

ANDAMIOS FLEXIBLES DE POLICAPROLACTONA/NANOTUBOS DE CARBONO PARA RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN CONTRÁCTIL DEL MÚSCULO ESTRIADO

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra dentro del campo tecnológico de la ingeniería de tejidos, en particular con el campo técnico de los andamios médicos biocompatibles.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen un problema creciente en el mundo. 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.

En relación con lo anterior, resulta necesario el desarrollo de alternativas para la regeneración del tejido muscular estriado. Una de estas alternativas es el uso de biomateriales. Los biomateriales empleados en regeneración cardíaca (o de otros músculos estriados) deben cumplir con requisitos como ser reabsorbibles, ser biocompatibles con el tejido (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 (Cui et al., 2016).

La policaprolactona (en adelante, PCL) es uno de los polímeros más utilizados a nivel mundial en aplicaciones médicas y farmacológicas debido a sus excelentes propiedades físicas como su excelente biocompatibilidad, alta degradación, baja citotoxicidad y sus excelentes propiedades 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).

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 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.

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.

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. 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).

Aunque se han realizado numerosos estudios utilizando PCL para aplicaciones cardíacas, la presente invención aporta una solución tecnológica basada en la fabricación de un andamio biomédico de PCL anclada químicamente con MWCNT-NH₂ para la regeneración muscular, incluyendo la cardíaca.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Fotografía de cuatro cajas de Petri, conteniendo membranas de PCL/MWCNT precipitadas con MeOH antes de ser secadas en campana de extracción.

Figura 2. 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.

Figura 3. Resultado obtenido 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%.

Figura 4. Integración del andamio de PCL(c)/MWCNT 5% al EDL del biomodelo murino.

Figura 5. Resultados de la prueba de contracción muscular.

Figura 6. Determinación de la estructura interna de los andamios de PCL(C)/MWCNT mediante XRD.

Figura 7. Geometría de los máximos de difracción que permiten determinar la estructura de los cristales de los andamios de PCL/MWCNT.

Figura 8. Determinación de la morfología superficial de los poros del andamio de PCL(C)/MWCNT 1%.

Figura 9. Determinación de la morfología superficial de los poros del andamio de PCL/MWCNT 3%.

Figura 10. Determinación de la morfología superficial de los poros del andamio de PCL/MWCNT 5%.

Figura 11. Ensayo de tracción para los andamios de PCL/MWCNT en función del porcentaje de nanotubos de carbono 1%, 3% y 5%.

Figura 12. Incremento del Módulo elástico para los andamios de PCL/MWCNT a medida que se incrementa la cantidad de MWCNT.

Figura 13. Incremento de la resistencia a la Tracción de los andamios de PCL/MWCNT a medida que se aumenta la cantidad de MWCNT.

Figura 14. Desplazamiento de los andamios de PCL/MWCNT obtenida por nanoindentación.

Figura 15. Dureza de los andamios de PCL/MWCNT obtenida por nanoindentación.

Figura 16. Módulo Elástico de los andamios de PCL/MWCNT calculados por nanoindentación.

Figura 17. Resistencia de la deformación plástica de los andamios de PCL(C)/MWCNT.

Figura 18. Recuperación Plástica de los andamios de PCL(C)/MWCNT.

Figura 19. Resultado de la prueba de citotoxicidad de los andamios de PCL(C)/MWCNT.

Figura 20. Etapa de inserción del alcohol primario 1-octanol al $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, para formar una especie activa.

5 **Figura 21.** Fase de Propagación de la polimerización por ROP de la PCL.

Figura 22. 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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10 La presente invención divulga un andamio biomédico compuesto por policaprolactona (PCL) y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT), donde el contenido de MWCNT se encuentra en proporciones del 1% al 5% en peso respecto a la PCL.

15 En un objeto adicional, la presente invención divulga el método de fabricación del andamio, mediante ultrasonido, a partir del control de las propiedades térmicas, en donde la temperatura de degradación disminuye a medida que aumenta la concentración de MWCNT.

El método para la fabricación de andamios biomédicos de PCL/MWCNT comprende el desarrollo de las siguientes etapas:

20 La síntesis de PCL mediante polimerización por apertura de anillo (ROP);

La funcionalización de los MWCNT mediante ultrasonido para mejorar la interacción con la matriz de PCL;

25 En la modalidad preferida de realización, el método incluye una etapa de preparación de andamios mediante moldeo por solvente o impresión 3D, para obtener porosidad e interconectividad específicas, según el contenido de MWCNT.

El andamio objeto de la presente descripción presenta una combinación optimizada de elasticidad y rigidez, determinada por el porcentaje de MWCNT, donde el andamio de PCL/MWCNT al 5% presenta mayor resistencia máxima y el de 1% mayor flexibilidad.

30 A su vez, presenta propiedades de conductividad eléctrica que incrementan con el aumento de la concentración de MWCNT, alcanzando conductividad adecuada en el andamio al 5%.

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.

La evaluación de las propiedades térmicas, mecánicas y biológicas del andamio se realizó mediante DSC, nanoindentación, análisis de Raman y pruebas de viabilidad celular.

A medida que aumenta la concentración de MWCNT, el andamio presenta una estructura cristalina mejorada, la cual fue verificada por análisis de difracción de rayos X (XRD).

Dentro de las ventajas técnicas aportadas por la presente invención se tiene que el andamio biomédico de PCL/MWCNT funcionalizado mediante ultrasonido, presenta una interconectividad del poro que se incrementa en, al menos, un 30% al aumentar la concentración de MWCNT del 1% al 5%.

La dimensionalidad del biodispositivo depende del sitio de implante y la funcionalidad esperada, por lo que las medidas del largo, ancho y espesor, pueden ser variables, en todo caso, el espesor del biodispositivo puede oscilar entre 50 µm y 2000 µm.

Los objetos anteriormente descritos, al igual que los objetos adicionales a que hubiere lugar, serán expuestos al detalle y con la suficiencia necesaria en el capítulo descriptivo que se divulga a continuación, el cual constituirá el fundamento del capítulo reivindicatorio.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención enseña andamios flexibles de policaprolactona (PCL) con nanotubos de carbono de pared múltiple MWCNT (Multi-Wall Carbon Nanotubes-NH₂ Rich; www.cheaptubes.com), susceptibles de aplicación como soporte a células de músculo estriado, comprobando su respuesta mecánica y eléctrica con una flexibilidad y elasticidad similar al tejido circundante.

En la invención objeto de la presente descripción, los nanotubos de multicapa son funcionalizados 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. Respecto al control de poros, técnicas como la impresión 3D permiten su adecuada resolución.

La Policaprolactona (PCL) es un poliéster alifático semicristalino de unidades repetidas de hexanoato. 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 oC) 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).

El CNT está basado en el número de cilindros de grafeno hexagonales que posee. Los CNT de un solo cilindro, se les denomina 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 objeto de implementación en los andamios que se revelan en la presente descripción poseen varios cilindros de grafeno concéntricos, por lo que se les denomina CNT de múltiple capa o MWCNT, con tamaño aproximado de 10-100 nm.

El método de fabricación de los andamios involucra la funcionalización de la PCL (sintetizada mediante ROP en la modalidad preferida de realización) con los nanotubos de carbono de pared múltiple MWCNT.

En una modalidad de realización, la funcionalización se llevó a cabo pesando 5 g de PCL, se agregaron a un Erlenmeyer de 250 mL que contenía 60 mL de cloroformo (CHCl₃); se puso bajo agitación constante de 600 rpm a temperatura ambiente (25°C) durante 1h. 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 MWCNT respectivamente.

Estos porcentajes previamente pesados 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 30 minutos. Una vez terminado este procedimiento, las soluciones de PCL/cloroformo y MWCNT/cloroformo por separado, se llevaron al equipo de ultrasonido por 1h adicional.

Una vez finalizada la hora, la PCL se mezcló con los MWCNT con los siguientes porcentajes; 1% PCL/MWCNT, 3% PCL/MWCNT y 5% PCL/MWCNT respectivamente. 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 metanol (meOH). Finalmente, se dejó evaporar el cloroformo en campana de extracción hasta obtener el material compuesto deseado, como se muestra en la Figura 1.

La caracterización estructural de los andamios de PCL/MWCNT se llevó a cabo mediante Espectroscopia RAMAN. Las mediciones y los espectros RAMAN se procesaron mediante una geometría de retrodispersión por un equipo marca Thermoscientific DXR, 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).

La caracterización superficial se llevó a cabo mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), donde los andamios de PCL/MWCNT 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, 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.

La determinación de la estructura cristalina de los andamios de PCL/MWCNT se llevó a cabo mediante difracción de rayos-x (XRD, alto ángulo), correspondiente al difractómetro de Rayos-X de referencia PANalytical X'pert proTM, 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. El equipo cuenta con un monocromador secundario que elimina la radiación K β y la fluorescencia, las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente.

Las caracterizaciones fisicoquímicas de los andamios de PCL/MWCNT se llevaron a cabo mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), con un equipo marca Mettler Toledo a una velocidad de calentamiento de 10 oC/min en una atmósfera de nitrógeno con un flujo de 80 mL/min desde 20 oC hasta 400 oC. Los análisis térmicos de la PCL y del PCL/MWCNT se realizaron mediante la técnica de TGA a una velocidad de calentamiento de 10 oC/min en una atmósfera de nitrógeno con un flujo de 80 mL/min desde 20 oC hasta 400 oC.

La dureza de los andamios de PCL/MWCNT se determinó mediante nanoindentación, usando un equipo nanoindentador marca Ubil-Hysitrom que tiene una punta piramidal Berkovich de 150 nm. 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.

El módulo de tracción de los andamios de PCL/MWCNT se determinó mediante ensayo de tracción, de acuerdo con la norma ASTM 3822-07, mediante la cual se seleccionaron tres muestras para cada uno de los porcentajes de (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 con mordazas

neumáticas especiales. Las probetas tipo V fueron fabricadas de acuerdo con la norma ASTM D638-22. 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 x 3.22 mm
- PCL/MWCNT 3%: espesor 0.22 mm x 3 mm
- PCL/MWCNT 5%: espesor 0.45 mm x 3.3 mm

La PCL y los andamios de PCL/MWCNT fueron sometidos a pruebas de impedancia eléctrica con un en un equipo de marca Wayne Kerr precisión Impedance Analyzer 6420. Las muestras fueron compactadas usando una portamuestras de técnica de cuatro puntas y la impedancia se llevó a cabo a diferentes rangos de frecuencias, mostrando el resultado en pantalla. Finalmente, los resultados de impedancia capacitiva, resistiva e inductiva (CRI) se procesaron en un computador, dando una gráfica impedancia (Z) vs rango de frecuencias.

SÍNTESIS DE PCL MEDIANTE ROP.

La PCL puede ser sintetizada 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).

En un balón de fondo redondo de 100 mL se vertió 20 mL de ϵ -caprolactona con 138 μ L de Sn (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).

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.

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.

Posteriormente, la PCL obtenida fue macerada en un mortero hasta obtener pequeños fragmentos.

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

La PCL(s) se obtuvo mediante el mecanismo de coordinación-inserción el cual se divide en tres etapas fundamentales. En la primera etapa, la de iniciación, el octoato de estaño ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) se inserta, en este caso, por un alcohol primario, el 1-octanol formando una especie que se ilustra en la Figura 20. El estaño actúa como un centro activo debido a sus orbitales de vacíos y capta los electrones desapareados del grupo hidroxilo del 1-octanol. Una vez captado este grupo hidroxilo, suelta el ácido-2-etil-hexanóico, dejando el alcóxido de estaño, la especie activa.

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 21, 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.

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 ($-\text{OH}$) final (Albertsson, 2003; Peñaranda, 2013) (Figura 22), quedando así, la PCL de alto peso molecular.

- 30 Los ejemplos que se describen a continuación son presentados con el objetivo de describir los aspectos preferidos de la invención, pero no constituyen una limitación al alcance de esta.

EJEMPLO 1.

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

Se pesaron 5 g de PCL comercial ($\text{PCL}_{(\text{C})}$) y 5 g de PCL sintetizada ($\text{PCL}_{(\text{S})}$). 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.

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

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 1).

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.

IMPLANTACIÓN DEL ANDAMIO DE PCL_(c)/MWCNT EN MÚSCULO PERIFÉRICO DE BIOMODELO MURINO.

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

a) Se pesó y se anestesió profundamente un ratón Wistar adulto con isoflurano inhalado, usando un vaporizador con 5% de isoflurano con un caudal de oxígeno min 1,5 L y una campana de vidrio con isoflurano algodón empapado en la parte inferior.

b) Se realizó un corte longitudinal en la piel sobre músculo extensor largo digital (ELD) de la pata izquierda de la rata. Se procedió a realizar la fulguración al músculo con un electrobisturí. El otro músculo de la pata contralateral se usó como control de reparación natural. Se suturó la piel sobre el músculo previa

infiltración con Bupivacaína para control del dolor post lesional e implante. Acto seguido, el ratón dejó en recuperación (Figura 2).

5 c) El andamio utilizado fue previamente sometido 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%.

10 d) Los andamios, en concentraciones de 1% y 5%, se sumergieron en una solución con células medulares diferenciadas a cardiomiocitos y fueron llevados a la sala de cirugía (Figura 8.43)

15 e) Se realizó nuevamente un corte longitudinal en la piel sobre músculo ELD de las ratas 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).

20 El músculo de la otra pata posterior sirvió como control. Este mismo procedimiento se repitió bajo estas cinco condiciones:

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

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).

30 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, donde se le realizó estimulación y respuesta al estímulo.

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y TÉRMICA DE LA PCL

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

35 Con el fin de comprobar si hubo una reacción de polimerización se realizaron pruebas de FT-IR, donde se compararon las bandas generadas por el monómero

de ϵ -caprolactona con las bandas generadas de la estructura de PCL sintetizada. (Figura 9.4).

Una técnica complementaria a la FT-IR es la espectroscopia RAMAN. Debido a su alta resolución, se decidió realizar la espectroscopia RAMAN como complemento,
5 para comparar la ϵ -caprolactona con la PCL_(s) y la PCL_(c).

El espectro RAMAN demostró 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.

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

La espectroscopia DSC se utilizó para visualizar temperaturas de las dos PCL. Se
10 pudo apreciar un espectro DSC muy similar entre las dos PCL cuyas propiedades térmicas son muy parecidas y se corrobora la obtención de PCL de alto peso molecular.

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

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).

FUNCIONALIZACIÓN DE PCL_(s) Y PCL_(c) CON NANOTUBOS DE CARBONO

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

Como resultado del acoplamiento se obtuvieron andamios porosos de PCL_(c)/MWCNT. Este proceso se refinó varias veces hasta obtener andamios de
25 mejor calidad.

Un aspecto importante de la figura 3 es que, a medida que se fue incrementando la cantidad de MWCNT a la PCL, Se generaron andamios mucho más porosos. Esto se debe a que los MWCNT generan aglomerados que permiten la formación de esos poros.

30 A pesar de que no se obtuvieron andamios con la PCL_(s) se realizaron varios análisis térmicos, mecánicos y estructurales con el objetivo de continuar con la comparación de estas propiedades con respecto a la PCL_(c).

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
35 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).

5 IMPLANTACIÓN DE LOS ANDAMIOS EN LOS MÚSCULOS DIGITALIS 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%

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.

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.

20 PRUEBAS DE CONTRACCIÓN MUSCULAR CON LOS ANDAMIOS DE PCL_(c)/MWCNT

Realización de las pruebas de contracción muscular con los andamios de PCL_(c)/MWCNT (Tabla 1)

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

25 Tabla 1. Condiciones experimentales para las pruebas de contracción muscular con los andamios de PCL_(c)/MWCNT

Una vez realizada las pruebas de contracción muscular de EDL, se realizó la gráfica de comparación (Figura 5).

Como se puede apreciar, el andamio de PCL_(C)/MWCNT 5% con células aumentó la fuerza de contracción muscular hasta en un 1.0 N, por encima de la fuerza de contracción realizada por el control natural y por el control fulgurado.

EJEMPLO 2.

Pruebas de citotoxicidad

Se realizaron ensayos de citotoxicidad in vitro de los andamios de PCL/MWCNT con fibroblastos de líneas celular L929 de la siguiente manera:

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. Poco antes del final del período de incubación, las células se evaluaron microscópicamente y se añadió el reactivo XTT (CyQUANT™ XTT Cell Viability Assay) y un reactivo de acoplamiento de electrones. Se realizó la siembra de esta línea celular L929 de fibroblastos en placa de 24 pozos (Corning™ 3526) y se dejó cultivando durante 24-48 horas en incubadora a 37°C y 5% de atmósfera de CO2.

Una vez cumplido el tiempo de incubación, se transfirieron 100 µL 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) se les retiró el medio de cultivo y se volvió a agregar XTT.

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 µL de XTT. 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.

EJEMPLO 3

Determinación de la estructura interna de los andamios de PCL/MWCNT mediante rayos XRD

Una vez fabricados los andamios de PCL/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 y de los PCL/MWCNT (1%, 3% y 5%) (Figura 6). Por lo anterior, se realizaron ensayos de difracción de

rayos x para la PCL y para los andamios de PCL/MWCNT 1%, PCL/MWCNT 3% y PCL/MWCNT 5%.

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).

5 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/MWCNT. Adicionalmente se observan las reflexiones a 26.6 y 43.5 asociadas a los planos (002) y (100) de los MWCNT, respectivamente.

10 La geometría de los máximos de difracción permite determinar la estructura de los cristales de los andamios de PCL/MWCNT (Figura 7).

En la figura 7 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, siendo el andamio de PCL/MWCNT 5% el más cristalino, lo cual se corrobora con imágenes de SEM.

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

25 **Determinación de la porosidad de los andamios de PCL/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 8) Como se aprecia en la figura 8, el andamio de PCL(C)/MWCNT 1% posee microporos no interconectados entre los 10 μm hasta los 50 μm .

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/MWCNT 1% (Figura 8) 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/MWCNT 3% presentó poros más grandes y con interconectividad y sus tamaños variaron entre los 25 μm hasta los 100 μm (Figura 9).

Para los andamios de PCL/MWCNT 3% (Figura 9) 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/MWCNT 1%. El andamio de PCL/MWCNT 5% presentó poros grandes, con interconectividad y sus tamaños variaron entre los 50 μm hasta los 800 μm (Figura 10).

Mientras que para los andamios de PCL/MWCNT 5% (Figura 10) se visualizó una superficie mucho más porosa, con muchos poros interconectados lo que hizo que su viabilidad celular fuera muy alta de 89.71%.

Ensayo de tracción de los andamios PCL/MWCNT

Con el fin de evaluar las propiedades mecánicas de deformación y de resistencia máxima (σ_T) que pueden soportar los andamios de PCL/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. por lo tanto, se realizaron pruebas de Tracción a los andamios con diferentes porcentajes de PCL/MWCNT (1%, 3% y 5%), para tener unos valores de resistencia máxima y E más precisos como se ilustra en la figura 11.

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 2).

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

Tabla 2. Cálculo del módulo elástico de los andamios de PCL/MWCNT 1%

En la figura 12 se realizó una comparación entre los E de los andamios de PCL/MWCNT en sus tres porcentajes y se encontró que el más flexible, con una

E de 0.74 MPa, es el andamio de PCL/MWCNT 1% y el más rígido con una E de 3.59 MPa es el andamio de PCL/MWCNT 5%, mientras que los andamios de PCL/MWCNT 3% presentaron una flexibilidad intermedia de E 1.29 MPa.

Los datos registrados del E de los andamios de PCL/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/MWCNT 1%, pero muy diferentes a los PCL/MWCNT 5% que tienen un porcentaje de deformación de casi un 80%. Por otro lado, Flores-Cedillo (2015), reporta E mucho más elevadas entre 172 a 608 MPa. Esto se debe a que los andamios fabricados 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/MWCNT, que es el valor máximo de la zona elástica que el material puede soportar antes de fatigarse (Tabla 3).

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

Tabla 3. Estimación de la resistencia máxima de los andamios de PCL/MWCNT 1%

Las comparaciones entre σ_T de los andamios de PCL/MWCNT fabricados son concordantes con las E halladas, el andamio con menor resistencia sería el de PCL/MWCNT 1% con un valor de 5.23 MPa, seguido del andamio de PCL/MWCNT 3% con un valor de 7.64 MPa y el de mayor resistencia sería el PCL/MWCNT de 5% con un valor de 14.7 MPa. Esto quiere decir que el andamio de PCL/MWCNT 1%, si se somete a una fuerza superior a 5.23 MPa se rompe, mientras que el andamio de PCL/MWCNT 5% posee una σ_T muy superior a los otros andamios (figura 13).

Este valor de σ_T del andamio de PCL/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.

Análisis mecánico mediante indentación instrumentada (nanoindentación) a

5 los andamios de PCL/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/MWCNT, tienen una dureza excelente del orden de los GPa. El parámetro de
10 desplazamiento aumenta a medida que se aumenta el porcentaje de nanotubos de carbono en los andamios de PCL/MWCNT (Figura 14).

Se encontró un aumento de los parámetros de dureza de los andamios de PCL/MWCNT a medida que aumentó el porcentaje de MWCNT (Figura 15).

Los resultados de las pruebas de nanoindentación establecen que, a medida que
15 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/MWCNT al 5% es el que mayor dureza posee, lo que indica un andamio rígido, mientras que el andamio de PCL/MWCNT al 1% es el andamio más blando. Esto es corroborado por Huang (2019), donde
20 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/MWCNT al 0.25 % una dureza de 0.04 GPa, para los andamios de PCL/MWCNT al 0.75%, una dureza de 0.05 GPa y una dureza similar para los andamios de PCL/MWCNT al 3%. Dichos resultados están muy por debajo de los
25 registrados en esta investigación, indicando que los MWCNT utilizados 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 se comprueban con las curvas de desplazamiento (Figura 15), donde el desplazamiento para el andamio
30 PCL/MWCNT al 5% es menor que el desplazamiento en nm registrado para los andamios de PCL/MWCNT 3% y los andamios de PCL/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/MWCNT al 5%, que fue de 0.74 MPa, indicando un material flexible. Esto se explica debido a que el ensayo
35 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/MWCNT de la porción que se nanoindentó (figura 16).

5 Como se aprecia en la figura 16, 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. Los nanotubos de carbono ejercen un incremento de esta resistencia a medida que éstos se incrementan (figura 17).

10 Lo que se observa en la Figura 17 es que los andamios de PCL/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
15 porque soportará mayores cargas de fuerza.

Otro parámetro importante para analizar de los andamios de PCL/MWCNT es el porcentaje de recuperación elástica (%R) (Figura 18). Esta recuperación se mide mediante la ecuación 1 y se calcula con base en el porcentaje de MWCNT contenidos en los andamios fabricados.

20
$$\%R = \frac{\delta_{max} - \delta_p}{\delta_{max}} * 100\% \text{ Ecuación 1}$$

Donde:

δ_{max} = es el desplazamiento máximo

δ_p = es el desplazamiento plástico

Aunque los resultados de la recuperación plástica son casi constantes para todos
25 los porcentajes de los andamios de PCL/MWCNT (Figura 18), 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/MWCNT 5% el más rígido de todos, por lo que este andamio se deforma poco elásticamente.

30 **Determinación de la citotoxicidad por mtt de los andamios de PCL/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 19).

Los resultados muestran que la PCL sintetizada en el laboratorio tuvo una
35 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/MWCNT 1% y PCL/MWCNT 3%, presentaron viabilidad celular muy parecida de 51.12% y 57.74% respectivamente. Mientras que el andamio de PCL/MWCNT 5% registró una viabilidad celular del 89.71%. 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/MWCNT 5% mencionado anteriormente.

Los datos obtenidos en esta prueba de citotoxicidad MTT fueron concordantes con los resultados obtenidos por Mattioli-Belmonte (2012) para los andamios de PCL/MWCNT 5%.

En conclusión, mediante ultrasonido se logró la funcionalización de la PCL con los MWCNT, dando como resultados materiales compuestos de PCL/MWCNT. Los acoplamiento más adecuados 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 PCL/MWCNT. Los andamios de PCL/MWCNT registraron propiedades térmicas que disminuyen a medida que se incrementa la cantidad de MWCNT. El módulo elástico de los andamios de PCL/MWCNT registraron que el andamio más flexible es el de PCL/MWCNT 1%, mientras que el andamio más rígido es el de PCL/MWCNT 5%. Las resistencias máximas de los andamios registraron que el andamio que más resistencia tiene es el PCL/MWCNT 5% y el de menor resistencia es el andamio de PCL/MWCNT 1%.

Las pruebas de nanoindentación arrojaron que los andamios de PCL/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.

En la prueba de citotoxicidad por MTT se determinó que la PCL no es citotóxica con un valor de viabilidad del 82%, mientras que los andamios del PCL/MWCNT 1% y PCL/MWCNT 3% mostraron toxicidad alta con un 58% de viabilidad. Caso contrario ocurrió con los andamios de PCL/MWCNT 5% que registraron una citotoxicidad muy baja, con una viabilidad del 90%.

El andamio presenta propiedades térmicas controladas, en donde la temperatura de degradación disminuye a medida que aumenta la concentración de MWCNT.

A su vez, presenta los siguientes efectos técnicos:

- Una combinación optimizada de elasticidad y rigidez, determinada por el porcentaje de MWCNT, donde el andamio de PCL/MWCNT al 5% presenta mayor resistencia máxima y el de 1% mayor flexibilidad;
- Propiedades de conductividad eléctrica que incrementan con el aumento de la concentración de MWCNT, alcanzando conductividad adecuada en el andamio al 5%;
- Una estructura cristalina mejorada a medida que aumenta la concentración de MWCNT, verificable por análisis de difracción de rayos X (XRD).

5

10

La funcionalización mediante ultrasonido genera que la interconectividad del poro se incrementa en al menos un 30% al aumentar la concentración de MWCNT del 1% al 5%. Además, funcionalización mediante ultrasonido permite asegurar una dispersión uniforme con incremento de propiedades mecánicas en un 50%.

15

La dimensionalidad del biodispositivo depende del sitio de implante y la funcionalidad esperada, por lo que las medidas del largo, ancho y espesor, pueden ser variables. En todo caso, el espesor del biodispositivo puede oscilar entre 50 μm y 2000 μm .

20

El andamio biomédico objeto de la invención presenta una dureza en el rango de 10 a 12 GPa, determinada por pruebas de nanoindentación, lo que garantiza estabilidad mecánica adecuada para aplicaciones de implantación.

La citotoxicidad es mínima con una viabilidad celular superior al 90%, como se evaluó mediante ensayos de MTT en concentraciones de MWCNT al 5%.

25

La aplicación del andamio biomédico resulta óptima para regeneración muscular, mejorando la fuerza de contracción muscular en comparación con la reparación natural. Al ser probado en cultivos de cardiomiocitos, se evidenció conductividad eléctrica en el rango de 0.2 a 1 S/m y una viabilidad celular mínima del 90% tras 15 días de cultivo, mejorando la fuerza de contracción celular en al menos un 20% respecto a la reparación natural.

30

El andamio funcionalizado con MWCNT proporciona propiedades viscoelásticas con alta recuperación de deformación, lo que lo hace ideal para soportar condiciones dinámicas durante su implantación. En consecuencia, es susceptible de aplicación en medicina regenerativa, dispositivos musculares implantables, ingeniería de tejidos, al presentar capacidad de soportar la proliferación y diferenciación de células musculares estriadas durante periodos prolongados de cultivo.

35

Así mismo, el andamio biomédico es absorbible en el organismo, con una tasa de pérdida de peso similar a la PCL comercial, adecuada para su degradación controlada in vivo.

Aunque la presente invención ha quedado descrita con las realizaciones preferentes mostradas, queda entendido que las modificaciones y variaciones que conserven el espíritu y el alcance de esta invención se entienden dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

- Anwaar-Nazeer, M., Yilgor, E., & Yilgor, I. (2019). Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer*. 168: 86-94.
- 5 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.
- Cui, Z., Yang, B., & Ren-Ke, Li. (2016). Application of Biomaterials in Cardiac Repair and Regeneration. *Engineering*. 2: 141-145.
- 10 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: 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.
- 15 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.
- 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.
- 20 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.
- 25 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.
- Kong, Y., Yuan, J., & Qiu, J. (2012). Preparation and Characterization of aligned carbon nanotubes/poly(lactic acid) composite fibers. *Physica B*. 407: 2451-2457.
- 30 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.
- 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.
- 35 Oledzka, E., & Narine, S.S. (2011). Organic Acids Catalyzed Polymerization of ϵ -caprolactone Synthesis and Characterization. *Journal of Applied Polymer Science*. 119: 1873-1882.
- 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.
- 40 Zeng, H., Gao, C., & Yan, D. (2006). Poly(ϵ -caprolactone)-Functionalized Carbon Nanotubes and Their Biodegradation Properties. *Advanced Functional Materials*. 16: 812-818.

