

## Sustratos electrohilados de poli(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) con glicósidos para reparación de la lesión medular

### Glycosides-bearing electrospun poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) substrates for the repair of injured spinal cord

García-Álvarez I<sup>1</sup>, Doncel-Pérez E<sup>1</sup>, García-Junceda E<sup>2</sup>, Fernández-Mayoralas A<sup>2</sup>, Garrido L<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Química Neuro-regenerativa, Unidad Neurología Experimental, Hospital Nacional de Paraplégicos, Servicio de Salud de Castilla La Mancha (SESCAM), Toledo, España. <sup>2</sup> Departamento de Química Biorgánica, Instituto de Química Orgánica General, CSIC, Madrid, España. <sup>3</sup> Departamento de Química Física, Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC, Madrid.

---

#### Resumen

**Objetivo:** Obtención mediante electrohilado de fibras micro- y submicrométricas de poliésteres funcionalizadas con glicósidos que constituyen elementos estructurales de proteoglicanos, para su uso en la reparación del tejido medular.

**Material y métodos:** Las fibras se prepararon a partir de disoluciones de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) con glicósidos sintéticos mediante electrohilado variando sistemáticamente las condiciones del proceso. La morfología de las fibras fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido. Asimismo, se evaluó la estabilidad de la interacción entre el glicósido y la fibra en medio acuoso, y su toxicidad en cultivos de células neurales.

**Resultados:** La morfología de las fibras obtenidas depende principalmente de los parámetros de la disolución. En medio acuoso, el glicósido sulfatado se liberó de las fibras más lentamente que el que no tenía dicho grupo funcional. La viabilidad de las células neurales no se vio afectada por los glicósidos.

**Conclusión:** La preparación de microfibras alineadas de poliéster funcionalizadas con glicósidos es posible. La mayor parte del glicósido permanece retenido en las fibras sumergidas en agua después de varios días. El electrohilado es una técnica muy accesible y versátil para la fabricación de soportes en estrategias de terapia celular de lesiones medulares.

**Palabras clave:**

Electrohilado, sustratos anisotrópicos, polihidroxialcanoatos, glicósidos, proteoglicanos.

#### Abstract

**Objective:** Preparation of functionalized micro- and submicrofibers by electrospinning of polyesters with glycosides which are structural elements of proteoglycans, for application to the repair of spinal cord lesions.

**Material and methods:** Solutions of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with synthetic glycosides were prepared varying systematically the processing conditions. Fiber morphology assessed by scanning electron microscopy. The stability of the interaction between the glycoside and the polymer fiber was evaluated in aqueous medium, and their toxicity in cultures of neural cells.

**Results:** The fiber morphology was altered mainly by the solution parameters. In aqueous medium, the glycoside with a sulfate group was released from fibers at slower rate than the non-sulfated glycoside. The viability of neural cells was not affected by the glycosides.

**Conclusion:** It is possible to fabricate aligned polyester micro fibers with glycosides. Most of the glycoside present in the fibers remains in the substrate after extraction in water for several days. Electrospinning is a very accessible and versatile technique for application to strategies of cellular therapy in spinal cord injuries

**Key words:**

Electrospinning, anisotropic scaffolds, polyhydroxyalkanoates, glycosides, proteoglycans.

---

#### Correspondencia

L. Garrido  
Departamento de Química Física  
Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC.  
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, España.  
e-mail: lgarrido@cetef.csic.es

## Introducción

La terapia con células mesenquimales pluripotenciales embrionarias y adultas (MSC) ha generado grandes expectativas en la reparación del tejido medular lesionado [1], que dependerá de su capacidad para integrarse y diferenciarse en el entorno de la médula espinal adulta. Para retener las MSC en la región de interés y favorecer una diferenciación apropiada, se ha propuesto trasplantar las células en soportes de biopolímeros o de polímeros sintéticos, en muchos casos modificados para facilitar la interacción sustrato-célula [2]. En la elección y el diseño del soporte deben considerarse diferentes factores biológicos, químicos y físicos que influyen en el comportamiento de las células madre trasplantadas.

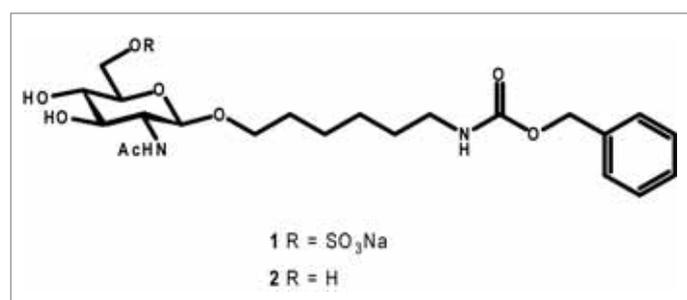
Los poliésteres sintéticos representan el mayor grupo de polímeros biodegradables, lo que ha permitido que sean empleados en medicina, ya que es posible regular la velocidad de degradación de los mismos [3]. Un ejemplo son los poli(hidroxicanoatos) (PHAs), que pueden ser mezclados con otros polímeros (naturales y sintéticos), modificados superficialmente (vía física o química) y se pueden preparar «composites» o híbridos con otro tipo de materiales o moléculas, para posteriormente ajustar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Las numerosas posibilidades de preparar 'a medida' los PHAs para aplicaciones médicas han demostrado que esta clase de materiales poseen un gran futuro como materiales en ingeniería tisular [4].

En particular, se ha observado que los copolímeros PHBHHx son biocompatibles con una gran cantidad de líneas celulares, entre las que cabe destacar las neuronas [5][6], convirtiéndolo en un material muy prometedor en aplicaciones para la regeneración del tejido medular lesionado.

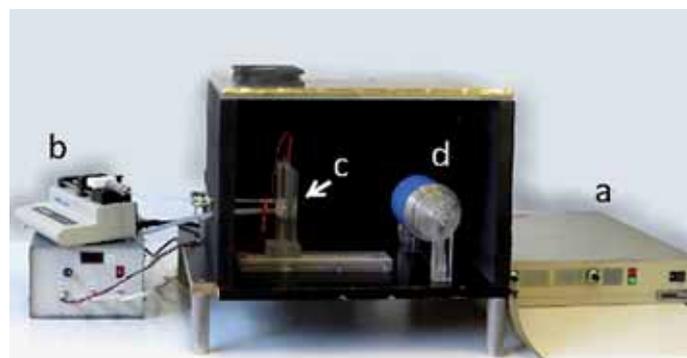
Considerando los factores biológicos, es deseable que un sustrato incorpore elementos que mimeticen la matriz extracelular. En el tejido nervioso los proteoglicanos constituyen un componente destacado de dicha matriz y de las superficies celulares, con funciones biológicas diversas. Es conocido que los proteoglicanos promueven el crecimiento y la diferenciación de neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) [7][8]. Estas propiedades están principalmente asociadas a la cadena glucídica del glicosaminoglicano, en concreto a cadenas de polisacáridos de heparán sulfato (HS) y condroitín sulfato (CS). Con estos conocimientos, en los últimos años se ha descrito la síntesis de fragmentos de HS y CS capaces de promover el crecimiento neurítico en cultivos [9][10]. El empleo de fibras electrohiladas ha suscitado gran interés en ingeniería de tejidos [11-13] y las fibras obtenidas mediante *electrospinning* o electrohilado pueden llegar a ser

de una escala geométrica similar a la de las fibras proteicas que forman la matriz extracelular. Se ha observado que cuando se emplean fibras alineadas en cultivos de MSC neurales, se promueve la diferenciación a células con características de neuronas [14][15]. Además, en estos cultivos se observó que el crecimiento de las neuritas tenía lugar en la dirección de alineación de las fibras. La técnica de electrohilado consiste en la obtención de fibras, generalmente, a partir de una disolución de polímero (también se pueden preparar fibras a partir del estado fundido) por acción de un campo eléctrico [16] (Figura 1).

En este trabajo se describe la optimización de la preparación de fibras de PHBHHx mediante electrohilado y se discute el efecto que los diferentes parámetros tienen sobre la morfología de las fibras y la topología del sustrato obtenido. Como glicósido sulfatado se ha utilizado el derivado de N-acetil-D-glucosamina con el grupo sulfato en posición 6 (compuesto 1, Esquema 1). Con fines comparativos se ha empleado también el correspondiente glicósido no sulfatado 2. La estabilidad de la interacción entre el glicósido y el polímero se ha estudiado analizando la liberación del glicósido a lo largo del tiempo desde las fibras sumergidas en medio acuoso.



**Esquema 1.** Estructura química del glicósido sulfatado (1) y su homólogo no sulfatado (2) utilizados en el presente trabajo.



**Fig. 1.** Equipo de electrohilado: (a) fuente de alimentación de alto voltaje, (b) bomba de inyección, (c) aguja y (d) colector (en este caso, rotatorio).

## I Material y métodos

Utilizamos Poly(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato) (PHBHHx) con una composición de 14,3% molar en 3-hidroxi-hexanoato, peso molecular  $M_w$ : 190.000 g mol<sup>-1</sup> y polidispersidad  $M_w/M_n$ : 1,47, que fue suministrado por el profesor G. Q. Chen (Universidad de Tsinghua, China) y se empleó sin purificación previa. Los disolventes empleados fueron cloroformo y diclorometano (Carlo Erba Réactifs-SdS, Val de Reuil, Francia), metanol y 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Los glicósidos utilizados en el estudio de optimización fueron sintetizados en el laboratorio y su procedimiento se describirá en otro trabajo.

### Electrohilado

La preparación de fibras se llevó a cabo mediante electrohilado de disoluciones de PHBHHx y el glicósido de interés (2% peso glicósido/peso polímero) en una mezcla de disolventes. Generalmente, la concentración de polímero en las disoluciones varió entre 18-33% peso polímero/volumen total de disolventes. El procedimiento habitual de preparación de una disolución consistió en disolver 1 g de polímero en 5 ml de cloroformo:diclorometano (1:1), añadiendo a continuación una disolución de 20 mg de glicósido en 400 ml de isopropanol fluorado. La disolución resultante se mantuvo con agitación magnética constante durante, al menos, 12 horas antes de proceder a su electrohilado. El equipo de electrohilado utilizado, de fabricación propia, consta principalmente de una fuente de alimentación de alto voltaje (Spellman SL Serie 30kV 600 W), una aguja o capilar metálico (0,584 mm de diámetro interno) conectado al polo positivo de la fuente y un colector rotatorio (tambor de 7 cm de diámetro) conectado a tierra. Además, dispone de una bomba de infusión (KDS Cientific, serie 100) para controlar el flujo de disolución inyectado en el campo eléctrico. Durante el proceso de optimización de preparación de fibras, además de la composición de la disolución, se varió el flujo de disolución (de 0,1 a 1,2 ml/h), la distancia entre la punta de la aguja y el tambor (de 12 a 18 cm), la velocidad de rotación del tambor (de 500 a 1.300 r.p.m.), la posición y el tamaño de la pantalla situada detrás de la aguja y el voltaje aplicado (de 6 a 27 kV). La temperatura y humedad relativa ambiente durante el electrohilado se mantuvieron habitualmente entre 20-24° C y 21-24%, respectivamente.

### Microscopía electrónica de barrido

La morfología de los sustratos preparados mediante electrohilado fue estudiada con microscopía electrónica. Brevemente, muestras de sustratos fueron recubiertas con Au/Pd y observadas en un microscopio electrónico de barrido Phi-

lips XL30 (Philips, Eindhoven, Holanda) a temperatura ambiente, utilizando los parámetros que se indican en cada fotografía.

### Análisis de la estabilidad de la interacción glicósido-polímero

Para el estudio de la liberación de glicósidos desde las fibras, se cortaron discos de 14 mm de diámetro, se pesaron individualmente y se colocaron en placas de 24 pocillos. Sobre los discos se colocaron aros de teflón para mantenerlos en el fondo de los pocillos, y se añadió 1,5 mL de H<sub>2</sub>O (MilliQ). Las muestras se incubaron a 37° C con agitación orbital (160 r.p.m.). A diferentes tiempos, se recogió el sobrenadante, se eliminó el agua por liofilización y el residuo se disolvió en MeOH o H<sub>2</sub>O para su análisis por HPLC. Se utilizaron dos cromatógrafos de líquidos con diferentes características: Cromatógrafo A: Jasco Pu-2089 Plus, equipado con un detector de ultravioleta Jasco UV-2075 Plus y un inyector Rheodyne de 20 microL. La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron con la aplicación Jasco ChromPass Chromatography Data System 1.8.6.1; Cromatógrafo B: Vertex P680, equipado con un detector fotodiodo array PDA-100, un compartimento para columnas termostaticado TCC-100 y un inyector Rheodyne de 20 microL. La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron con la aplicación Chromeleon 6.60. Las muestras provenientes de los discos con el glicósido sulfatado 1. disueltas en H<sub>2</sub>O se analizaron en el cromatógrafo A a temperatura ambiente, mientras que aquellas con el glicósido, 2. disueltas en MeOH se analizaron en el cromatógrafo B a 20° C.

### Cultivo celular de neuroesferas de embriones de rata E15

Todos los experimentos realizados con animales fueron aprobados por el Comité Ético Institucional y siguieron la directiva núm. 86/609/CEE del Consejo Europeo y las recomendaciones del Departamento de Salud de EE.UU. para limitar el dolor y malestar. Las ratas Wistar gestantes fueron adquiridas a Harlan (Barcelona, España). Después de anestesiadas se les practicó cesárea para obtener embriones de 15 días (E15). El cuerpo estriado de estos embriones E15 fue diseccionado y mecánicamente dissociado a células individuales [17][18]. La suspensión celular fue incubada en medio NB27 (una mezcla de medio Neurobasal y suplemento B27 –GIBCO, Escocia, Reino Unido– conteniendo factores de crecimiento bFGF humano (10 ng/mL) y EGF humano (20 ng/ml) –Peprotech, New Jersey, EE.UU.–, L-glutamina (0.5 mM), L-glutamato (25 mM), penicilina (100 U/mL), streptomina (0.1 mg/mL), todo de Sigma-Aldrich), y también fungizona (2.5 µg/mL; Invitrogen, Madrid, España). Después de siete días en este medio de cultivo

(llamado medio NB27) se obtuvieron neuroesferas en suspensión que fueron separadas por centrifugación a baja velocidad y lavadas con PBS y nuevamente centrifugación. Las neuroesferas fueron disociadas mediante una tripsinización moderada y perfundidas a través de una aguja (p25) para su disociación en células individuales. Este proceso se repitió cada 3-4 días para su expansión celular.

### Ensayo de viabilidad

La línea celular TEG-3 de células de glia envolvente de bulbo olfativo [19] o las células disociadas de neuroesferas fueron sembradas a  $1-2 \times 10^4$  células por pocillo en placas de microtitulación e incubadas en DMEM-10% Suero Fetal Bovino, FBS, (Lonza, Bruselas, Bélgica) durante 6 horas para facilitar su adherencia a la placa. El medio fue aspirado y se añadieron 100  $\mu$ l del compuesto a ensayar diluido en DMEM-2% FBS. Se ensayaron, al menos, tres réplicas por variante experimental. La viabilidad de las células fue determinada a las 48 horas mediante un *kit* de ensayo de proliferación (Vybrant MTT Proliferation Assay Kit, Molecular Probes, Leiden, Holanda) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cambios de absorbancia a 570 nm fueron detectados en un espectrofotómetro (Ultra384, Tecan).

### Ensayo de inhibición de la proliferación

La inhibición fue calculada mediante la fórmula (% inhibición) =  $100 - 100[(X - B)/(A - B)]$  (1), donde A es el valor de absorbancia que corresponde a células mantenidas en DMEM+2% BFS (control de máxima proliferación); B es el valor de absorbancia del medio de cultivo (control de mínima proliferación); y X corresponde a los valores de absorbancia en células tratadas con los inhibidores [20]. Las curvas de dosis respuesta de % inhibición vs concentración fueron obtenidas por triplicado y las curvas sigmoideas obtenidas son mostradas. El procesamiento de los datos se realizó con los programas Microsoft Excel para Windows XP y GraphPad Prism, versión 4.

### Cultivo de células sobre sustratos sintéticos

Los sustratos sintéticos a ensayar fueron esterilizados previamente mediante radiación UV en una campana de flujo laminar y en las placas de cultivo celular a utilizar (24-wells plate, Costar™). Los sustratos fueron inmovilizados en los pocillos con anillos de teflón (Figura 2), posteriormente se añadieron 500  $\mu$ L de neuroesferas resuspendidas en medio NB27 más 10% FBS. La adhesión y diferenciación celular de las neuroesferas fue seguida por microscopía de *time-lapse* en contraste de fase (Leica DMI 6000B) durante 48 horas.

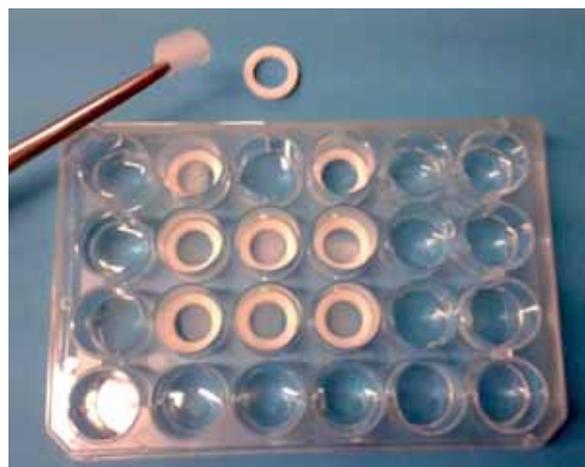


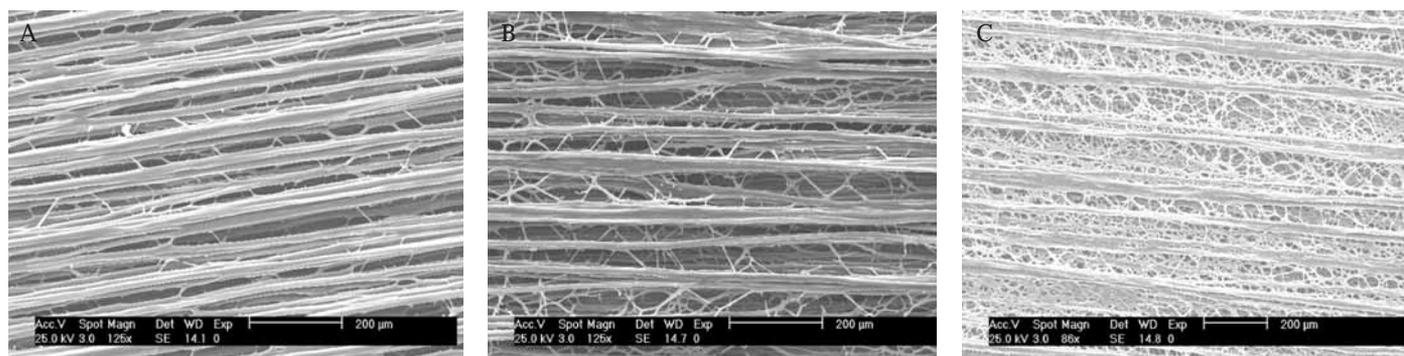
Fig. 2. Placa de cultivo con anillos de teflón para inmovilizar los sustratos de PHBHH.

## Resultados

La obtención de fibras por electrohilado de disoluciones de polímero depende de factores intrínsecos del proceso y de la disolución, que son interdependientes y que para alcanzar el éxito obligan, generalmente, a encontrar un compromiso entre los valores que se les asignan, como se ha anticipado en la introducción. Además, en nuestro caso, la fabricación de sustratos miméticos de la matriz extracelular del SNC para reparar o regenerar la médula lesionada requiere fibras alineadas y formulaciones complejas con factores sintéticos y biológicos capaces de promover localmente una respuesta celular adecuada. Esto conlleva la preparación de mezclas homogéneas de compuestos que presentan propiedades dispares en disolución, haciendo necesaria la utilización de combinaciones de disolventes apropiados para cada componente y, al mismo tiempo, miscibles. Así, en la optimización de la fabricación de fibras uniformemente funcionalizadas y orientadas de PHBHHx se estudió la influencia en la morfología de las fibras de los siguientes factores: 1) disolventes, 2) concentración, 3) carga libre, 4) uniformidad y magnitud del campo eléctrico, y 5) variación de flujo de disolución.

### 1. Influencia de los disolventes

La preparación de mezclas homogéneas de PHBHHx y glicósidos requiere combinar disolventes con diferente polaridad y, consecuentemente, diferentes propiedades eléctricas. La Figura 3 muestra tres ejemplos de fibras de PHBHHx obtenidas en las mismas condiciones pero utilizando mezclas de disolventes con distintas constantes dieléctricas (Tabla 1). Se observa que solo es necesario añadir pequeñas cantidades de disolventes con valores de constante dieléctrica altos para aumentar el número de ramificaciones que presentan las fibras. También se observa una tendencia de las fibras a for-



**Fig. 3.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido correspondientes a fibras de PHBHHx preparadas a partir de disoluciones al 23,5% (p polímero/v disolventes) en: A)  $\text{Cl}_3\text{CH}$  (0,48)/ $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  (0,48)/ $(\text{CF}_3)_2\text{CHOH}$  (0,04); B)  $\text{Cl}_3\text{CH}$  (0,48)/ $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  (0,48)/ $\text{CH}_3\text{OH}$  (0,04), y C)  $\text{Cl}_3\text{CH}$  (0,463)/ $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  (0,463)/ $\text{CH}_3\text{OH}$  (0,037)/  $\text{DMSO}$  (0,037). La velocidad de flujo (0,2 ml/h), la distancia entre la punta de la aguja y el colector (16 cm) y la velocidad de rotación del tambor (1.200 rpm) se mantuvieron constantes. El voltaje aplicado varió ligeramente; A) 14,9 kV, B) 11,9 kV, y C) 11,4 kV. La adición de disolventes con un valor de constante dieléctrica alta favorece la ramificación de las fibras aunque disminuye ligeramente el campo eléctrico aplicado.

**Tabla 1. Propiedades de los disolventes utilizados**

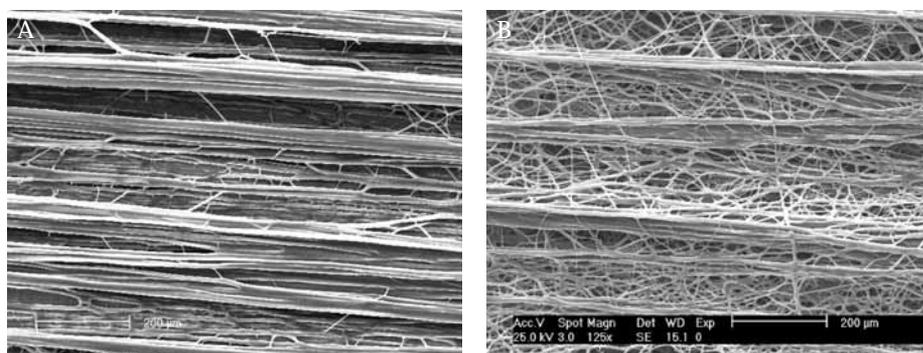
Disolvente	Fórmula	Densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	Punto de ebullición ( $^{\circ}\text{C}$ )	Constante dieléctrica
Cloroformo	$\text{Cl}_3\text{CH}$	1,498	61,7	4,8
Diclorometano	$\text{Cl}_2\text{CH}_2$	1,326	39,8	9,1
Isopropanol fluorado	$(\text{CF}_3)_2\text{CHOH}$	1,596	58,2	17,8
Metanol	$\text{CH}_3\text{OH}$	0,791	64,6	32,6
Sulfóxido de dimetilo	$(\text{CH}_3)_2\text{OS}$	1,092	189	47

mar agrupaciones discretas (cordones) con una separación entre ellas que se incrementa con el aumento de la constante dieléctrica de los disolventes empleados.

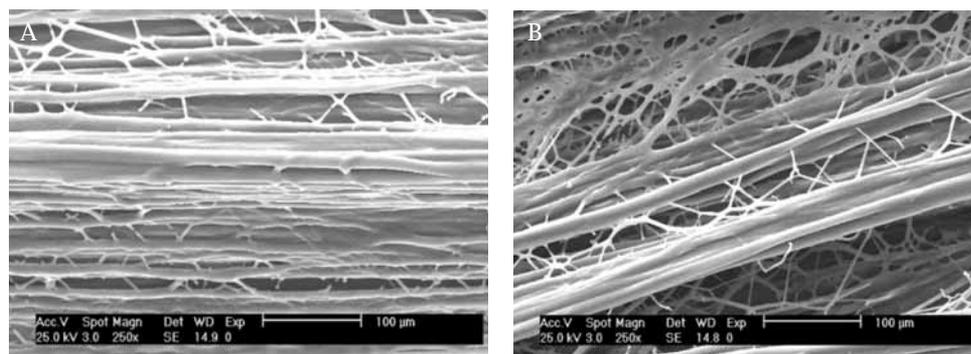
## 2. Influencia de la concentración de polímero

En la Figura 4 se muestra el efecto de la concentración del

polímero en la morfología de las fibras, observándose un incremento en el número de fibras no orientadas al aumentar la concentración de PHBHHx de 24 a 28% peso polímero/volumen disolventes. Los valores correspondientes al resto de parámetros involucrados en el proceso se mantuvieron constantes.



**Fig. 4.** Microscopía electrónica de barrido correspondientes a fibras de PHBHHx con glicósido 2 (2% p glicósido/p polímero) preparadas a partir de disoluciones en  $\text{Cl}_3\text{CH}$  (0,47)/ $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  (0,47)/ $\text{CH}_3\text{OH}$  (0,06) con A) 24, y B) 28% p polímero/v disolventes. La velocidad de flujo (0,2 ml/h), la distancia entre la punta de la aguja y el colector (16 cm) y la velocidad de rotación del colector (1.200 r.p.m.) se mantuvieron constantes. El voltaje aplicado fue A) 11,6 kV, y B) 12,2 kV.



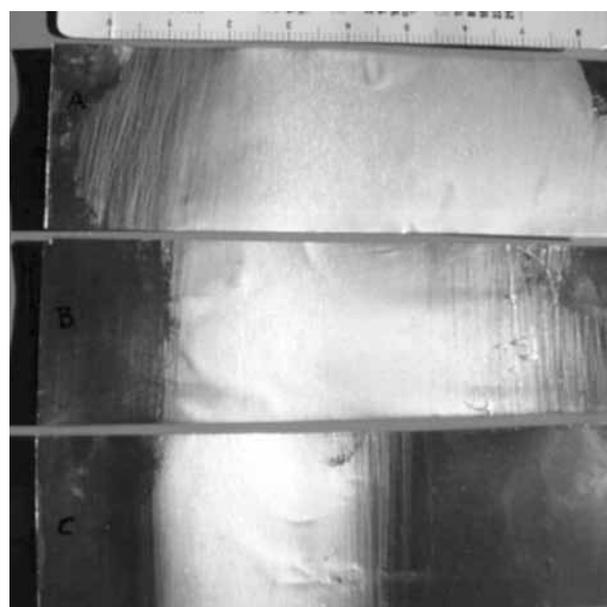
**Fig. 5.** Microscopía electrónica de barrido correspondiente a fibras de PHBHHx preparadas a partir de disoluciones al 23,5% p polímero/v disolventes con un 2% p glicósido/p polímero: A) glicósido 2, y B) glicósido sulfatado 1. En los dos casos se utilizaron las mismas condiciones de electrohilado. La muestra en A) no tiene carga libre, mientras que en B) tiene una carga libre de 7 mEq.

### 3. Influencia de las cargas libres

La presencia de cargas libres en la disolución aumenta la inestabilidad (zigzag) del hilo de disolución; consecuentemente, se deposita un mayor número de fibras de forma caótica o desordenada, aunque es posible observar un alineamiento de conjuntos de fibras (cordones), con mayor o menor número de fibras fusionadas parcialmente, según se muestra en la Figura 5.

### 4. Influencia del campo eléctrico

La uniformidad y magnitud del campo eléctrico aplicado durante el electrohilado juegan un papel importante, particularmente en lo que concierne al alineamiento de las fibras. Así, se puede mejorar la uniformidad del campo eléctrico colocando una pantalla detrás de la aguja o capilar utilizado para generar el hilo de disolución, conectada al mismo potencial que la aguja. La Figura 6 muestra cómo la dispersión de la deposición de fibras se reduce con la colocación de una pantalla a 2,5 cm detrás de la punta de la aguja y cómo un aumento de la longitud de la pantalla en relación a la del colector reduce aún más el ancho de la deposición. La pantalla obliga a aumentar el potencial aplicado para conseguir que el flujo de disolución se proyecte sobre el colector. Así, el valor del potencial aplicado varía de 5,6 kV sin pantalla a 12,7 kV con pantalla. Generalmente, el uso de una pantalla contribuye a mejorar el alineamiento de las fibras al limitar la oscilación de la fibra en su trayectoria hacia el colector. No obstante, una reducción excesiva en anchura de la región de deposición de las fibras impide parcialmente la evaporación efectiva del disolvente o disolventes y favorece la fusión de fibras, alterando su topología, como se muestra en la Figura 7. Por otra parte, y en igualdad de condiciones, un aumento en



**Fig. 6.** Efecto de una pantalla situada detrás (2,5 cm) de la punta de la aguja sobre la dispersión de las fibras en el colector: sin pantalla (muestra superior), con pantalla de longitud inferior a la longitud del tambor (muestra central), y con pantalla de longitud similar a la longitud del tambor (muestra inferior). En el último caso, se consigue una mejor definición del campo eléctrico en el volumen determinado por la pantalla/aguja y el colector, favoreciendo la deposición de fibras en una zona más estrecha (~3 cm) comparado con la ausencia de pantalla (~8 cm). En los tres casos se empleó una disolución de PHBHHx en  $\text{Cl}_3\text{CH}$  (0,28)/ $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  (0,66)/ $(\text{CF}_3)_2\text{CHOH}$  (0,06) al 20% p polímero/v disolventes. Las condiciones de electrohilado fueron: velocidad de flujo 0,2 ml/h; distancia aguja-colector 16 cm, y velocidad de rotación del colector 1.200 rpm. El voltaje aplicado fue de 5,6 kV (muestra superior), 8,7 kV (muestra central) y 12,7 kV (muestra inferior).

la magnitud del campo eléctrico contribuye a aumentar el zigzag del flujo de disolución y favorece la deposición desordenada de fibras sobre el colector (Figura 8).

### 5. Influencia de la variación de flujo

La Figura 9 muestra el efecto de un aumento en la velocidad de flujo de 0,9 a 1,2 ml/h, manteniendo constante el resto de las variables del proceso. El aumento de velocidad conduce a la pérdida de alineamiento de las fibras y formación de esferas (perlas) más o menos deformadas (elipsoides).

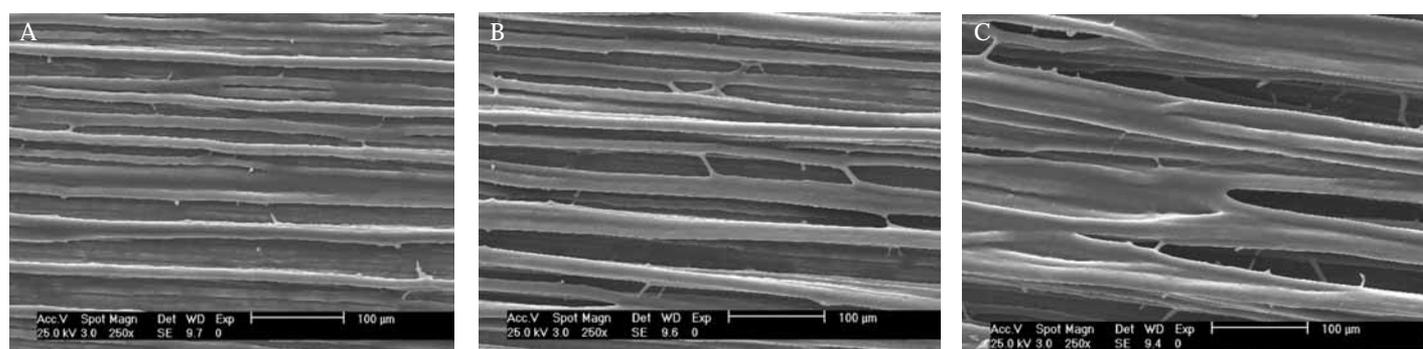
La estabilidad de la interacción entre el glicósido y el polímero se evaluó mediante la determinación por HPLC de la cantidad de glicósido liberado a lo largo del tiempo desde la fibra sumergida en agua (Figura 10).

Después de siete días, un  $4 \pm 0,2\%$  del glicósido 1 se liberó de los sustratos, frente a un  $75 \pm 2\%$  de liberación observado para el glicósido 2. El glicósido sin sulfato 2 se liberó por

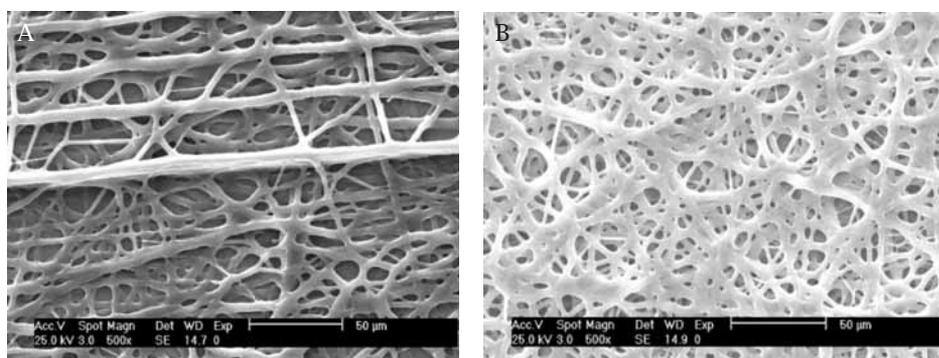
completo después de nueve días. Tras la extracción con  $H_2O/MeOH$  (1:1) de los discos con glicósido sulfatado, se obtuvo aproximadamente el 50% de 1, lo que confirma que éste queda retenido en el sustrato y que está altamente integrado con el poliéster, ya que se libera muy lentamente al medio acuoso y no se extrae por completo con  $H_2O/MeOH$ .

### I Discusión

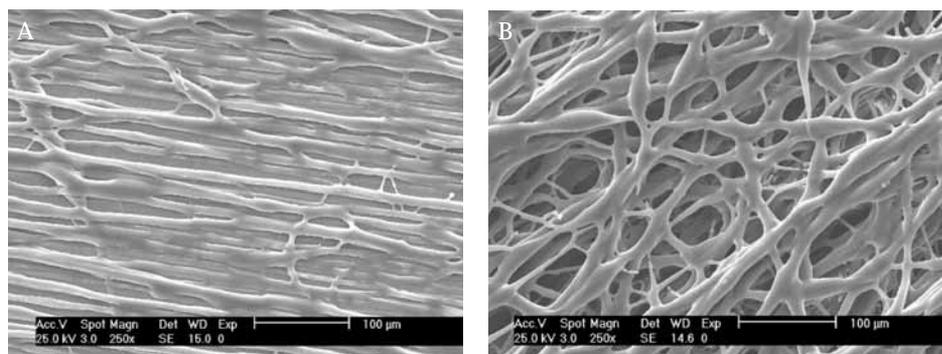
A diferencia de la técnica de electrodispersión (*electrospray*), que también utiliza campos eléctricos para la obtención de recubrimientos mediante la deposición sobre una superficie conductora de gotas de una disolución diluida de polímero, en electrohilado se obtienen fibras cuando se utilizan disoluciones suficientemente viscosas que permiten una deformación viscoelástica de las mismas sin pérdida de continuidad (formación de gotas) hasta su deposición en el colector. Este colector puede ser estático o dinámico, con



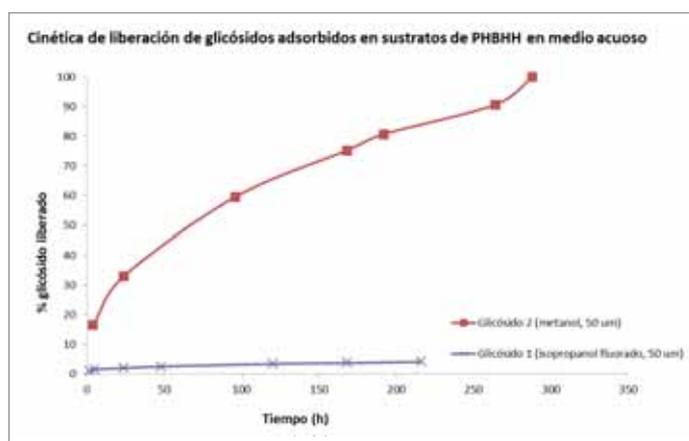
**Fig. 7.** Microscopía electrónica de barrido correspondiente a las muestras descritas en Figura 6, que ilustran la influencia de la presencia y el tamaño de una pantalla situada 2,5 cm detrás de la punta de la aguja que forma el hilo de disolución en el campo eléctrico: A) sin pantalla, y con B) pantalla de 13 x 16 cm<sup>2</sup> y C) pantalla de 13x18 cm<sup>2</sup>. La fusión de las fibras de PHBHHx es más notable en la Figura C que en A o B.



**Fig. 8.** Microscopía electrónica de barrido correspondiente a fibras de PHBHHx con octil N-acetil-β-D-glucosaminido (2% p glicósido/p polímero) en  $Cl_3CH/CH_3OH$  al 26% p polímero/v disolventes. El campo eléctrico aplicado fue: A) 0,53 kV/cm, y en B) 1,0 kV/cm. Las velocidades de flujo y rotación del colector se mantuvieron constantes, 0,9 ml/h y 610 rpm, respectivamente. El aumento del valor del campo eléctrico contribuye a un aumento de la inestabilidad del hilo y a la deposición caótica de las fibras sobre el colector.



**Fig. 9.** Microscopía electrónica de barrido correspondiente a fibras de PHBHHx preparadas a partir de una disolución en clorformo, 26% p polímero/v disolvente, con una velocidad de flujo de: A) 0,9 ml/h, y B) 1,2 ml/h. Las restantes condiciones de electrohilado no se cambiaron, siendo la distancia entre la punta de la aguja y el colector de 15 cm, la velocidad de rotación del colector igual a 610 rpm y el voltaje aplicado de 9,9 kV.



**Fig. 10.** Cinética de liberación en medio acuoso de glicósidos en sustratos de PHBHHx.

movimientos rotacional y transversal [13]. Los colectores dinámicos permiten la obtención de fibras orientadas. No obstante, también es posible la preparación de sustratos con fibras orientadas utilizando un colector bipolar estático con una separación entre polos de unos pocos centímetros [13][16]. Asimismo, se pueden alinear fibras realizando la deposición en presencia de un campo magnético transversal al campo eléctrico [21][22].

Según se deduce de lo indicado anteriormente, el diámetro y morfología de las fibras resultantes dependen de varios factores que pueden agruparse en dos categorías: los parámetros del proceso y los parámetros de la disolución [11]. Los primeros incluyen el campo eléctrico (relación entre el voltaje aplicado y la distancia entre la aguja y el colector), el flujo de disolución del polímero y, en cierta medida, la velocidad de rotación del colector. En los parámetros intrínsecos de la disolución se incluyen la densidad,

el punto de ebullición y la constante dieléctrica del disolvente, el tipo y peso molecular del polímero, y la viscosidad, la tensión superficial y la conductividad de la disolución. Además, las condiciones ambientales de temperatura y humedad afectan al desarrollo del proceso y a las características finales de las fibras. Los parámetros citados están interrelacionados y la variación de uno de ellos conlleva una modificación de los valores de otro u otros parámetros para obtener un resultado adecuado a la prestación de interés. Así, por ejemplo, se ha observado que al aumentar el voltaje aplicado el diámetro de las fibras al principio decrece y luego aumenta. También se incrementa el diámetro de las fibras al aumentar el flujo de la disolución del polímero y con el incremento de la concentración del polímero. Por otra parte, el diámetro de la fibra decrece conforme aumenta la distancia entre la aguja y el colector. En general, la preparación de sustratos con fibras alineadas demanda condiciones de electrohilado mucho más restrictivas que las utilizadas para la producción de sustratos con fibras dispuestas de forma aleatoria y, frecuentemente, es necesario alcanzar un compromiso entre las variables que intervienen en el proceso para conseguir el objetivo propuesto [23][24].

En un intento de predecir el comportamiento de una disolución de polímero en un campo eléctrico, además de correlaciones fenomenológicas, se han propuesto leyes escalares que relacionan algunos de los parámetros citados anteriormente con la morfología de las fibras, principalmente en sistemas polímero-disolvente sencillos [25-27]. No obstante, en el caso de formulaciones que involucran a más de un polímero, aditivos o mezclas de disolventes, unido a la compleja relación entre las variables que controlan el proceso de electrohilado, se hace necesario determinar experi-

mentalmente las condiciones en las que es posible obtener fibras mediante electrohilado para cada sistema.

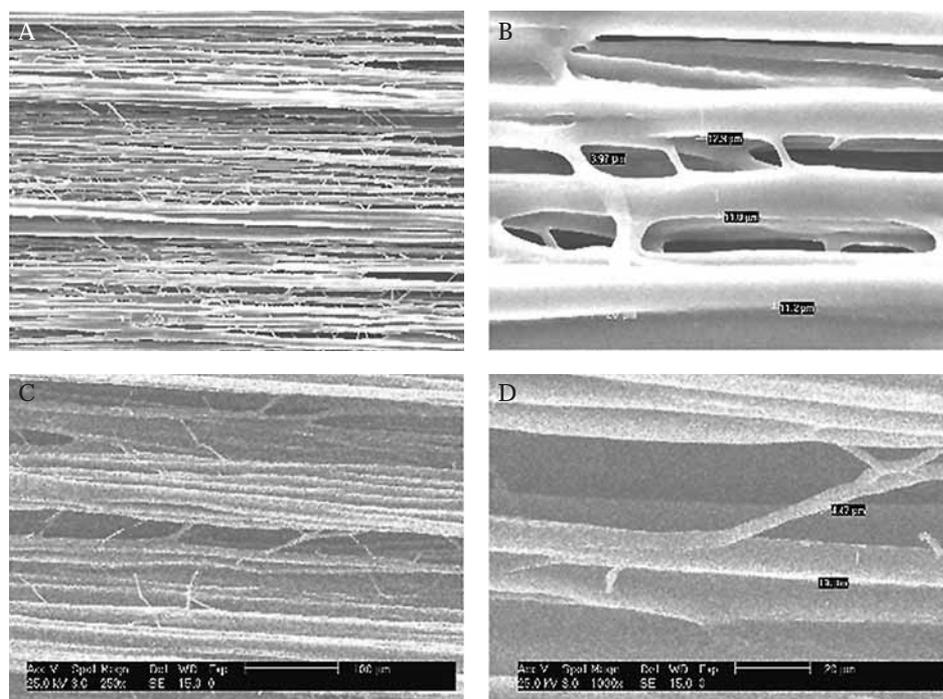
Los resultados obtenidos indican que el glicósido sulfatado 1 se retiene más en el sustrato de PHBHHx que su análogo sin sulfato 2. Este resultado es contrario a lo esperado inicialmente, ya que parecía razonable suponer que los compuestos cargados tenderían a liberarse con más facilidad en medio acuoso. El efecto observado experimentalmente en la liberación de los compuestos podría atribuirse a la influencia de la morfología y grado de empaquetamiento de las fibras, así como a la homogeneidad de la mezcla inicial polímero-glicósido. No obstante, conviene resaltar que es deseable que los glicósidos sulfatados permanezcan en los sustratos durante el tiempo de cultivo celular, lo cual se ha conseguido con estos materiales.

La elección de los disolventes empleados para obtener una disolución homogénea de glicósido y PHBHHx es un factor determinante para la preparación de fibras con una morfología óptima. Mientras que el PHBHHx se disuelve satisfactoriamente en cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y/o diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), los glicósidos son moléculas polares y requieren el empleo de un co-solvente que debe ser miscible con cloroformo y/o diclorometano, como puede ser el metanol, empleado para obtener los sustratos con el glicósido 2. En el caso del glicósido sulfatado 1, que es una molécula con

cargas, es necesario el empleo de un co-solvente de alta polaridad, miscible con cloroformo y diclorometano, por lo que se utilizó isopropanol fluorado  $(\text{CF}_3)_2\text{CHOH}$ . Las imágenes de SEM de las fibras obtenidas se muestran en la Figura 11.

Considerando que las fibras obtenidas tienen una morfología comparable, la mayor retención en los sustratos de PHBHHx del glicósido 1 en medio acuoso podría atribuirse a una mayor homogeneidad de la disolución; es decir, a una mejor integración/interacción entre los diferentes componentes de la mezcla de electrohilado (glicósido 1, PHBHHx, disolventes), así como a la acción de las fuerzas electroestáticas generadas durante el proceso de electrohilado.

La anisotropía estructural es una característica de la médula espinal y, por ello, parece deseable que un soporte diseñado para reparar una lesión en este tejido posea la capacidad de favorecer el crecimiento axonal en una dirección predeterminada [2]. La técnica de electrohilado permite obtener soportes celulares anisotrópicos que pueden dirigir el desarrollo de neuritas en la dirección de interés; lo cual es una ventaja frente a soportes isotrópicos utilizados en modelos experimentales de lesión medular (p.e., geles o sustratos porosos de diferentes tipos). Además, en este trabajo se ha mostrado que es posible incorporar en las fibras de polímero electrohiladas elementos estructurales característicos



**Fig. 11.** SEM de sustratos de PHBHHx con A) glicósido 2 no sulfatado (sustrato de espesor ~50 micras, co-solvente empleado MeOH) B) glicósido 1 sulfatado (sustrato de espesor ~50 micras, co-solvente empleado  $(\text{CF}_3)_2\text{CHOH}$ ).

de los glicosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular del SNC y que pueden contribuir a mejorar la interacción sustrato-célula. Aunque queda fuera del alcance del trabajo preliminar presentado aquí, se puede indicar que la técnica permite también la incorporación de otros agentes biológicos que favorezcan esa interacción y promuevan la diferenciación y crecimiento celular en la forma deseada.

## Conclusiones

Mediante la técnica de electrohilado se han producido fibras alineadas de poly(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) (PHBHHx) funcionalizadas con glicósidos sintéticos que son elementos estructurales de los glicosaminoglicanos. Se ha evaluado la influencia que tienen diferentes factores del proceso sobre la morfología de las fibras. Así, el mejor compromiso entre la orientación-diámetro de fibra y las condiciones de electrohilado se obtuvo empleando una pantalla de dimensiones iguales o inferiores a la longitud del cilindro colector, campos eléctricos de 0,5 a 0,75 kV/cm, concentraciones de polímero entre el 20-24% (peso polímero/volumen disolvente) y disolventes de baja a moderada constante dieléctrica (8-18). Los ensayos para determinar la interacción entre los glicósidos y las fibras revelaron que la mayor parte del glicósido sulfatado 1 se mantiene expuesto en la superficie durante más de una semana sumergidas en agua.

Los resultados preliminares en células neurales indicaron que los sustratos funcionalizados con los glicósidos permitieron la adhesión y migración de las células sin afectar a su viabilidad. **I**

## Agradecimientos

Para la realización de este trabajo se ha contado con ayudas de FUNDACIÓN MAPFRE y del Instituto de Salud Carlos III (PI11/01436 and PI11/00592).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Schwab JM, Brechtel K, Mueller CA, Failli V, Kaps HP, Tuli SK, Schluesener HJ. Experimental strategies to promote spinal cord regeneration-an integrative perspective. *Prog Neurobiol* 2006; 78:91-116.
- Teixeira AI, Duckworth JK, Hermanson O. Getting the right stuff: controlling neural stem cell state and fate in vivo and in vitro with biomaterials. *Cell Res* 2007; 17:56-61.
- Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* 2007; 32:762-98.
- Freier T. Biopolyesters in tissue engineering applications. *Adv Polym Sci* 2006; 203:1-61.
- Bian Y-Z, Wang Y, Aibaidoula G, Chen G-Q, Wu Q. Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2009; 30:217-25.
- Xu X-Y, Li X-T, Peng S-W, Xiao J-F, Liu C, Fang G, Chen KC, Chen G-Q. The behavior of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds. *Biomaterials* 2010; 31:3967-75.
- Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 2000; 80:1267-90.
- Murrey HE, Hsieh-Wilson LC. The chemical neurobiology of carbohydrates. *Chem Rev* 2008; 108:1708-31.
- Tully SE, Mabon R, Gama CI, Tsai SM, Liu X, Hsieh-Wilson LC. A chondroitin sulfate small molecule that stimulates neuronal growth. *J Am Chem Soc* 2004; 126:7736-7.
- Rawat M, Gama CI, Matson JB, Hsieh-Wilson LC. Neuroactive chondroitin sulfate glycomimetics. *J Am Chem Soc* 2008; 130:2959-61.
- Pham QP, Sharmu U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng* 2006; 12:1197-2110.
- Hong JK, Madhally SV. Next generation of electrospayed fibers for tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2011; 17:125-41.
- Liu W, Thomopoulos S, Xia Y. Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Adv Healthcare Mater* 2012; 1:10-25.
- Lim SH, Xingyu Y, Song H, Yarema KJ, Mao H-Q. The effect of nanofiber-guided cell alignment on the preferential differentiation of neural stem cells. *Biomaterials* 2010; 31:9031-9.
- Mahairaki V, Lim SH, Christopherson GT, Xu L, Nasonkin I, Yu C, Mao H-Q, Koliatsos VE. Nanofiber matrices promote the neuronal differentiation of human embryonic stem cell-derived neural precursors in vitro. *Tissue Eng Part A* 2011; 17:855-63.
- Li D, Xia Y. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel. *Adv Mater* 2004; 16:1151-70.
- Bazán E, López-Toledano MA, Redondo C, Alcázar A, Mena MA, Paino CL, Herranz AS. Characterization of rat neural stem cells from embryonic striatum and mesencephalon during in vitro differentiation. En: Castellano B, González B, Nieto-Sampedro M (eds). *Understanding glial cells*. Dordrecht, Kluwer Acad Publ; 1998. 133-47.
- Lobo MV, Alonso FJ, Redondo C, López-Toledano MA, Caso E, Herranz AS, Paino CL, Reimers D, Bazán E. Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded free-floating neurospheres. *J Histochem Cytochem* 2003; 51:89-103.

19. Moreno-Flórez MT, Bradbury EJ, Martín-Bermejo MJ, Agudo M, Lim F, Pastrana E, Ávila J, Díaz-Nido J, McMahon SB, Wandosell F. *Mol Ther* 2006; 13:598-608.
20. Doncel-Pérez E, García-Álvarez I, Fernández-Mayoralas A, Nieto-Sampedro M. Synthetic glycolipids for glioma growth inhibition developed from neurostatin and NF115 compound. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23:435-9.
21. Yang D, Lu B, Zhao Y, Jiang X. Fabrication of aligned fibrous arrays by magnetic electrospinning. *Adv Mater* 2007; 19:3702-6.
22. Liu Y, Zhang X, Xia Y, Yang H. Magnetic-field-assisted electrospinning of aligned straight and wavy polymeric nanofibers. *Adv Mater* 2010; 22:2454-7.
23. Kiselev P, Rosell-Llompart J. Highly aligned electrospun nanofibers by elimination of the whipping motion. *J Appl Polym Sci* 2012; 125:2433-41.
24. Sun Z, Deitzel JM, Knopf J, Chen X, Gillespie JW. The effect of solvent dielectric properties on the collection of oriented electrospun fibers. *J Appl Polym Sci* 2012; 125:2585-94.
25. Shenoy SL, Bates WD, Frisch HL, Wnek GE. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer-polymer interaction limit. *Polymer* 2005; 46:3372-84.
26. Gupta P, Elkins C, Long TE, Wilkes GL. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer* 2005; 46:4799-810.
27. Koski A, Yim K, Shivkumar S. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Mat Letters* 2004; 58:493-7.

---

#### Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.