUCCIÓN DE LOS ANDAMIOS DE PCL_(c)/MWCNT

La parte metodológica de la construcción de los andamios de PCL_(c)/MWCNT se expuso en la sesión 8.2. Vale la pena resaltar en este apartado que una vez acoplada la PCL_(c) con los MWCNT este material compuesto se puso en caja Petri (Figura 9.25) para posteriormente ser secada en campana de flujo laminar y así obtener los andamios; esto se realizó para todos los porcentajes de PCL_(c)/MWCNT.

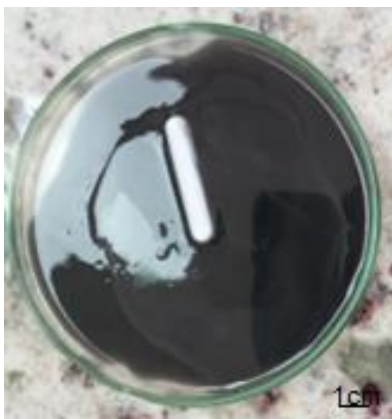


Figura 9.25. Material compuesto de $PCL_{(C)}/MWCNT$ antes de ser llevado a campana de flujo laminar para ser secado y obtener los andamios de $PCL_{(C)}/MWCNT$.

9.7. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA INTERNA DE LOS ANDAMIOS DE $PCL_{(C)}/MWCNT$ MEDIANTE RAYOS XRD

Una vez fabricados los andamios de $PCL_{(C)}/MWCNT$ se pretendió determinar su estructura interna por medio de la técnica de XRD. Con la estructura interna se determina la fase cristalina en el estado sólido de la $PCL_{(C)}$ y de los $PCL_{(C)}/MWCNT$ (1%, 3% y 5%) (Figura 9.26). Por lo anterior, se realizaron ensayos de difracción de rayos x para la $PCL_{(C)}$ y para los andamios de $PCL_{(C)}/MWCNT$ 1%, $PCL_{(C)}/MWCNT$ 3% y $PCL_{(C)}/MWCNT$ 5%,

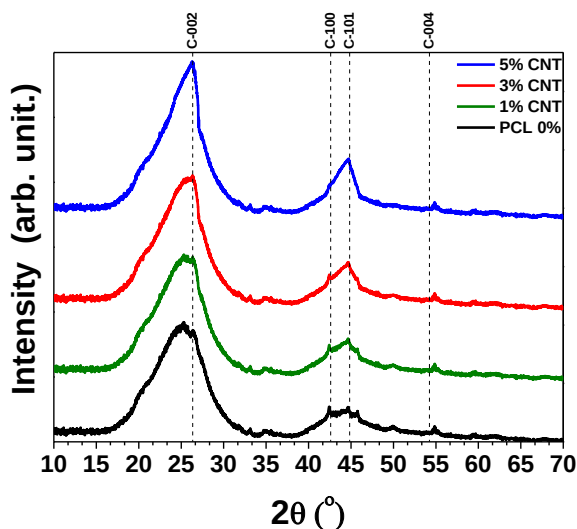


Figura 9.26. Determinación de la estructura interna de los andamios de PCL_(C)/MWCNT mediante XRD.

Esto permitió determinar el sistema cristalino al que pertenecen los andamios, así como los parámetros de celda (unidad de celda con que se organiza un cristal). La figura 9.26 muestra los difractogramas de rayos x, en los cuales se pueden observar los picos típicos de difracción de la PCL a 19.6, 23.76 y 36.32, esto evidencia la naturaleza semicristalina de estos andamios de PCL_(C)/MWCNT. Adicionalmente se observan las reflexiones a 26.6 y 43.5 asociadas a los planos (002) y (100) de los MWCNT, respectivamente.

La geometría de los máximos de difracción permite determinar la estructura de los cristales de los andamios de PCL_(C)/MWCNT (Figura 9.27).

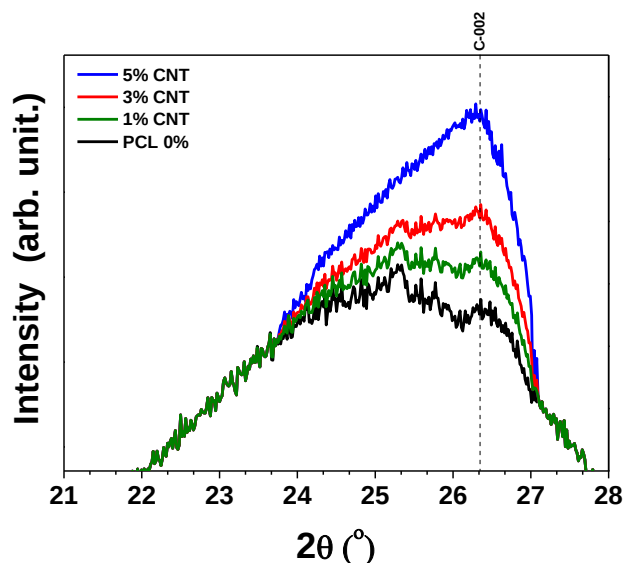


Figura 9.27. Geometría de los máximos de difracción que permiten determinar la estructura de los cristales de los andamios de PCL_(C)/MWCNT.

En la figura 9.27 se puede observar un aumento en la intensidad del pico asociado al plano (002) de los MWCNT, en la medida en que se usaron mayores concentraciones de MWCNT, siendo la concentración de 5% donde se presentó mayor intensidad en el pico. Vale la pena resaltar que los difractogramas muestran la naturaleza semicristalina de la PCL, pero se notaron ciertos cambios en los picos de difracción asociados al porcentaje de MWCNT usados, lo anterior concuerda con la investigación reportada por Hudecki, (2019), esta sinergia estructural puede ser evidencia de la efectiva interacción entre los WMCNT y PCL_(C), siendo el andamio de PCL_(C)/MWCNT 5% el más cristalino, lo cual se corrobora con imágenes de SEM.

Esta naturaleza semicristalina de los andamios de PCL_(C)/MWCNT encontrada mediante XRD se corroboró por DSC y TGA. Por lo que se procede a revisar su morfología superficial de poros.

9.8. DETERMINACIÓN DE LA POROSIDAD DE LOS ANDAMIOS DE PCL_(C)/MWCNT

9.8.1. Determinación de la Porosidad de los Andamios de PCL_(C)/MWCNT mediante Microscopía Óptica

La porosidad de los andamios de PCL_(C)/MWCNT se observó por medio de microscopía óptica. Se empezó determinando la porosidad de la PCL_(C) con el propósito de comparar la porosidad de ésta con la porosidad de los andamios de PCL_(C)/MWCNT (1%, 3%, 5%).

El andamio con PCL_(C) a simple vista no presentó poros, pero cuando se puso frente al microscopio óptico presentó un poro interconectado de diámetro de 1200.73 μm (Figura 9.28).

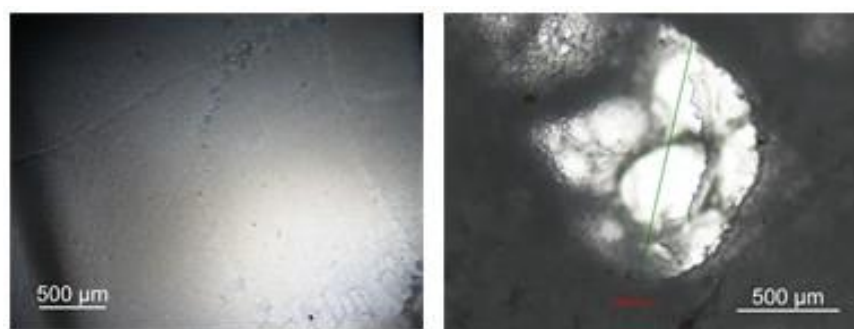


Figura 9.28. Porosidad del PCL_(C) observada por microscopio óptico con un aumento de (4-1.5X)

Se les realizó el mismo procedimiento a los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1%. Se observa un poro interconectado de diámetro 714.67 μm , apto para que las células puedan anclarse y empezar a realizar sus funciones específicas (Figura 9.29)

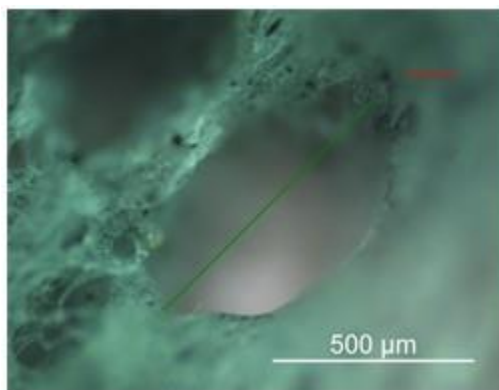


Figura 9.29. Porosidad del andamio de PCL_(M)/MWCNT 1%, observado por microscopio óptico con un aumento de (20-2X).

Se observa para el andamio de PCL_(M)/MWCNT 1% (Figura 9.29) un solo poro interconectado de 714.67 μm . Pese a que el tamaño de poro se redujo considerablemente en comparación al reportado por la PCL, es aún muy grande para estas células.

Al observar por el microscopio óptico al andamio de PCL_(M)/MWCNT (3%), éste presentó una mayor porosidad. Los poros que aquí se observaron fueron aquellos que presentaron interconectividad, sus diámetros fueron 153.74 μm (izquierda), 93.59 μm (derecha) y 550.26 μm (abajo). Se evidenció una heterogeneidad en el diámetro de los poros, en donde la mayoría de ellos, presentaban diámetros inferiores a los requeridos por las células para poderse anclar (Figura 9.30).

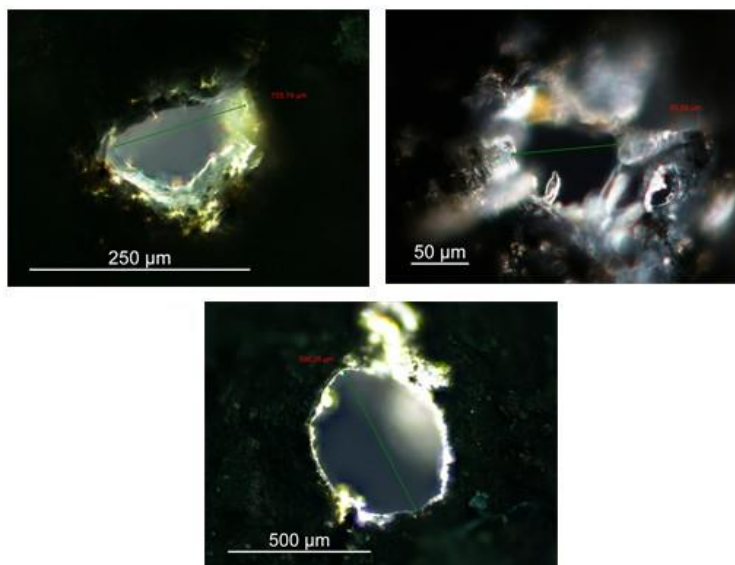


Figura 9.30. Porosidad del andamio de PCL_(C)/MWCNT 3%, observado por microscopio óptico con un aumento de (20-2X).

En el andamio de PCL_(C)/MWCNT 3% se encontraron varios poros (Figura 9.30) y se registraron aquellos poros interconectados. El primer poro interconectado de la foto superior izquierda, posee un tamaño de 153.74 μm, apto para el anclaje de CM, el segundo poro interconectado de la foto superior derecha, posee un tamaño de poro de 93.59 μm, apto también para en anclaje de CM. Finalmente, el tercer poro interconectado de la parte inferior, posee un tamaño de poro de 550.26 μm tamaño ideal para que los CM se anclen en las paredes del poro, se promueva el anclaje entre células y estas puedan ejercer sus funciones adecuadamente.

Con el andamio PCL_(C)/MWCNT 5% se evidenció una gran cantidad de poros interconectados (Figura 9.31). En la parte superior izquierda de la figura 9.31, se muestra un poro con diámetro de 568.62 μm, en la parte superior derecha se muestran tres poros con diámetros de 250.73 μm, 234.54 μm y 466.53 μm respectivamente. En el centro izquierda de la figura se muestra un poro de diámetro 345.88 μm; en el centro derecha de la figura se muestra un macro poro de 1922.78 μm; en la parte inferior izquierda se muestra un poro de diámetro de 534.84 μm y en la parte inferior derecha se muestra un poro de 677.07 μm. Estos poros están dentro del rango óptimo para el crecimiento y viabilidad celular.

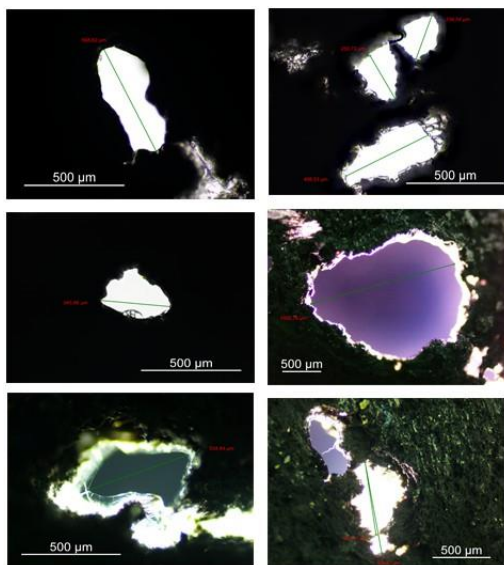


Figura 9.31. Porosidad del andamio de PCL_(C)/MWCNT 5%, observado por microscopio óptico con un aumento de (10X).

El andamio de PCL_(C)/MWCNT 5% (Figura 9.31) registró una porosidad bastante elevada, motivo por el cual se registraron únicamente seis poros interconectados. El primer poro de la parte superior izquierda posee un tamaño de 568.62 μm tamaño ideal para en anclaje celular debido a lo explicado anteriormente. Los poros de la parte superior derecha poseen tamaños de 250.73 μm , 234.54 μm y 466.53 μm respectivamente, todos adecuados para el anclaje de CM. El tercer poro de la mitad izquierda posee un tamaño de 345.88 μm , tamaño adecuado para anclaje CM. El cuarto poro del centro derecha, posee un tamaño de poro de 1922.78 μm . El quinto poro de la parte inferior izquierda posee un tamaño de poro de 534.84 μm , tamaño ideal para el anclaje de CM. El sexto poro de la parte inferior derecha posee un tamaño de 667.07 μm , tamaño ideal para el anclaje de CM.

Determinar la porosidad de los andamios de PCL_(C)/MWCNT es muy importante porque estos poros proporcionan una superficie y un volumen vacío que favorecen la entrada, proliferación y crecimiento de CM mediante un intercambio de fluidos, lo cual promueve la formación de nuevo tejido cardíaco (Matiolli-Belmonte, 2012). Por lo anterior, se aprovechó la capacidad de los MWCNT en formar aglomerados

generando poros de manera espontánea en los andamios. Se debe distinguir entre dos tipos de poros, uno es el que forma fases continuas con el medio poroso (poro interconectado o efectivo) y el otro consiste en la formación de fases discontinuas con el medio poroso (poro no interconectado). Este último tipo de poro no puede contribuir al transporte de nutrientes a través del medio poroso por medio de las células. Esto sólo lo realizan los poros interconectados; por tal motivo, se reportaron únicamente los poros interconectados de cada uno de los andamios de PCL_(C)/MWCNT.

Ahora bien, los CM poseen un tamaño dependiendo del sitio donde estén ubicados. Vu, (2014) en un capítulo de su libro titulado “Biomaterials and cells for cardiac tissue engineering” establece que el tamaño de un CM ventricular humano es de 100 a 150 μm de largo y con un diámetro de 20 a 35 μm . Por otra parte, en un trabajo de investigación realizado por Tracy, (2011) donde midió el tamaño de cardiomiocitos del ventrículo izquierdo en autopsia de cadáveres, encontró que los CM son cilíndricos y que tienen un diámetro de 17 a 25 μm y una longitud de 60 a 140 μm . De acuerdo con lo anterior, se podría deducir que poros por debajo de los rangos reportados, no permitirían un anclaje celular y, por ende, no serían adecuados para aplicaciones cardíacas.

En la determinación de la porosidad de los andamios PCL_(C) se observó un solo poro interconectado de 1200.73 μm ; estos poros tan grandes implican que los pocos CM que se logren anclar a las paredes del poro, no van a lograr el anclamiento e interconexión de las otras células a su superficie, sino que van a quedar aisladas y no van a ejercer sus funciones específicas de manera correcta. Con lo discutido anteriormente se comprueba que a medida que se incrementa la cantidad de MWCNT en los andamios mayor porosidad tendrán, esto se comprobó con el andamio de PCL_(C)/MWCNT 5% con mayor cantidad de poros. Por otro lado, es importante señalar que la formación de estos poros no se debió a la adición de ningún componente como NaCl o a la utilización de ningún tamiz, sino que como se dijo, se aprovechó la capacidad de los MWCNT de formar aglomerados para

generar poros. Es por esta razón que se explica la heterogeneidad en el tamaño de poros en los andamios.

9.8.2. Determinación de la porosidad de los andamios de PCL_(C)/MWCNT mediante SEM

Se comprobó, mediante microscopia óptica, que los poros generados en los andamios están interconectados y poseen el diámetro suficiente para que las células puedan anclarse a ellos y así ejercer sus funciones específicas. Lo que se pretendió por SEM es ver la morfología de esos poros en todos los porcentajes de los andamios (Figura 9.32).

Como se aprecia en la figura 9.32, el andamio de PCL_(C)/MWCNT 1% posee microporos no interconectados entre los 10 μm hasta los 50 μm .

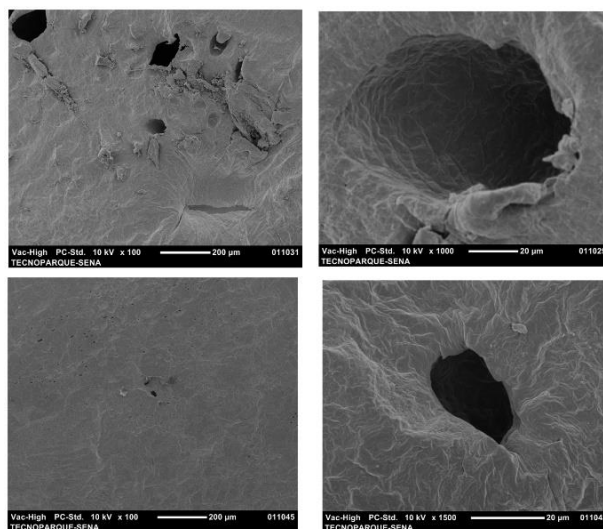


Figura 9.32. Determinación de la morfología superficial de los poros del andamio de PCL_(C)/MWCNT 1%.

El SEM se utilizó, en esta ocasión, para visualizar la superficie de los andamios, independientemente si éstos tuvieran poros interconectados. Por este motivo, es importante resaltar que los poros de los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% (Figura

9.32) son muy pequeños y la gran mayoría no presentan interconectividad. Debido a esto, se registró una viabilidad celular muy baja del 51.12%.

La morfología de los poros del andamio de PCL_(C)/MWCNT 3% presentó poros más grandes y con interconectividad y sus tamaños variaron entre los 25 μm hasta los 100 μm (Figura 9.33).

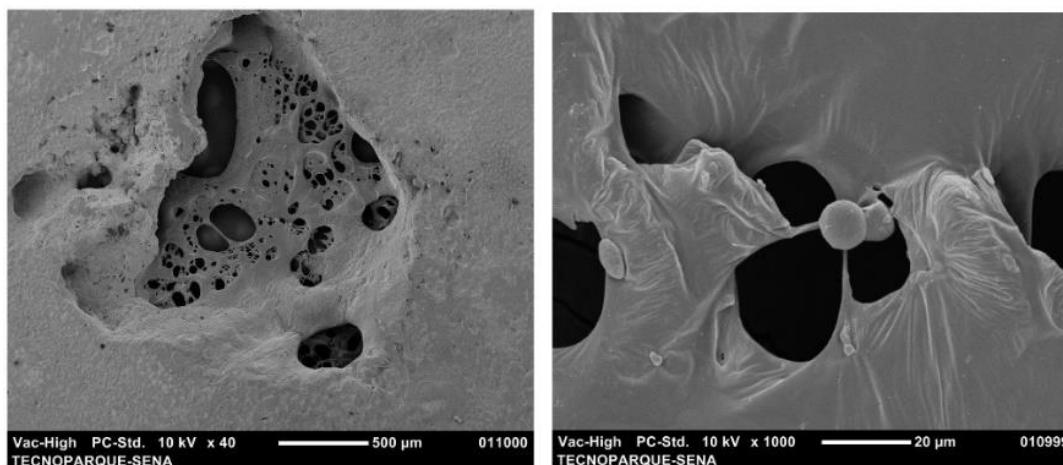


Figura 9.33. Determinación de la morfología superficial de los poros del andamio de PCL_(C)/MWCNT 3%.

Para los andamios de PCL_(C)/MWCNT 3% (Figura 9.33) se observaron poros más grandes e interconectados, lo que hizo que la viabilidad celular fuera del 57.74% muy similar a la de los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1%.

El andamio de PCL_(C)/MWCNT 5% presentó poros grandes, con interconectividad y sus tamaños variaron entre los 50 μm hasta los 800 μm (Figura 9.34).

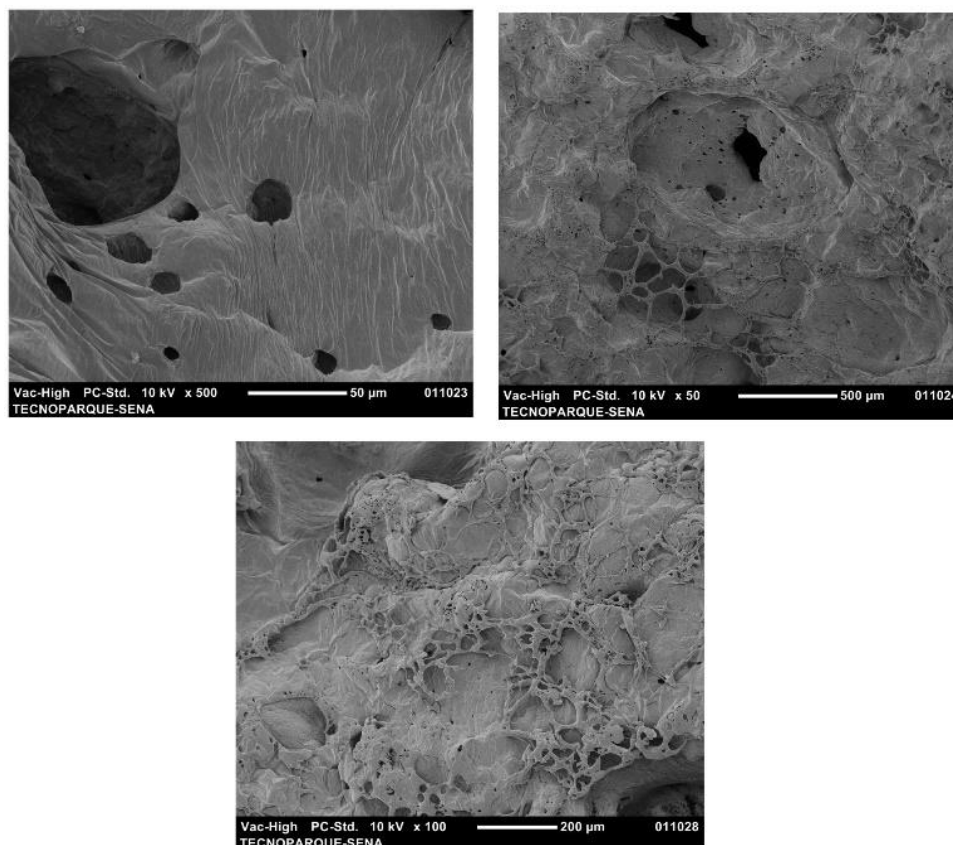


Figura 9.34. Determinación de la morfología superficial de los poros del andamio de PCL_(C)/MWCNT 5%.

Mientras que para los andamios de PCL_(C)/MWCNT 5% (Figura 9.34) se visualizó una superficie mucho más porosa, con muchos poros interconectados lo que hizo que su viabilidad celular fuera muy alta de 89.71%, aún más alta que la viabilidad de la PCL_(C) de 81.92%.

Dada la aplicación de estos andamios en recuperación de la falla cardiaca, es de vital importancia que éstos sean caracterizados mecánicamente mediante ensayos de Tracción, para determinar si éstos poseen la elasticidad y la resistencia suficiente como para soportar las cargas que se realizan en el corazón.

9.9. ENSAYO DE TRACCIÓN DE LOS ANDAMIOS PCL_(C)/MWCNT

Con el fin de evaluar las propiedades mecánicas de deformación y de resistencia máxima (σ_T) que pueden soportar los andamios de PCL_(C)/MWCNT, se realizaron pruebas de tracción. Estas pruebas de Tracción nos permiten determinar el módulo de elasticidad, módulo de Young (E), que nos dice qué tan rígido es el material. Entre mayor sea el valor del E más rígido será el material.

9.9.1. Cálculo de E y σ_T para los andamios de PCL_(C)/MWCNT

Para este trabajo de investigación se requieren E bajos para que el material sea flexible, por lo tanto, se realizaron pruebas de Tracción a los andamios con diferentes porcentajes de PCL_(C)/MWCNT (1%, 3% y 5%), para tener unos valores de resistencia máxima y E más precisos como se ilustra en la figura 9.35.

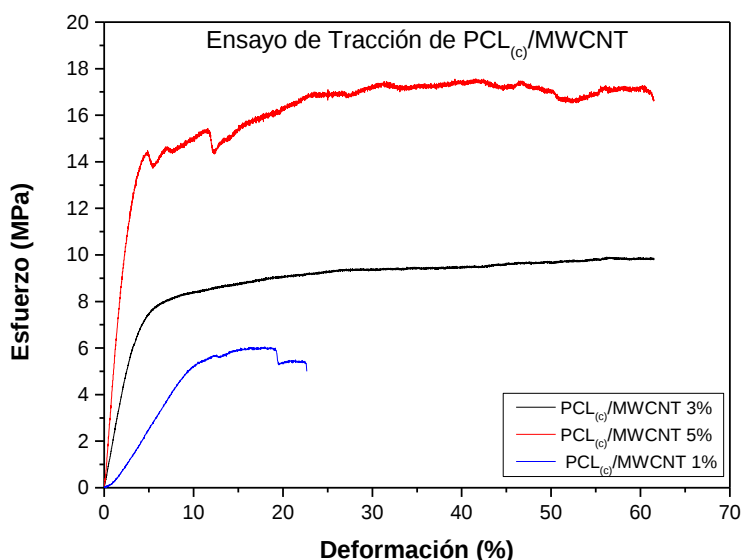


Figura 9.35. Ensayo de tracción para los andamios de PCL_(C)/MWCNT en función del porcentaje de nanotubos de carbono 1%, 3% y 5%.

El E se calculó usando la relación entre el esfuerzo y la deformación en la zona lineal de las gráficas y se tomó el valor de la pendiente (Tabla 9.3).

Tabla 9.3. Cálculo del módulo elástico de los andamios de PCL_(c)/MWCNT 1%

Andamio PCL _(c) /MWCNT (%)	Módulo elástico (MPa)
1	0.74
3	1.29
5	3.59

En la figura 9.36 se realizó una comparación entre los E de los andamios de PCL_(c)/MWCNT en sus tres porcentajes y se encontró que el más flexible, con una E de 0.74 MPa, es el andamio de PCL_(c)/MWCNT 1% y el más rígido con una E de 3.59 MPa es el andamio de PCL_(c)/MWCNT 5%, mientras que los andamios de PCL_(c)/MWCNT 3% presentaron una flexibilidad intermedia de E 1.29 MPa.

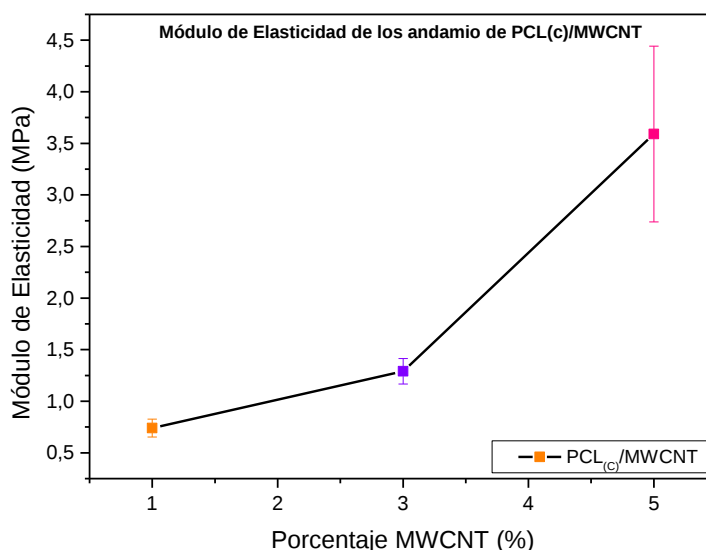


Figura 9.36. Incremento del Módulo elástico para los andamios de PCL_(c)/MWCNT a medida que se incrementa la cantidad de MWCNT

Para aplicaciones cardiacas encontramos que, debido a factores como el envejecimiento, pérdida de masa muscular o infarto cardiaco, el músculo cardiaco

sufre un debilitamiento en su fuerza y flexibilidad. Se estima que el corazón alcanza una máxima eficiencia (en términos de fuerza) a los 30 años y luego se reduce paulatinamente al incrementar la edad, significando una disminución en la tasa promedio de fuerza tensil del músculo, en el sistema cardiovascular, en un 7% entre los 30-37 años y un 21% de disminución entre los 60-70 años. La fuerza de tensil estándar para el músculo cardíaco es de 0.11 MPa, lo que significa que el músculo cardíaco para una persona de 80 años podría esperarse que esté funcionando a solo dos tercios de su fuerza máxima como resultado del envejecimiento (Benedicta-Edwards, 2005).

De acuerdo con lo anterior, se puede afirmar que, aunque todos los andamios de PCL_(c)/MWCNT se ajustan a la fuerza tensil estándar para el músculo cardíaco, el que mejor se ajusta es el PCL_(c)/MWCNT al 1%. Esto es debido a que tiene un E muy cercano a la fuerza tensil estándar del corazón de 0.11MPa, lo que lo hace muy flexible, comparable al músculo cardíaco. Caso contrario ocurre con el andamio de 5% que presenta una E bastante alta de 3.59 MPa, lo que lo hace bastante rígido para este tipo de aplicaciones, sin embargo, esto no quiere decir que no pueda ser utilizado en aplicaciones cardíacas. Con respecto a los andamios de PCL_(c)/MWCNT al 3% se puede deducir que, pese a que tiene rigidez, se podrían utilizar para otro tipo de tejidos en músculo estriado esquelético.

Los datos registrados del E de los andamios de PCL_(c)/MWCNT de esta tesis, coinciden con los registrados por Meng (2020) donde se reportan resultados de E entre 1.4 a 6 MPa para andamios de PCL/MWCNT de 0.1% y PCL/MWCNT de 0.2% con un porcentaje de deformación del 20%, similar al porcentaje de deformación de los andamios de PCL_(c)/MWCNT 1% desarrollados en esta tesis, pero muy diferentes a los PCL_(c)/MWCNT 5% que tienen un porcentaje de deformación de casi un 80%. Vale la pena resaltar, que en la figura 9.35 los nanotubos de carbono actúan como refuerzo ya que no permitieron que las probetas se rompieran por completo, sino que se fueran fracturando por partes, en forma de hilos. Por otro lado, Flores-Cedillo (2015), reporta E mucho más elevadas entre 172 a 608 MPa. Esto se debe

a que los andamios fabricados en dicha investigación constituyen una mezcla de PCL, hidroxiapatita, quitosano y MWCNT, para ser utilizados en implantes dentales, por esta razón éstos deben ser rígidos y por ende poseer E elevados.

Se procedió a estimar la resistencia máxima de los andamios de PCL_(c)/MWCNT, que es el valor máximo de la zona elástica que el material puede soportar antes de fatigarse (Tabla 9.4).

Tabla 9.4. Estimación de la resistencia máxima de los andamios de PCL_(c)/MWCNT 1%

Andamio PCL _(c) /MWCNT (%)	Resistencia máxima, σ_T (MPa)
1	5.23
3	7.64
5	14.7

Las comparaciones entre σ_T de los andamios de PCL_(c)/MWCNT fabricados son concordantes con las E halladas, el andamio con menor resistencia sería el de PCL_(c)/MWCNT 1% con un valor de 5.23 MPa, seguido del andamio de PCL_(c)/MWCNT 3% con un valor de 7.64 MPa y el de mayor resistencia sería el PCL_(c)/MWCNT de 5% con un valor de 14.7 MPa. Esto quiere decir que el andamio de PCL_(c)/MWCNT 1%, si se somete a una fuerza superior a 5.23 MPa se rompe, mientras que el andamio de PCL_(c)/MWCNT 5% posee una σ_T muy superior a los otros andamios (ver figura 9.37).

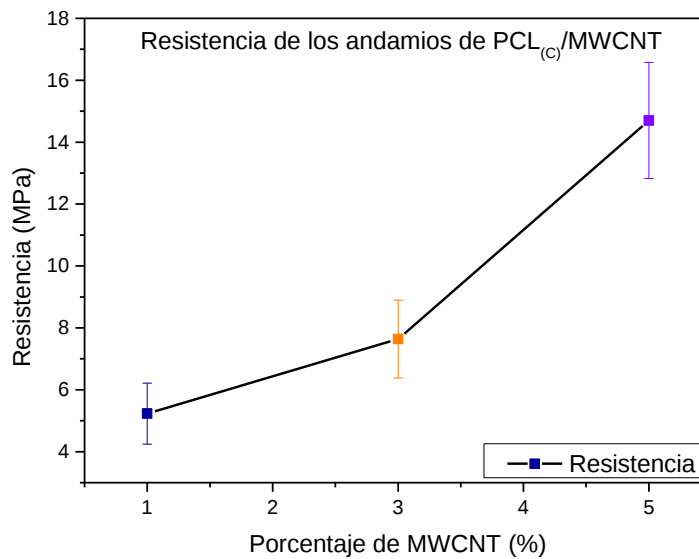


Figura 9.37. Incremento de la resistencia a la Tracción de los andamios de PCL_(c)/MWCNT a medida que se aumenta la cantidad de MWCNT

Este valor de σ_T del andamio de PCL_(c)/MWCNT 5% sería favorable para aplicaciones cardiacas y en tejidos que tuviesen que soportar cargas altas como rodilla y huesos. Como evidencia de esto, Flores-Cedillo (2015), reportó σ_T cercanos a los reportados, entre 18 a 42 MPa, para andamios que pueden utilizados en regeneración ósea.

9.9.2. Análisis estadístico de los datos de Tracción obtenidos para los andamios de PCL/MWCNT

En la Tabla 9.5 se presenta los resultados del análisis de varianza para el modelo GAMM ajustado, donde se sugiere mediante los términos suavizados que la Tracción, cambia en función de la Elongación (Términos suavizados: valor-p < 0.05).

Tabla 9.5. Análisis de varianza del Esfuerzo según PCL con MWCNT y Elongación.

Términos	Estadístico F	Valor-p	Resultado
Paramétricos:			
Tratamiento	9.340	<2.0E-16	Significante
Suavizados:			
s(Elongación) : Tratamiento 1%	698.6	<2.0E-16	Significante
s(Elongación) : Tratamiento 3%	5083.1	<2.0E-16	Significante
s(Elongación) : Tratamiento 5%	176.8	<2.0E-16	Significante

Mediante la Tabla 9.6 se evidencia que la PCL con MWCNT tiene un efecto significativo sobre la Tracción (Término paramétrico: valor-p < 0.05), encontrándose diferencias entre PCL/MWCNT 1% y PCL/MWCNT 5%, donde los valores medios más elevados se obtienen en esta última condición experimental.

Tabla 9.6. Prueba de contrastes múltiples entre tratamientos con valores-p ajustados por el método de Bonferroni para la variable Esfuerzo.

Factor	Media	Desviación	Réplicas	Agrupación*
Tratamiento 1%	7.16	2.7	3	a
Tratamiento 3%	11.54	5.29	3	b
Tratamiento 5%	3.15	2.08	2	a b

*Letras iguales indican que no existe diferencias significativas

9.9.3. Observación de Superficie de Fractura de las probetas de los andamios de PCL_(C)/MWCNT mediante SEM

Una vez realizado el ensayo de tracción de los andamios de PCL_(C)/MWCNT, las probetas quedan fracturadas. Estas fracturas permiten un acercamiento a las propiedades del material. Por ejemplo, si una fractura fue gradual genera hilos, mientras que si una fractura fue directa no genera hilos.

De acuerdo con lo anterior, se observaron las fracturas de las probetas de todos los porcentajes de los andamios de PCL_(C)/MWCNT mediante SEM (Figura 9.38 (a), (b) y (c)).

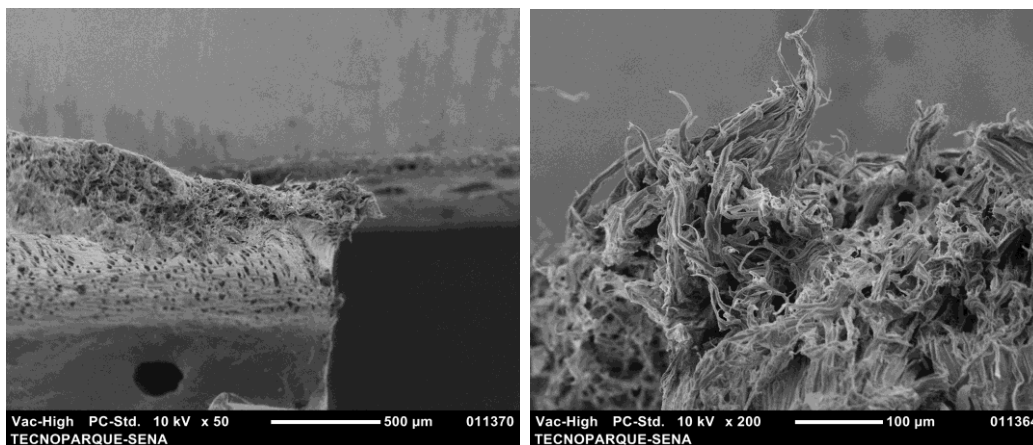


Figura 9.38. Fractura de la probeta del andamio PCL_(C)/MWCNT 1%. La probeta presenta porosidad y se observan hilos en su fractura.

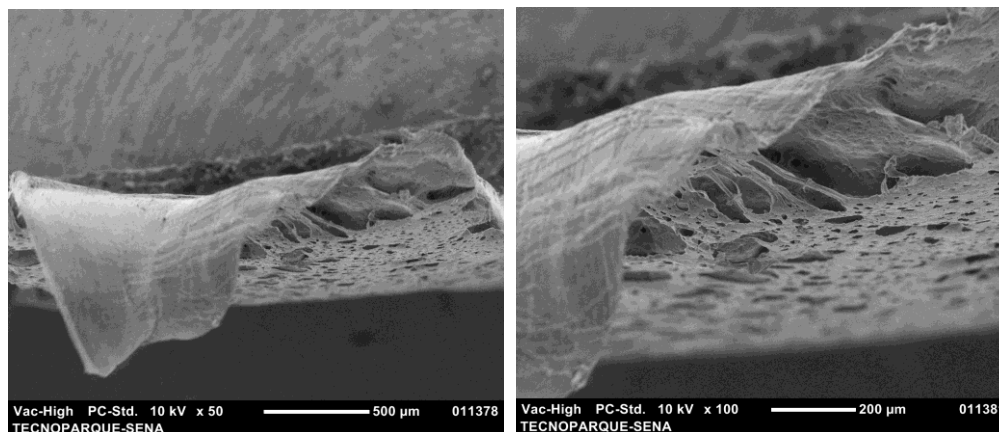


Figura 9.38b. Fractura de la probeta para ensayo de traccion del andamio $PCL_{(C)}/MWCNT$ 3%.

La probeta es aún más porosa que la del 1% y se evidencia que este andamio es mucho más rígido, lo que concuerda con los datos de módulo de elasticidad obtenido de 3.59 MPa obtenido anteriormente.

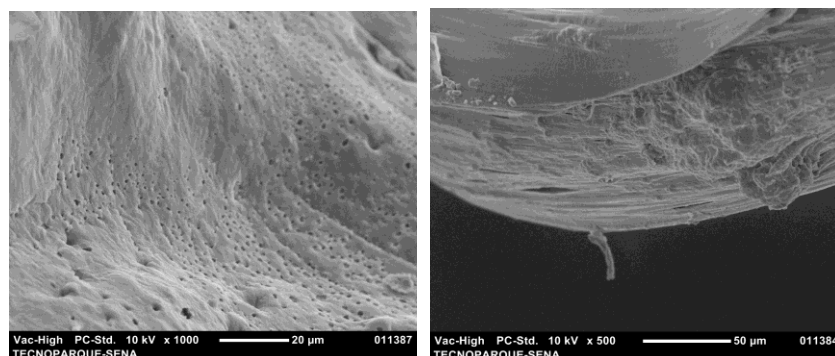


Figura 9.38c. Fractura de la probeta del andamio $PCL_{(C)}/MWCNT$ 5% (Karen Astudillo, Tecnoparque, Sena)

La probeta es porosa y se evidencia la presencia de hilos que pueden servir como un refuerzo ante una posible ruptura del material.

El andamio de $PCL_{(C)}/MWCNT$ al 5% (Figura 9.38c), muestra unos hilos generados en la fractura y no una fractura plana longitudinal; estos hilos generados en la fractura se deben al reforzamiento de los MWCNT del material sin que el andamio

se fatigue tan rápidamente (Figuras 9.38a y 9.38b), debido a que en la región plástica se observan unas “escaleras” que no permiten que el material se fracture de lleno sino por partes generando hilos (Figura 9.39).



Figura 9.39. Fractura de una probeta del andamio de PCL_(C)/MWCNT al 3%, con forma de hilo

El resultado descrito fue corcondante para el resto de los andamios que también se fracturaron de esta manera. Se infiere que este tipo de fracturas son muy comunes encontrarlas en materiales viscoelásticos como polímeros, en especial aquellos que están fabricados con PCL debido a su alta flexibilidad. La fractura nos abre las puertas para determinar que tanta dureza tienen estos andamios de PCL_(C)/MWCNT, por lo que se realizaron pruebas de nanoindentación.

9.10. ANÁLISIS MECÁNICO MEDIANTE INDENTACIÓN INSTRUMENTADA (NANOINDENTACIÓN) A LOS ANDAMIOS DE PCL_(C)/MWCNT

Las pruebas de nanoindentación se utilizan para determinar dos parámetros muy importantes, uno de estos es la dureza del material y el otro es el desplazamiento que sufren los andamios cuando se les aplica una carga. Los andamios de PCL_(C)/MWCNT, tienen una dureza excelente del orden de los GPa. El parámetro

de desplazamiento aumenta a medida que se aumenta el porcentaje de nanotubos de carbono en los andamios de PCL_(C)/MWCNT (Figura 9.40).

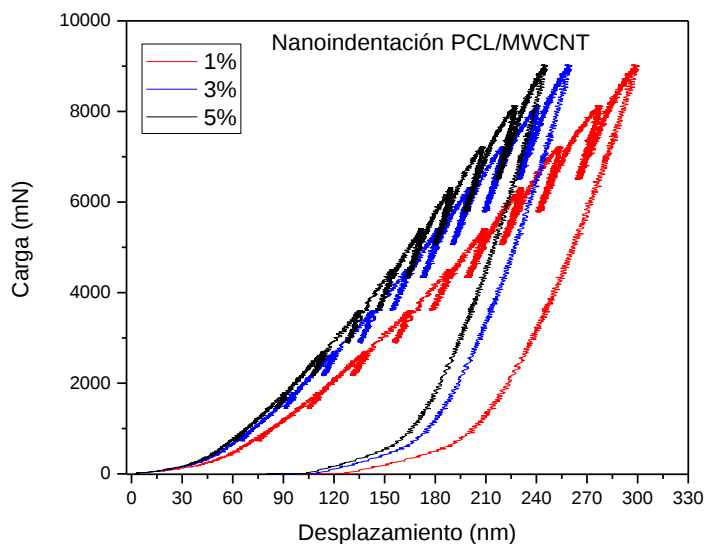


Figura 9.40. Desplazamiento de los andamios de PCL_(C)/MWCNT obtenida por nanoindentación.

Se encontró un aumento de los parámetros de dureza de los andamios de PCL_(C)/MWCNT a medida que aumentó el porcentaje de MWCNT (Figura 9.41).

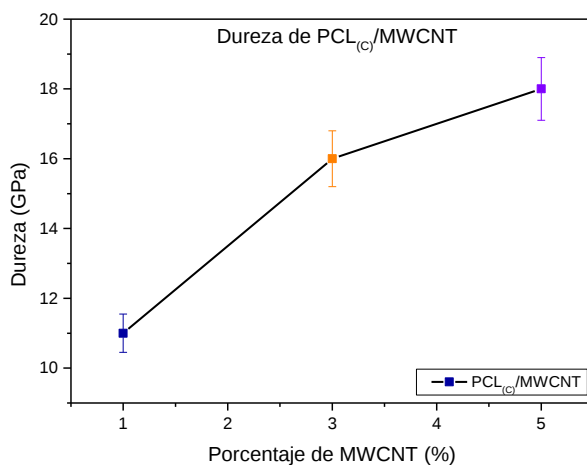


Figura 9.41. Dureza de los andamios de PCL_(C)/MWCNT obtenida por nanoindentación.

Los resultados de las pruebas de nanoindentación establecen que, a medida que se aumenta la cantidad de MWCNT en los andamios, aumenta su dureza (la resistencia de un material a ser deformado plásticamente). En consecuencia, el andamio de PCL_(c)/MWCNT al 5% es el que mayor dureza posee, lo que indica un andamio rígido, mientras que el andamio de PCL_(c)/MWCNT al 1% es el andamio más blando. Esto es corroborado por Huang (2019), donde se registró un incremento en la dureza de los andamios a medida que se incrementaba la cantidad de MWCNT. Huang, registró para sus andamios de PCL_(c)/MWCNT al 0.25 % una dureza de 0.04 GPa, para los andamios de PCL_(c)/MWCNT al 0.75%, una dureza de 0.05 GPa y una dureza similar para los andamios de PCL_(c)/MWCNT al 3%. Dichos resultados están muy por debajo de los registrados en esta tesis, indicando que los MWCNT utilizados en esta investigación no solo sirven como refuerzo de la matriz de PCL, sino que contribuyen enormemente a las propiedades mecánicas de los andamios (Huang, 2019).

Los resultados de dureza obtenidos en el presente trabajo se comprueban con las curvas de desplazamiento (Figura 9.41), donde el desplazamiento para el andamio PCL_(c)/MWCNT al 5% es menor que el desplazamiento en nm registrado para los andamios de PCL_(c)/MWCNT 3% y los andamios de PCL_(c)/MWCNT 1%, siendo este último el más blando de todos los andamios. Lo anterior no es concordante con el módulo elástico reportado para los andamios de PCL_(c)/MWCNT al 5%, que fue de 0.74 MPa, indicando un material flexible. Esto se explica debido a que el ensayo de tracción es una medida macro, donde se evalúa todo el sistema, mientras que cuando se hace nanoindentación, las áreas que toma la medida son muy pequeñas. Por otro lado, el equipo de nanoindentación puede haber tomado una región donde haya aglomeración de MWCNT cuya dureza es mayor y registre esos datos.

Con la nanoindentación también se calcula el E de los andamios de PCL_(c)/MWCNT de la porción que se nanoindentó (ver figura 9.42).

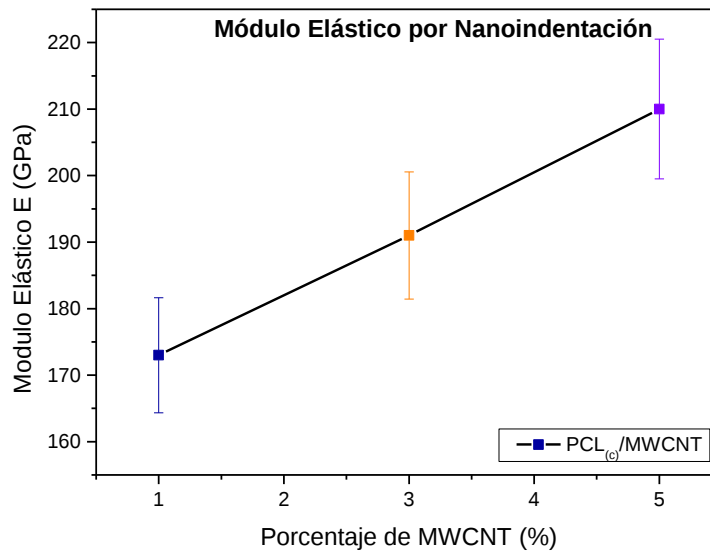


Figura 9.42. Módulo Elástico de los andamios de PCL_(c)/MWCNT calculados por nanoindentación.

Como se aprecia en la figura 9.42, el módulo elástico es muy elevado del orden de los 220 GPa y éste aumenta a medida que aumentan la cantidad de nanotubos, esta misma tendencia se visualiza en el cálculo de la resistencia de la región plástica de los andamios. Para aplicaciones cardiacas lo importante es la flexibilidad, por lo que se puede argumentar que se deben tomar los valores del módulo elástico y no los valores de dureza ya que ésta última se halla en la región plástica del material y lo que interesa para este tipo de aplicaciones es la región elástica.

Los nanotubos de carbono ejercen un incremento de esta resistencia a medida que éstos se incrementan (ver figura 9.43).

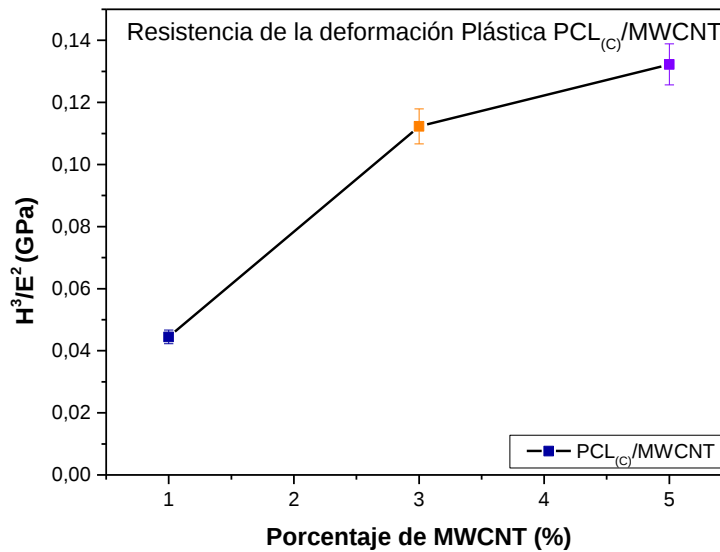


Figura 9.43. Resistencia de la deformación plástica de los andamios de PCL_(C)/MWCNT

Lo que se observa en la Figura 9.43 es que los andamios de PCL_(C)/MWCNT al 1% son los que menor resistencia a la deformación plástica, mientras que a medida que se va incrementando el porcentaje de nanotubos de carbono esta resistencia aumenta. Esto quiere decir que, a medida que se incrementa el porcentaje de nanotubos mayor será la resistencia plástica del material, lo que es favorable porque soportará mayores cargas de fuerza que es lo que se busca para este tipo de aplicaciones cardiacas.

Otro parámetro importante para analizar de los andamios de PCL_(C)/MWCNT es el porcentaje de recuperación elástica (%R) (Figura 9.44). Esta recuperación se mide mediante la ecuación 9.1 y se calcula con base en el porcentaje de MWCNT contenidos en los andamios fabricados.

$$\%R = \frac{\delta_{max} - \delta_p}{\delta_{max}} * 100\% \quad \text{Ecuación 9.1}$$

Donde:

$\delta_{\max}$ = es el desplazamiento máximo

δ_p = es el desplazamiento plástico

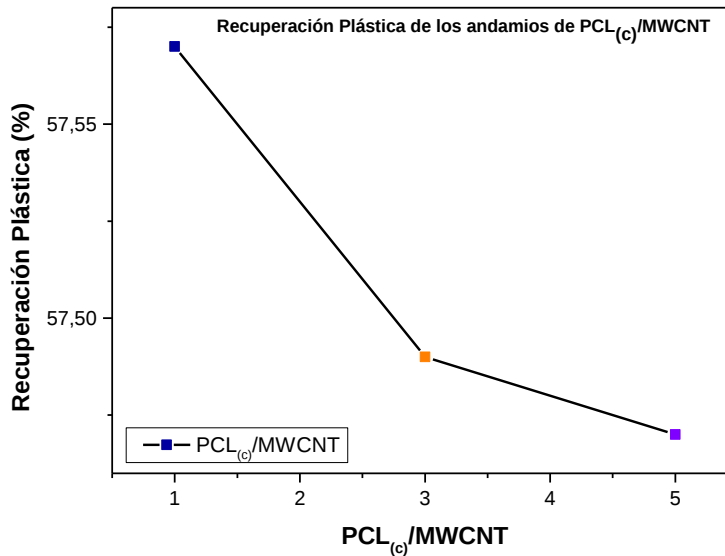


Figura 9.44. Recuperación Plástica de los andamios de PCL(c)/MWCNT.

Aunque los resultados de la recuperación plástica son casi constantes para todos los porcentajes de los andamios de PCL(c)/MWCNT (Figura 9.44), se aprecia que a medida que se incrementan los MWCNT en los andamios su recuperación plástica disminuye esto es debido a que los MWCNT le aportan más rigidez a los andamios (Piedrahita, 2017); siendo el andamio de PCL(c)/MWCNT 5% el más rígido de todos, por lo que este andamio se deforma poco elásticamente.

Los andamios de PCL(c)/MWCNT en todos sus porcentajes pueden ser utilizados en aplicaciones de ingeniería de tejidos, mas aún en el área de recuperación de tejidos musculares.

Con la nanoindentación se terminan todas las pruebas de revisión de las propiedades, térmicas y mecánicas de los andamios de PCL(c)/MWCNT. Como se trata de aplicaciones cardiacas, se debe revisar la conducción de estos andamios.

9.11. DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE LOS ANDAMIOS DE PCL_(c)/MWCNT MEDIANTE IMPEDANCIA.

La conductividad eléctrica de la PCL_(c) y de los andamios de PCL_(c)/MWCNT (1%, 3% y 5%) se determinaron mediante impedancia. Una vez hallada la impedancia, se procedió a calcular la resistividad mediante ajuste de circunferencia.

Al determinar la conductividad eléctrica de la PCL_(c) se encontró que no presenta resultados consistentes de impedancia, lo que quiere decir que la PCL_(c) no es conductora y por lo tanto debe presentar valores de resistencias altos (Figura 9.45-Tabla 9.7).

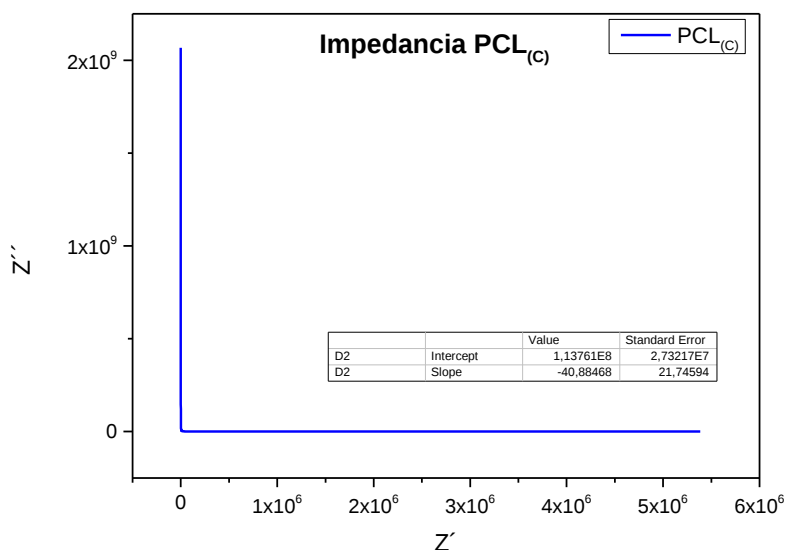


Figura 9.45. Comprobación de la conducción eléctrica de la PCL_(c) mediante la prueba de Impedancia de las 4 puntas.

La impedancia del andamio de PCL_(c)/MWCNT 1%, tuvo un comportamiento similar al de la PCL_(c) y por tanto tampoco conduce la corriente eléctrica ya que su gráfica presenta datos inconsistentes con la curva de impedancia (Figura 9.46).

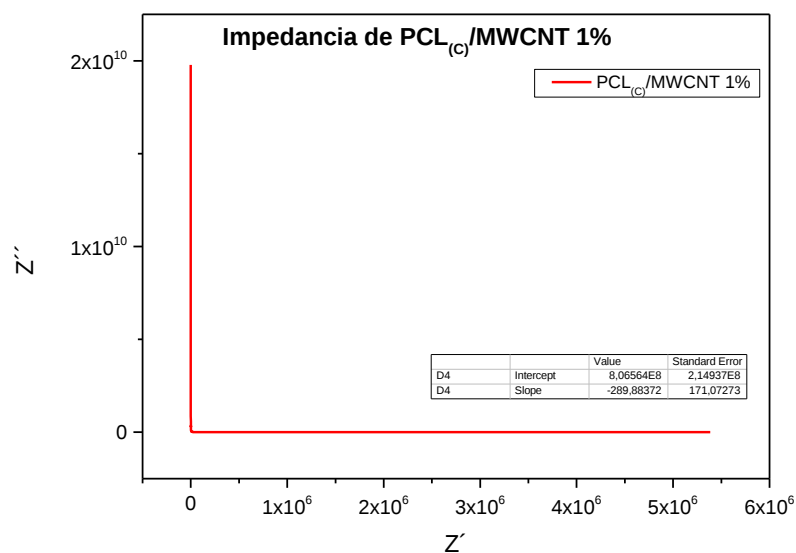


Figura 9.46. Comprobación de la conducción eléctrica de la PCL_(C)/MWCNT 1% mediante la prueba de Impedancia de las 4 puntas.

Caso contrario ocurrió con los andamios de PCL_(C)/MWCNT 3% y con el de PCL_(C)/MWCNT 5% que sí mostraron datos coherentes de conductividad eléctrica mediante impedancia (Figura 9.47-Figura 9.48).

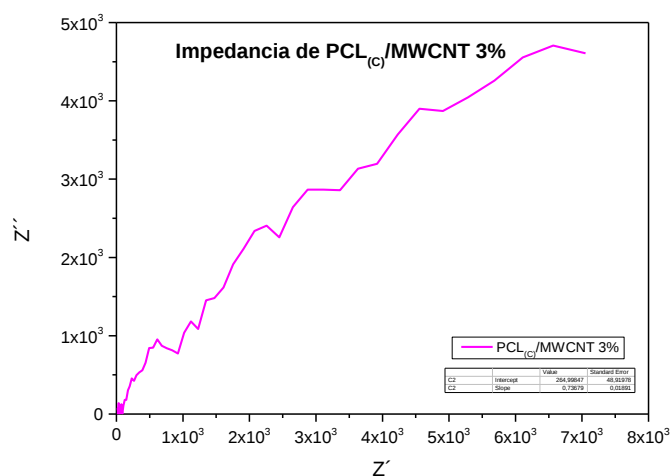


Figura 9.47. Comprobación de la conducción eléctrica de la PCL_(C)/MWCNT 3% mediante la prueba de Impedancia de las 4 puntas.

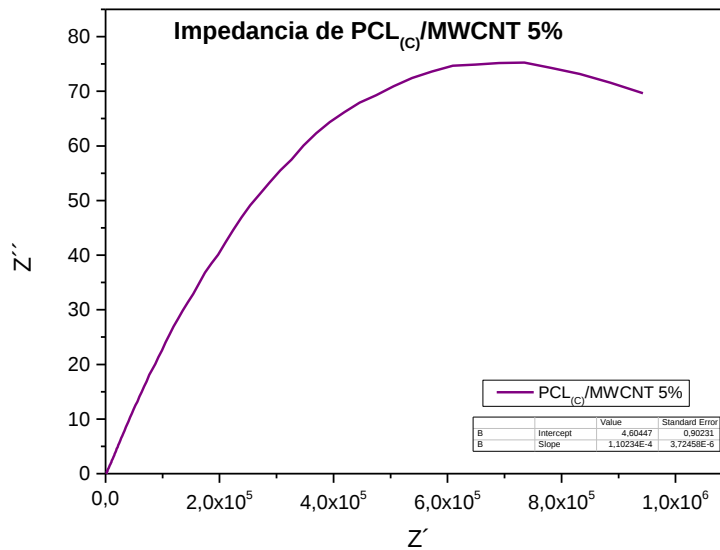


Figura 9.48. Comprobación de la conducción eléctrica de la PCL_(C)/MWCNT 5% mediante la prueba de Impedancia de las 4 puntas.

Es muy importante resaltar, que en todas las mediciones de impedancia tanto de la PCL_(C) como de los andamios de PCL_(C)/MWCNT hubo datos que no mostraron ningún comportamiento (ninguna tendencia), estos fueron eliminados. Por lo tanto, se tomó el primer segmento de datos donde realmente hubo algún tipo de tendencia y no el conglomerado de datos arrojados por el impedancímetro.

Una vez determinada la impedancia se encontraron los valores de resistividad (Tabla 9.7).

Tabla 9.7. Valores de resistividad hallados en el ensayo de impedancia

Material compuesto o andamio	Resistividad (Ω)
PCL _(C)	1.14x10 ⁸
PCL _(C) /MWCNT 1%	8.07x10 ⁸
PCL _(C) /MWCNT 3%	265
PCL _(C) /MWCNT 5%	4.60

Los datos de resistividad (Figura 9.49) muestran que para la $PCL_{(C)}$ y para el andamio de $PCL_{(C)}/MWCNT$ 1% son muy altos, lo que permite deducir que los materiales mencionados no son conductores, mientras que los datos de los andamios de $PCL_{(C)}/MWCNT$ 3% y $PCL_{(C)}/MWCNT$ 5%, registran datos de resistividad bajos, conducen la corriente, de donde se resalta el andamio de $PCL_{(C)}/MWCNT$ 5% como el mejor conductor.

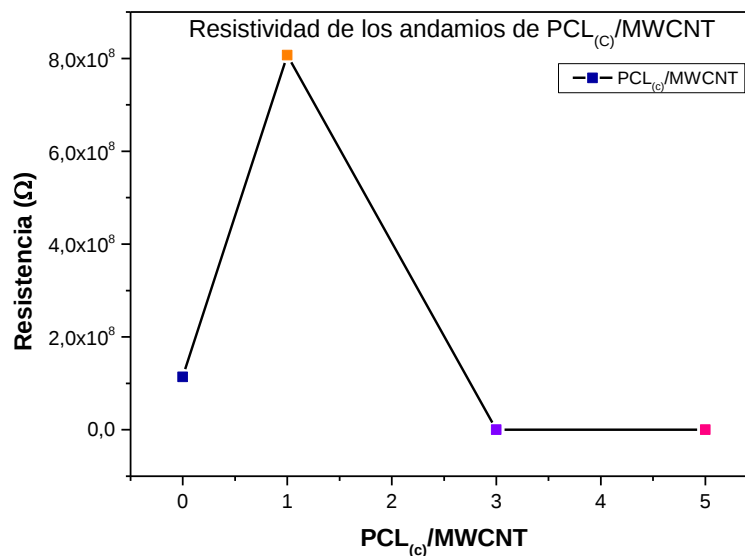


Figura 9.49. Resultados de Resistividad de los andamios de $PCL_{(C)}/MWCNT$ comparado con $PCL_{(C)}$.

El corazón tiene como función principal el bombeo de sangre para todo el organismo. Sin embargo, este bombeo no se realiza de forma homogénea a un ritmo fijo, sino que depende a las necesidades puntuales de la persona. Cuando la persona necesita un mayor aporte de oxígeno, el corazón es capaz de aumentar la frecuencia y el vigor de la contracción para suministrar un mayor flujo de sangre, por consiguiente, se incrementa el número de litros que se bombea por minuto. En reposo, el corazón bombea de 4 a 5 l de sangre por minuto (lpm), durante actividad física, el bombeo llega a más de 10 (lpm). Con base en lo anterior, el corazón tiene la capacidad de regular el número de contracciones según las demandas del

organismo y debe ser capaz de acelerar o desacelerar de manera automática. Para que esto ocurra el corazón debe generar de manera espontánea e independiente impulsos eléctricos a 50, 60 o 70 latidos por minuto (lpm); estos impulsos generalmente se aceleran a unos 200 lpm con el incremento de la edad para satisfacer la necesidad que el cuerpo requiere y deben de abarcar todo el corazón, para que no solo sea una zona que se active a una frecuencia determinada sino todo el corazón. Lo anterior implica que el corazón tiene la capacidad de estar conectado eléctricamente para que, si una zona se activa a 60 lpm, los impulsos generados se expandan por todo el corazón y este tenga un latido a la misma frecuencia (Moreno, 2021).

De lo argumentado se desprende que es muy importante verificar si los andamios fabricados de $PCL_{(C)}/MWCNT$ tienen algún tipo de conducción eléctrica que les permita, una vez implantados en corazón, potenciar esos impulsos eléctricos generados y así poder brindar una solución a la falla cardiaca. Con esta idea se le realizaron pruebas de impedancia eléctrica a la $PCL_{(C)}$ y a los andamios $PCL_{(C)}/MWCNT$ de 1%, 3% y 5%. La prueba realizada a la $PCL_{(C)}$ (Figura 9.45) no presentó datos consistentes de impedancia eléctrica, lo que la hace no conductora. Esto se corroboró con los resultados de conductividad (Tabla 9.7) que registra una resistividad muy alta de $1.14 \times 10^8 \Omega$, oponiéndose al flujo de corriente de corriente eléctrica. Lo anterior significa que esta $PCL_{(C)}$ no es apta para la aplicación en recuperación de la falla cardiaca. Continuando con la prueba de impedancia para el andamio de $PCL_{(C)}/MWCNT$ 1% (Figura 9.46), tampoco hay conducción de corriente eléctrica mediante impedancia, teniendo una resistividad alta de $8.07 \times 10^8 \Omega$, impidiendo que los electrones pasen de un lado a otro libremente.

Para que el corazón funcione correctamente, se requiere que el nodo sinusal genere los impulsos, que el resto del tejido los transmita mediante las células cardiacas que poseen canales iónicos en forma de túnel que comunican el interior con el exterior de la célula (Figura 9.50).

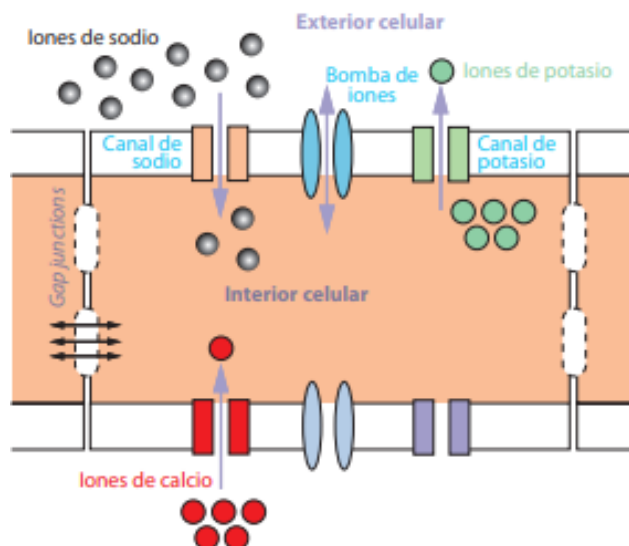


Figura 9.50. Flujo de corriente eléctrica en el corazón (Tomada de Moreno, 2016).

Como se observa, a través de estos túneles pasan de manera pasiva iones; que en el exterior de la célula abundan los iones sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) con cargas eléctricas positivas de +30 mV, mientras que en el interior de la célula abundan los iones de carga negativa de -80 mV y otros iones como el K^+ . La diferencia en concentración de estos iones tanto del interior como del exterior de la célula es fundamental para que la electricidad pueda transmitirse y generarse en el corazón. De acuerdo con lo anterior, es muy importante que los andamios sean conductores para que las células cardíacas puedan realizar sus funciones normales. Con respecto a la prueba de impedancia de $\text{PCL}_{(\text{C})}/\text{MWCNT}$ de 3% (Figura 9.47) registra una resistividad alta de 265 Ω . Este resultado, pese a que es muy alto, se evidencia que estos andamios presentan impedancia a frecuencias altas, producto del incremento de la cantidad de MWCNT. A los andamios de $\text{PCL}_{(\text{C})}/\text{MWCNT}$ de 5% se les realizó pruebas de impedancia (Figura 9.48) mostrando un resultado de 4.60 Ω valor muy adecuado para que los CM puedan activar estos túneles y realizar las contracciones de forma adecuada.

Vale la pena resaltar que los datos registrados de impedancia fueron a frecuencias altas ya que a frecuencias bajas no se registraron valores congruentes. Esto se debe a que la prueba de impedancia se realiza a muestras con superficies lisas y

los andamios de PCL_(C)/MWCNT tienen estructura rugosa debido al acoplamiento. Además, por ser materiales porosos, la impedancia no se registró al pasar por estos poros, por este motivo se registró impedancia únicamente a frecuencias altas.

Por lo anterior, se puede decir que los andamios de PCL_(C)/MWCNT 5% son los que mejor conductividad poseen, por lo que pueden ser andamios ideales para la aplicación deseada en esta investigación doctoral.

9.12. DIFERENCIACIÓN CELULAR DE MSC A CM

Antes de realizar el proceso de diferenciación celular, se tenían MSC sin diferenciar (Figura 9.51).

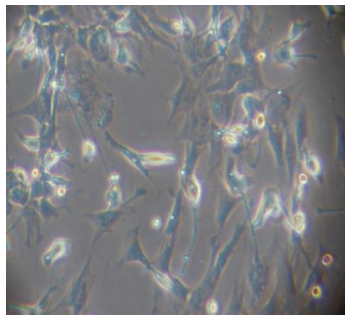


Figura 9.51. MSC sin diferenciar vistas desde un microscopio óptico

Una vez realizado el proceso de diferenciación reportado en la sección 8.9, se obtuvieron células diferenciadas a CM (Figura 9.52).

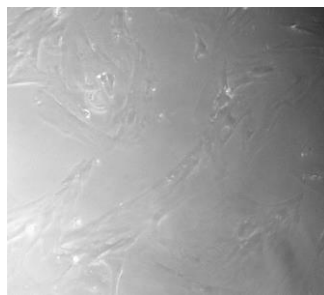


Figura 9.52. Células diferenciadas a cardiomiocitos (CM) vistas desde un microscopio óptico

Los CM diferenciados fueron utilizados para celularizar los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% y PCL_(C)/MWCNT 5% para realizar las pruebas de implantación en el músculo EDL de biomodelos murinos y sus pruebas de contracción muscular.

Estos CM fueron utilizados en la parte de citotoxicidad, celularización de los andamios de PCL_(C)/MWCNT, implantación, ensayo de contracción muscular.

9.13. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD POR MTT DE LOS ANDAMIOS DE PCL_(C)/MWCNT

Una vez se realizaron todas las caracterizaciones de los andamios, se procedió a realizar las pruebas de citotoxicidad por el método MTT de todos los porcentajes de los andamios (Figura 9.53).

Los resultados muestran que la PCL sintetizada en el laboratorio tuvo una viabilidad celular del 97.24%, mientras que la PCL comercial registró una viabilidad más baja de 81.24%. Con respecto a la viabilidad celular de los andamios, los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% y PCL_(C)/MWCNT 3%, presentaron viabilidad celular muy parecida de 51.12% y 57.74% respectivamente. Mientras que el andamio de PCL_(C)/MWCNT 5% registró una viabilidad celular del 89.71%.

Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang (Li, 2015). Se observa (Figura 9.53) que la PCL_(S) registra un porcentaje de viabilidad celular de 97.24%, seguido de los andamios de PCL_(C)/MWCNT 5% con un 89.71%, mientras que los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% y PCL_(C)/MWCNT 3%, registraron una viabilidad celular muy similar, de 51.12% y 57.74% respectivamente. Los datos indican que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, por lo que si se observa presencia de formazán las células están realizando actividad catalítica y por ende están vivas. Este caso ocurrió, en su gran mayoría, para el andamio de PCL_(C)/MWCNT 5% mencionado anteriormente.

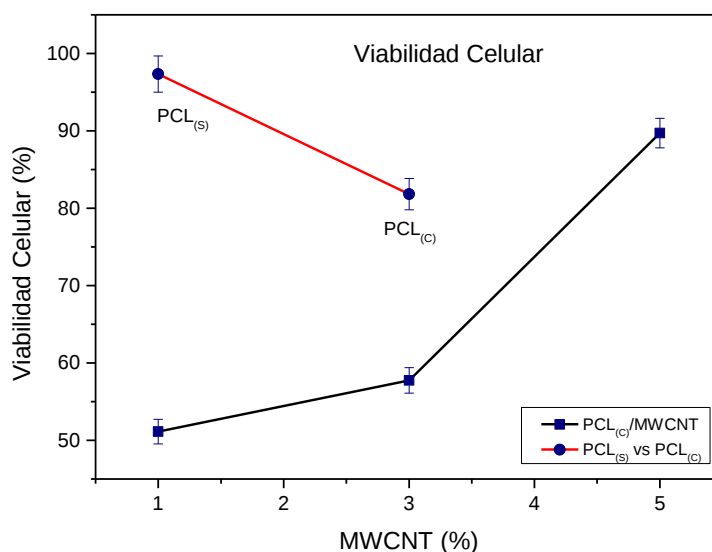


Figura 9.53. Resultado de la prueba de citotoxicidad de los andamios de PCL_(C)/MWCNT

Los datos obtenidos en esta prueba de citotoxicidad MTT fueron concordantes con los resultados obtenidos por Mattioli-Belmonte (2012) para los andamios de PCL_(C)/MWCNT 5%; pero inconsistentes para los resultados de los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% y PCL_(C)/MWCNT 3%; ya que los andamios de PCL/CNT de Mattioli-Belmonte, 2012, arrojaron valores de compatibilidad celular mayores del 75%. En dicha investigación también se resaltó que se tuvo problemas de adhesión celular a los andamios obtenidos. Dado que los resultados registrados para los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% y PCL_(C)/MWCNT 3% son muy parecidos y para minimizar costos en la parte de implantación de los andamios en biomodelos se decidió descartar el andamio de PCL_(C)/MWCNT 3% para la parte de implantación.

9.14. COMPROBACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS ANDAMIOS DE PCL_(C)/MWCNT

Una vez comprobado que los andamios de PCL_(C)/MWCNT no son citotóxicos, se procedió a comprobar si las células diferenciadas a cardiomiocitos se anclarían a los andamios y pudiesen crecer en ellos. Para comprobarlo, se realizó la siembra de estas células a los andamios y se observó por el microscopio óptico el crecimiento de estas células en los días 4, 8 y 15, para andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% (Figura 9.54) y PCL_(C)/MWCNT 5% (Figura 9.55).

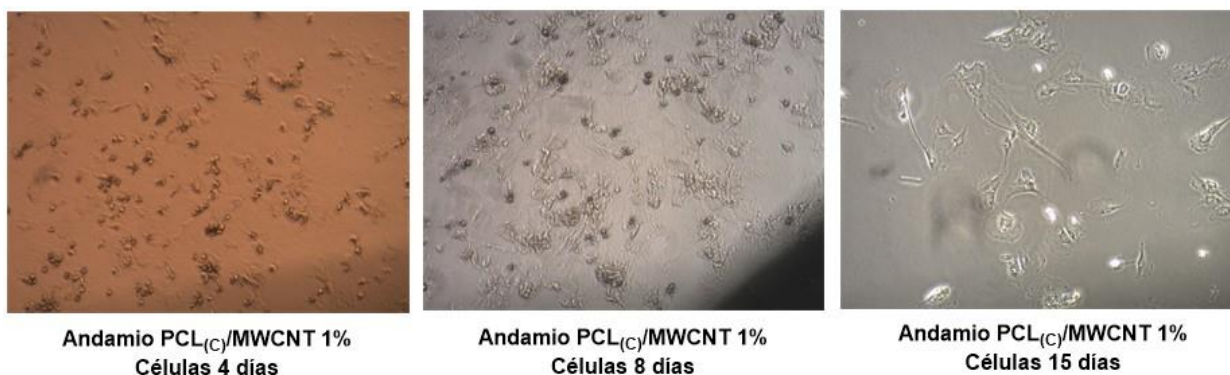


Figura 9.54. Viabilidad celular del andamio de PCL_(C)/MWCNT 1%

Se observó un crecimiento celular proporcional al tiempo en el andamio PCL_(C)/MWCNT 1%.

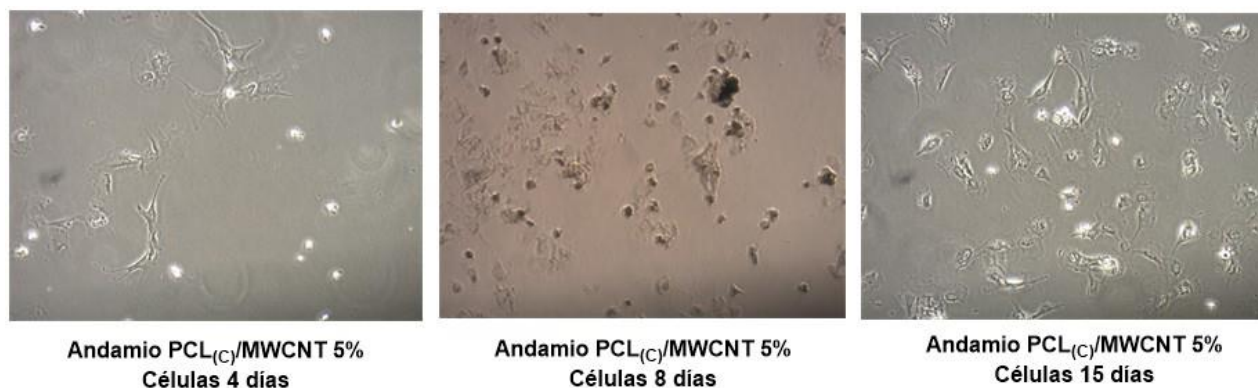


Figura 9.55. Viabilidad celular del andamio de PCL_(C)/MWCNT 5%

Se observó un crecimiento celular proporcional al tiempo en el andamio PCL_(C)/MWCNT 5%.

Las pruebas de viabilidad celular se les realizó a los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% y PCL_(C)/MWCNT 5% que implantarían en biomodelos. Se observó (Figura 9.54) que las células diferenciadas a CM se implantaron exitosamente en los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1%, y al cuarto día se observó crecimiento celular. No obstante, al octavo día se observa un mayor número de células con un mayor crecimiento; hasta que el día 15 se observan CM con 100% de crecimiento listos para ser implantados.

Por otra parte, se observó, para el andamio de PCL_(C)/MWCNT 5% (Figura 9.55), que en el día cuatro había pocas células. Sin embargo, se dio un crecimiento celular significativo al día ocho, finalizando con un aumento importante del número de células para el día 15. Lo anterior, comprueba que los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% y PCL_(C)/MWCNT 5% no son citotóxicos. Se evidenció mediante SEM que las células, una vez implantadas en los andamios, pueden crecer, proliferarse y realizar sus funciones específicas. Por esto se infirió que estos andamios pueden ser implantados en biomodelos murinos.

Una vez comprobada la viabilidad celular en los andamios de PCL_(C)/MWCNT, se realizó la implantación de los andamios en los muslos EDL de biomodelos murinos.

9.15. IMPLANTACIÓN DE LOS ANDAMIOS EN LOS MÚSCULOS DIGITORUM EXTENSOR LONGUS (EDL) DE BIOMODELOS MURINOS.

Una vez realizada la implantación de los andamios en los EDL de los biomodelos murinos, sacrificados a los 15 días, se procedió a la extracción del EDL de la rata, para verificar si los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% y PCL_(C)/MWCNT 5%, presentaban algún tipo de reacción inflamatoria o si éstos no se integraban a la

fracción electro fulgurada de los EDL de los biomodelos. Resultados de la verificación para el andamio de PCL_(C)/MWCNT 1% (Figura 9.56).



Figura 9.56. Integración del andamio de PCL_(C)/MWCNT 1% al EDL del biomodelo murino.

No se observó ninguna reacción adversa al tejido ni inflamación que pudiese comprometerlos, además, el andamio de PCL_(C)/MWCNT 1% muestra una excelente integración al tejido.

Resultados de la verificación para el andamio de PCL_(C)/MWCNT 5% (Figura 9.57).



Figura 9.57. Integración del andamio de PCL_(C)/MWCNT 5% al EDL del biomodelo murino.

No se observó ninguna reacción adversa al tejido ni inflamación que pudiese comprometer los tejidos, además, el andamio de PCL_(C)/MWCNT 5% muestra una excelente integración al tejido. Lo anterior significó que estos tejidos estaban listos para ser sometidos a pruebas de estimulación eléctricas de contracción muscular.

Los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% y PCL_(C)/MWCNT 5% fueron implantados en el músculo EDL de ratas wistar (Figuras 9.56 y 9.57). Los andamios implantados no presentaron ninguna respuesta inmune y su integración a 15 días de sacrificio de las ratas fue muy apropiado. Lo anterior indica que los andamios pueden ser puestos a prueba en regeneración de tejido cardíaco sin que los biomodelos presenten ningún tipo de respuesta inmune (o rechazo); esto da a entender, que los WMCNT en combinación con la PCL no presentan ninguna actividad citotóxica que pueda impactar el tejido implantado en el biomodelos.

No se encontraron artículos de PCL/MWCNT para aplicaciones cardíacas donde se hayan implantado en EDL en biomodelos murinos; sin embargo, sí se encontraron reportes como el de Leong, (2015) que implantó sus andamios de PCL en EDL de biomodelos murinos con el objetivo de ver la recuperación del ligamento cruzado anterior (LCA), dando resultados promisorios.

Vale la pena resaltar que esta parte de implantación de andamios de PCL_(C)/MWCNT en EDL para aplicaciones cardíacas es único e innovador, ya que no se pudo encontrar literatura similar a lo realizado en esta tesis doctoral.

9.16. PRUEBAS DE CONTRACCIÓN MUSCULAR CON LOS ANDAMIOS DE PCL_(C)/MWCNT

Los músculos estriados esqueléticos en su interior poseen fibras, filamentos y proteínas muy importantes como la miosina, actina, tropomiosina y la mioglobina, que son necesarios para que la contracción muscular se realice de manera adecuada (Brun, 2007; Carter, 2018).

La contracción muscular esquelética es regida por varias etapas que se resumirán a continuación (Brun, 2007; Carter, 2018):

1. Las células nerviosas que están en reposo (potencial de reposo) deben activarse y adquirir la fuerza suficiente como para realizar la contracción (potencial de acción).
2. Estas células nerviosas activadas liberan acetilcolina sobre las células musculares provocando una despolarización en la membrana que se transmite a lo largo del musculo.
3. La contracción dependerá de los iones Ca^{2+} , este ion calcio se une a la troponina que recubre la actina, deja libre los puntos de unión de la actina con la miosina; esto provoca una despolarización en la membrana que se transmitirá a lo largo del musculo.
4. Como la concentración de Ca^{2+} no es suficiente para producir la contracción, se permite la entrada de Ca^{2+} extracelular por los canales de calcio que se abren.
5. Los puntos de unión miosina-actina están libres y al unirse se produce la contracción. Una vez producida la contracción viene la relajación, donde se rompen los enlaces para que el músculo no esté contraído. Esta ruptura del enlace se produce gracias a la acción de la miosina y el ATP, que mediante hidrólisis rompe los enlaces. Este proceso se favorece, únicamente cuando la concentración de calcio disminuye.

El mecanismo descrito anteriormente, se muestra en la figura 9.58.

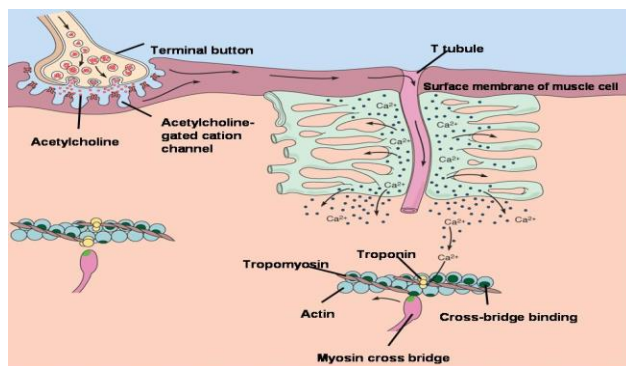


Figura 9.58. Representación gráfica de la contracción muscular, descrita anteriormente (Carter, 2018).

En la tabla 9.8 se muestran las pruebas de contracción muscular con los andamios de PCL_(C)/MWCNT

Tabla 9.8. Condiciones experimentales para las pruebas de contracción muscular con los andamios de PCL_(C)/MWCNT

Tipo de muestra	Condiciones de experimentación
Blanco	EDL sin ninguna lesión
Control	EDL electrofulgurado
PCL _(C) /MWCNT 1%	Con Células
PCL _(C) /MWCNT 1%	Sin Células
PCL _(C) /MWCNT 5%	Con Células
PCL _(C) /MWCNT 5%	Sin Células

De acuerdo con la anterior tabla 9.8, se realizaron pruebas de contracción muscular para los andamios PCL_(C)/MWCNT 1% y PCL_(C)/MWCNT 5% con y sin células. La Figura 9.59 muestra que la fuerza de contracción de los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% es inferior a la reparación natural, por lo que los andamios no serían adecuados en recuperación de la función contráctil. No obstante, la fuerza de contracción de los andamios de PCL_(C)/MWCNT 5% con células supera la fuerza de contracción de la reparación natural hasta en un orden de magnitud y en ordenes de magnitud a la fuerza de contracción del musculo electrofulgurado; estos resultados son muy promisorios, porque permiten la reparación natural de la función contráctil de músculo estriado esquelético y en musculo estriado cardiaco.

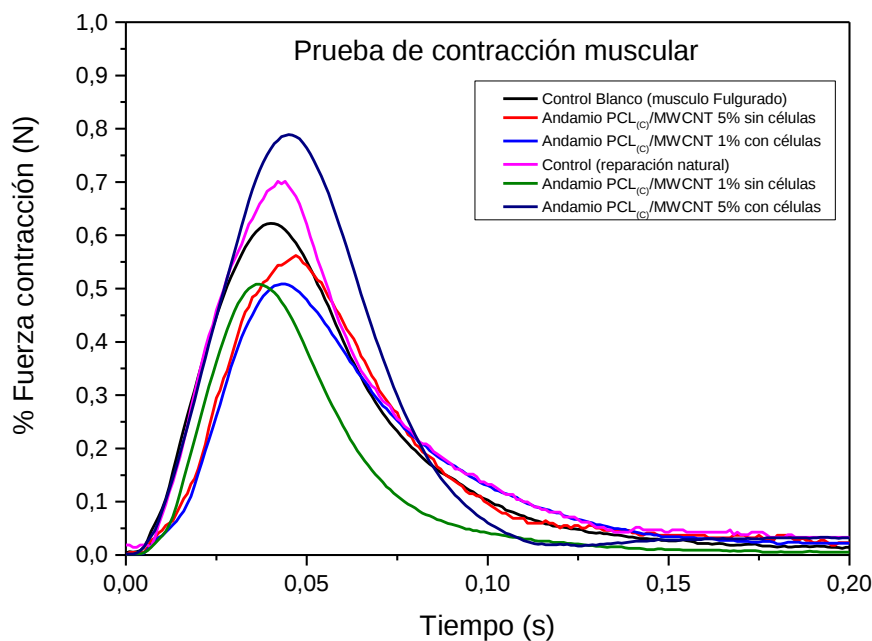


Figura 9.59. Resultados de la prueba de contracción muscular de los andamios de PCL_(c)/MWCNT del músculo EDL de biomodelos murinos.

Los andamios de PCL_(c)/MWCNT al 1% sin células y con células no tienen un efecto recuperador de la función contráctil comparadas con la reparación natural y con musculo electrofulgurado de la rata wistar (figura 9.60).

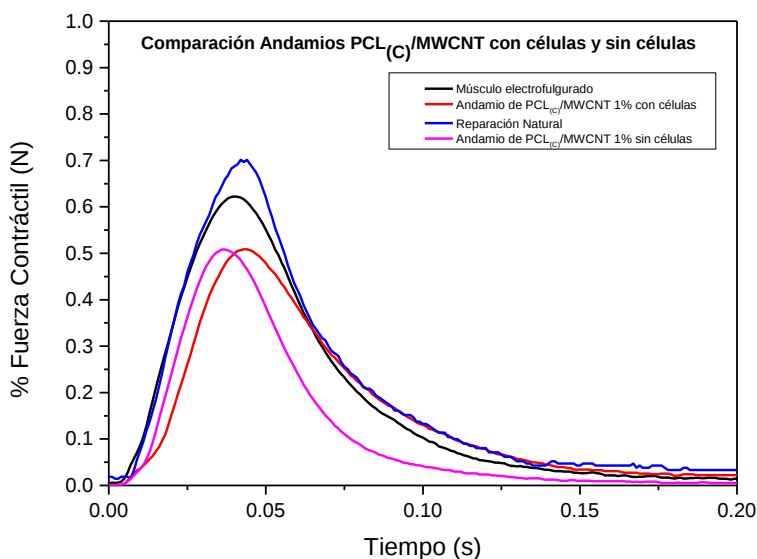


Figura 9.60. Comparación entre la fuerza de contracción muscular de los andamios de PCL(c)/MWCNT al 1% sin células y con células con respecto a la contracción muscular del musculo electrofulgurado y la contracción natural.

Ante la inquietud si el andamio de PCL(c)/MWCNT al 1% con células mejora la contracción muscular con respecto al PCL(c)/MWCNT al 1% sin células (Figura 9.61), se puede afirmar que aunque el valor de fuerza de contracción de los andamios de PCL(c)/MWCNT al 1% con células (0,5086 N) es mayor que el valor de fuerza de contracción de los andamios de PCL(c)/MWCNT al 1% sin células (0,5083) su diferencia es tan mínima que no hay incidencia significativa que el andamio de PCL(c)/MWCNT al 1% con células mejore la contracción muscular ya que los resultados de fuerza de contracción son muy similares.

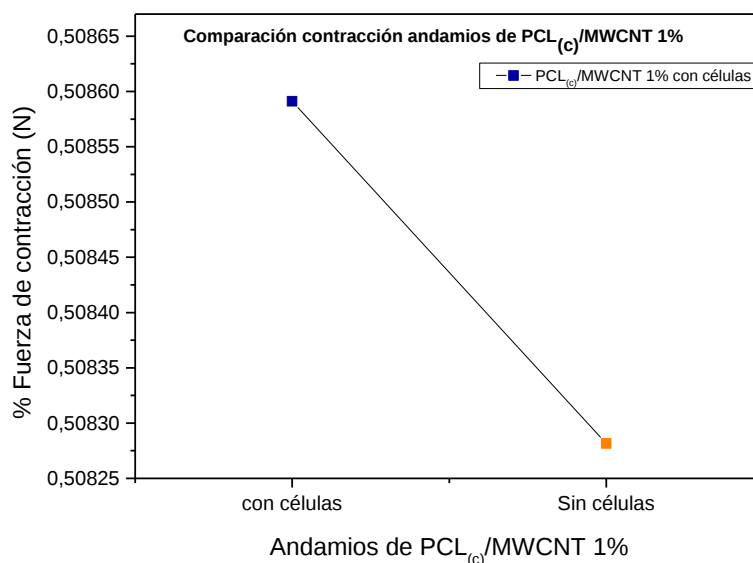


Figura 9.61. Comparación entre la fuerza de contracción muscular de los andamios de PCL(c)/MWCNT al 1% sin células y con células.

Por lo que esta prueba de contracción comprueba que estos andamios no son adecuados en la reparación de músculo estriado ni esquelético ni cardíaco. Pero pueden utilizado para otro tipo de aplicaciones que pueden ser estudiadas en trabajos de investigación a futuro.

La fuerza de contracción de los andamios de PCL(c)/MWCNT al 5% con células mejora la contracción muscular con respecto al PCL(c)/MWCNT al 5% sin células, a la reparación natural y a la contracción muscular con electrofulguración (Figura 9.62). Siendo estos andamios PCL(c)/MWCNT al 5% candidatos promisorios para ser utilizados en recuperación de la contracción de músculos no solo cardíacos sino también en músculos esqueléticos.

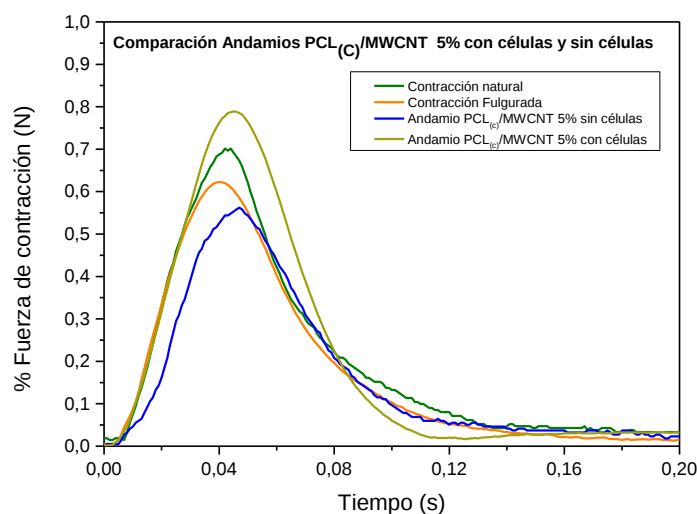


Figura 9.62. Comparación entre la fuerza de contracción muscular de los andamios de PCL_(c)/MWCNT al 5% sin células y con células con respecto a la contracción muscular del musculo electrofulgurado y la contracción natural.

Los andamios de PCL_(c)/MWCNT al 5% con células presentan una excelente capacidad de recuperación de fuerza en la contracción muscular (0,789 N) si los comparamos con respecto a los PCL_(c)/MWCNT al 5% sin células (0,562 N). Representando en una recuperación de la fuerza contráctil de un 28.77% mayor con respecto al andamio de PCL_(c)/MWCNT al 5% sin células (Figura 9.63).

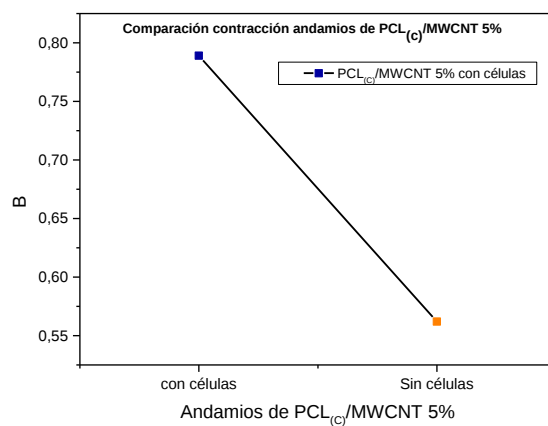


Figura 9.63. Comparación entre la fuerza de contracción muscular de los andamios de PCL_(c)/MWCNT al 5% sin células y con células.

Comparando la fuerza de contracción de los andamios de PCL_(c)/MWCNT al 5% con células (0,789 N), respecto a la fuerza de contracción del músculo electrofulgurado (0,622 N), representando una fuerza de contracción de un 21.16% mayor (Figura 9.64).

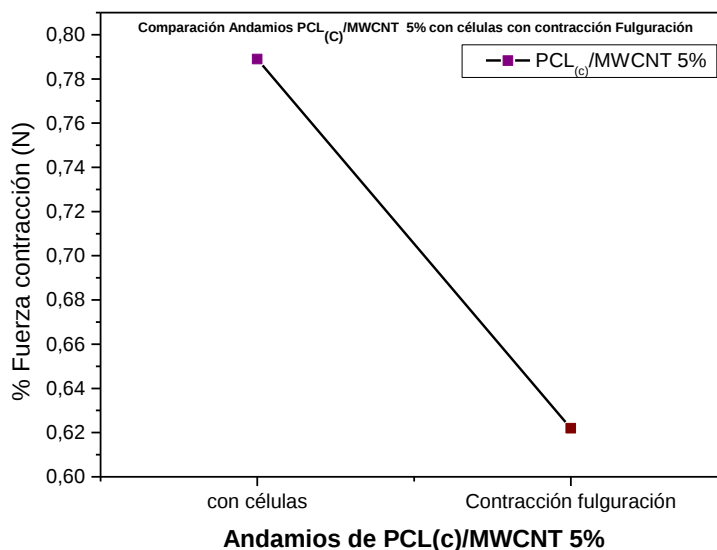


Figura 9.64. Comparación entre la fuerza de contracción muscular de los andamios de PCL_(c)/MWCNT al 5% con células con respecto a la fuerza de contracción del músculo fulgurado.

Los resultados obtenidos de la figura 9.64, quieren decir que si a una persona con lesión cardíaca se le implanta este biodispositivo de PCL_(c)/MWCNT al 5% con células diferenciadas, no solamente regenerará tejido, sino que reduciría el tiempo de recuperación enormemente. Disminuyendo así costos de hospitalización y de rehabilitación postinfarto.

Finalmente, se realizó la comparación entre la fuerza de contracción del andamio de PCL_(c)/MWCNT al 5% con células (0,789 N), con respecto a la fuerza de contracción ejercida naturalmente por el músculo (0,701 N), representando una fuerza de contracción de un 11.15% mayor (Figura 9.65).

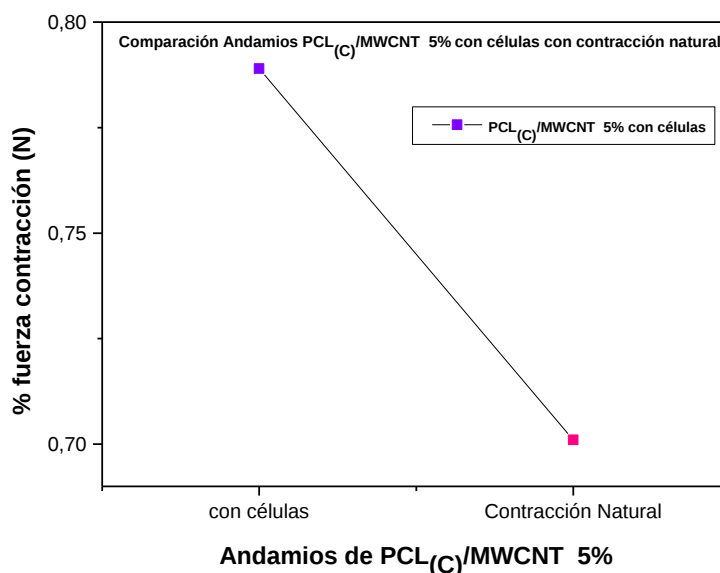


Figura 9.65. Comparación entre la fuerza de contracción muscular de los andamios de PCL_(c)/MWCNT al 5% con células con respecto a la fuerza de contracción del musculo natural.

Con base en los resultados obtenidos en la figura 9.65, los andamios de PCL_(c)/MWCNT al 5% con células mejorarían la fuerza de contracción, por lo que para el caso de deportistas de alto rendimiento se vería representado en un mejoramiento de la potencia muscular en sus respectivos deportes.

9.16.1. Análisis estadístico de los datos de contracción muscular obtenidos para los andamios de PCL/MWCNT

En la Tablas 9.9 y 9.10 se presentan los resultados del análisis de varianza para el modelo GAMM ajustado, donde se sugiere mediante los términos suavizados que la Contracción muscular cambian en función del tiempo (Términos suavizados: valor-p < 0.05).

Mediante la Tabla 9.9 se evidencia que la PCL(c) con MWCNT tiene un efecto significativo sobre la contracción muscular (Término paramétrico: valor-p <

0.05), encontrándose diferencias entre todas las condiciones evaluadas, donde los valores medios más elevados se obtienen en las condiciones experimentales PCL(c)/MWCNT 5% con células y Control EDL electrofulgurado, mientras que los valores medios más bajos se obtienen en las condiciones experimentales PCL(c)/MWCNT 1% con/sin células y PCL(c)/MWCNT 5% sin células (ver Tabla 9.14).

Tabla 9.9. Análisis de varianza de la Fuerza en el tiempo según PCL(c) con MWCNT.

Términos	Estadístico F	Valor-p	Resultado
Paramétricos:			
Tratamiento	3729	<2.0E-16	Significante
Suavizados:			
s(Tiempo): 1% - Con células	1270	<2.0E-16	Significante
s(Tiempo): 1% - Sin células	2452	<2.0E-16	Significante
s(Tiempo): 5% - Con células	11692	<2.0E-16	Significante
s(Tiempo): 5% - Sin células	2209	<2.0E-16	Significante
s(Tiempo): 1% - Blanco	4573	<2.0E-16	Significante
s(Tiempo): 1% - Control	5553	<2.0E-16	Significante

Tabla 9.10. Prueba de contrastes múltiples entre tratamientos con valores-p ajustados por el método de Bonferroni para la variable Fuerza.

Factor	Media	Desviación	Agrupación*
1% - Con células	0.1343	0.0996	a
1% - Sin células	0.1265	0.1429	b
5% - Con células	0.2695	0.3114	c
5% - Sin células	0.1115	0.1353	d
Blanco	0.1591	0.1951	e
Control	0.1930	0.2145	f

Lo anterior que permite analizar que el andamio de PCL_(C)/MWCNT 5% no solo tiene propiedades mecánicas y térmicas aptas para ser utilizado en regeneración muscular, sino que, una vez se completen las investigaciones de rigor y protocolos, a futuro podría aumentar la velocidad de recuperación de aquellas personas que hayan tenido alguna lesión muscular o cardíaca, como también de deportistas de alto rendimiento.

En suma, esta tesis presenta evidencias que soportan la hipótesis enunciada, lográndose que el material compuesto de PCL soportado con MWCNT-NH₂ sirviera como andamio para crecimiento de células de músculo estriado incluyendo cardiomiocitos. Este trabajo es innovador, ya que las aplicaciones de PCL/MWCNT más importantes han sido para hueso (ver estado del arte) y para uso odontológico, aunque se reconoce que este es un primer paso para la cadena de investigaciones que se podrían derivar del presente trabajo.

10. CONCLUSIONES

- En el laboratorio, es posible realizar exitosamente la síntesis de PCL de alto peso molecular mediante ROP por coordinación-inserción utilizando ϵ -caprolactona como monómero y $\text{Sn}(\text{OCT})_2$ como iniciador. La PCL sintetizada es muy similar al PCL comercial, a juzgar por las bandas resultantes del análisis por FT-IR, RAMAN.
- Las propiedades térmicas de la PCL sintetizada y PCL comercial son muy similares, al ser comparadas por medio de DSC. Este comportamiento térmico similar se extiende a las temperaturas T_m , T_c y T_d de las dos PCL.
- La pérdida de peso de la PCL sintetizada es muy similar a la PCL comercial, con lo cual se comprueba que la PCL sintetizada es de alto peso molecular. No obstante, en la espectroscopia de masas se encontró que la PCL comercial posee peso molecular más elevado que la PCL sintetizada, esto se debe a que el tiempo de polimerización de la sintetizada fue de 48 h y ésta no posee plastificante. Aun así, la sintetizada registró un peso molecular elevado de 451 g/mol
- Mediante ultrasonido es posible lograr la funcionalización de la PCL comercial y sintética con los MWCNT, dando como resultados materiales compuestos de $\text{PCL}_{(S)}/\text{MWCNT}$ y membranas de $\text{PCL}_{(C)}/\text{MWCNT}$. Los acoplamiento más adecuados para los objetivos de esta tesis se realizaron con tres porcentajes, 1%, 3% y 5% de MWCNT con respecto a la PCL. Mediante RAMAN se verificó el correcto acoplamiento químico de los materiales compuestos de $\text{PCL}_{(S)}/\text{MWCNT}$ y membranas de $\text{PCL}_{(C)}/\text{MWCNT}$.
- Los andamios de $\text{PCL}_{(S)}/\text{MWCNT}$ y membranas de $\text{PCL}_{(C)}/\text{MWCNT}$ registraron propiedades térmicas que disminuyen a medida que se incrementa la cantidad de MWCNT

- El porcentaje de pérdida de peso de los andamios PCL_(S)/MWCNT y los del PCL_(C)/MWCNT fueron muy similares, con un leve descenso en la temperatura de degradación a medida que se incrementa la cantidad de MWCNT.
- El módulo elástico de los andamios de PCL_(C)/MWCNT registraron que el andamio más flexible es el de PCL_(C)/MWCNT 1%, mientras que el andamio más rígido es el de PCL_(C)/MWCNT 5%.
- Las resistencias máximas de los andamios registraron que el andamio que más resistencia tiene es el PCL_(C)/MWCNT 5% y el de menor resistencia es el andamio de PCL_(C)/MWCNT 1%.
- En las fracturas de los andamios de PCL_(C)/MWCNT se pudo comprobar la presencia de hilos, lo que supone que los MWCNT actuaron como refuerzo ante una ruptura del andamio.
- Las pruebas de nanoindentación arrojaron que los andamios de PCL_(C)/MWCNT presentan durezas muy elevadas de 10 a 12 GPa, siendo andamios muy estables a la hora de ser implantados. Las pruebas de desplazamiento muestran un material viscoelástico con un porcentaje de recuperación alto.
- Los XRD mostraron que a medida que se aumenta la cantidad de MWCNT los andamios se vuelven más cristalinos, lo que hace potenciar sus propiedades térmicas y mecánicas.
- Los andamios de PCL_(C)/MWCNT al 1%, mostraron baja interconectividad de poro, por consiguiente, una mayor densidad; mientras que la porosidad y la interconectividad fue aumentando a medida que fue aumentando la cantidad de MWCNT en los andamios hasta obtener poros de tamaño adecuado para que las células musculares se puedan anclar y puedan tener una adecuada funcionalidad.

- Las pruebas de conductividad eléctrica mediante impedancia mostraron que tanto la PCL_(C) como los andamios de PCL_(C)/MWCNT 1% no poseen conductividad, mientras que los andamios de PCL_(C)/MWCNT 3%, mostraron una conductividad media y los andamios de PCL_(C)/MWCNT 5%, mostraron una conductividad adecuada.
- En la prueba de citotoxicidad por MTT se determinó que la PCL_(C) no es citotóxica con un valor de viabilidad del 82%, mientras que los andamios del PCL_(C)/MWCNT 1% y PCL_(C)/MWCNT 3% mostraron toxicidad alta con un 58% de viabilidad. Caso contrario ocurrió con los andamios de PCL_(C)/MWCNT 5% que registraron una citotoxicidad muy baja, con una viabilidad del 90%.
- Los andamios en los tres porcentajes (1%, 3% y 5%) mostraron viabilidad celular a los 4, 8 y 15 días de haber implantado las células diferenciadas.
- Las pruebas de contracción muscular mostraron que los andamios de PCL_(C)/MWCNT 5%, fueron los que mejores resultados de fuerza de contracción registraron, incluso por encima de la reparación natural, lo que indica su potencial en la disminución del tiempo de recuperación en pacientes con algún tipo de lesión muscular.
- Se desarrolló un andamio de PCL/nanotubos de carbono conductor eléctrico, y absorbible, que permitió la adherencia de células musculares estriadas cultivadas, como cardiomiocitos.

11. IMPACTOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

No existe en el mundo un biodispositivo implantable que sea bioabsorbido y completamente funcional para recuperar la capacidad contráctil, por condiciones metabólicas, por lo anterior, se han realizado numerosas publicaciones tanto nacionales como internacionales en regeneración de tejidos, abarcando específicamente el área de remodelación cardíaca jugando un papel significativo en el desarrollo de la investigación y conocimiento en este específico tema. Pero no se ha llegado a un andamio de este tipo que tenga en cuenta características como flexibilidad, biodegradabilidad, no citotoxicidad, propiedades eléctricas y conductoras, así como la diferenciación celular de cardiomiocitos. desarrollar este andamio de PCL/MWCNT y que puedan sobrevivir puedan ser funcionales, mejorando el funcionamiento. De poder ponerse a prueba la hipótesis y lograr los objetivos se contribuiría enormemente a la baja de la tasa de mortalidad y morbilidad asociada a la insuficiencia cardíaca crónica, mejorando la calidad de vida de las personas y disminuyendo los costos de incapacidad causados por esta enfermedad en el sistema de salud y social.

12. ESTRATEGIAS DE COMUNICACIÓN

Los resultados de este proyecto de tesis serán divulgados y transferidos por medio de las siguientes actividades:

- ✓ Presentación de los resultados del proyecto a nivel nacional e internacional mediante ponencias y congresos.
- ✓ Transferencia al sector científico y productivo de los resultados mediante sometimiento de artículos en revistas especializadas en el tema de ingeniería de tejidos.
- ✓ Transferencia al sector científico y productivo de los resultados mediante la publicación de un artículo de la rúbrica sobre la selección de artículos esenciales para su trabajo de investigación en revistas especializadas en el tema de educación y salud.
- ✓ Presentación de un programa para un curso de Introducción a los Biomateriales en ingeniería de tejidos que podrá ser dictado a estudiantes de pregrado en Ingenierías y postgrado salud.

13. RECURSOS CONTACTOS E INFRAESTRUCTURA

Los recursos humanos disponible para desarrollar esta investigación son:

- ✓ Estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Valle,
M.Sc. José Peñaranda Armbrecht
- ✓ Director de Tesis Doctoral: Doctor José Óscar Gutiérrez Montes, M.Sc.
Facultad de Salud, director del grupo de Medicina Regenerativa y
farmacología Universidad del Valle.
- ✓ Codirector: Ph.D. Julio Cesar Caicedo Angulo profesor de la escuela de
Ingeniería de Materiales de la Universidad del Valle.
- ✓ Codirectora de tesis doctoral, Ph. D. Paola Andrea Neuta Arciniegas, facultad
de ingenierías, Universidad Autónoma de Occidente.
- ✓ Apoyo por parte del profesor Santiago Castaño Valencia, Ph.D, profesor de
la facultad de salud.
- ✓ Apoyo por parte de la profesora Ph D. Inge Armbrecht, profesora del
Departamento de Biología, facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la
Universidad del Valle.
- ✓ Apoyo por parte de los Doctores Diana Yamileth Velásquez y el Doctor Paulo
Cesar, del SENA ASTIN sección de Tecnoacademia regional Valle del
Cauca.
- ✓ Apoyo del grupo de Farmacología Univalle de la facultad de salud.

14. REFERENCIAS

Albertsson, A-C., & Varma, I.K. (2003). Recent development in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications. *Biomacromolecules*. **4**: 1466-1486.

Alteköester, A.K., & Harvey, R.P. (2015). Bioengineered FSTL1 Patches Restore Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Trends in Molecular Medicine*. **TRMOME 1078**. 1-3.

American College of Cardiology Committee. (2000). Myocardial Infarction Redefines- A Consensus Document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. **36:3**; 1-17.

Anderson, J.M., Rodriguez, A., & Chang, D.T. (2008). Foreign Body Reaction to Biomaterials. *Semin. Immunology*. **20:2**. 86-100.

Anwaar-Nazeer, M., Yilgor, E., & Yilgor, I. (2019). Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer*. **168**: 86-94.

Ashtari, K., Nazari, H., Ko, H., Tebon, P., et al. (2019). Electrically conductive materials for cardiac tissue Engineering. *Advanced Drugs Delivery Reviews*. **144**: 162-179.

Ates, M., Akdogan, A., & Eker, B. (2017). Carbon nanotube-based nanocomposite and their applications. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 1-22.

Atzet, S., Curtin, S., Trinh, P., Bryant, S., & Ratner, B. (2008). Degradable Poly (2-hydroxyethyl methacrylate)-co- Polycaprolactone Hydrogels for Tissue Engineering Scaffolds. *Biomacromolecules*. **9**: 3370-3377.

Balint, R., Cassidy, N.J., & Cartmell, S.H. (2014). Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 1-13.

Banaszcyk, J., Schwarz, A., De Mey, G., & Van Langenhove, L. (2010). The Van de Pauw Method for Sheet Resistance Measurements of Polypyrrole-Coated Para-aramide Woven Fabrics. *Journal of Applied Polymer Science*. **117**: 2553-2558.

Bello, A., Grima, M., & Laredo, E. (2014). Conductividad Eléctrica de Nanocompuestos Polímero/Nanotubos de Carbono en PCL y en la mezcla PCL/PLA. *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V.* **29:1**. 127-132.

Benedicta-Edwards, M., Draper, E.R., Hand, J.W., Taylor K. & Young, I.R. (2005). Mechanical testing of humans cardiac tissue: some implications for MRI safety. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*. **7:1**. 835-840.

Berger, C., Poncharal, P., Yi, Y., & De Heer, W. (2003). Ballistic Conduction in Multiwalled Carbon Nanotubes. *Journal of Nanoscience & nanotechnology*. **3: (1-2)**. 171-177.

Berry, M.F., Engler, A.J., Woo, Y.J., Pirolli, T.J. Bish, L.T., et.al. (2006). Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *American journal Physiological Heart Circulation Physiology*. **290**: H2196-H2203.

Bicknell, K.A., Coxon, C.H. & Brooks, G. (2007). Can the cardiomyocyte cell cycle be reprogrammed? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **42**: 706-721.

Blackwell, C., Haernvall, K., Guebitz, G.M., Groombridge, M., Gonzales, D., & Khosravi, E. (2018). Enzymatic degradation of Star Poly(ϵ -caprolactone) with different Central Units. *Polymers*. **10**: 1266.

Brun, C.E., Chevalier, F.P., Dumont, N.A., & Rudnicki, M.A. (2017). The Satellite Cell Niche in Skeletal Muscle. *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*. 1-22.

Bursac, N. (2009). Cardiac Tissue Engineering Using Stem Cells. *Eng Med Biol Mag*. **28**:2. 80-89.

Callegaro, L. (2009). The metrology of electrical impedance at high frequency: a review. *Measurement Science and Technology*. **20**: 1-15.

Castilla-Cortázar, I., Más-Estellés, J., Meseguer-Dueñas, J.M., Escobar, J.L., Et.Al. (2012). Hydrolytic and enzymatic degradation of Poly(ϵ -caprolactone) network. *Polymer Degradation and Stability*. **97**: 1241-1248.

Carrasco, F., Pagès, P., Gámez-Perez, J., Santana, O.O., & Mashpoch, M.L. (2010). Processing of Poly (lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties. *Polymer Degradation and Stability*. **95**: 116-125.

Carter, S., Solomon, T.P. (2018). In vitro experimental models for examining the skeletal muscle cell biology of exercise: the possibilities, challenges and future developments. *European Journal of Physiology*. 1-17.

Carvalho, P.H., Falci, A.P., Souza, B., Silva, B., et.Al. (2012). Differentiation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Into Cardiomyocytes. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. **100**:1. 82-89.

Chandika, P., Heo, S-Y., Kim, T-H., Oh, G-W., et.Al. (2020). Recent advances in biological macromolecule-based tissue-engineered composite scaffolds for cardiac

tissue regeneration applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. **164**: 2329-2357.

Che, H-L., Muthiah, M., Ahn, Y., Son, S., Kim, W.J. et.al. (2011). Biodegradable Particulate Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor Plasmid from Polycaprolactone/Polyethylenimine Electrospun Nanofibers for the treatment of Myocardial Infarction. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **11:1**. 7073-7077.

Chisholm, S.H., Galluci, J.C., & Kremper, C. (2007). Ring-opening polymerization of L-Lactide by organotin(IV)alkoxides, $R_2Sn(OPr^i)_2$: Estimation of the activation parameters. *Polyhedron*. **26**: 4436-4444.

Choi, S.H., & Park, T.G. (2012). Synthesis and Characterization of elastic PLGA/PCL/PLGA tri-block copolymers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. **13**:10. 1163-1173.

Collins, M.N., Ren, G., Younh, K., Pina, S., et.al. (2021). Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials*. **31**: 1-22.

Criollo, W.D. (2013). Ensayo Citotoxicidad *in vitro* de un biocompuesto. *Bacteriología y Laboratorista Clínico. Especialista en Cultivos Celulares*. 1-13.

Coats, A.W. & Redfren, J.P. (1968). Thermogravimetric Analysis. *Analyst*. **88**. 906-923.

Cui, Z., Yang, B., & Ren-Ke, Li. (2016). Application of Biomaterials in Cardiac Repair and Regeneration. *Engineering*. **2**: 141-14nsbourg, D.J., & Karroonnirum, O. (2010). Ring-Opening Polymerization of L-Lactide and ϵ -Caprolactone Utilizing Biocompatible Zinc Catalyst. Random Copolymerization of L-Lactide and ϵ -Caprolactone. *Macrocolecules*. **43**: 8880-8886.

Darensbourg, D.J. & Karroonnirum, O. (2010). Ring-Opening Polymerization of L-Lactide and ϵ -caprolactone Utilizing Biocompatible Zinc Catalyst. Random Copolymerization of L-Lactide and ϵ -caprolactone. *Macromolecules*. **43:1**. 8880-8886.

De la Vega, H. (2009). Nanotubos de Carbono y sus aplicaciones en la electrónica. *Trabajo de pregrado de Ingeniero Electrónico*, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Dehghani, M.H., Kamalian, S., Shayeghi, M., Yousefi, M. et al. (2019). High-performance removal of diazinon pesticide from water using multiwalled carbon nanotubes. *Microchemical Journal*. 1-20.

Doh, J., Park, sang-In., Yang, Q., & Raghavan, N. (2021). Uncertainty quantification of percolating electrical conductance for wavy carbon nanotube-filled polymer composites using Bayesian inference. *Carbon*. **172**: 308-323.

Dong, C.M., Qiu, K.Y., Gu, Z.W., & Feng, X.D. (2001). Synthesis of star-shaped poly(ϵ -caprolactone)-b-poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) with multifunctional Initiator and stannous octoate catalyst. *Macromolecules*. **34**: 4691-4696.

Dong, C.M., Guo, Y.z., Qiu, K.Y., Gu, Z.W. & Feng, X.D. (2005). In vitro degradation and controlled release behavior of D,L-PLGA 50 and PCL-b-D,L-PLGA50 copolymer microspheres. *Journal of Controlled Release*. **107**: 53-64.

Donghui, Jing, B.S., Abhirath Parikh, B.S., Canty, J.M., & Tzanakakis, E.S. (2008). Stem Cells for Heart Cell Therapies. *Tissue Engineering: Part B*. **14:4**. 393-406.

Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*. 1-13.

Elzein, T., Nasser-Eddine, M., Delaite, C, Bistac, S., & Dumas, P. (2004). FTIR study of polycaprolactone chain organization al interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. **273:1**. 381-387.

Feng, R., Song, Z., & Zhai, G. (2012). Preparation and in vivo pharmacokinetics of curcumin-loaded PCL-PEG-PCL triblock copolymeric nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. **7**: 4089-4098.

Flores-Cedillo, M.L., Alvarado-Estrada, K.N., Pozos-Guillén, A.J. et.al. (2016). Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone scaffolds seeded with human dental pulp stem cells for bone tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Mater Med*. **27:35** 1-12.

Franco, J.A., Kloefkorn, H.E., Hochman, S., & Wilkinson, K.A. (2014). An *In Vitro* Adult Mouse Muscle-nerve Preparation for Studying the Firing Properties of Muscle Afferents. *Journal of Visualized Experiments*. **91**:1-6.

Fredericks, S., Merton, G.K., Lerena, M.J., Heining, P., Carter, N.D., & Holt, D.W. (2001). Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory animals. *Clinica Chimica Acta*.**304**: **65-74**.

Gbaguidi, A., Namilae, S., & Kim, D. (2019). Stoichastic percolation model for the effect of nanotube agglomeration on the conductivity and piezoresistivity of hybrid nanocomposites. *Computational Materials Science*. **166**: 9-19.

George, N., Varghese, G.A., & Joseph, R. (2019). Improved mechanical and barrier properties of Natural rubber-Multiwalled carbon nanotube composites with segregated network structure. *Materials today: proceedings*. 9:1. 13-20.

Ghaziof, S., & Nahrkhalaji, M. (2017). Preparation, Characterization, Mechanical Properties and Electrical Conductivity Assessment of Novel Polycaprolactone/Multi-Wall Carbon Nanotubes Nanocomposites for Myocardial Tissue Engineering. *Acta Physica Polonica A*. **131**: 428-431.

Gómez, E. (2016). Capítulo 2. Introducción, epidemiología de la falla cardiaca e historia de las clínicas de falla cardiaca en Colombia. *Revista Colombiana de Cardiología*. 1: 6-12.

Guarino, V., Gentile, G., Ambrosio, L., & Sorrentino, L. (2017). Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. 1-36.

Guillén-Girón, T. (2018). Fabricación de filamentos de PCL y PVA reforzados con HAp para ser usados en impresión 3D. *Tecnología en Marcha*. **31**:2. 58-71.

Guzmán-Muñoz, E., & Méndez-Rebolledo, E. (2018). Electromiografía en las Ciencias de la Rehabilitación. *Salud Uninorte*. **34**:3. 753-765.

Haghighi, M., Ansari, M., Hassanzadeh-Aghdam, M.K. & Nankali, M. (2019). Analytical formulation for electrical conductivity and percolation threshold of epoxy multiscale nanocomposites reinforced with chopped carbon fibers and wavy carbon nanotubes considering tunneling resistivity. *Composites Part A*. **126**: 1-11.

Han, J., Park, J., & Kim, B.S. (2015). Integration of mesenchymal stem cells with nanobiomaterials for the repair of myocardial infarction. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **95**: 15-28.

Haywood, L.J.(1988). Treatment of myocardial infarction: A review. *Journal of the National Medical Association*. **80**:4. 459-461.

Herreros, J., Chachques, J.C., Trainini, j. Pontón, A., et.al. (2011). Regeneración Celular Cardiaca. *Cirugía Cardiovascular*, **18**:3, 207-215.

Hiemenz, P., Lodge, T. (2007). Polymer Chemistry. 2 Ed. Boca Raton: CRC Press. **96**: 336, 338–339 pp.

Ho, C.M.B., Lin, A.M.P.T.P., Ng, S.H., Yeong, W.Y., Et.Al. (2016). 3D Printed Polycaprolactone Carbon Nanotube Composite Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering. *Micromolecular Bioscience*. 1-9.

Huang, M.H., Coudane, J., Li, S. & Vert, M. (2005). Methylated and pegylated PLA-PCL-PLA block copolymers via the chemical modification of di-hydroxy PCL combined with the ring opening polymerization of lactide. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. **43**: 4196-4205.

Huang, B. Vyas, G., Roberts, I., Poutrel, Q-A., Et. Al. (2019). Fabrication and characterization of 3D printed MWCNT composites porous scaffolds for bone regeneration. *Materials Science & Engineering C*.**98**: 266-278.

Hudecki, A., Lyko-Morawska, D., Likus, W., Skonieczna, M., et.al. (2019). Composite Nanofibers Containing Multiwall Carbon Nanotubes as Biodegradable Membranes in Reconstructive Medicine. *Nanomaterials*. **9**:**63**. 1-16.

Hutmacher, D. (2001). Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives. *Biomaterials Science*. **12**:**1**. 107-124.

Jecg, S., Vempati, S., Dawson, P., Knite, M., Linarts, A. et al. (2015). Electrical conduction and rheological behavior of composites of Poly(ϵ -caprolactone) and MWCNTs. *Polymer*. **58**: 209-221.

Jenča, D., Melenovský, V., Stehlik, J., et.al. (2021). Heart Failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC heart Failure*. **8**: 222-237.

Jin, J., Jeong, S.I., Shin, Y.M., Lim, K.S., Shin, H.S. et.al. (2009). Transplantation of mesenchymal stem cells within a poly(lactide-co- ϵ -caprolactone) scaffold improves cardiac function in a rat myocardial infarction model. *European Journal of Heart Failure*. **11**: 147-153.

Johnson, T., & Christman, K.L. (2012). Injectable hydrogel therapies and their delivery strategies for treating myocardial infarction. *Expert Opin. Drug Delivery*. **10:1**. 59-72.

Kazemi, F., Mohammadpour, Z., Naghib, S.M., Zare, Y. & Rhee, K.Y. (2021). Percolation onset and electrical conductivity for a multiphase system containing carbon nanotubes and nanoclay. *Journal of Material Research and Technology*. **15**: 1777-1788.

KIT ROCHE. Versión 6, may 2004, kit for 2000 test store at- 15 to -25°C.

Kricheldorf, H.R., Kreiser-Saunders, I., & Boettcher, C. (1995). Polylactones: 31. Sn(II)octoate-initiates polymerization of L-lactide: a mechanistic Study. *Polymer*. **36:(6)**. 1253-1259.

Kricheldorf, H.R. (2001). Syntheses and application of polylactides. *Chemosphere*. **45**: 49-54.

Kotula, A.P., Snyder, C.R., & Migler, K.B. (2017). Determining conformational order and crystallinity in polycaprolactone via Raman spectroscopy. *Polymer*. **117**: 1-10.

Kong, Y., Yuan, J., & Qiu, J. (2012). Preparation and Characterization of aligned carbon nanotubes/polylactic acid composite fibers. *Physica B*. **407**: 2451-2457.

Kumar, A., Patel, A., Duvalsaint, L., Desai, M & Marks, E. (2014). Thymosin β 4 coated nanofiber scaffolds for the repair of damaged cardiac tissue. *Journal of Nanobiotechnology*. **12**:(10). 47-55.

Lang, M., Bei, J., & Wang, S. (2012). Synthesis and Characterization of Polycaprolactone/poly (ethylene oxide)/polylactide-tri-component polymers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. **10**:4. 501-512.

Leoni, G & Soehnlein, O. (2018). (Re) Solving Repair After Myocardial Infarction. *Frontiers in Pharmacology*. 1-7.

Leor, J., Landa, N., & Cohen, S. (2006). Renovation of the injured heart with myocardial tissue engineering. *Expert review of cardiovascular therapy*. **4**:2. 239-252.

Liang, D., Hsiao, B.S. & Chu, B. (2007). Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **59**: 1392-1412.

Li, X., & Bhushan, B. (2002). A review of nanoindentation continuous stiffness measurement technique and its applications. *Materials Characterization*. **48**: 11-36

Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. (2015). Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices (Review). *Biomedical Reports*. **3**:1. 617-620.

Lindsey, M.L., Bolli, R., Canty, Jr, J.M., Du, X.J., et.al. (2018). Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *American Journal of Physiol Heart Circ Physiology*. **314**: H812-H838.

Lipik, V.T., & Abadie, JM. (2010). Process Optimization of Poly(ϵ -caprolactone) Synthesis by Ring Opening Polymerization. *Iranian Polymer Journal*. **19:11**. 885-893.

Liu, Y., Xu, Y., Wang, Z., Wen, D., Zhang, W., et.al. (2016). Electrospun nanofibrous sheets of collagen/elastin/polycaprolactone improve cardiac repair after myocardial infarction. *American Journal of Trans. Res*. **8:4**. 1678-1694.

Lobo, B., Hermosa, C., Abella, A., & Gordo, F. (2018). Electrical impedance tomography. *Annals of Traslational Medicine*. **8:6**. 1-9.

Lu, C., Liu, L., Guo, S.R., Zhang, Y., Li, Z & Gu. J. (2007). Micellization and gelation of aqueous solutions of star-shaped PEG-PCL block copolymers consisting of branched 4-arm poly(ethylene glycol) and polycaprolactone blocks. *European Polymer Journal*. **43**: 1857-1865.

Lu, C., Guo, S-R., Zhang, Y., & Yin, M. (2006). Synthesis and aggregation behavior of four types of different shaped PCL-PEG block copolymers. *Polymer International*. **55:694**. 694-700.

Mano, J.F., Hungerford, G., & Gómez, J.L. (2008) Bioactive Poly (L-Lactic Acid)-Chitosan Hybrid Scaffolds. *Materials Science and Engineering C* **28**: 1356- 1365.

Mariani, E., Lisignoli, G., Borzì, R.M. & Pulsatelli, L. (2019). Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response? *International Journal of Molecular Sciences*. **20:636**. 1-42.

Martín, J.M.A.(2003). Láminas delgadas y recubrimientos: Preparación, propiedades y aplicaciones. Editorial CSIC-CSIC Press

Martín, N. (2011). Sobre fullerenos, nanotubos de carbón y grafenos. *ARBOR ciencia, Pensamiento y Cultura*. 115-131.

Masumoto, H., Ikuno, t., Takeda, M., Fukushima, H, et.al. (2014). Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. *Scientific Reports*. **4**: 1-7.

Mattioli-Belmonte, M., Vozzi, G., Whulanza, Y., Seggiano, M. et. al. (2012). Tuning polycaprolactone-carbon nanotube composites for bone tissue engineering scaffolds. *Materials Sciences and Engineering C*. **32**: 152-159.

McMahan, S., Taylor, A., Copeland, K.M. & Pan. Z. (2019). Current advances in biodegradable synthetic polymer based cardiac patches. *Journal of Biomedical Materials Resolution*. **108**: 972-983

MC MURRY, J. (2000). Química orgánica. 5 Ed. México: Thomson Learning. 452-454 pp.

Meng, Z.X., Zheng, W., Li, L., & Zheng, Y.F. (2010). Fabrication and Characterization of three-dimensional nanofiber membrane of PCL-MWCNTs by electrospinning. *Materials Science and Engineering C*. **30**: 1014-1021.

Meng, Z, He, J., Xia, Z., & Li, D. (2020). Fabrication of microfibrous PCL/MWCNTs scaffolds via melt-based electrohydrodynamic printing. *Materials Letters*. **278:1**. 1-5.

Ming-Dong, C., Guo, Y-Z., Qiu, K-Y., Gu, Z-W., & Feng, X-D. (2005). In vitro degradation and controlled release behavior of D,L-PGLA50 and PCL-b-D,L-PGLA50 copolymer microspheres. *Journal of Controlled Release*. **107:1**. 53-64.

Misión Colombia Envejece. (2015). Cifras, Retos y Recomendaciones. ISBN (online): 978-958-58408-7-4

Moreno, J. (2021). Cómo se comunican eléctricamente las células del corazón. Libro de la salud Cardiovascular. Ed. Universidad Nacional de Colombia.

Moscoso, I., Centeno, A., López, E., Rodríguez-Barbosa, J.I., Et.Al. (2005). Differentiation “In Vitro” of Primary and Immortalized Porcine Mesenchymal Stem Cells into Cardiomyocytes for Cell Transplantation. *Transplantation Proceedings*. **37:1**. 481-482.

Mutiso, R.M., & Winey, K.I. (2012). Nanostructured Polymer Materials and Thin Films. *Polymer Science: A*. **43**: 1-8.

Naughton-Duszová, A., Csanádi, T., Sedlák, R., Hvizdos, P., & Dusza, J. (2019). Small-Scale Mechanical Testing of Cemented Carbides from the Micro- to the Nano-Level: A review. *Metals*. **9:502**. 1-26.

Nelson, D., Ma, Z., Fujimoto, K.L., Hasshizume, R., & Wagner, W.R. (2011). Intramyocardial biomaterial injection therapy in the treatment of heart failure: Materials, outcomes and challenges. *Acta Biomaterialia*. **7**: 1-15.

Neuta, P.A. (2013). Implementación de un modelo pre-clínico con aloinjertos de células mesenquimales diferenciadas para prevenir la insuficiencia cardiaca crónica secundaria a un infarto agudo de miocardio. *Tesis de Doctorado*. Universidad del Valle, Cali. Colombia.

Ohnishi, S., Sumiyoshi, H., Kitamura, S., & Nagaya, N. (2007). Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Letters*. 3961-3966 Oledzka, E., & Narine, S.S. (2011). Organic Acids Catalyzed Polymerization of ϵ -caprolactone Synthesis and Characterization. *Journal of Applied Polymer Science*. **119**: 1873-1882.

Pack, J.W., Kim, H., Cho, I-Whan., Park, S.Y. & Kim, Y.H. (2001). Microstructure Analysis and Thermal Property of Copolymers Made of Glycolide and ϵ -Caprolactone by Stannous Octoate. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. **40**: 544-554.

Pan, L., Pei, X., He, R., Wan, Q., & Wang, J. (2012). Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **93**: 226-234.

Paulson, K., Lionheart, W., & Pidcock, M. (1993). Optimal Experiments in Electrical Impedance Tomography. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. **12**:4. 681-686.

Peña, B., Laughter, M., Jett, S., Rowland, T.J. et.al. (2018). Injectable Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*. **18**: 1-22.

Peñaranda-Armbrecht, J., Agudelo, C., Zuluaga, F & Valencia, C. (2016). Synthesis of Poly (Lactic Acid) and Production of Scaffolds by Electrospinning. *MOJ Proteomics & Bioinformatics*. **4**:6. 1-11.

Peñaranda-Armbrecht, J. (2013). Síntesis de Poli (ácido L-Láctico) de alto peso molecular, aplicación en electrohilado y fabricación de matrices usadas en crecimiento celular de fibroblastos. *Trabajo de grado de Maestría*, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Piedrahita, W.F., Aperador, W., Caicedo, J.C. & Prieto, P. (2017). Evolution of Physical properties in hafnium carbonitride thin films. *Journal of Alloys and Compounds*. **690:1**. 485-496.

Potschke, P., Villmow, T., & Krause, B. (2013). Melt mixed PCL/MWCNT composites prepared at different rotation speeds: Characterization of Rheological, thermal, and electrical properties, molecular weight, MWCNT macrodispersion, and MWCNT length distribution. *Polymer*. **54**: 3071-3078.

Porras-Reyes, B.H & Mustoe, T.A. (1992). Cicatrización: conceptos actuales. *Acta Médica Colombia*. **17:1**. 31-45.

Prosper-Cardoso, F., Herreros, J., & Alegría, E. (2003). Stem Cells to Regenerate Cardiac Tissue in Heart Failure. *Revista Española de Cardiología*. **10:9**. 935-939.

Rangappa, S., Fen. C., Lee, E.H., Bongso, A., & Wei, S.E. (2003). Transformation of Adult Mesenchymal Stem Cells Isolated From the Fatty Tissue Into Cardiomyocytes. *Annals Thoracic Surgery Journal*. **75:1** 775-779.

Realpe, F., Agredo, G., & Zarama, Y.C. (2012). Manual de procedimientos y protocolos en el laboratorio de patología de un hospital nivel III de la ciudad de Popayán. Año 2012. Trabajo de grado de pregrado.

Revista Colombiana de Cardiología. (2008). Guías Colombianas de cardiología, Síndrome Coronario Agudo sin Elevación del ST (Angina inestable e infarto agudo de miocardio sin elevación del ST). **15:3**. 1-99.

Roche, S., Triozon, F., Rubio, A., & Mayou, D. (2001). Conduction mechanisms and magnetotransport in multiwalled carbon nanotubes. *Rapid Communications*. **64: 121401**. 64-67.

Rolin, C., Kang, E., Lee, J-H, Borghs, G., et.al. (2016). Change carrier mobility in thin films of organic semiconductors by the gated van der Pauw method. *Nature Communications*. **8:14975**. 1-9.

Roth, G.A., Abera, S.F., Alam. K., Ärnlóv, J. et.al (2017). Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of American College of Cardiology*. **70:1**. 1-25.

Ryu, A. (2017). Virus Structure. Chapter 2. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. 1-9.

Sacks, F.M., Pfeffer, M.A., Moye, L.A., et.Al. (1996). The effect of Pravastatin on Coronary events after Myocardial Infarction in Patients with Average Cholesterol Levels. *The New England Journal of Medicine*. **335:14**. 1001-1009.

Saeed, K., Park, S-Y, Lee-Hwa-Jeong, B., Jong-Beom, et al. (2006). Preparation of electrospun nanofibers of carbon nanotube/polycaprolactona nanocomposite. *Polymer*.**47**: 8019-8025.

Safaeijavan, R., Soleimani, M., Divsalar, A., Eidi, A. & Ardeshirylajimi, A. (2014). Comparison of random and aligned PCL nanofibrous electrospun scaffolds on cardiomyocyte differentiation of human adipose-derived stem cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. **17:1**. 903-911.

Shadrin, Y., Khodabukus, A., & Bursac, N. (2016). Striated muscle function, regeneration, and repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **73**: 4175-4202.

Stokes, D.J,. (2008). *Principles and Practice of Variable Pressure Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM)*. Chichester: John Wiley & Sons. ISBN 978-0470758748.

Storey, R.F., & Sherman, J.W. (2002). Kinetics and mechanism of the stannous octoate –catalyzed bulk polymerization of ϵ -caprolactone. *Macromolecules*. **35**: 1504-1512.

Suwantong, O. (2016). Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats. *Polymers Advanced Technologies*. **27**: 1264-1273.

Teo, K.K., & Dokainish, H. (2017). The Emerging Epidemic of Cardiovascular Risk Factors and Atherosclerotic Disease in Developing Countries. *Canadian Journal of Cardiology*. **33**: 358-365.

Thygesen, A. et. Al. (2000). Myocardial Infarction Redefined-A Consensus Document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. **36:3**. 959-969.

Thygesen, K., Alpert, J.S., & White, H.D. (2007). Universal Definition of Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. **50:22**. 2173-2192.

Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J. & Kessler, P.D. (2002). Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart. *Circulation*. **105:1**. 93-98.

Tsuchiya, Y., Kitajima, Y., Masumoto, H., & Ono, Y. (2020). Damaged Myofiber-Derived Metabolic Enzymes Acts as Activators of Muscle Satellite Cells. *Stem Cell Reports*. **15: 1-15**.

Universidad de Kumamoto. (2020). Damaged Muscles don't just die, they regenerate themselves. *Science Daily*. 1-3.

Valencia-Basto, C. (2010). Cicatrización: Proceso de Reparación Tisular. Aproximaciones Terapéuticas. *Investigaciones Andina*. **(20):12**. 85-98.

Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable Polymers. *Materials*. **2**: 307-344.

Wang, R.M., & Christman, K.L. (2016). Decellularized Myocardial matrix hydrogels: In basics research and preclinical studies. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **96**: 77-82.

Wang, T., Jiang, X., Tang, Q.Z., Li, X.Y., Lin, T., et.al. (2009). Bone marrow stem cells implantation with α -cyclodextrin/MPEG-PCL-MPEG hydrogels improves cardiac function after myocardial infarction. *Acta Biomaterialia*. **5**: 2939-2944.

Wang, L., Wang, Y., Zhuang, O. (2019). Simple self-referenced ratiometric electrochemical sensor for dopamine detection using electrochemically pretreated glassy carbon electrode modified by acid-treated multiwall carbon nanotube. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 851: 1-7.

Wickham, A.M., Islam, M.M., Mondal, D., Phopase, J., Sadhu, V., et.al. (2014). Polycaprolactone-thiophene-conjugated carbon nanotube meshes as scaffolds for cardiac progenitor cells. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*. **102B:7**. 1553-1561.

Woodruff, M.A., & Hutmacher, D.W. (2010). The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. **35**: 1217-1256.

Yao, X., Liu, Y., Gao, J., Yang, L., Mao, D. et.al. (2015). Nitric oxide releasing hydrogel enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells for myocardial infarction. *Biomaterials*. **60**: 130-140.

Yeong, W.Y., Sudarmadji, H.Y., Chua, C.K. Leong, K.F. Et.al. (2010). Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering. *Acta Biomaterialia*. **6**: 2028-2034.

Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T. Et.al. (2004). Effect of Potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. **364**: 937-952.

Zeng, H., Gao, C., & Yan, D. (2006). Poly(ϵ -caprolactone)-Functionalized Carbon Nanotubes and Their Biodegradation Properties. *Advanced Functional Materials*. **16**: 812-818.

Zhang, D., Chen, Q., Shi, C., Chen, M. Ma, K., et.al. (2020). Dealing with the Foreign-Body Response to implanted Biomaterials: Strategies and Applications of New Materials. *Advanced Functional Materials*. 1-22.

ZULUAGA, F. GOMEZ, F. (2000). Introducción a la Química de Polímeros. 1 ed. Santiago de Cali: Editorial Univalle, 46-54 PP.