

PELÍCULAS DE POLÍMEROS NATURALES PARA POSIBLE
REEMPLAZO DURAL

DANIELA ZAPATA BEDOYA
ALIX SORAYA VALENZUELA GARZÓN

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE BIOINGENIERÍA
MEDELLIN
2018

PELÍCULA DE POLÍMEROS NATURALES PARA POSIBLE
REEMPLAZO DURAL

DANIELA ZAPATA BEDOYA
ALIX SORAYA VALENZUELA GARZÓN

Trabajo de grado para optar por el título de BIOINGENIERA

ASESORA:
CLAUDIA PATRICIA OSSA OROZCO
INGENIERA MECÁNICA, Ph. D.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOMATERIALES BIOMAT
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
MEDELLIN
2018

DEDICATORIA

A Dios	mi fe
A mis padres	mi veneración
A mis hermanos	mi fortaleza
A mi familia	mi pilar
A mi pareja	mi amor incondicional
A mis maestros	mi respeto
A mis amigos	mi presencia
A quienes me ayudaron	mi agradecimiento
A quienes ofendí	mi disculpa
A quienes me ofendieron	mi perdón
A mi alma mater	mi gratitud
A mi patria	mi devoción

Y para todos los que creen que la ciencia puede cambiar el mundo

AGRADECIMIENTOS

Fueron muchos los momentos claros y oscuros a lo largo de este camino, pero afortunadamente nos podemos sentar a escribir la parte más emotiva y personal de este trabajo: los agradecimientos a todos aquellos quienes de una manera u otra nos ayudaron a alcanzar esta meta.

Ángela – Carlos y Elsa - Gemma, por quienes tenemos la dicha de disfrutar de esto que se llama vida y de sentir su apoyo constante en cada paso o decisión que hemos tomado a lo largo de nuestras existencias. No nos alcanzaría el tiempo para agradecerles profundamente todo su apoyo, cariño, comprensión y el amor que nos han brindado. Gracias por enseñarnos a ser mejor todos los días, soñar por lo que queremos, amar lo que hacemos y a no conformarnos. Gracias a la vida por estar con nosotras. Son ustedes, los merecedores de cada pequeño logro que hemos alcanzado y que alcanzaremos en futuros proyectos.

A nuestros hermanos **Simón – Laura y Tatiana - Fabián**, en quienes encontramos la dicha y la razón de seguir en este mundo de oportunidades y retos.

Gracias a nuestra familia por inculcarnos su capacidad de lucha y fortaleza, por hacernos ser tan obstinadas en todo lo que emprendemos, gracias por su ayuda incondicional y sin límites, gracias por aguantarnos cuando nosotras mismas no lo hacíamos, gracias por ser un ejemplo.

Nos gustaría expresar nuestro más profundo agradecimiento a la Doctora Claudia Patricia Ossa Orozco, directora de este barco, por confiar en nosotras desde el primer momento y darnos la valiosa oportunidad de emprender el camino en este bonito, pero a la vez tan arduo mundo de la ciencia. Por trasladarnos su pasión, perseverancia, sabiduría y talento. Por enseñarnos que la familia y el compromiso con la investigación pueden ir de la mano. Por todo mil y mil gracias.

A los laboratorios de Biología celular, Bioprocesos por la donación de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. A laboratorio de polímeros por su dedicación y tiempo con los ensayos mecánicos. A Dayana Meza por la paciencia y amabilidad a la hora de registrar las mejores imágenes microscópicas de nuestras películas. A Luz Marina Restrepo por los fibroblastos, que fueron parte fundamental para culminar esta tesis. A la Doctora Lenka Toro por sus conocimientos en los ensayos de citotoxicidad. A Jerónimo Osorio por el tiempo, la entrega y cordialidad en los buenos resultados antimicrobianos obtenidos.

A todo el grupo de trabajo de Biomat por compartir risas, conversaciones, largos días en el laboratorio, prestar material cuando la angustia se apoderaba de nosotras. Gracias por su compañía y apoyo.

Lili, gracias por compartir con nosotras angustias y alegrías tanto a nivel laboral como personal, por ser un apoyo incondicional, fuente de ánimo e inestimable ayuda, gracias por tu sencillez y entrega completa. Gio, nos has enseñado que las cosas son más simples de lo que parecen: “La primera vez duele, pero luego se disfruta. Esto es ciencia, hay que respirar y volver hacer”. Que las soluciones muchas veces las tenemos al alcance de la mano.

Un millón de gracias a nuestros amigos y compañeros, que de una manera u otra han intentado comprender lo que hacíamos cacharreando en el laboratorio y nos han ofrecido su apoyo, comprensión y ánimos.

Gracias a nuestra compañera de tesis por tu templanza y paciencia, nadie mejor que tú comprende el sacrificio que supone la ciencia. Gracias por escucharme, animarme y estar SIEMPRE ahí a pie de cañón, tanto en los buenos, pero sobre todo en los malos momentos. Gracias por todas las vivencias compartidas, los viajes, las risas... eres una persona increíble y me siento muy afortunada de poder decir a voz en grito que eres una gran amiga.

Esta tesis es por y para nosotras. No nos cabe ninguna duda que este trabajo no hubiera sido posible si no fuera por nuestro espíritu de lucha y superación personal que siempre nos hemos alentado a desarrollar. Por qué merecemos lo que soñamos y hacemos que las cosas sucedan.

Esta investigación ha sido posible gracias a la financiación de la Universidad de Antioquia, Vicerrectoría de Investigación (CODI) por el proyecto “Películas de polímeros naturales para posible reemplazo dura!” con código PR8-2-18.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	XII
RESUMEN	XIII
CAPÍTULO 1:INTRODUCCIÓN	1
1.1 INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2 OBJETIVOS.....	6
1.2.1 Objetivo general	6
1.2.2 Objetivos específicos.....	6
CAPÍTULO 2:FUNDAMENTOS TEÓRICOS	7
2.1 INTRODUCCIÓN	7
2.2 SISTEMA NERVIOSO.....	7
2.2.1 Sistema nervioso central	9
2.3 MENINGES	10
2.3.1 Desarrollo de las meninges	12
2.3.1.1 Duramadre	13
2.4 INGENIERÍA DE TEJIDOS	19
2.4.1 Ingeniería de tejidos cerebral	21
2.5 BIOMATERIALES.....	23
2.5.1 Biomateriales poliméricos.....	25
2.5.2 Biomateriales compuestos	26
2.6 FIBROÍNA	27

2.6.1	Generalidades	28
2.6.2	Propiedades	28
2.6.3	Aplicaciones	29
2.7	QUITINA Y QUITOSANO	30
2.7.1	Generalidades	31
2.7.2	Propiedades	32
2.7.3	Aplicaciones	34
2.8	REEMPLAZO DE DURAMADRE	37
2.8.1	Xenoinjertos	38
2.8.2	Autólogos	39
2.8.3	Homólogo	40
2.8.4	Sintético	41
2.8.5	Naturales	43
CAPÍTULO 3:DESARROLLO DEL MATERIAL COMPUESTO.....		49
3.1	MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1.1	Materiales.....	49
3.1.1.1	Equipos	49
3.1.1.2	Reactivos	50
3.1.1.3	Material biológico	50
3.1.2	Metodología	50
3.1.2.1	Tipo de investigación.....	50
3.1.2.2	Materia prima	51
3.1.2.3	Síntesis de películas	55
CAPÍTULO 4:RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		66
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	66
4.1.1	Fibroína de seda	66
4.1.1.1	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) ...	66
4.1.2	Quitina y quitosano.....	67
4.1.2.1	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) ...	67
4.1.2.2	Difracción de rayos x (DRX)	70

4.2 SÍNTESIS DE PELÍCULAS.....	72
4.2.1 Caracterización de películas.....	72
4.2.1.1 Espesor de películas y morfología.....	72
4.2.1.2 Propiedades mecánicas	75
4.2.1.3 Evaluación de la bioactividad	81
4.2.1.4 Ángulo de contacto.....	88
4.2.1.5 Estudio de hinchamiento	91
4.2.1.6 Actividad antimicrobiana.....	93
4.2.1.7 Citotoxicidad.....	97
4.3 CONCLUSIONES	101
RECOMENDACIONES FINALES.....	108
PERSPECTIVAS FUTURAS	109
BIBLIOGRAFÍA.....	110

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 2:

Figura 1. División del SN [36].	8
Figura 2. Esquema del SNC recubierto por el cráneo, las vértebras, las meninges y el LCR [35].	10
Figura 3. Meninges. (a) Vista anterior de las meninges espinales y (b) Vista superior de una disección de las meninges craneales [36].	11
Figura 4. Desarrollo de las meninges. Después se cierra el tubo neural (A, B), las células de la cresta neural y el mesodermo (C) migran para rodear el tubo neural y formar los primordios de la duramadre y de la aracnoides y la piamadre (D). Un seno dérmico [38].	13
Figura 5. Vista medio sagital de la cavidad craneal tras extraer el encéfalo, mostrando la orientación y extensión de la hoz del cerebro y la tienda del cerebelo [36].	14
Figura 6. La estructura de las meninges. Las capas de la duramadre se muestran en tonos de gris, la aracnoides en tonos de rosa y la piamadre en verde [39].	15
Figura 7. Elementos principales de la ingeniería de tejidos [48]	21
Figura 8. Descripción general del enfoque de Ingeniería de tejido neural. Dos enfoques: convencional (tipos de injertos) y enfoque de ingeniería de tejidos. Se elaboran tipos de estímulos, células y biomateriales [55].	23
Figura 9. Aplicaciones de la fibroína de seda [80]	30
Figura 10. Representación de las cadenas de quitina y de quitosano desacetilado para evidenciar su similitud estructural [66].	32
Figura 11. Materiales usados para reemplazo dural [84],[87].	48

CAPÍTULO 3:

Figura 12. Esquema del procedimiento de extracción de fibroína de seda	52
Figura 13. Esquemización del proceso de fabricación de diferentes muestras de las películas poliméricas para posible reemplazo dural.	57
Figura 14. Probetas para el ensayo de tracción	63

CAPÍTULO 4:

Figura 15. FTIR de scaffold de fibroína liofilizada a partir de la solución extraída. En azul las amidas correspondientes a la seda I t el morado las correspondientes a la seda II	66
Figura 16. Espectro infrarrojo de absorbancia del polvo de quitosano.....	68
Figura 17. Espectro infrarrojo de absorbancia del polvo de quitosano.....	70
Figura 18. Difractograma de rayos-X del quitosano.....	71
Figura 19. Difractograma de rayos-X de la quitina.....	71
Figura 20. Espesor de las películas en los días 0 y 28	72
Figura 21. Micrografías de las películas preparadas.	73
Figura 22. Esfuerzo máximo de las películas ensayadas	76
Figura 23. Módulo de elasticidad de las películas ensayadas	77
Figura 24. Curvas Esfuerzo vs deformación de las películas.....	79
Figura 25. Variación del peso al estar las películas inmersas en SBF.....	82
Figura 26. Degradación en el contorno de las películas en los días 7, 14 y 21....	83
Figura 27. Evolución del pH durante los 21 días de inmersión	87
Figura 28. Valores de ángulo de contacto para películas de (a) 100% quitosano; (b) 50% quitosano-50% fibroína; (c) 100% quitosano- 20% quitina; (d) 50% quitosano-50% fiborina-20% quitina	89
Figura 29. Capacidad de hinchamiento de las películas.....	91
Figura 30. Histograma general de la zona de inhibición de las películas contra E. Coli y S. Aureus	94
Figura 31. Zona de inhibición del crecimiento alrededor de las películas para (a) E. coli y (b) S. aureus	97
Figura 32. Porcentaje de absorbancia para las películas en diferentes longitudes de onda.....	98
Figura 33. Extractos de las películas.....	99
Figura 34. Células en contacto con el extracto de las películas 24 horas después.	100

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 2:

Tabla 1. Propiedades mecánicas de tres sustitutos dúrales y datos mecánicos informados para duramadre nativa.....	18
Tabla 2. Potencial de aplicación de la quitina / quitosano [97], [100].	34

CAPÍTULO 3:

Tabla 3. Formulaciones preliminares de las películas para posible reemplazo dural	60
Tabla 4. Formulaciones seleccionadas de las películas para posible reemplazo dural.....	62

CAPÍTULO 4:

Tabla 5. Propiedades superficiales y mecánicas de las películas	80
Tabla 6 Estudio citotóxico de las películas M1, M2, M3 y M4	98
Tabla 7. Comparación de las propiedades de las películas poliméricas M1, M2, M3 y M4.....	106

RESUMEN

A causa de accidentes, enfermedades y/o problemas congénitos y diferentes procedimientos neuroquirúrgicos, frecuentemente se compromete la integridad de la duramadre, que es la membrana fibrosa que recubre el cerebro y la médula espinal. El daño a la duramadre debe repararse para proteger la corteza subyacente, evitar daños en los tejidos corticales y fugas de líquido cefalorraquídeo (LCR). Cuando no se puede lograr el cierre primario, comúnmente se utiliza un sustituto para sellar y reparar el defecto dural.

Numerosos materiales se han implementado para reconstruir la duramadre dañada, desde láminas de metal y tejidos corporales (autólogos, homólogos), hasta xenoinjertos y materiales biosintéticos. Un sustituto dural ideal debería restaurar adecuadamente la continuidad de la duramadre y prevenir la fuga del LCR, mientras minimiza la infección. Las propiedades del material deben facilitar la sutura y/o adherencia, también deben imitar el comportamiento de la duramadre natural para permitir que se cubran fácilmente los tejidos corticales. Además, un sustituto de duramadre apropiado minimizará la inflamación del tejido local y preferiblemente fomentará la infiltración de las células y la vascularización, para acelerar la reconstrucción de la duramadre nativa; sin inducir resultados no deseados de fibrosis o adherencias corticales. No obstante, la búsqueda extensiva de un óptimo sustituto dural se ha extendido por más de un siglo y ha abarcado más de 50 materiales diferentes, todos tienen limitaciones y desventajas como la formación de adherencias, malas propiedades físicas y mecánicas, reacciones inflamatorias, alto costo y dificultad para obtener, almacenar y procesar.

Por lo anterior, los recientes adelantos en el campo de la ingeniería y los materiales para aplicaciones biomédicas, han estimulado la necesidad de desarrollar compuestos de polímeros naturales que permiten obtener propiedades importantes como buena resistencia mecánica, aumento de la actividad antimicrobiana,

biocompatibilidad y bioactividad, por lo que en esta investigación se desarrolló un compuesto de quitosano, quitina y fibroína de seda extraída directamente de los capullos del gusano de seda *Bombyx mori*, debido a que estos materiales son biocompatibles y cada uno de ellos presenta propiedades físicas y químicas adecuadas para su uso en medicina regenerativa con potencial aplicación como remplazo dural.

La fabricación de las películas poliméricas se realizó por el método de *casting* a partir de diferentes formulaciones de quitosano al 50 y 100% p/p, 50 y 100% v/v de fibroína de seda, 20% p/v de quitina respecto al quitosano, 5% de entrecruzante (glutaraldehído) y 25% de plastificante (glicerina) respecto a la cantidad de quitosano usado, para posterior caracterización de los materiales por medio de ensayos de degradación, morfología, SEM, resistencia a la tracción, mojabilidad y actividad antimicrobiana con cepas Gram negativas y Gram positivas. Si bien, los resultados obtenidos demostraron que la mayoría de las formulaciones evaluadas son aptas para su potencial aplicación como remplazo de duramadre, se destaca que el porcentaje de quitosano y la fibroína de seda presenta efectos relevantes en el comportamiento del material, además que la quitina fue crucial para las propiedades mecánicas obtenidas. Se realizó también una caracterización biológica, para conocer el comportamiento celular que inducen *in vitro* las películas fabricadas, donde se utilizaron fibroblastos humanos en ensayos de citotoxicidad, revelando que todas las formulaciones desarrolladas fueron biocompatibles y no presentaron reacciones tóxicas. Lo que muestra el potencial de estas películas para ser usadas como reemplazo dural.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción y planteamiento del problema

Los órganos centrales del Sistema Nervioso (SN) están encerrados en tres meninges que de afuera hacia dentro son la duramadre, la aracnoides y la piamadre. La duramadre es una membrana densa y resistente de tejido fibroso blanco, que se adhiere al interior de la bóveda craneana a través de una membrana de tejido conjuntivo (periostio) [1]. De igual manera, es una de las capas inversoras del cerebro que no solo protege al sistema nervioso central (SNC), sino que además ofrece aislamiento, soporte mecánico, protección y contención del líquido cefalorraquídeo (LCR)[2].

En algunas ocasiones, esta meninge puede resultar afectada como consecuencia de un traumatismo durante la extirpación de un tumor, anomalías congénitas o fracturas de base craneal por accidentes [3]. Por otro lado, el número de personas que padecen déficits funcionales a causa de estas lesiones aumentan a nivel mundial, como resultado de accidentes cerebrovasculares o traumatismos craneoencefálicos (TCE) que pueden afectar diferentes áreas cerebrales del SNC [4]. Los TCE son la principal causa de muerte y discapacidad permanente en Colombia. El informe de la Universidad de la Sabana publicado en el 2017, revela que este trauma es una de las patologías de mayor prevalencia en el territorio colombiano, por cada cien mil habitantes se presentan 200 casos de TCE; de acuerdo con cifras recientes del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, el politraumatismo (incluyendo TCE) se registró en el 65.5% de las lesiones fatales en accidentes de tránsito, seguido por el TCE, con el 27.2 % [5], implicando directa o indirectamente afecciones en la duramadre.

Por otro lado, en algunas operaciones en las que se tratan las malformaciones de Chiari, craniectomías descompresivas postraumáticas/postavasculares, la hidromielia y la mielopatía cervical, puede estar indicada una extensión plástica de

la duramadre[6], por lo tanto, es necesario recurrir a otros materiales o tejidos (sustitutos biológicos o sintéticos) para reemplazar el tejido perdido y aislar el cerebro del entorno externo (duraplastia).

Es importante denotar, que un cierre inadecuado de la duramadre, expone al paciente a posibles complicaciones postoperatorias debido a una comunicación anormal entre el compartimento subaracnoideo y el espacio extradural, como fístulas del LCR, infecciones, neumocéfalo hipertensivo, seudomeningocele, hernia de tejido neural, adherencias, meningitis y epilepsia [7],[8]. Teniendo en cuenta lo anterior, cada vez es más difícil ignorar la morbilidad asociada con una pérdida de la integridad dural, por lo cual, en los últimos años, ha existido un interés creciente en la búsqueda extensiva de un óptimo sustituto dural [9]. Uno de los propósitos principales de cualquier material que se use como sustituto dural, es poseer la capacidad de reducir o prevenir las adherencias entre la corteza cerebral y los tejidos blandos [10]. Esto, a su vez, disminuye la posibilidad de convulsiones postoperatorias o postraumáticas. Al evaluar posibles sustitutos duros, varios autores han enumerado las propiedades que debe poseer el material idóneo de la siguiente forma: inercia en el tejido, no toxicidad, no debe inducir una respuesta inmunológica o inflamatoria, resistencia a la tracción, disponibilidad en varios tamaños conservando su forma después de la aplicación, facilidad de esterilización y consistencia blanda. Además, el sustituto debe permanecer intacto el tiempo suficiente para evitar el crecimiento interno del tejido fibroso, en el período antes de la regeneración del pia-aracnoideo [11].

Si en primera instancia no es posible el cierre de la duramadre, es necesario recurrir al uso de injertos duros. Por lo tanto, en la práctica neuroquirúrgica común, se han utilizado diversas medidas como el uso de trasplantes autólogos, injertos y materiales homólogos, heterólogos y alogénicos. Esta búsqueda se ha extendido por más de un siglo y ha abarcado más de 50 materiales diferentes, no obstante, todos tienen limitaciones y desventajas como la formación de adherencias, malas propiedades físicas y mecánicas, alto costo y dificultad para obtener, almacenar y procesar.

Lo ideal es que el reemplazo dural se realice con autoinjertos de tejidos del periostio, fascia temporal, fascia lata o galea. Laun *et al.* [12] exponen que estos injertos son fáciles de manejar, no son tóxicos y presentan un comportamiento biológico favorable, sin embargo, el uso de estos tejidos deja de ser útil cuando los defectos son de gran tamaño. Además, requieren de un tratamiento inmediato para la conservación del injerto, aumentado el tiempo de operación y exposición al ambiente. Por otro lado, Yamada *et al.* [13] reportan que la duramadre homóloga también es ampliamente utilizada, pero los métodos actuales de esterilización no garantizan que esté libre de riesgo de virus latentes, priones e infecciones. Es importante mencionar que aunque los parches autólogos son la mejor opción debido a la ausencia de reacciones inmunitarias, en algunos casos no son posibles o son difíciles de cosechar, por lo que se requieren medidas alternativas [14].

En otros casos los sustitutos dúrales no autólogos (aloinjertos, xenoinjertos y materiales sintéticos) como pericardio bovino, celulosa oxidada regenerada, submucosa del intestino delgado bovino, politetrafluoroetileno expandido, matriz de colágeno, colágeno derivado de piel bovina o poliéster uretano, se han usado ampliamente en el pasado, demostrando ser en la mayoría de los casos, inmunológicamente neutral, muy flexible y resistente contra el estiramiento y la tensión, accesible y con la formación de una cicatriz mínima [15]. No obstante, Todd *et al.* [16] refiere que los injertos no autólogos promueven la colonización crónica y la infección recurrente cuando se usan en heridas contaminadas o infectadas, conllevando a riesgos inmunológicos fatales. Algunos materiales sintéticos mencionados anteriormente, fueron injertos dúrales populares utilizados en los años ochenta y noventa, pero se ha demostrado tasas significativas de hemorragia, fibrosis y síntomas de meningitis [9].

En Colombia, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), es el ente encargado de la protección de la salud individual y colectiva de los colombianos, mediante la aplicación de las normas sanitarias asociada al consumo y uso de alimentos, medicamentos, dispositivos médicos y otros productos objeto de vigilancia sanitaria, reportó que el uso de agentes hemostáticos a base de

gelatina absorbible durante la reparación de defectos de la duramadre asociados con operaciones de laminectomía y craneotomía ha sido asociado con fiebre, infección, estenosis espinal, meningitis, aracnoiditis, dolor de cabeza, parestesias e intenso dolor [17]. Por otro lado, esta entidad ha avalado a la empresa TM médicas para la comercialización de un injerto dural biodiseñado a partir de materiales naturales como el colágeno, que mantiene la resistencia a largo plazo, caracterizándose por minimizar las tasas de fuga de LCR, generando un fuerte sello en la cavidad dural [18].

De igual manera, la compañía MediRex fabrica injertos de duramadre no sintéticos a partir de colágeno bovino, mostrando resultados adecuados para tratar los defectos craneales [19]. Por su parte, la empresa Nefromédicas, comercializa el adhesivo y sellante biológico BioGlue, conformado por albúmina de suero bovino y glutaraldehído, el cual, forma un hidrogel de proteína flexible que se enlaza covalentemente con los tejidos y se une mecánicamente con materiales sintéticos logrando la adherencia y fuerza óptimas para aplicaciones médicas, como coadyuvante de los métodos estándar para reparación quirúrgica en reforzamiento de parénquima dañada y tejido [20].

A nivel internacional se ha potencializado la industria en la fabricación y desarrollado de materiales para reemplazo dural, TissueMed comercializa una película selladora fabricada de polímeros sintéticos, diseñada específicamente para reforzar el cierre de duramadre y lograr un sellado hermético que evita fugas de LCR [21]. De forma similar, DePuySynthes es una compañía que vende el producto DuraForm como sustituto dural biocompatible, hecho a partir de colágeno exhibe resistencia a la tracción y capacidad de manejo en húmedo, es fácil de agarrar y manipular, a mano o con pinzas [22]. El lado inferior suave y liso se amolda suavemente a las complejas estructuras superficiales del cerebro y la duramadre, minimizando pliegues indeseables. Por último, la empresa Hemisur comercializa un parche de pericardio bovino entrecruzado con glutaraldehído para reparación dural, defectos a nivel craneal, resección de tumores, traumas y corrección de aneurismas [23].

Prácticamente todos los injertos dúrales utilizados hasta ahora se han asociado con complicaciones, algunas de ellas importantes. En los últimos años, la atención de los investigadores y neurocirujanos se ha enfocado hacia la investigación y el uso de un "sustituto dural ideal" [24]. Es así como los polímeros naturales como el colágeno o el alginato, tienen resultados prometedores para restaurar el defecto de la duramadre y crear condiciones favorables para el desarrollo del tejido conectivo en el sitio de la lesión.

Por lo anterior, los recientes adelantos en el campo de la ingeniería y los materiales para aplicaciones biomédicas, han estimulado la necesidad de desarrollar compuestos de polímeros naturales que permiten obtener propiedades importantes como buena resistencia mecánica, aumento de la actividad antimicrobiana, biocompatibilidad y bioactividad. La fibroína de seda derivada del gusano de seda, es un polímero-proteína crucial para aplicaciones biomédicas. Las propiedades útiles de este polímero son la capacidad de promover la formación de tejidos, biodegradabilidad controlada, hemocompatibilidad, citocompatibilidad, elasticidad y flexibilidad [25]. Por su parte, el quitosano, es una sustancia que se obtiene por desacetilación de la quitina, estimula los macrófagos, quimiotactona, los neutrófilos y ayuda a acelerar la curación de las heridas [26]. Los derivados de quitosano limitan la formación de cicatrices y la retracción durante la cicatrización [27]. Son versátiles, biodegradables y no tóxicos; ofrece una amplia gama de aplicaciones; puede obtenerse en diversas formas, incluidos polvos, geles y películas [28]. Se han utilizado en la regeneración de la piel y para la ingeniería de tejidos ortopédicos [26]. Así mismo, la quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, no es tóxica, es biodegradable, biofuncional y biocompatible, además de tener características antimicrobianas [29].

Estudios previos han hallado que al unir polímeros y proteínas como el quitosano y la fibroína, se obtiene excelente compatibilidad biológica, osteoconducción, mayor nivel de proliferación y diferenciación osteogénica, degradabilidad enzimática

controlada y elevadas propiedades mecánicas [30]. El estudio de Li *et al.* [31] acerca de la fabricación de nanofibras de fibroína/quitina, demostraron que esta mezcla podría ser un candidato potencial para andamios de ingeniería tisular, porque tiene una estructura tridimensional biomimética y una baja adhesión y dispersión celular [32]. La literatura científica desarrollada hasta el momento, es limitada sobre el uso de los materiales mencionados anteriormente para el reemplazo de la duramadre. En consecuencia, el propósito de esta investigación es poner a prueba la hipótesis de que la elaboración de películas de polímeros fibroína/quitina y fibroína/quitosano podrían ser una alternativa efectiva como sustituto dural. Para ello, se realizarán ensayos morfológicos y mecánicos, se evaluarán las propiedades de degradación y se analizará la actividad antimicrobiana y la citotoxicidad de las películas fabricadas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar películas fabricadas de polímeros naturales fibroína – quitosano y fibroína - quitina para posible reemplazo dural.

1.2.2 Objetivos específicos

Desarrollar un protocolo para la elaboración de películas de polímeros naturales fibroína – quitosano y fibroína - quitina para un posible reemplazo dural.

Analizar las propiedades morfológicas, mecánicas, mojabilidad y de degradabilidad de las películas elaboradas.

Determinar el comportamiento antimicrobiano y la citotoxicidad de las películas fabricadas.

Establecer el protocolo que mejores propiedades presente para un posible reemplazo dural.

CAPÍTULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Introducción

En este capítulo se exponen los conceptos teóricos relevantes para el entendimiento de los fenómenos que toman lugar durante el desarrollo de la tesis. En primera instancia, se presenta las características morfológicas de la duramadre, puesto que es el tejido que se busca reparar con las películas a fabricar. Posteriormente, se presentan los materiales usados en la fabricación de las biopelículas, sus características, propiedades y aplicaciones. También se abordan los diferentes materiales que han sido utilizados a lo largo de la historia para el reemplazo de la duramadre, su comportamiento biológico y sus ventajas y limitaciones en neurocirugía. Por último, se presentan las propiedades de los materiales seleccionados para la fabricación de las películas poliméricas, lo que facilitará la comprensión de los resultados obtenidos.

2.2 Sistema nervioso

El sistema nervioso humano es complejo y se encuentra clasificado entre los sistemas orgánicos más pequeños en términos de peso corporal. Está formado por billones de unidades que interactúan entre sí, de tal manera que definen la conducta y la manera de reaccionar de un ser vivo frente a los distintos estímulos del medio interno o externo [33].

Histológicamente, el tejido nervioso se distribuye a lo largo de todo el cuerpo y forma una red de comunicación integral. Las funciones se centran en detectar, analizar, integrar y transmitir la información que se genera por estímulos sensoriales y cambios químicos o mecánicos, así como organizar y coordinar las funciones corporales [34].

Desde el punto de vista neuroanatómico y funcional, el sistema nervioso se divide en sistema nervioso central (SNC) o neuroeje y sistema nervioso periférico (SNP), como se ilustra en la Figura 1. El SNC se encarga de procesar la información sobre el medio ambiente y el estado del cuerpo, para generar un comportamiento adecuado en respuesta a los estímulos analizados. Está constituido por el encéfalo, que ocupa la cavidad craneana, y el cordón espinal, que ocupa parte del conducto raquídeo. El SNP está compuesto por los pares craneanos, relacionados de alguna manera con el cráneo, y los pares raquídeos y con las vértebras. Los nervios periféricos son los responsables de llevar información aferente o sensitiva desde la periferia hacia el SNC, e información eferente o motora desde el SNC hacia los órganos blanco, como músculos y glándulas [35].

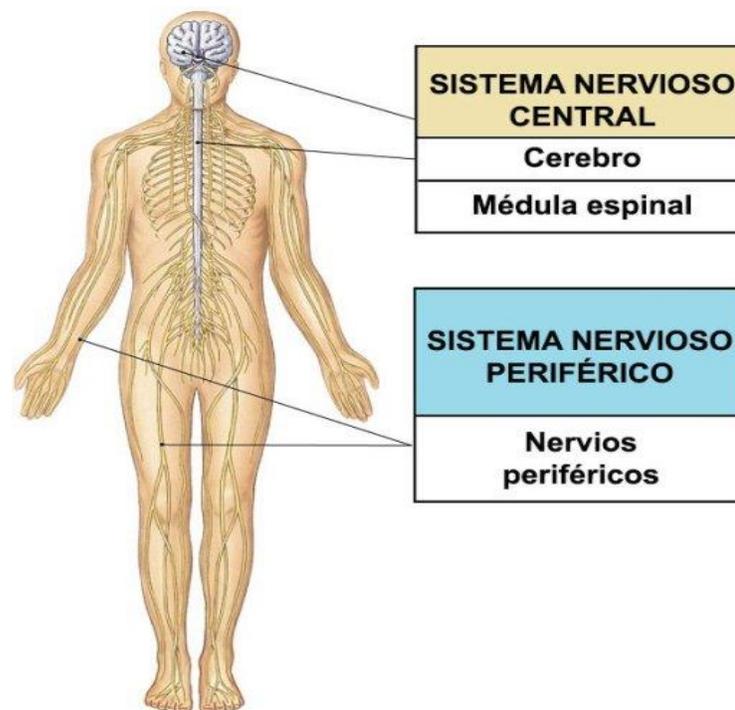


Figura 1. División del SN [36].

2.2.1 Sistema nervioso central

Consta de la médula espinal y el encéfalo. A pesar de que ambos están conectados anatómicamente, la médula espinal y el encéfalo muestran un grado significativo de independencia funcional. La médula espinal, es mucho más que una vía para que la información viaje hasta o desde el encéfalo, aunque la mayor parte de los datos sensitivos se transmiten al encéfalo, la médula espinal también integra y procesa información por sí misma [36].

El SNC requiere de protección especial, por eso se encuentra recubierto por el cráneo, las vértebras que forman el conducto raquídeo y tres capas de tejido conjuntivo denominadas meninges: la duramadre, la aracnoides y la piamadre. La duramadre es la capa más externa y gruesa, la piamadre es la capa que tapiza la superficie del neuroeje y, entre estas dos membranas, se encuentra la aracnoides, que se adhiere a la cara interna de la duramadre. Entre la aracnoides y la piamadre se encuentra el espacio subaracnoideo, que contiene líquido cefalorraquídeo (LCR). En este líquido se encuentra suspendido todo el neuroeje. Las secciones en las que el espacio subaracnoideo se ensancha se conocen como cisternas. Un ejemplo de estas es la cisterna lumbar, que se observa en la Figura 2, en la que se aprecia también el filum terminale, una prolongación de la piamadre que une el cordón espinal a la duramadre. El ligamento coccígeo es una prolongación de la duramadre que se fija al hueso cóccix.

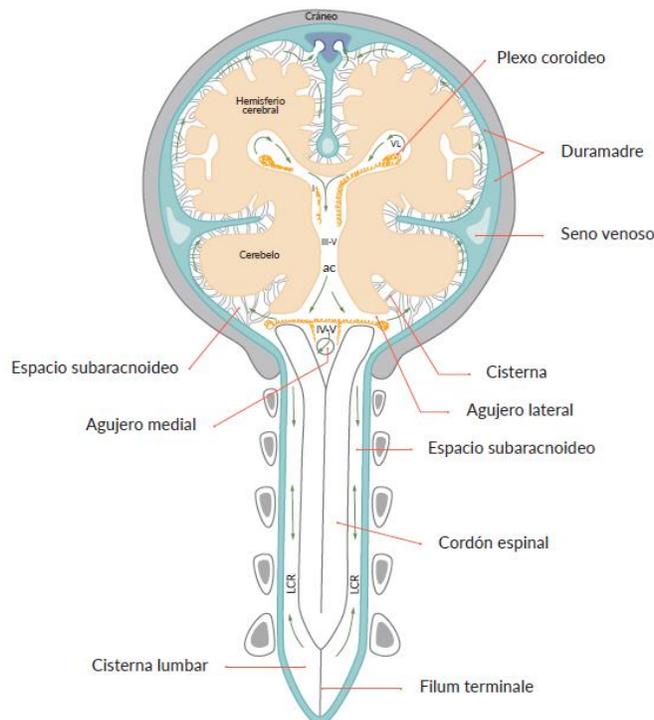


Figura 2. Esquema del SNC recubierto por el cráneo, las vértebras, las meninges y el LCR [35].

2.3 Meninges

Los delicados tejidos nerviosos también deben estar protegidos contra contactos perjudiciales con las paredes óseas circundantes del canal vertebral [36]. Unas membranas especializadas, conocidas en conjunto como meninges (del griego *meninx*: membrana) son revestimientos conjuntivos que constituyen las cubiertas exteriores del nerroeje, dividiéndose en tres capas meníngeas: la duramadre, la aracnoides y la piamadre, que se disponen anatómicamente en la región espinal y craneal, proporcionando protección, estabilidad física y absorción de los impactos [37]. Las meninges espinales cubren la médula espinal y rodean las raíces de los nervios raquídeos. Los vasos sanguíneos que se ramifican en estas capas también transportan oxígeno y nutrientes a la médula espinal. En el agujero magno del cráneo, las meninges espinales se continúan con las meninges craneales, que evitan el contacto con la bóveda craneana y los huesos circundantes [36]; en la Figura 3 se presenta las dos clasificaciones de estas membranas.

La duramadre posee tejido conjuntivo denso, llamada también paquimeninge (del griego *pachy*: grueso). La capa más interna es la piamadre (del latín *pia*: delicada), de tejido conjuntivo laxo, que se adhiere a la superficie del neuroeje. La aracnoides de tejido conjuntivo laxo que se adhiere a la superficie interior de la duramadre y desde allí envía prolongaciones llamadas trabéculas aracnoideas que se fusionan con la piamadre y atraviesan el espacio subaracnoideo por donde circula el líquido cefalorraquídeo (LCR). La disposición de las trabéculas aracnoideas en dicho espacio ha sido comparada con una telaraña y de ahí su nombre de aracnoides que se deriva del griego *aracné* que significa araña. La piamadre y la aracnoides tienen estructura histológica y origen embrionario similares, las dos provienen de la cresta

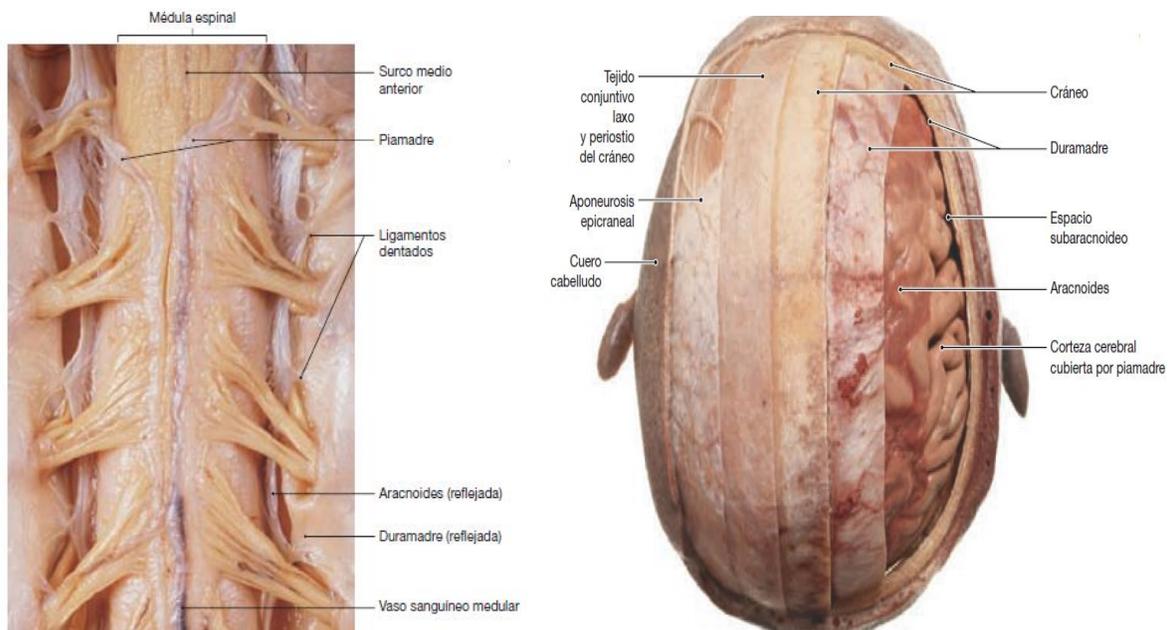
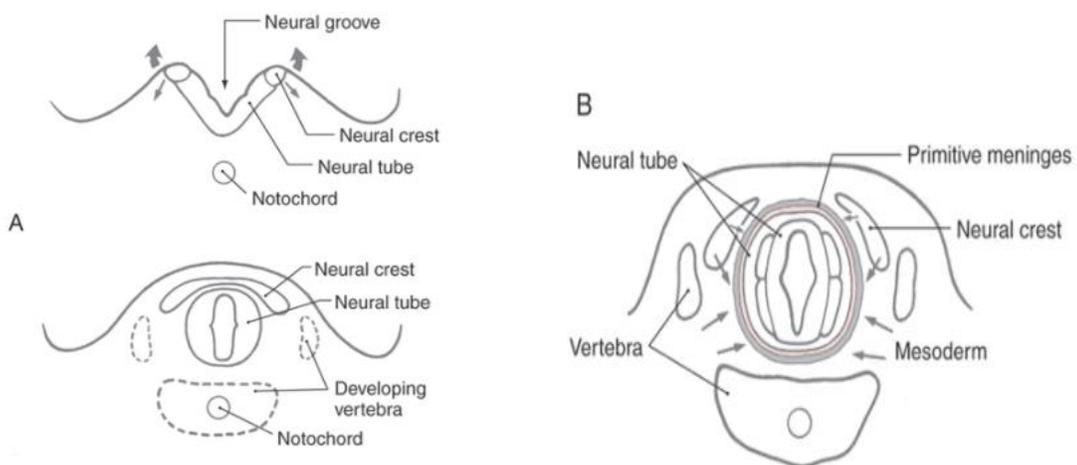


Figura 3. Meninges. (a) Vista anterior de las meninges espinales y (b) Vista superior de una disección de las meninges craneales [36].

neural. Por ello se las describe en conjunto como las leptomeninges (del griego *leptos* que traduce blando). El LCR disminuye la tendencia de varias fuerzas (como la gravedad) para evitar la distorsión del encéfalo [37].

2.3.1 Desarrollo de las meninges

Las meninges se desarrollan a partir de células de la cresta neural y mesénquima (mesodermo, que migran para rodear el SNC en desarrollo entre los 20 y 35 días de gestación (Figura 4 A-C). En conjunto, estas crestas neurales y células mesodérmicas forman las meninges primitivas (meninx primitiva). Entre los 34 y 48 días de gestación, las meninges primitivas se diferencian en una capa externa más compacta llamada extomeninx y una capa interna reticulada denominada endomeninx (Figura 4 D). A medida que avanza el desarrollo (45 a 60 días de gestación), el ectomeninx se vuelve más compacto y aparecen espacios en esta capa que se correlacionan con las posiciones de los futuros senos venosos. Al mismo tiempo, el endomeninx se vuelve más reticulado y los espacios que aparecen en su parte interna corresponden a los espacios subaracnoideos y las cisternas del adulto. En general, el ectomeninx se convertirá en la duramadre y el endomeninx formará la aracnoides y la piamadre (las leptomeninges) del sistema nervioso adulto (Figura 4 D). Al final del primer trimestre, se establece el plan general de las meninges [38].



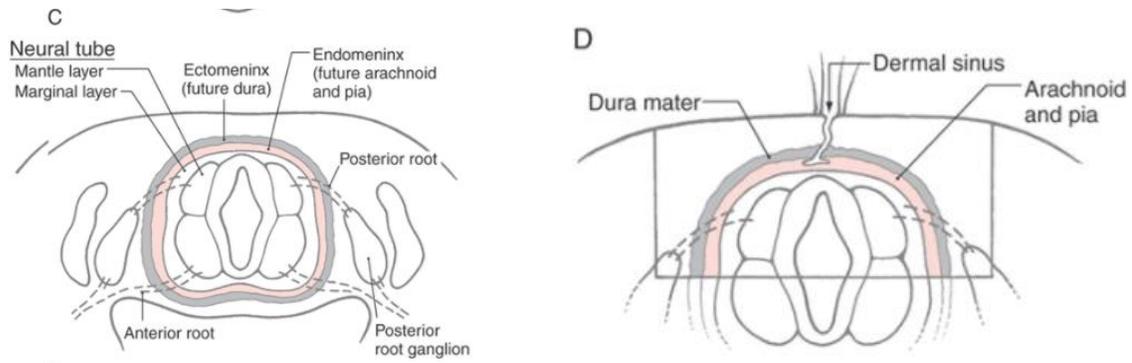


Figura 4. Desarrollo de las meninges. Después se cierra el tubo neural (A, B), las células de la cresta neural y el mesodermo (C) migran para rodear el tubo neural y formar los primordios de la duramadre y de la aracnoides y la piamadre (D). Un seno dérmico [38].

2.3.1.1 Duramadre

(*Dura*, *dura* + *mater*, madre) es una capa resistente y fibrosa que forma la cubierta más externa de la médula espinal y el cerebro. La duramadre de la médula espinal consta de una capa de tejido conjuntivo irregular denso cuyas superficies externa e interna están cubiertas por un epitelio escamoso simple. El epitelio externo no está unido a las paredes óseas del canal vertebral, y el espacio epidural intermedio contiene tejido areolar, vasos sanguíneos y tejido adiposo. Las inserciones localizadas de la duramadre en el borde del agujero magno del cráneo, en la segunda y tercera vértebras cervicales, en el sacro y en el ligamento longitudinal posterior sirven para estabilizar la médula espinal en el canal vertebral [36].

Caudalmente, la duramadre espinal se estrecha desde una vaina hasta un denso cordón de fibras de colágeno, que finalmente se unen a componentes del filum terminal para formar el ligamento coccígeo. El ligamento coccígeo se extiende a lo largo del canal sacro y se entreteteje con el periostio del sacro y el cóccix. Las inserciones craneales y sacras proporcionan estabilidad longitudinal. El soporte lateral está proporcionado por los tejidos conjuntivos del espacio epidural y por las prolongaciones de la duramadre que acompañan a las raíces de los nervios raquídeos cuando pasan a través de los agujeros intervertebrales. Distalmente, el

tejido conjuntivo de la duramadre espinal se continúa con la vaina de tejido conjuntivo que rodea cada nervio espinal [35].

La duramadre craneal está formada de dos capas fibrosas. La capa más externa, o capa endostial, se fusiona con el periostio que recubre los huesos craneales. La capa más interna se denomina capa meníngea; en muchas áreas las capas endostial y meníngea están separadas por un espacio estrecho que contiene líquido intersticial y vasos sanguíneos, incluyendo las grandes venas conocidas como senos duros. Las venas del cerebro se abren en estos senos que a su vez vierten la sangre en la vena yugular interna del cuello [36].

En cuatro localizaciones, los pliegues de la capa meníngea de la duramadre craneal se extienden profundamente en la cavidad craneal (Figura 5). Estos tabiques subdividen la cavidad craneal y proporcionan un soporte para el encéfalo, limitando el movimiento del cerebro.

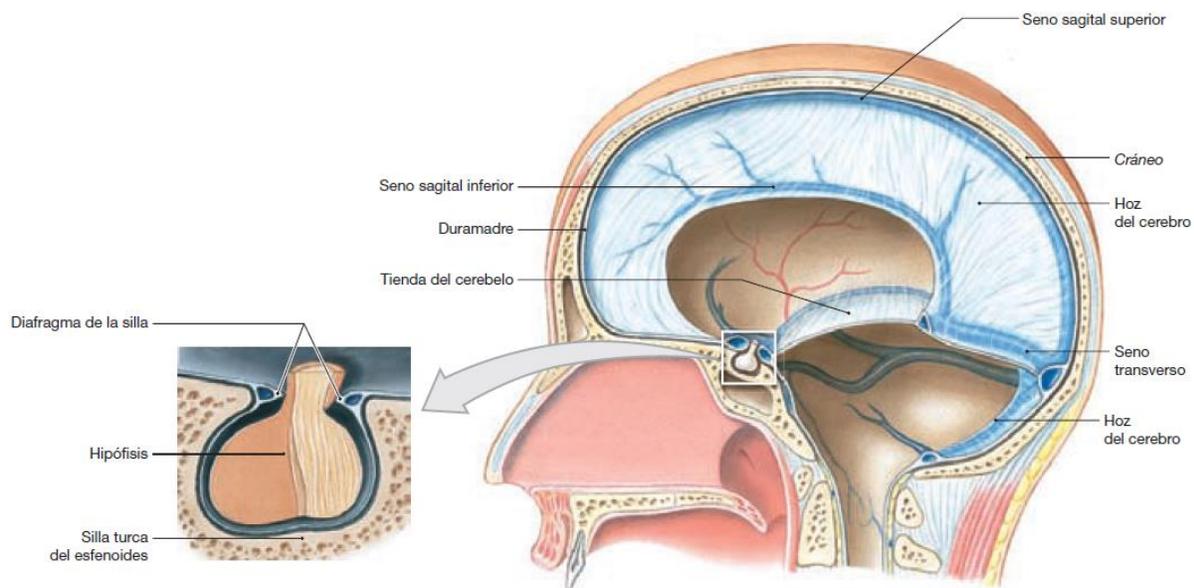


Figura 5. Vista medio sagital de la cavidad craneal tras extraer el encéfalo, mostrando la orientación y extensión de la hoz del cerebro y la tienda del cerebelo [36].

2.3.1.1.1 Capas de la duramadre

La duramadre como se ha mencionado antes está compuesta de fibroblastos alargados y cantidades copiosas de fibrillas de colágeno. Esta membrana contiene vasos sanguíneos y nervios que generalmente se divide en porciones de células externas (perióstica), internas (meníngicas) y de borde [39] como se presenta en la Figura 6.

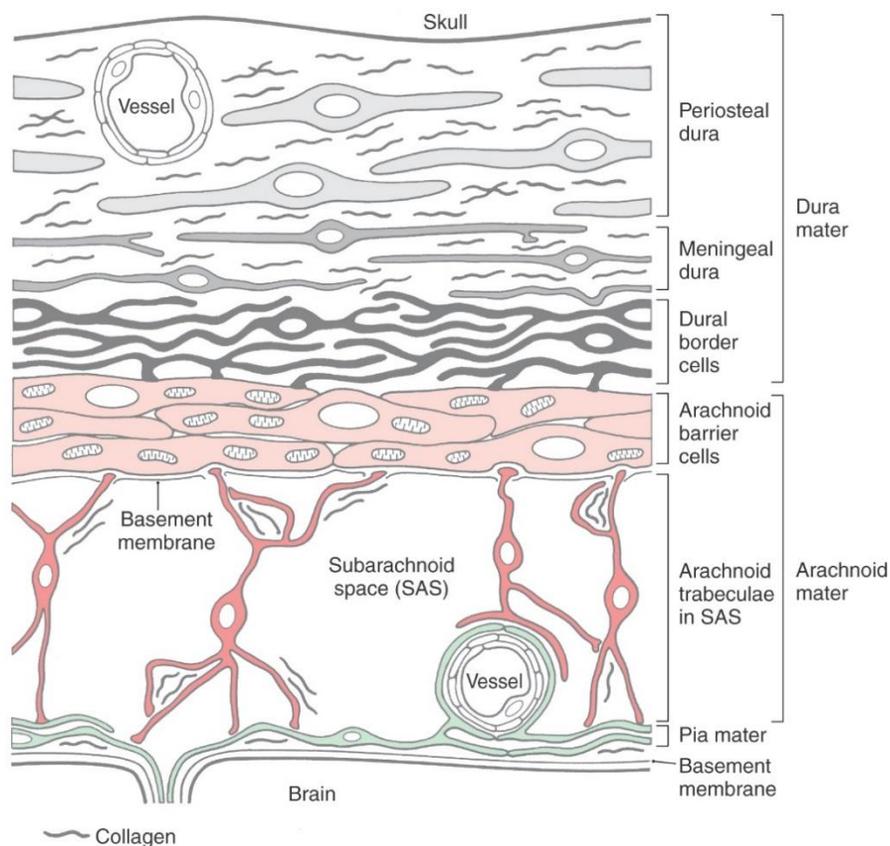


Figura 6. La estructura de las meninges. Las capas de la duramadre se muestran en tonos de gris, la aracnoides en tonos de rosa y la piamadre en verde [39].

La capa perióstica es adherente al cráneo y está formada por fibroblastos de citoplasma electrólucido, con prolongaciones elongadas y abundante colágeno extracelular. Los fibroblastos del periostio son más grandes y ligeramente menos alargados que otras células durales. Esta porción de la duramadre se adhiere a la

superficie interna del cráneo, y su unión es particularmente tenaz a lo largo de las líneas de sutura y en la base craneal. Por el contrario, los fibroblastos de la duramadre meníngea son más aplanados y elongados, sus núcleos son más pequeños y su citoplasma puede ser más oscuro que el de las células del periostio. Estas dos hojas se separan entre sí para formar los senos venosos de la duramadre, que tienen todas sus paredes formadas por duramadre recubierta de endotelio. Aunque rara vez se observan uniones celulares entre los fibroblastos duros, las grandes cantidades de colágeno entrelazado en porciones perióstica y meníngea de la duramadre otorgan a estas capas de las meninges una gran resistencia.

2.3.1.1.2 Propiedades mecánicas

La duramadre juega un papel funcional en el complejo espinal-meníngeo (SCM). Al ser la estructura más fuerte de las meninges, ayuda a mantener el flujo y la presión del líquido cefalorraquídeo y protege la médula espinal de la carga mecánica externa [40]. Como la duramadre tiene una estructura fibrosa anisotrópica y existe en condiciones de estiramiento dinámico y húmedo en el cerebro, sus propiedades mecánicas aún no se han investigado adecuadamente, pero un análisis por microscopía electrónica de barrido muestra que la duramadre está compuesta por haces de muchas fibras de colágeno interconectadas que corren paralelas y generalmente en dirección longitudinal, lo que corresponde a la dirección de carga básica de la duramadre. Hay una sustancia amorfa entre ellos: fibras elásticas más gruesas. El número de fibras transversales es pequeño y se limita principalmente a las capas internas donde las fibras se extienden perpendiculares a las fibras longitudinales [41].

En la literatura hay poca descripción de las propiedades mecánicas de la duramadre y no se han publicado informes definitivos sobre las propiedades mecánicas de las meninges [42], no obstante, muchos autores han intentado plasmar análisis comparativos entre sustitutos duros basados en colágeno xenogénico y reportes de la literatura sobre duramadre humana, es así como en Tabla 1 se resumen las

propiedades de resistencia mecánica, la rigidez (módulo de Young), el grosor y la resistencia a la extracción de la sutura de algunos sustitutos empleados en remplazo dural; reportadas por algunos autores [43].

Aunque para este análisis se encontró que los tres sustitutos duros probados eran seguros y efectivos en la curación de defectos creados quirúrgicamente en la duramadre, estos productos de colágeno derivados de bovino entran en contacto directo con el sistema nervioso central; existiendo una posibilidad teórica de que estos dispositivos de colágeno puedan transmitir la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), la forma humana de la enfermedad de las vacas locas [43].

Tabla 1. Propiedades mecánicas de tres sustitutos dúrales y datos mecánicos informados para duramadre nativa

Material	Módulo de Young (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Tensión máxima (%)	Espesor (mm)
Duramadre humana				
Van Noort <i>et al</i>	21.3 - 48.0	3.28 - 7.86	No reporta	No reporta
McGarvey <i>et al</i>	61.50 ± 9.60	9.41 ± 1.54	No reporta	No reporta
Wolfenbarger <i>et al</i>	69.50 ± 1.28	6.65 ± 0.14	No reporta	0.58 ± 0.03
Yamada <i>et al</i>	2.75 ± 1.41	8.80 ± 2.37	No reporta	0.626 ± 9.4
Sacks <i>et al</i>				
Orientación paralela	192.61 ± 23.51	12.76 ± 1.65	No reporta	No reporta
Orientación perpendicular	72.60 ± 10.86	5.21 ± 1.01	No reporta	No reporta
Sustitutos dúrales				
DuraGuard	81.33 ± 20.48	13.50 ± 3.34	No reporta	0.40 ± 0.00
Durepair	69.94 ± 9.49	22.70 ± 2.83	No reporta	0.50 ± 0.002
Polímeros sintético bioadsorbible	27.5 ± 8.09	11.4 ± 2.84		0.22 ± 3.7
Película de fibroína de seda 2011	No reporta	65.6 ± 7.1	7.0 ± 0.6	No reporta
Película de fibroína de seda 2015	7.16 ± 0.66-12-1 ± 2.4	0.88 ± 0.10-1.53 ± 0.45	35.7 ± 6.39-75.3 ± 15.6	0.035

Los valores se expresan como el error estándar medio de la media, excepto para Van Noort *et al.*, en el que se informó un rango para el módulo de Young

2.3.1.1.3 Cirugías u operaciones

Durante la neurocirugía craneal, se deben realizar procedimientos de duraplastia para las siguientes situaciones: 1) una parte ausente o eliminada de la duramadre; 2) reparación de la fístula de la duramadre; o 3) la ampliación del compartimiento duro o intracraneal. Estos casos requieren cierre dural hermético para minimizar el riesgo de fístula de líquido cefalorraquídeo (LCR), infección, hernia, cicatrización de la corteza cerebral y adherencias [44].

Aunque las neurocirugías craneales parecieran ser un procedimiento de rutina, las complicaciones postoperatorias de la misma; pueden conllevar a múltiples riesgos añadidos en un paciente previamente comprometido por enfermedad neurológica de base. Las complicaciones post operatorias son definidas como todo evento adverso que puede agregar morbilidad y/o mortalidad en un paciente que ha sido sometido a una intervención quirúrgica [45]. De acuerdo al tiempo de aparición de las mismas, Gooch divide las complicaciones de neurocirugía en complicaciones tempranas (antes de los 30 días), o tardías (pasados los primeros 30 días) [46]. Los factores que podrían estar relacionados a su desarrollo, se dividen en 2 grupos: los factores relacionados al procedimiento quirúrgico en sí, como hematoma epidural, colección subgaleal, hematoma subdural, contusión cerebral postquirúrgica, nuevo inicio de convulsiones, infección de herida operatoria, dehiscencia de herida, o factores relacionados al paciente asociados a complicaciones de la cirugía como el tiempo operatorio promedio, uso de antibiótico profilaxis, tipo de injerto utilizado, forma de guardado del injerto, edad, el sexo, las comorbilidades previas [47].

2.4 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que aplica los principios y métodos de bioingeniería, ciencia de los materiales y ciencias de la vida hacia el ensamblaje de sustitutos biológicos que restablecerán, mantendrán y mejorarán las funciones tisulares después del daño ya sea por enfermedad o por procesos

traumáticos. Los principios generales de la ingeniería de tejidos implican la combinación de células vivas con un soporte natural / sintético o andamio para construir una construcción tridimensional que sea funcional, estructural y mecánicamente igual o mejor que el tejido que se va a reemplazar [48].

Por lo tanto, la ingeniería tisular al aplicar los principios de la ingeniería y de las ciencias de la salud para el desarrollo de estructuras biológicas, genera tejidos que permiten restaurar, mantener o mejorar la función del tejido u órgano primitivo [49]. Para lograr esto, es necesario combinar armoniosamente materiales y componentes celulares con el objeto de utilizarlos en tratamientos específicos que garanticen el éxito terapéutico [50]. Así, el progreso científico reciente en biomateriales y terapias basadas en células ha creado avances excepcionales en el desarrollo de tejidos modificados genéticamente. Existen tres componentes principales en el campo de la ingeniería de tejidos, el primer lugar se presenta un andamio que proporciona estructura y sustrato para el crecimiento y desarrollo del tejido; en segundo lugar una fuente de células para facilitar la formación de tejido requerida y, por último, factores de crecimiento o estímulos biofísicos para dirigir el crecimiento y la diferenciación de las células dentro del andamio. Tomados en conjunto, estos componentes constituyen lo que se conoce como la tríada de ingeniería de tejidos (Figura 7) [51].

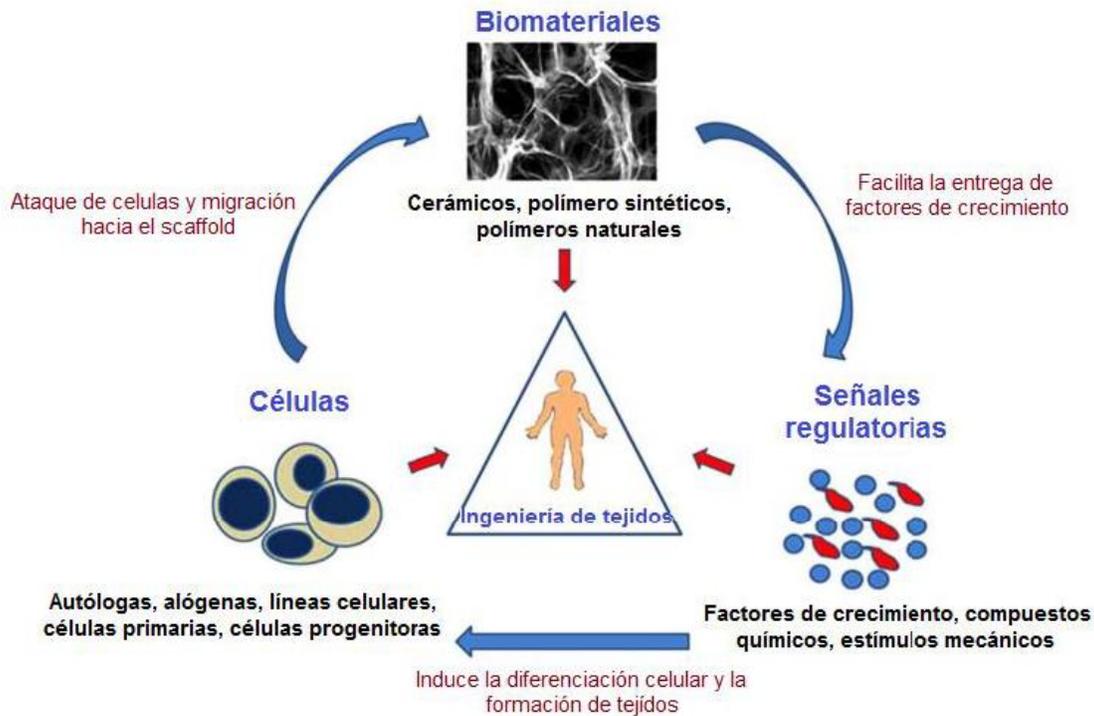


Figura 7. Elementos principales de la ingeniería de tejidos [48]

Es importante mencionar que, en el campo de la ingeniería de tejidos ha existido gran avance, no obstante, es necesario seguir trabajando para reemplazar órganos y tejidos. La fuente celular óptima, el diseño de los andamios y los biorreactores in vitro, el uso y desarrollo de la tecnología de microfabricación para crear tejidos y órganos vascularizados aún se están investigando. La búsqueda y el uso de una célula madre multipotente o pluripotente apropiada en la ingeniería de tejidos es un concepto emergente. Ciertamente, muchas áreas de investigación con células madre y sus aplicaciones clínicas potenciales están asociadas con controversias; por lo tanto, es importante abordar los problemas éticos, legales y sociales con anticipación [52].

2.4.1 Ingeniería de tejidos cerebral

Las enfermedades o lesiones del sistema nervioso son devastadoras para el individuo y tienen importantes implicaciones en la pérdida funcional severa y costos sociales. La retina, las meninges, la médula espinal, el cerebro y el nervio periférico

tienen diferentes entornos moleculares y celulares y, por lo tanto, requieren estrategias específicas de ingeniería tisular [53]. En efecto, la ingeniería de tejidos del sistema nervioso es la ciencia del diseño, creación y realización de sistemas donde las células neuronales están organizadas en una manera controlada, para llevar a cabo un diagnóstico apropiado, mitigar o suavizar los efectos negativos de las lesiones del SNP y SNC y realizar los tratamientos terapéuticos apropiadas en el sistema nervioso y lograr su rehabilitación [54],[55].

La ingeniería del tejido neural, por lo tanto, implica explorar cuestiones que rigen la selección y el uso de componentes celulares o factores de crecimiento, y el modo óptimo de organización de esos componentes, de esta manera, es posible tener el control de las interacciones entre las células y su entorno.

Ahora, la necesidad de presentar mejores enfoques para el tratamiento de lesiones nerviosas, ha permitido a la ingeniería tisular brindar la regeneración, reparación y reemplazo del tejido en el sitio de la lesión. En consecuencia, es posible restaurar la funcionalidad, incluso para lesiones complejas del SNC como los traumatismos craneoencefálicos. Así mismo, las estrategias de tratamiento que combinan el trasplante celular, la entrega de moléculas y las construcciones de andamios de biomateriales se consideran la mayor esperanza para una posible regeneración y recuperación funcional en lesiones de medula espinal [56]. Por consiguiente, la ingeniería tisular se logra mediante la fabricación de un andamio que imita todas las propiedades del tejido que debe repararse para favorecer la penetración celular y la regeneración de los tejidos en tres dimensiones: el biomaterial utilizado, las células y los estímulos mecánicos, en la Figura 8 se presenta gráficamente esta triada.

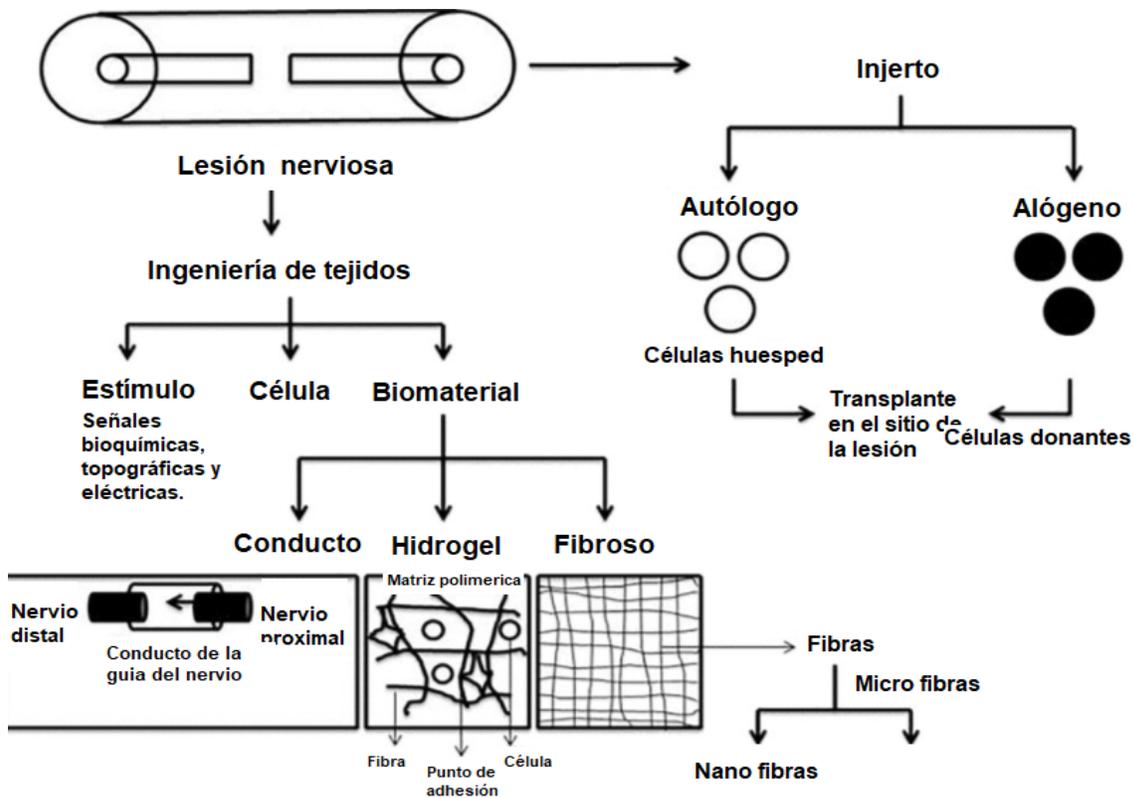


Figura 8. Descripción general del enfoque de Ingeniería de tejido neural. Dos enfoques: convencional (tipos de injertos) y enfoque de ingeniería de tejidos. Se elaboran tipos de estímulos, células y biomateriales [55].

Si bien, en la actualidad, la ingeniería de tejidos en el sistema nervioso es un área desafiante pero posible, siempre y cuando se enfoque hacia el reemplazo funcional de un componente neuroactivo que falta, el rescate o la regeneración de tejido neuronal degenerado y la construcción de biosensores inteligentes basados en células y circuitos neuronales *in vitro* [55].

2.5 Biomateriales

La definición más reciente sobre biomateriales fue dada por Jeffrey O. Hollinger, quien define un biomaterial como “una sustancia (diferente a un medicamento) o conjunto de sustancias sintéticas o naturales, que pueden ser usados por un período de tiempo como parte de un sistema, el cual trata de curar, mejorar o reemplazar un órgano, un tejido o una función del cuerpo” [57], aunque el término "biomateriales" se ha utilizado alternativamente para describir materiales derivados de fuentes

biológicas o para describir materiales utilizados para terapias en el cuerpo humano [58], una característica esencial es que un biomaterial sea biocompatible.

La definición más utilizada de biocompatibilidad fue introducida en 1999 en el diccionario Williams de biomateriales, el cual la precisa como la “capacidad de un material para llevar a cabo con una respuesta inmune apropiada en una situación específica” [59], definición que adopta la ISO 10993 que estipula la evaluación biológica de dispositivos médicos [60]. Aunque esta definición es efímera, habla de la interacción de los biomateriales en su entorno biológico y no solo de cumplir la función de diseño, lo cual centra, desde el punto de vista investigativo, la necesidad de desarrollar biomateriales que presenten una respuesta inmune adecuada [61].

Los biomateriales desempeñan un papel importante, de hecho, indispensable, en el campo de la ingeniería de tejidos. Los biomateriales se han utilizado durante siglos para aplicaciones como reemplazo de lentes intraoculares y empastes dentales, pero los avances en biología celular y molecular, química, ciencia de materiales e ingeniería han brindado oportunidades mucho más amplias para el uso clínico.

Los polímeros, al ser orgánicos, ofrecen una versatilidad que no tiene comparación con los metales y la cerámica. El amplio espectro de propiedades físicas, mecánicas y químicas proporcionadas por los polímeros ha impulsado la extensa investigación, desarrollo y aplicaciones de los biomateriales poliméricos. La importancia de los polímeros como biomateriales se refleja en el tamaño del mercado de los polímeros médicos, que se estima en aproximadamente unos mil millones dólares. Muchos de estos polímeros se desarrollaron inicialmente como plásticos, elastómeros y fibras para aplicaciones industriales no médicas, pero luego se desarrollaron como materiales biomédicos específicos. Con el rápido crecimiento de la biología moderna y los esfuerzos de colaboración interdisciplinarios, los biomateriales poliméricos se están transformando en materiales bioactivos y biomiméticos, con una excelente biocompatibilidad.

2.5.1 Biomateriales poliméricos

Los polímeros son macromoléculas formadas por cientos o miles de unidades básicas funcionales denominadas monómeros que se unen a partir de enlaces covalentes. un polímero se puede clasificar como biopolímero cuando cumple con propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad química, baja toxicidad [62]. Los polímeros pueden ser de naturaleza sintética y/o natural; estos últimos, provenientes directamente del reino animal o vegetal, se obtienen por procesos metabólicos de seres vivos o de la misma naturaleza, en cambio, los polímeros sintéticos se desarrollan a partir de síntesis química [63]. Esta última clasificación presenta una ventaja sobre los naturales, puesto que, se pueden obtener en función de una aplicación específica, pero, los polímeros naturales poseen buena biocompatibilidad y son de bajo costo [64]. No obstante, en general, los polímeros presentan variadas propiedades y usos, destacándose en el sector farmacéutico, agrícola, alimentario y textil.

Así mismo, una de las aplicaciones más representativas en siglo XXI, es el uso de polímeros en la ingeniería de tejidos [65]. Por lo cual, una gran cantidad de polímeros naturales y sintéticos se utilizan actualmente en este campo interdisciplinario. Entre los polímeros naturales se encuentra el colágeno, gelatina, elastina, actina, queratina, albúmina, quitosano, ácido algínico, quitina, celulosa, seda y ácido hialurónico. Estos materiales naturales son aceptados fácilmente por sistemas biológicos en los que pueden procesarse metabólicamente a través de rutas establecidas. Sin embargo, poseen algunas desventajas que incluyen una posible inmunogenicidad, complejidad estructural y propiedades biomecánicas inferiores [66].

Los polisacáridos y las proteínas forman parte de los materiales poliméricos naturales con mayores aplicaciones en el área de ingeniería tisular. Tal es el caso de la quitina y el quitosano, que se caracterizan por ser uno de los mejores polisacáridos con excepcional biocompatibilidad y biodegradabilidad, que consta de grupos multifuncionales que lo convierten en un candidato potencial para el

desarrollo futuro de biomateriales (a través del procesamiento) para el funcionamiento celular y la diferenciación hacia la ingeniería tisular [67]. De igual manera, los biomateriales a base de proteínas (fibroína de seda, colágeno, metrigel ácido hialurónico), se han derivado de fuentes animales y se han explorado en la regeneración de tejidos [67]; son bien conocidos por su buena biocompatibilidad y capacidad de degradación natural controlada, siendo especialmente útiles en aplicaciones de sutura, materiales de andamios, vehículos de entrega de fármacos, entre otros [66].

Teniendo en cuenta lo anterior, es posible afirmar que los polímeros naturales se presentan como una opción viable para el reemplazo dural por sus buenas propiedades al estar en contacto con el cuerpo humano y su amplio estudio en la ingeniería de tejidos [68].

Por otro lado, debido a su disponibilidad y tasa de degradación controlable, los biomateriales sintéticos también se consideran candidatos potenciales en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. En comparación con los polímeros naturales, los polímeros sintéticos se pueden adaptar fácilmente en cualquier forma para aplicaciones tisulares, proporcionando una estructura tridimensional (3D) que no solo desempeña un papel de apoyo para el tejido sino que también interactúa con las células para controlar su función y diferenciación [69].

Los polímeros han asumido un papel importante en aplicaciones médicas. En la mayoría de estas aplicaciones, los polímeros tienen poca o ninguna competencia de otros tipos de materiales, caracterizándose por propiedades como flexibilidad, resistencias al ataque bioquímico, buena biocompatibilidad, ligero peso, disponen de una amplia variedad de composiciones con propiedades físicas y mecánicas adecuadas [58].

2.5.2 Biomateriales compuestos

En primer lugar, se entiende por material compuesto, aquel formado por dos o más componentes, de forma que las propiedades del material final sean superiores que las de los componentes por separado [70]. Así entonces, esta combinación de biomateriales puede unir sus fuentes desde diferentes escalas, desde el enfoque nanométrico hasta nivel macroscópico, donde sus fases se encuentran delimitadas por una escala mayor a la atómica. Por otro lado, las propiedades mecánicas tienden a cambiar con relación a como era cada material de forma separada. Estas propiedades dependen en gran medida de la homogeneidad de sus fuentes y su comportamiento en la formación de heterogeneidades o diferencias que presentan, la fracción de volumen que ocupan y principalmente por la interfaz de sus constituyentes [71].

El desarrollo de este tipo de biomateriales para la regeneración tisular se ha convertido en el foco de un intenso interés de investigación, puesto que se busca que cada uno de los materiales que conforman el compuesto sean biocompatibles y además, cumplan con las características biológicas necesarias para la aplicación que desea dársele y que la interfaz que se cree entre los componentes no se degrade fácilmente en los ambientes corporales [71]. Hoy en día, existen más oportunidades disponibles mediante el enfoque compuesto de combinar los biomateriales en forma de biopolímeros o biocerámicas ya sean sintéticos o naturales, con el propósito de lograr respuestas de células diana que son cruciales en los procesos de regeneración tisular [72].

2.6 Fibroína

En particular, la fibroína de seda es especialmente valorada en dispositivos biomédicos y relacionados con un énfasis cada vez mayor en la integración humana sin problemas y la sostenibilidad ambiental. La fibroína de seda se está desarrollando activamente como un componente "verde" para reemplazar o complementar los materiales convencionales, especialmente los que se consideran inadecuados, especialmente para bioaplicaciones avanzadas donde la biocompatibilidad o la sostenibilidad es crucial [73].

La fibroína del gusano de seda es un biopolímero natural con una larga historia de aplicaciones en el cuerpo humano como material de sutura y ligamentos artificiales; propiedades como su biocompatibilidad y biodegradabilidad le permiten ser actualmente utilizada para el desarrollo de gran variedad de dispositivos biomédicos y nuevas tecnologías de regeneración [74].

2.6.1 Generalidades

La seda se descubrió en la China hace más de 4600 años por una antigua emperatriz llamada Xi Ling-Shi [75]. La sericultura se introdujo en Corea alrededor del año 200 a.C., cuando grupos de inmigrantes chinos arribaron allí. A Occidente la seda llegó a través de numerosas rutas. En el año 300 d. C., la sericultura se extendió hacia el Occidente y la cría del gusano de seda se estableció en la India. La seda dejó de ser un material industrial y tomó gran valor [76].

La seda, es segregada por las glándulas sericígenas del gusano de seda (*Bombyx mori*), que la utiliza para elaborar el capullo, una estructura cerrada de protección en la que realiza la metamorfosis de larva a adulto. Tal como es segregado el hilo de seda, que es continuo y puede medir hasta 1.500 metros, consta de dos proteínas. Una de ellas es la fibroína, que es una proteína polimérica y lineal, que alterna dominios amorfos y otros de lámina beta, constituye el 70% del peso del capullo. La otra proteína es la sericina, hidrosoluble y de estructura globular, que mantiene unidos los filamentos de fibroína [74].

2.6.2 Propiedades

En el siglo XXI, sigue siendo extremadamente difícil encontrar materiales naturales o sintéticos que exhiban las numerosas propiedades atractivas de la fibroína de seda *B. mori*, tales como procesabilidad acuosa, biocompatibilidad, biodegradabilidad controlable, facilidad de funcionalización y diseño, flexibilidad, abundancia natural, transparencia óptica, resistencia, estabilidad térmica, dureza,

ultra-delgadez y ultra-suavidad. Con las propiedades que se listan a continuación, la fibroína de seda se ha convertido en el principal candidato de materiales de origen natural [73]

1. Es un material de naturaleza proteica, altamente biocompatible. No se verifica rechazo ni respuesta inflamatoria en los tejidos donde se injerta. El rechazo ocasional que se ha reportado con algunas suturas, se atribuye a la contaminación de la fibroína con sericina [77].
2. Presenta una gran resistencia mecánica a tracción, junto a una gran flexibilidad [77].
3. Es biodegradable, pero aun ritmo más lento que en otros biomateriales orgánicos, lo que permite una mejor consolidación de los tejidos. En dos años se reabsorbe totalmente y no se encuentran rastros de la misma en los tejidos [78].
4. Su producción es sencilla, y sostenible. La cría del gusano de seda es sencilla y de bajo costo, si se dispone de moreras, y la elaboración de los materiales se hace predominantemente en medio acuoso con técnicas relativamente simples [77].
5. Presenta la interesante propiedad de tener una superficie altamente reactiva. Su superficie presenta grupos carboxilo terminal a los que se pueden unir de forma covalente péptidos tales como el péptido RGD (arginina-glicina-aspartico), hormonas, tales como la PTH, y factores de crecimiento, tales como la BMP-2 (*bone morphogenetic protein-2*)[79] . Estas proteínas favorecen de forma muy significativa tanto la adhesión como el desarrollo de los cultivos celulares implantados sobre la matriz [77].

2.6.3 Aplicaciones

La fibroína de seda, se ha desarrollado rápidamente en los últimos años para aplicaciones novedosas en suturas quirúrgicas y textiles de moda, así como para demostrar aplicaciones avanzadas prometedoras en electrónica, optoelectrónica, fotónica, recolección almacenamiento de energía, láser, portadores de suministro

de fármacos inducidos activados de forma inalámbrica, revestimientos o sensores de alimentos comestibles inteligentes, filtros de agua de alto rendimiento y productos de consumo, esta variedad de aplicaciones se resume en la Figura 9.



Figura 9. Aplicaciones de la fibroína de seda [80]

2.7 Quitina y quitosano

Entre los materiales naturales más usados en la actualidad una pareja de

polisacáridos que ha tomado mucho auge por la infinidad de aplicaciones que ha logrado encontrarseles, y, especialmente, por su poco impacto ambiental, lo constituye la quitina y el quitosano [81]. La quitina y el quitosano son aminopolisacáridos naturales que se caracterizan por tener estructuras únicas, propiedades multidimensionales, funciones altamente sofisticadas y aplicaciones de amplio espectro en áreas biomédicas y otras áreas industriales [82], [83]. Al ser considerados materiales de gran potencial futurista con inmensas posibilidades de modificaciones estructurales para impartir propiedades y funciones deseadas, el trabajo de investigación y desarrollo sobre quitina y quitosano ha alcanzado un estado de intensa actividad en muchas partes del mundo [84].

2.7.1 Generalidades

Por su amplia distribución en la naturaleza la quitina es el segundo polisacárido en abundancia, después de la celulosa [85]. Los residuos del procesado del marisco contienen en general un 14 a 35% de quitina asociada con proteínas, pigmentos y depósitos de calcio, estimándose por tanto una producción mundial anual de quitina en los residuos de unas 120.000 toneladas [86]. La quitina fue descubierta por el profesor Henri Braconnot en 1811 cuando estudiaba sustancias derivadas del Agáricos Volváceas y otros hongos [86]. En el año 1830 Odier, le dio el nombre de quitina en un artículo sobre insectos donde se reportó que había encontrado en algunos insectos la misma sustancia que forma la estructura de las plantas, llamándola “quitina” (del griego *tunic*, envoltura). El descubrimiento del quitosano por C. Rouget en 1859 supuso el inicio de una investigación intensiva sobre estos compuestos [86].

Tanto la quitina como el quitosano están formados por cadenas lineales de monómeros de glucopiranosas unidas por enlaces β -(1-4), que provoca la estructura rígida y sin ramificaciones de estas moléculas. La diferencia entre la estructura química del quitosano, poli [β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosas], y el de la quitina, poli [β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranosas], radica en el carbono número 2, en donde la quitina posee un grupo acetoamida, mientras que en el

quitosano ese grupo es desacetilado, resultando en un grupo amino [62]. Lo anterior se puede evidenciar en la Figura 10

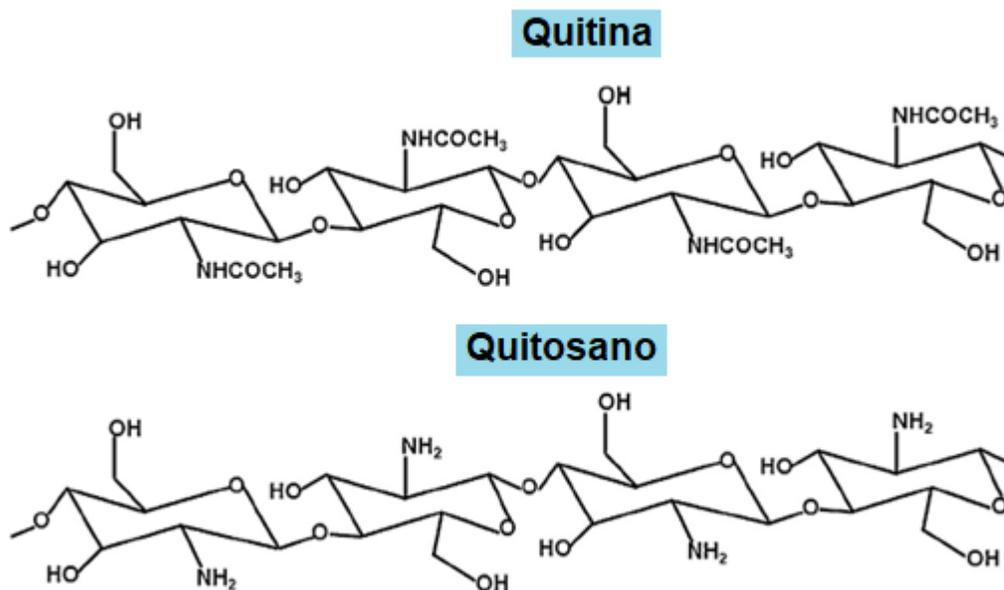


Figura 10. Representación de las cadenas de quitina y de quitosano desacetilado para evidenciar su similitud estructural [66]

La abundancia de los grupos hidroxilo y amino altamente reactivo en el quitosano, o del grupo acetoamida en la quitina, y su tendencia a formar puentes de hidrogeno intra e intermoleculares, resultan en la formación de agregados lineales con un amplio grado de cristalinidad [87]. Esto contribuye a la fuerza mostrada por las estructuras quitinosas y a que sea insolubles en agua. La estructura química de estos compuestos influye también en el peso molecular llegando a alcanzar los 106 Dalton, afectando propiedades como la solubilidad, la resistencia mecánica y la degradación [66].

2.7.2 Propiedades

Estos biopolímeros se caracterizan por presentar atributos positivos ante una excelente biocompatibilidad y una admirable biodegradabilidad con seguridad ecológica y baja toxicidad, con actividades biológicas versátiles, como la capacidad

antimicrobiana y la baja inmunogenicidad, brindando amplias oportunidades para un mayor desarrollo científico en el área de los biomateriales para uso humano [29], [88]. A diferencia de la quitina, el quitosano es soluble y sus propiedades lo hacen más fácil de manejar. Sin embargo, ambos compuestos se han utilizado en ingeniería de tejidos para diferentes aplicaciones [89]. La quitina ha demostrado propiedades altamente hidrofóbicas gracias a la estructura polimérica de la N-acetilglucosamina convirtiéndola en un material duro [90]. Así mismo, la quitina es insoluble en agua y muchos solventes orgánicos, pero puede ser diluida en hexafluoropropanol, hexafluoroacetona y cloro-alcoholes en conjunto con soluciones acuosas de ácidos minerales [91]. Este biopolímero posee excelentes propiedades eléctricas que pueden aplicarse a los tejidos que requieren una conductancia eléctrica, y además, posee propiedades que se pueden usar para el desarrollo de nervios y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas [90].

A pesar de que la quitina tiene algunas propiedades interesantes, el quitosano se ha adoptado como la opción más utilizada para la construcción de andamios para el campo de la ingeniería tisular [92]. Este material es insoluble en soluciones acuosas neutras; no obstante, en soluciones diluidas de ácido acético ($\text{pH} < 6$) los grupos amino del quitosano comienzan a protonarse (asociándose con el contraión acetato) haciendo soluble el polímero cargado [91]. Este hecho permite explicar algunas propiedades del quitosano como son: la habilidad de enlazarse con sustancias cargadas negativamente tales como lípidos, proteínas, colorantes, entre otras; así como su comportamiento como floculante, adherente y adsorbente, adicionales a las reacciones típicas de las aminas [93], [94]. Una propiedad importante del quitosano es su estructura rígida, caracterizada por numerosos enlaces por puentes de hidrógeno, la cual le confiere una buena estabilidad térmica [95]. De acuerdo a Sugimoto [94], se descompone aproximadamente a 170°C y se degrada antes de fundir, lo cual es característico de polisacáridos que poseen muchos enlaces por puentes de hidrógeno [95].

Este polímero natural es biodegradable, biocompatible, no tóxico, semipermeable, además, cuenta con buenas propiedades filmogénicas, inhibe el crecimiento de varios hongos, levaduras y bacterias presentando inmunogenicidad evadiendo el

desarrollo de anticuerpos [96]. Además, no se han observado respuestas antiinflamatorias o alérgicas en la ingestión, inyección, implantación y aplicación tópica de sujetos humanos [97]. De igual manera, una característica importante de este polímero es su velocidad de degradación, que se encuentra relacionada con el grado de desacetilación (relación D -glucosamina / N-acetilglucosamina) [98].

Las propiedades mecánicas del quitosano están determinadas por los tamaños de poro, el peso molecular y la cristalinidad del polímero. Los polímeros de alta porosidad, peso molecular más bajo y menos cristalinos son mecánicamente menos competentes y viceversa [62]. Es importante denotar que, el quitosano tiene poca fuerza mecánica e inestabilidad para mantener una forma predefinida [99]. Sin embargo, esta característica se ha mejorado mediante la reticulación y entrecruzamiento de este biomaterial con otros polímeros [89].

2.7.3 Aplicaciones

Tanto en formas nativas como modificadas, la quitina y el quitosano se utilizan en una amplia gama de aplicaciones, como en los alimentos, la biotecnología, la ciencia de los materiales, los productos farmacéuticos, también recientemente en la terapia génica y la bioingeniería. En la Tabla 2. Potencial de aplicación de la quitina / quitosano se resumen varias de las aplicaciones de estos biopolímeros en diferentes industrias.

Tabla 2. Potencial de aplicación de la quitina / quitosano [84], [87].

Aplicación	Efecto
Cosmética	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tratamiento del acné ✓ Mantenimiento de humedad de la piel. ✓ Cuidado dental. ✓ Líneas de expresión. ✓ Lentes de contacto
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Resistencia al quebrado de papel. ✓ Mejora el brillo del papel. ✓ Resistencia al deterioro microbiano o enzimático.

Papelera y textil	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mejora biodegradabilidad de materiales plásticos. ✓ Mayor permeabilidad del papel. ✓ Menos absorción de grasa. ✓ Mejora propiedades anti elásticas en papel fotográfico. ✓ Mejora viscosidad de colorantes y tintas en telas. ✓ Mayor estabilidad y resistencia color en telas
Bioingeniería	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Actividad inmunológica y antitumoral. ✓ Homeostático y anticoagulante. ✓ Curación de heridas. ✓ Bacteriostático/fungistático. ✓ Anticolesterolémico. ✓ Sedante del SNC. ✓ Ayuda a regenerar tejido conjuntivo. ✓ Acelera formación de osteoblastos. ✓ Liberación controlada de fármacos.
Tratamiento de aguas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Floculación para clarificar el agua. ✓ Remoción de iones metálicos y residuos orgánicos. ✓ Reducción de olores.
Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Activador de mecanismos de defensa en plantas. ✓ Estimulación de crecimiento en plantas. ✓ Liberación de agroquímicos y nutrientes en suelo. ✓ Cubierto de semillas contra congelamiento. ✓ Mejora de germinación de semillas. ✓ Protege de daño microbiano.
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Aditivo <p>Prolongar sabor.</p> <p>Antioxidante</p> <p>Gelificarte.</p> <p>Control de textura.</p> <p>Clasificación de desacidificación de bebidas de frutas.</p>

Industria alimentaria	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Agente nutricional Fibra dietaria. Antifúngico/fungistático. ✓ Películas y cubiertas comestibles Reducción en producción de etileno y dióxido de carbono. Control de transferencia de humedad. Control de oxidación enzimática en frutas. Barrera protectora contra el medio.
-----------------------	--

Una de las principales aplicaciones del quitosano/quitina es como recubrimiento de frutas, verduras y flores; sus propiedades lo convierten en una alternativa de gran atractivo puesto que como se mencionó anteriormente son biodegradables, no tóxicos, incompatibles, comestibles y antimicrobianos [87]. En la industria textil, estos polímeros naturales aportan a las prendas un tiempo de vida útil más prolongado haciéndolas más durables, también les imprime sus características antimicrobianas, haciéndolas ideales para la práctica de la medicina y los deportes. Además, son materiales amigables con el medio ambiente al ser biodegradable y no poseer sustancias tóxicas, haciendo que los procesos sean más limpios, contribuyendo al cuidado del planeta [100].

El quitosano ha cobrado gran importancia en el tratamiento de aguas residuales al remover los sólidos suspendidos, ya sea desechos del procesamiento de vegetales o iones metálicos provenientes de industrias químicas como el plomo, cadmio, mercurio y cobre [87].

Por otro lado, la actividad antimicrobiana del quitosano será diferente dependiendo del tipo de microorganismo contra el cual se esté trabajando y la edad celular del mismo. Cada microorganismo, bien sea una bacteria (Gram positiva o Gram negativa), un hongo o una levadura posee una estructura celular diferente y con el tiempo ésta también varía, haciendo que la efectividad del quitosano para combatir a los microbios sea también diferente. En cuanto a la actividad antimicótica, el

quitosano suprime la esporulación, evitando la reproducción de los hongos. ésta característica se ve favorecida por valores bajos de pH [84].

Uno de los campos con mayor interés en el uso de quitosano es la ingeniería de tejidos, en la formulación de vendajes, materiales de curación, micro encapsulación de fármacos y la formación de tejidos como cartílago, husos, piel, tendones y ligamentos [29],[87]. Algunas de las características que hacen al quitosano atractivo para este campo de aplicación son sus propiedades mecánicas, su facilidad de manipulación, su biodegradabilidad y su biocompatibilidad. Lo anterior debido a que es un compuesto heteropolisacárido lineal y aniónico, químicamente similar a los compuestos presentes en las matrices extracelulares de los tejidos humanos, por lo que también tiene ciertas actividades biológicas similares. Además, gracias a su carácter básico, puede interactuar con las superficies celulares y proteínas plasmáticas [29],[87],[100],[101]. Por otra parte, debido a que los materiales farmacéuticos que se introducen en el cuerpo son susceptibles a infecciones, se debe contar con materiales que minimicen este riesgo y eviten cualquier efecto secundario. Los injertos de quitosano recubiertos con hidrogel han mostrado capacidad de inhibir la replicación del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y resistencia a *E. Coli* [102].

Una de las aplicaciones significativas de estos biopolímeros es su capacidad de repeler insectos. Aunque la principal aplicación del quitosano en la agricultura consiste en mejorar los rendimientos agronómicos, ya sea por mejorando la germinación de las semillas recubiertas con polímero o bien, mediante la protección de las semillas del ataque de hongos [87].

2.8 Reemplazo de duramadre

La duraplastia es una intervención neuroquirúrgica común, que implica el uso de injertos sintéticos o biológicos para asegurar el cierre de la duramadre [103], cuando ésta se ve comprometida por diversas situaciones, entre ellas traumatismos durante la extirpación de un tumor, anomalías congénitas o fracturas de base craneal por accidentes [3]. Estos casos requieren cierre hermético para minimizar el riesgo de

fístula de LCR, infección, hernia, cicatrización de la corteza cerebral y adherencias [44].

Beach fue el primero en proponer la idea de la duraplastia en 1890, cuando sugirió que una sustancia inerte y aséptica como el oro podría ser útil en el tratamiento de las convulsiones causadas por la cicatriz cerebral [104]. Por lo tanto, dos años después, utilizó una lámina de este material precioso para proteger el cerebro de un paciente con lesión cerebral y epilepsia intermitente [105], sin embargo, no se realizó ningún reporte de este procedimiento hasta 1897 [104]. Como resultado, algunos expertos le atribuyen a Robert Abbe la realización de la primera duraplastia, cuando en 1895 utilizó caucho esterilizado para prevenir las adherencias meníngeas de un paciente que presentaba *paquimeningitis* hipertrófica [103],[106].

A partir de ese momento, se han implementado una variedad de materiales para reconstruir la duramadre dañada, desde láminas de metal y tejidos corporales (autólogos, homólogo), hasta xenoinjertos y materiales biosintéticos [44]. No obstante, el sustituto dural ideal no ha sido identificado y la investigación continúa, con la expectativa de encontrar un material inerte, no tóxico, no carcinogénico, que sea impermeable a los líquidos; capaz de sostener suturas, con buenas propiedades mecánicas, especialmente resistencia a la tracción, además, no debe causar adherencias meníngeas o aumentar las infecciones; debe ser manejado, y esterilizado fácilmente y además, económico [107],[108] ver resumen en la Figura 11.

2.8.1 Xenoinjertos

A comienzo del siglo XX fueron utilizadas membranas vitelinas [109], peritoneo de buey, de ovejas y amnios (membrana más interna de las que envuelven el embrión de los mamíferos, aves y reptiles) para realizar intervenciones de cierre dural [110],[111], pero estos procedimientos fueron abandonados por fuertes reacciones inflamatorias, adherencias corticoméngeas y absorción tardía [112],[113].

En los últimos diez años se han incluido xenoinjertos de pericardio bovino [114],[115], pericardio ovino [116], dermis porcina [117], peritoneo porcino [118], piel

bovina procesada [119] y esponja de colágeno de tendones flexores bovinos (XenoDerm), [120],[120] para reemplazos duros tanto experimentalmente y en un entorno clínico por resultados favorables en cuanto a su baja tasa de reacción inflamatoria y la formación de una adhesión meningocerebral muy delgada y fácilmente removible cuando el cerebro está dañado [111],[118].

En la actualidad, la FDA ha aprobado la comercialización de diferentes materiales heterogéneos. Dura-Guard, es un implante de duramadre resistente a la tracción, que se sutura fácilmente a los tejidos circundantes y se produce a partir de hojas procesadas de pericardio bovino [104]. Del mismo modo, DuraGen es una espuma de colágeno que se deriva de los tendones de aquiles bovinos como un injerto onlay en la convexidad del cerebro. De acuerdo con la entidad regulatoria, estos productos han demostrado ser biocompatible, inmunes a infecciones y resistente a la fuga de LCR [43]. Estas matrices atólicas poseen la ventaja de ser totalmente reemplazadas por el propio tejido del paciente en unos pocos meses, pero, la mayor desventaja en su uso es el costo, a veces muy elevado, lo que hace casi imposible la utilización de este material en forma continua [121].

2.8.2 Autólogos

Caporale y De Bernardis informaron sobre la primera implantación de membrana autóloga, realizada por el cirujano Sacchi en 1893, quien efectuó una craneotomía redonda, dejando la galea aponeurótica (estructura del cuero cabelludo que conecta las partes frontal y occipital del músculo occipitofrontal) adherida al colgajo óseo (parte del cráneo); extrajo un fragmento de duramadre dañada, volteó el colgajo óseo boca abajo y sin suturas, reemplazó el defecto dural con la galea adherente [111]. Desde 1909, la fascia lata y la fascia temporal se han utilizado como remplazo de esta meninge, reportando bajas tasas de complicaciones [44]. En el estudio de Penfield [122] y de Glaser & Thienes [123], se reconocen la fascia como un implante adecuado para remplazo de duramadre, indican que induce una reacción inicial de células gigantes y fagocitosis, pero se resuelven con el tiempo. Durante los últimos 50 años, los injertos autólogos (pericráneo, fascia lata, grasa, músculo y fascia

temporal) a menudo se preferían como un injerto económico no inmunogénico que se fusionaba con la duramadre nativa [68]. Sin embargo, el tejido disponible a menudo está limitado o dañado y requiere una segunda incisión quirúrgica [124],[103]. Otros investigadores informan que los injertos autólogos como galea-pericranio o fascia lata representan un sustrato de injerto dural óptimo porque no inducen reacciones inmunológicas o inflamatorias y no son tóxicos, se integran rápidamente en tejidos nativos, son flexibles, fuertes, fácilmente suturables y de bajo costo [124],[125],[126],[127]. Lamentablemente, no siempre es posible realizar un autoinjerto con estos tejidos, puesto que, en primer lugar, el pericráneo puede dañarse y puede ser insuficiente cuando el defecto dural es grande [128], en segunda instancia, el uso de fascia lata autóloga nunca ha sido popular porque requiere una incisión adicional, con tiempo de operación adicional, y puede estar relacionado con complicaciones en el sitio donante [8],[129]. Además, aunque muchos autores aconsejan implantar tejido autólogo como el pericráneo siempre que sea posible, hoy en día, muchos neurocirujanos no se animan a hacerlo porque requiere tiempo tanto para retirar la capa de galea-pericráneo como para suturarla [128]. Por su parte, Cobb [130] indica que los materiales autólogos a menudo son inadecuados en cantidad y se obtienen con la morbilidad asociada de las incisiones adicionales.

2.8.3 Homólogo

En la década de 1950, Sharkey, Usher, Robertson & Pollard Jr, propusieron el uso de duramadre cadavérica liofilizada y Rosomoff aseguró su uso en intervenciones neuroquirúrgicas [131]. Sin embargo, en el estudio clínico realizado por Cantore, Guidetti & Delfini [132], se encuentra evidencia de que este injerto homólogo no se adhiriere al cerebro ni a la médula espinal de forma adecuada. Campbell y colaboradores [133], exponen que la implementación de duramadre de cadáveres humanos resuelve el problema de la disponibilidad limitada respecto a tejidos autólogos o heterogéneos, pero se desaconseja su aplicación debido a la exposición de infecciones víricas o enfermedades priónicas como la enfermedad de

Creutzfeldt-Jakob en menos de 1 año después de la implantación de duramadre liofilizada [134],[103],[44].

Durante muchos años, la duramadre homóloga liofilizada y esterilizada por rayos X (Lyodura) se ha utilizado ampliamente debido a su facilidad y su amplia disponibilidad [128]. Desafortunadamente, los métodos de esterilización no protegen contra el riesgo de infecciones latentes por virus, y se han informado algunos casos de probables de enfermedad de Creutzfeldt-Jacob [135],[136]. Sin embargo, estos casos no están claros porque no hay un reporte conciso sobre todos los pacientes tratados con el mismo lote de duramadre que ocasionó esta afectación [128].

Otras investigaciones han advertido que, los injertos no autógenos se han asociado con complicaciones potencialmente dañinas en un número relativamente pequeño de documentos [128]; estos incluyen hemorragia, bacterias, virus y transmisión fatal de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, reacción del cuerpo extraño, respuesta inmune sistémica, cicatrización excesiva, curación inferior, disolución prematura del injerto, fístula del LCR, meningitis aséptica, hidrocefalia, pseudomeningocele, inflamación cortical, adherencias y heridas dehiscencia [125], [127], [137],[138]. Situación que conlleva a que en 1990 la Organización Mundial de la Salud recomendara abandonar el uso de injertos duros de cadáver y de origen animal [121].

Desde el 2012 la membrana amniótica se ha utilizado en neurocirugía como material de cobertura para defectos duros, convirtiéndose en una opción bastante nueva. El primer estudio sobre este tema realizado por Tomita [139], se encontró que la membrana amniótica podría usarse para el relleno del injerto con el fin de cerrar los defectos de la duramadre sin causar rechazo de tejido, infección o fuga de LCR [44].

2.8.4 Sintético

En la búsqueda del sustituto ideal para duraplastia, fueron utilizados una variedad de materiales sintéticos, entre ellos, celuloide y celofán, esponjas de polivinilo y películas polietileno [111]. Este polímero demostró buenos resultados tempranos en la implementación clínica, puesto que microscópicamente, se determinó que se une

por membranas de tejido conectivo interno y externo generando un engrosamiento de la aracnoides sin anomalía cortical [140],[141],[142],[143].

Luego, en la década de 1950, con el advenimiento de la tecnología industrial, se produjo el desarrollo de materiales "inertes", apareciendo productos como Orlon, Dacron y Vinyon N [104],[144]. A pesar del entusiasmo inicial por estos materiales, solo el dacrón recubierto con una película de caucho de polisiloxano (dacrón revestido de silicona) se usó ampliamente como sustituto dural durante años [145]. Los demás causaban reacciones y adherencias fibróticas cuando la corteza presentaba una lesión fuerte [111]. Así mismo, se descubrió que el teflón causaba adherencias densas y muy pronto fue abandonado [146], [147]. Después de un tiempo de investigaciones, se manifestó que el dacrón revestido con silicona estaba implicado en una variedad de problemas tales como la formación progresiva de adhesión cortical [104]. Se demostró que, poco después de su implantación como injerto dural, se desarrollaba una neomembrana vascularizada de tejido de colágeno que no se adhería alrededor de la lámina sintética, dejando un espacio potencial en el cual la sangre se acumulaba generando infecciones [148],[149].

Por otro lado, la silicona fue utilizada en neurocirugía en 1967 [150] para remplazo de duramadre, reparación de fístula de líquido cefalorraquídeo, agrandamiento del canal cervical después de cirugía para múltiples discos cervicales, reconstrucción del canal dural en casos de mielomeningocele, protección cerebral en cirugía cerebral cuando se esperaba una nueva operación, y la prevención de la curación epidural hipertrófica después de laminectomía. No obstante, su uso disminuyó por las descripciones de complicaciones hemorrágicas tardías e inflamatorias resultantes del uso de este material [109],[149].

Los sustitutos duros sintéticos, tales como el Goretex (politetrafluoroetileno – PTFE), Neuropatch (poliéster-uretano alifático, microporoso), Biomesch (polietileno terephthalato y silicona). Dacrón (parche de poliéster, tejido poco poroso), Ethisorb (polímero reabsorbible compuesto por filamentos de vicrilo y de polidioxanona), Sylastic, mallas de Vycril, poliglactina, películas de polisiloxano-carbonato, celulosa bacteriana, entre otros, tienen como principal ventaja la no transmisión de enfermedades infecciosas, lo que los hace seguros y confiables para su utilización

[121]. Sin embargo, cada uno de estos materiales está asociado con limitaciones significativas [151],[152],[153]. Las características de manejo de las láminas sintéticas son pobres en comparación con los materiales biológicos. Además, se ha expresado preocupación con respecto a los riesgos a largo plazo de hemorragia por la reacción tisular adyacente al injerto [153],[154].

En contraste con lo anterior, algunos materiales tienen una estructura casi rígida, resultando en ocasiones difícil de colocar, moldear y suturar, volviendo incómoda la duraplastia. Asimismo, no siempre el tejido circundante se une correcta y fuertemente al sustituto, por lo que se debe extremar el cuidado a la hora de realizar los puntos de sutura del mismo a la duramadre remanente. Existen numerosas publicaciones que hacen referencia a la asociación de estos materiales con altas tasas de complicaciones causadas por reacciones a cuerpo extraño, generación de adherencias y cicatrices del tejido cerebral subyacente, encapsulación, posibilidades de sangrados como hematomas epidurales o subdurales tardíos, infecciones de herida quirúrgica, y fístulas de LCR [124],[155], [156].

De igual manera, algunos autores reportan que los materiales sintéticos no experimentan una fusión vascular y epitelial con la duramadre nativa como un injerto biológico, lo que puede dificultar la radiografía y puede inducir reacciones inflamatorias o lesiones por fricción [68],[157],[158] [159].

En general, un material de injerto sintético es rechazado por el cuerpo de un paciente debido a una reacción inflamatoria tisular local marcada por irritación de la corteza debajo del cerebro, formación excesiva de tejido cicatricial, meningitis y hemorragia [160].

De acuerdo con Azzam y colaboradores [103], el futuro de los sustitutos duros continúa evolucionando a medida que los productos pasan de ensayos en animales a humanos y los injertos sintéticos se vuelven más similares a la duramadre humana.

2.8.5 Naturales

Hasta la fecha, ha habido escaso acuerdo en cuanto a los materiales ideales para un buen sustituto dural, por lo que en las últimas investigaciones se ha centrado el

foco de interés en trabajar la unión de polímeros naturales y sintéticos, con el fin de mejorar propiedades mecánicas y la biocompatibilidad, características que no se obtienen con los componentes individuales.

Los materiales naturales como el colágeno o el alginato presentan resultados prometedores como sustitutos del injerto dural. Estos materiales son capaces de restaurar el defecto dural y crear condiciones óptimas para el desarrollo de tejido conectivo en el sitio de la lesión [161],[162].

También se tienen reportes experimentales de la implementación de polímeros naturales como la gelatina, el quitosano y la fibroína de seda para esta aplicación [163], no obstante, los expertos indican que, aunque poseen una buena biocompatibilidad y capacidad inunogénica, no cuentan con propiedades mecánicas adecuadas [164],[165].

Las proteínas de la seda se usan actualmente en una amplia variedad de aplicaciones médicas [166],[167],[168],[169]. En un intento por encontrar un material de reparación dural más adecuado, Kim, Eum, *et al* [165] presentan una película fabricada con fibroína de seda elaborada por el método de evaporación de solvente, indicando que puede ser segura para su aplicación en procedimientos neuroquirúrgicos, inhibiendo eficazmente la inflamación sin efectos secundarios o pérdidas de LCR. En cuanto a las propiedades mecánicas, se presenta una alta resistencia a la tracción duramadre artificial, permitiendo suturarlo fácilmente a la duramadre de las ratas sin desgarrar. Aunque los efectos a largo plazo de este material de la duramadre artificial deben ser validados en animales más grandes, los resultados de este estudio indican que es adecuado para la aplicación en duraplastia.

De igual manera, Flanagan, Tien, *et al* [170], combinaron las técnicas de evaporación de solvente, electrospinning y electrogelation para crear un sustituto dural de fibroína degradable. Este injerto se fabricó como un sistema adhesivo de doble capa diseñado para sellar durotomías mientras funciona como un andamio de regeneración dural. Los resultados experimentales muestran una barrera impermeable a la fuga de LCR que limita las adherencias corticales, es biocompatible con células neurales y fibroblastos y, por lo tanto, no se espera que

induzca una respuesta inmune. Además, posee propiedades mecánicas comparables con la duramadre nativa. Con base a lo anterior, la fibroína de seda, una vez más expone su potencial como un sistema de reparación dural, sin requerir suturas, factor que mejoraría las limitaciones y complicaciones postoperatorias inducidas de los materiales y técnicas actuales de cierre dural.

Otro polímero natural importante en la ingeniería de tejidos es el quitosano y sus derivados, puesto que su versatilidad permite su empleo en diversas formas, incluidos polvos, geles y películas [28]. Este polisacárido se caracteriza por ser biodegradable, biofuncional y biocompatible, no tóxico y con excelentes propiedades antimicrobianas, lo que ofrece una amplia gama de aplicaciones [98]. Aunque el quitosano tiende a ser frágil y resistente, es una alternativa prometedora para usar para remplazo dural. En efecto, Sandoval, Ramos, *et al* [8] con el objetivo de encontrar el sustituto dural ideal, diseñan una injerto bicapa de quitosano que presenta una superficie lisa y otra porosa, lo que asegura resistencia a las deformaciones y que al momento de suturarse permita obtener un cierre hermético. Este andamiaje bicapa se describe como una innovación, debido a que presenta un mayor parecido estructural y funcional a la duramadre humana. Así entonces, este modelo experimental *in vivo* permite la infiltración de fibroblastos y el depósito ordenado de fibras de colágeno, sin causar rechazo debido a la presencia de poros interconectados. Una característica significativa de este sustituto es su bajo costo y su grosor similar a la duramadre humana que no comprime el tejido nervioso. No obstante, es necesario realizar estudios futuros para confirmar si el injerto bicapa se absorbe totalmente y evaluar el tejido nervioso subyacente para descartar la neurotoxicidad de la membrana y así vislumbrar la posibilidad cercana de llevar la fibroína de seda al horizonte clínico de la neurocirugía y la duraplastia.

La literatura existente ha encontrado una fuerte relación entre los apósitos basados en quitina y quitosano, indicando que pueden acelerar la reparación de diferentes tejidos, facilitar la contracción de las heridas y regular la secreción de mediadores inflamatorios como la interleucina 8, la prostaglandina E2 y la interleucina 1 β [171]. Como se ha mencionado antes, muchos investigadores han demostrado que la quitina y el quitosano son biodegradables y proporcionan actividades

bacteriostáticas y fungistáticas [172], [173], siendo adecuados para tratamientos de heridas y aplicaciones de reemplazo óseo [174],[175], pero hay información limitada sobre su uso para el cierre de la duramadre [8],[176].

Por lo tanto, el trabajo de Pogorielov, Kravtsova, *et al* [177] es una valiosa contribución al área de neurocirugía e ingeniería tisular, puesto que centran su estudio en el diseño de nuevos sustitutos de quitina-quitosano para el cierre de la duramadre evaluando su efectividad y seguridad. Estos autores indican que la película fabricada presenta una elasticidad satisfactoria y puede simular superficies de cualquier complejidad. Además, en los experimentos no se evidencia respuestas inflamatorias o inmunes a la implantación de la membrana de quitina-quitosano. De igual manera, la película descrita posee propiedades que la hacen aplicable para la duraplastia en diferentes regiones del cráneo; se puede quitar fácilmente donde sea necesario porque no se adhiere al cerebro o los tejidos circundantes. por otro lado, el crecimiento del tejido conectivo no es excesivo y no provoca la adhesión ni la formación de cicatrices. Otra ventaja del sustituto es la transparencia, que permite ver el espacio subdural, característica útil si se requiere una nueva operación.

En cuanto a la degradación, el compuesto fabricado fue lentamente reabsorbible y la tasa de reabsorción dependerá de la cantidad de quitina añadida, dado que la quitina es menos reabsorbible que el quitosano. La propuesta de la membrana de quitina-quitosano es también una alternativa económica respecto a los otros injertos disponibles en el mercado para duramadre, debido a la accesibilidad de la quitina como un segundo polisacárido más abundante encontrado en la naturaleza después de la celulosa [178].

Innegablemente las uniones de estos polímeros naturales exponen una alternativa prometedora como reemplazo dural, acercándose a los requerimientos deseables que debe cumplir un buen sustituto para duramadre.

Ahora bien, al utilizar un material compuesto para el reemplazo dural es posible desarrollar películas delgadas y obtener nanofibras mediante diferentes métodos como el electrospinning o evaporación de solventes. Sionkowska & Płanicka [179], han trabajado una mezcla de quitina-fibroína de seda como un candidato potencial para las películas en ingeniería tisular y mejora de los defectos craneales, con

excelentes propiedades de unión celular, biocompatibilidad, rugosidad superficial, flexibilidad, humectabilidad, y baja citotoxicidad. Así mismo, Yoo , Yeo, *et al* [180] han desarrollado dos tipos de injertos de quitina y fibroína de seda nanoestructurados (estructuras mixtas e híbridas) mediante electro hilado, para fabricar armazones miméticos e imitar la estructura y la función biológica de las proteínas de la matriz extracelular [81] . En estos materiales se examinó la unión de las células y la diseminación de los queratinocitos epidérmicos humanos, evidenciándose de los resultados la gran aplicabilidad en duraplastia y en el recubrimiento de heridas.

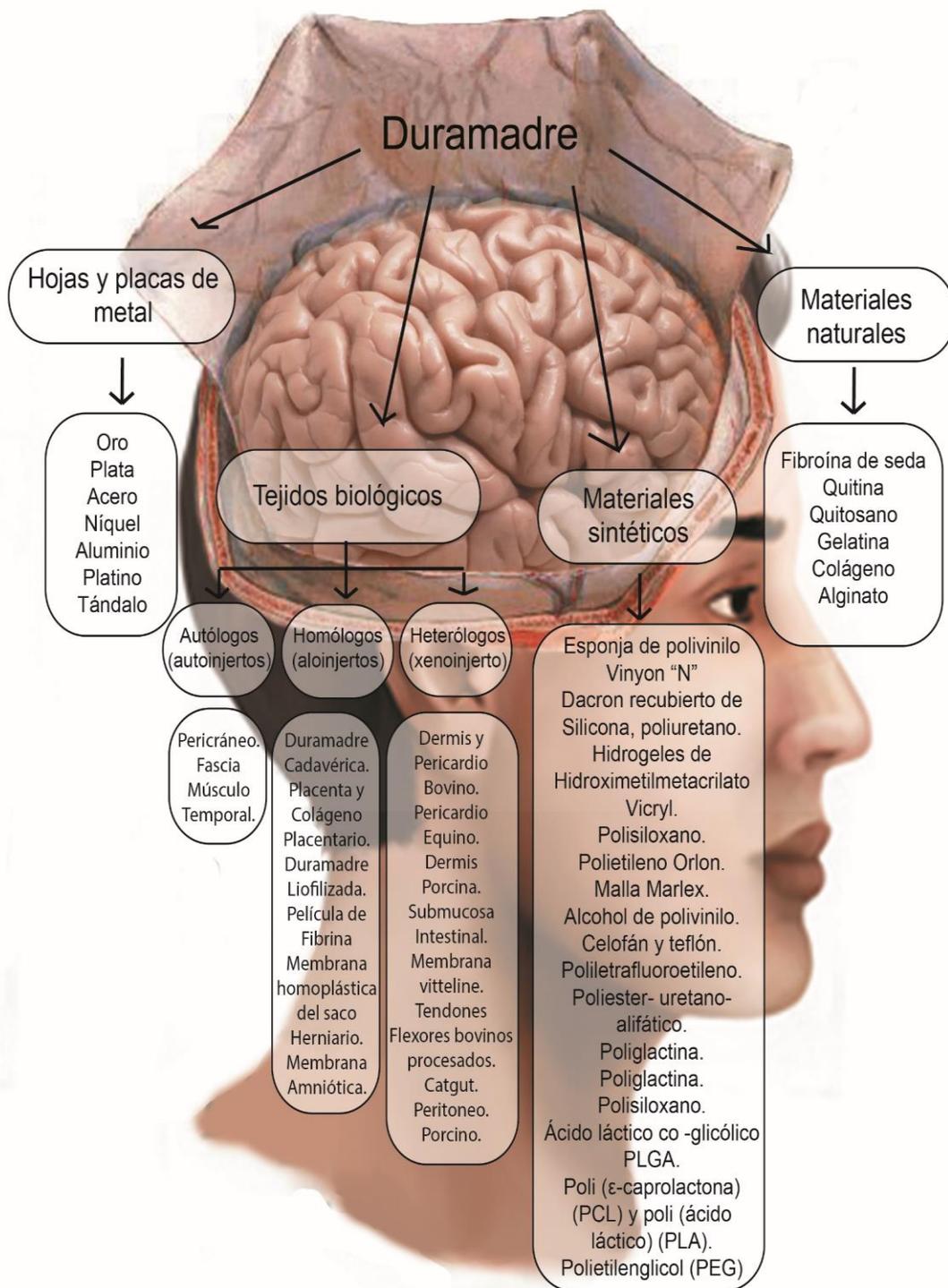


Figura 11. Materiales usados para reemplazo dural [84],[87].

CAPÍTULO 3: DESARROLLO DEL MATERIAL COMPUESTO

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Materiales

La fabricación, estudio de morfología, así como las propiedades de degradación y actividad antimicrobiana de las películas fabricadas como posible reemplazo dural, se llevó a cabo en el Laboratorio de Biomateriales del Programa de Bioingeniería, los ensayos mecánicos fueron desarrollados en el Laboratorio de Polímeros de las instalaciones de la Universidad de Antioquia adscritos a la Facultad de Ingeniería. Por otro lado, la determinación de la citotoxicidad *in vitro* se realizó por parte de la Doctora Lenka Toro y, en el Laboratorio de Minerales CIMEX de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín se obtuvieron los resultados del ensayo de ángulo de contacto.

3.1.1.1 Equipos

Para la fabricación de las películas se empleó agitadores magnéticos con calefacción VELP Scientifica (Italia), balanza analítica Ohaus (sensibilidad de 0,001 g y 0,0001 g), sonicador Branson (E.U), micropipetas (2-20 μ L y 100-1000 μ L), nevera Haceb (Colombia).

Para la evaluación geométrica se utilizó un calibrador digital Mitutoyo (Japón) con resolución de 0,01 mm, para analizar la morfología se usó un microscopio electrónico de barrido JEOL (E.U). Para la evaluación de grupos funcionales, se empleó un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Shimatzu (Japón). El ensayo mecánico se realizó en la maquina universal de ensayos Digimess (Argentina). Para la degradabilidad se empleó la incubadora Memmert

(Alemania), en las propiedades antimicrobianas se utilizó un agitador orbital Vicking (Argentina), una cabina de flujo laminar horizontal, una incubadora Memmert (Alemania) y una autoclave Olsoteck (Colombia).

3.1.1.2 Reactivos

Se usó quitosano con grado de desacetilación de 75% ($C_{12}H_{24}N_2O_9$, Sigma Aldrich), quitina (Sigma Aldrich), capullos del gusano *Bombyx mori* (Corseda), carbonado de sodio (Na_2CO_3 , Químicos JM), cloruro de calcio ($CaCl_2$, PanReac), etanol (C_2H_6O , Sigma Aldrich), membranas de acetato de celulosa (Visdecol), glicerol (Merk), glicerina (Merk), glutaraldehído ($C_5H_8O_2$, PanReac), ácido acético (glacial) (CH_3COOH , Merk).

Todos los reactivos empleados en esta investigación fueron de grado analítico y las soluciones fueron preparadas con agua desionizada. Los materiales de vidrio utilizados se lavaron con jabón neutro y se enjuagaron con agua destilada.

3.1.1.3 Material biológico

El presente trabajo involucró pruebas *in vitro*, en las cuales se utilizó células de fibroblastos con el método MTS, debido a que la revisión bibliográfica evidenciando un robusto soporte científico que lo cataloga como el modelo más fiable y similar para medir supervivencia y proliferación celular para el caso de la aplicación de reemplazo de duramadre. Así mismo, el ensayo de sensibilidad antimicrobiana se empleó *Escherichia coli* como patógeno Gram negativa y *Staphylococcus aureus* como bacteria Gram positiva.

3.1.2 Metodología

3.1.2.1 Tipo de investigación

La investigación realizada se desarrolló teniendo en cuenta un diseño de tipo descriptivo desde el enfoque mixto, lo que permitió obtener información de los hechos, situaciones, eventos o fenómenos tal como han sido manifestados en cada

una de los análisis morfológicos, mecánicos, ángulo de contacto, degradación y además, ensayos antimicrobianas y citotóxicos, con el fin de identificar propiedades y características importantes de las películas fabricadas, así mismo, abordar los objetivos planteados y la discusión de los resultados en este estudio.

Para determinar las mejores propiedades para un posible reemplazo dural, se usó un diseño experimental factorial, el cual consistió en el desarrollo de 4 muestras con diferentes concentraciones poliméricas, con sus respectivos triplicados, en donde las variables independientes son la relación entre entrecruzante y plastificante y la concentración de los polímeros utilizados en la fabricación de las películas, la temperatura y el tiempo de inmersión para las prueba de degradación, las dimensiones de las películas y las probetas para el ensayo mecánico. Así mismo, se determinó como variables dependientes la capacidad de cambio de peso y pH en el tiempo, la fuerza soportada debido a un esfuerzo de tracción, la capacidad de formación de halo de inhibición y la proliferación celular.

3.1.2.2 *Materia prima*

3.1.2.2.1 *Fibroína de seda*

3.1.2.2.1.1 *Extracción de fibroína*

La producción de una solución acuosa de fibroína de seda para su posterior manipulación en la formación de películas, sigue un protocolo desarrollado por Echeverri *et al* [181], con algunas modificaciones realizados por el Grupo de Investigación en Biomateriales BioMat de la Universidad de Antioquia, este procedimiento se observa en la Figura 12, donde inicialmente se escogen y preparan los capullos por sus características físicas, posteriormente, son separadas las proteínas que constituyen las fibras de seda por el método denominado

desgomado, a continuación, se diluye la fibroína para realizar el proceso de diálisis y eliminar los restos de sales de los procesos anteriores [181],[182].

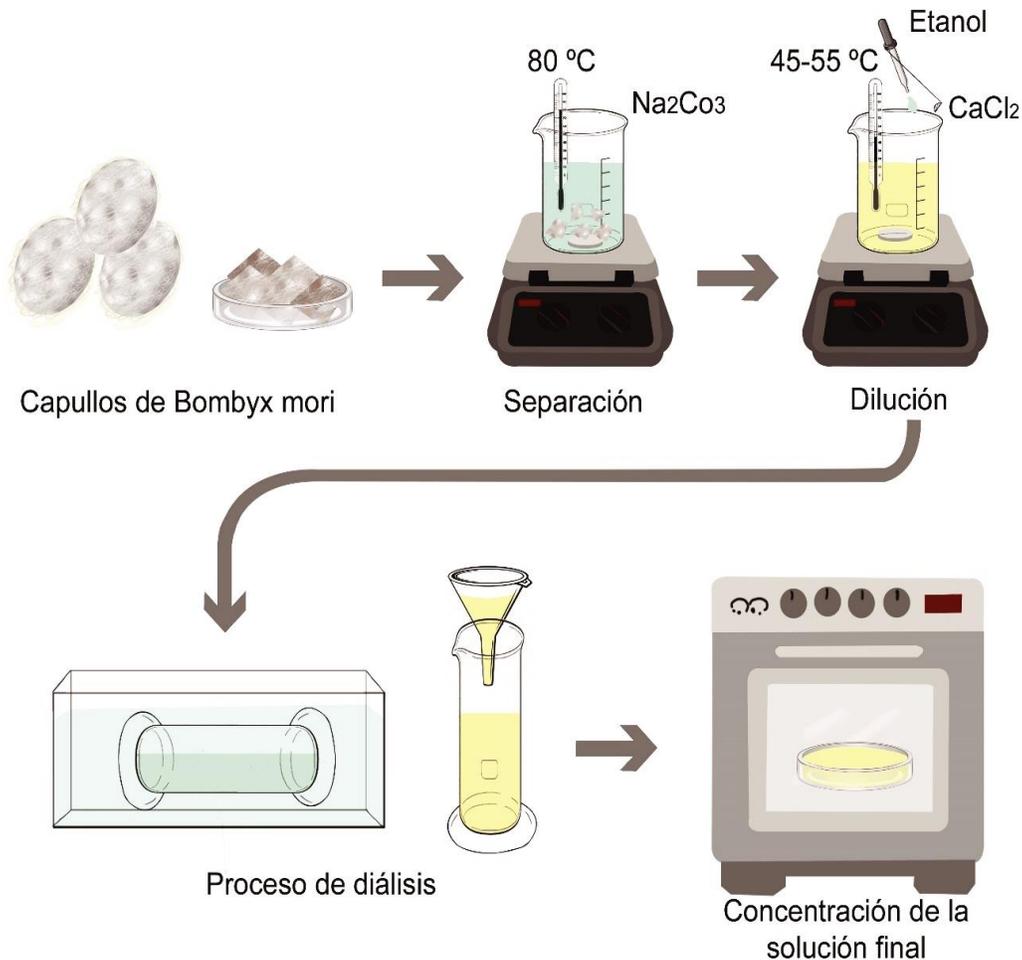


Figura 12. Esquema del procedimiento de extracción de fibroína de seda

3.1.2.2.1.2 Preparación de los capullos

Los capullos adquiridos de la empresa Corseda, fueron seleccionados visualmente de acuerdo a su aspecto, siendo preferidos aquellos que no tenían signos de que el gusano *Bombyx mori* había comenzado su proceso del rompimiento del capullo para pasar a la fase de adultez o que mostraran signos de degradación, seguidamente, se cortaron los capullos en trozos de aproximadamente 1 cm para facilitar los procesos posteriores.

3.1.2.2.1.3 Separación de la fibroína

Se procedió con la purificación de los capullos de *Bombyx mori* seleccionados, a través de la eliminación de la sericina por un proceso denominado desgomado, que separa la fibroína de la sericina. Es último componente es una glucoproteína soluble en agua que se encarga de unir los filamentos de fibroína y, aunque contribuye aumentando las propiedades mecánicas de la seda, tiene efectos perjudiciales biológicos sobre la integración de la seda en dispositivos ópticos y biomédicos [183].

Por lo anterior, para el desgomado, se preparó una solución de carbonato de sodio Na_2CO_3 y agua destilada en una relación molar 1:1000, la cual fue llevada a agitación magnética a 80°C . Después de alcanzar dicha temperatura, los capullos previamente seleccionados y cortados fueron agregados y sumergidos totalmente en este medio líquido manteniendo una relación de aproximadamente el 1 % p/v (peso/volumen), en condiciones de agitación y temperatura constantes por una hora. La fibroína obtenida presenta una apariencia similar al algodón, se retira de la solución y es lavada manualmente con agua destilada aproximadamente 3 veces, para dejar secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

3.1.2.2.1.4 Disolución de la fibroína

Dado que la proteína es insoluble al agua se vuelve necesaria su disolución en una solución salina o ácida [184], por lo tanto, se preparó una solución 1:8:2 molar de cloruro de calcio CaCl_2 , agua destilada y etanol $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ respectivamente. Dado que esta reacción es exotérmica, debió agregarse de forma moderada el CaCl_2 y alternadamente, adicionar en trozos pequeños la fibroína desgomada obtenida en el proceso anterior, de igual manera, se requiere que el beaker donde se realice el proceso se encuentre sellado, puesto que el etanol es volátil y genera evaporación. Esta etapa se realizó en agitación magnética constante con un rango de temperatura entre 45 y 55°C por una hora o hasta que la seda se disolviera por completo, formando una solución altamente viscosa con una conductividad eléctrica

alta perjudicial para el proceso de fabricación de películas, por lo que se hace necesario realizar un proceso de diálisis [185].

3.1.2.2.1.5 Diálisis

La diálisis permite realizar un intercambio de iones entre agua destilada y la solución previamente cargada por el CaCl_2 y $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ mediante el uso de membranas de acetato de celulosa, que fueron hidratadas por inmersión en agua destilada y posteriormente se les fue retirado el exceso de agua para verter la solución de fibroína, cuidando mantener los extremos sellados con pinzas para evitar fugas. Una vez lleno el tubo de diálisis con la solución de fibroína, fue dispuesto en un recipiente con agua destilada y sumergido totalmente para que se diera un intercambio iónico uniforme, con un recambio de agua cada 2 horas durante las primeras 12 horas, luego cada 5 horas por 24 horas y finalmente 2 veces al día hasta completar mínimo 3 días una vez iniciada la diálisis.

Tras este proceso, la solución acuosa de fibroína de seda debe ser almacenada en la nevera por el lapso máximo de 30 días, antes de que esta se degrade por completo [186].

3.1.2.2.1.6 Obtención y concentración de la fibroína

Una vez se finalizó el proceso de diálisis el producto final fue una solución de fibroína con concentración desconocida, por lo que se procedió a calcular su concentración por medio del peso obtenido después de secar totalmente varias muestras de la solución a $80\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora, las concentraciones de esta solución oscilaron entre 1,5 y 2,5% de fibroína, razón por la cual en algunos casos fue necesario llevar la solución a la concentración requerida por medio de la evaporación del agua.

3.1.2.2.1.7 Caracterización de la fibroína

La fibroína extraída fue caracterizada por medio de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), con la finalidad de determinar los grupos

funcionales y componentes principales que componen la fibroína extraída, se procedió a realizar un análisis infrarrojo de una porción de un scaffold en un rango de barrido entre 400 y 4000 cm^{-1} y un número de ciclos de 24.

3.1.2.2.2 Caracterización quitina y quitosano

Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X (DRX)

Con la finalidad de determinar los grupos funcionales y componentes principales del quitosano y la quitina, se procedió a realizar un análisis infrarrojo al polvo de la quitina y el quitosano en un rango de barrido entre 400 y 4000 cm^{-1} y un número de ciclos de 24.

Por medio de la técnica de difracción de rayos X, se determinó la presencia de quitina y quitosano usando la radiación de $\text{Cu } K\alpha$ ($\lambda = 0,1542 \text{ \AA}$) se realizó a diferentes ángulos, con pasos de $0,02^\circ$ por segundo.

3.1.2.3 Síntesis de películas

Las películas se fabricaron con diferentes cantidades de quitosano al 50 y 100% p/p, 50 y 100% v/v de fibroína de seda, 20% p/v de quitina respecto al quitosano, 5% de entrecruzante (glutaraldehído) y 25% de plastificante (glicerina) respecto a la cantidad de quitosano usado. Para los ensayos preliminares se utilizaron otros porcentajes de fibroína de seda, quitosano y glicerina que serán detallados en la siguiente sección. Las películas se elaboraron por el método de vaciado de placa (*casting*). Para preparar cada cantidad de solución de quitosano, se diluyó en una solución acuosa de ácido acético al 1% (v/v) en agua destilada, bajo agitación magnética durante 2 horas a una temperatura de 60°C . Es importante referir que la fibroína siempre se encontró en solución.

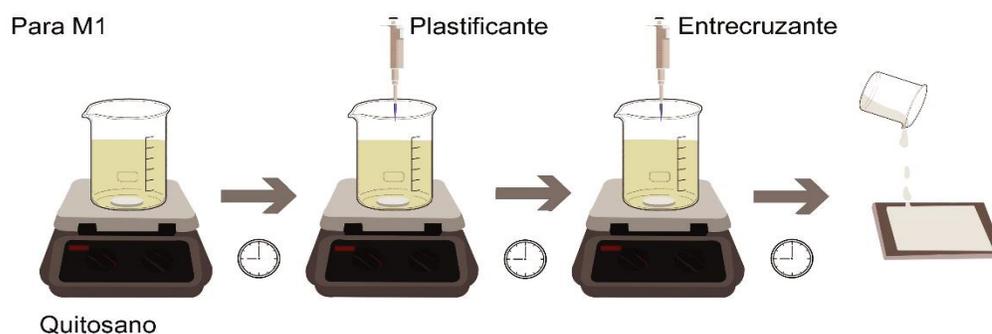
Para la muestra M1, se agregó el plastificante en la solución diluida de quitosano y se dejó en agitación continua por 15 minutos para posteriormente, agregar el

entrecruzante y realizar el envasado en el molde. En la muestra M2, nuevamente se agregó el plastificante en la solución diluida de quitosano y se dejó en agitación continua por 15 minutos, paralelamente a este proceso, la solución de fibroína se tenía bajo agitación magnética. Después, la solución de quitosano se mezcló con la solución de fibroína para posteriormente, agregar el glutaraldehído y realizar el envasado en el molde.

La muestra M3, se preparó agregando partículas de quitina en la solución de quitosano, luego, se dejó en agitación magnética por 15 minutos, se agregó el plastificante y después de 15 minutos, se adicionó el entrecruzante para finalmente realizar el envasado de la mezcla final.

Por último, la muestra M4 que contiene los tres polímeros, se elaboró agregando quitina en la solución de quitosano, y luego de mantener en agitación magnética la fibroína de seda, se mezcló con la solución heterogénea de los polisacáridos y se agitó por 15 minutos. Seguidamente, se adicionó el glutaraldehído y se vertió en las placas de vidrio.

Todas las películas fabricadas con sus diferentes concentraciones fueron secadas a temperatura ambiente por 48 horas. Luego de este tiempo, las películas preparadas se retiraron cuidadosamente del molde, se envolvieron en papel film y se guardaron en un desecador. En la Figura 13, se muestra esquematizado el proceso para la preparación de las películas poliméricas para cada uno de los formulados.



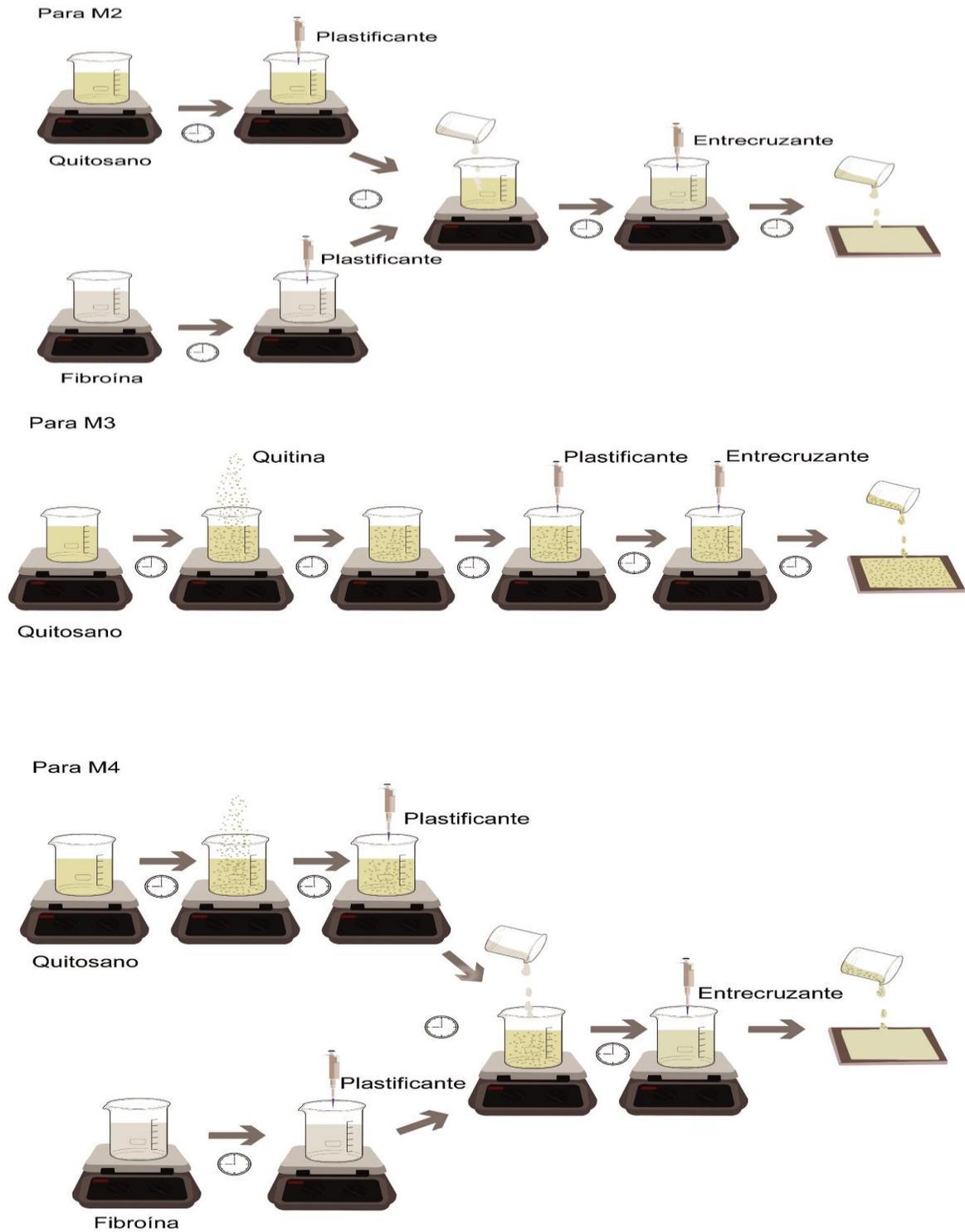


Figura 13. Esquematzación del proceso de fabricación de diferentes muestras de las películas poliméricas para posible reemplazo dural.

3.1.2.3.1 Prueba preliminar

Para la determinación de los porcentajes de los materiales a usar en la fabricación de las películas para posible reemplazo dural, se realizaron cuatro fases preliminares en donde se estudiaron características organolépticas, con el fin de determinar cuáles formulaciones eran las indicadas en cuanto a elasticidad, transparencia y rugosidad para los ensayos y caracterizaciones previamente mencionadas.

En la Tabla 3 se muestran las concentraciones usadas en los ensayos preliminares y se resaltan en negrita los porcentajes de las muestras F27, F28, F29 y F30 que fueron las seleccionados de acuerdo a los resultados obtenidos. Para poder llegar a esta elección, es necesario informar que desde la fase 1 se determinó que la contracción de 50% de fibroína y 50% de quitosano era adecuada para realizar los siguientes ensayos. En la fase 2, se evaluó la influencia del entrecruzaste (glutaraldehído) y el plastificante (glicerina/glicerol) en el resultado final de las películas, por tanto, en la fase 3, se descartó el glicerol y las películas fueron fabricadas solo con glicerina, además fue evaluado el comportamiento de la quitina. Teniendo en cuenta los estudios anteriores, en la fase 4 se retoma nuevamente el glicerol y la glicerina, pero con nuevas concentraciones, así mismo, se valora detalladamente la interacción del contenido de la quitina respecto a la unión del quitosano y la fibroína.

Por consiguiente, en la Tabla 4 se presentan 4 formulaciones seleccionadas después de los ensayos anteriores y serán denominadas M1, M2, M3 y M4, desde este punto en adelante. Es importante mencionar que M4 se utiliza con el fin de realizar comparaciones respecto a las otras concentraciones seleccionadas, para los ensayos realizados a las películas con potencial aplicación en reemplazo de duramadre.

Tabla 3. Formulaciones preliminares de las películas para posible reemplazo dural

Fase	Muestra	Fibroína (p%)	Quitosano (p%)	Quitina (g/g quitosano)	Glutaraldehído (g/g compuesto)	Glicerol (g/g quitosano)	Glicerina (g/g quitosano)
Fase 1	F1	30	70			1,5	
	F2		100			1,5	
	F3	70	30			2,5	
	F4	50	50	-	5	1,5	-
	F5	50	50			2,5	
	F6	30	70			2,5	
	F7	100	-			-	
Fase 2	F8	50	50		5	1,5	-
	F9	50	50	-	-	1,5	-
	F10	50	50		5	-	1,5
	F11	50	50		-	-	1,5
Fase 3	F12	50	50				1,5
	F13	30	70				1,5
	F14	10	90	20	5	-	1,5
	F15	-	100				1,5
Fase 4	F16	50	50				
	F17	-	100	-			
	F18	50	50		5	20	-
Fase 4.1	F19	-	100	20			
	F20	50	50				
	F21	-	100	-	5	-	20
Fase 4.2	F22	-	100	20			
	F23	50	50				
	F24	-	100	-			
	F25	50	50		5	30	-
	F26		100	20			

	F27		100				
Fase 4.3	F28	50	50	-			
	F29	-	100		5	-	30
	F30	50	50	20			

Tabla 4. Formulaciones seleccionadas de las películas para posible reemplazo dural

Muestra	contenido				
	Fibroína (p%)	Quitano (p%)	Quitina (g/g quitano)	Glutaraldehído (g/g compuesto)	Glicerina (g/g quitano)
M1	-	100	-		
M2	50	50	-	5	30
M3		100	20		
M4	50	50	20		

3.1.2.3.2 Caracterización de películas

3.1.2.3.2.1 Espesor de películas

La medida de espesor de las películas fabricadas se realizó con un calibrador digital y con medición de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM). El espesor se tomó en diferentes regiones de la película, con el fin de que las medidas quedaran de forma homogénea si en algún caso había imperfecciones. Por lo tanto, el grosor se da como el promedio de los valores medidos.

3.1.2.3.2.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La estructura y morfología de la superficie de las películas fue analizada utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL -JSMia 6490 LV).

3.1.2.3.2.3 Ensayos de resistencia mecánica

La evaluación de la resistencia a la tracción de las diferentes formulaciones de películas poliméricas se realizó en la máquina universal de ensayos, con una celda de carga de 500 N a una velocidad de 5 mm/min, características previstas bajo la norma ASTM D882. Las muestras usadas en esa prueba fueron cortadas en rectángulos con dimensiones de 15 mm de ancho y 60 mm de largo, con un refuerzo de etilvinilacetato (foamy) en los extremos. como se muestra en la Figura 14.

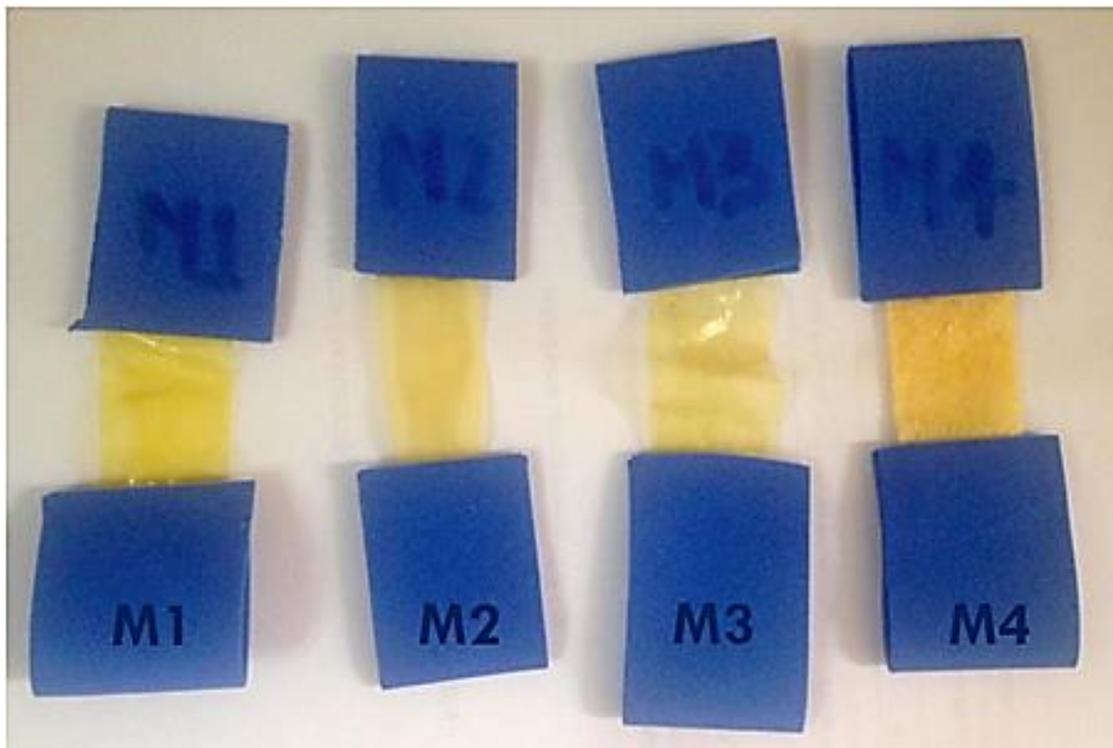


Figura 14. Probetas para el ensayo de tracción

3.1.2.3.2.4 Ensayo de degradación

Para la evaluación de la estabilidad de las películas se realizaron pruebas de degradación, con el fin de evaluar el comportamiento del material sometido a condiciones fisiológicas simuladas en SBF, para lo cual tres réplicas de cada formulación se sumergieron en SBF a 37 °C durante 1, 7, 14, 21 y días.

Se evaluó la pérdida de peso en las muestras y la variación del pH en la solución en los días mencionados. Cada periodo de tiempo las muestras eran retiradas del SBF (para evitar la acidificación) y secadas a temperatura ambiente durante 1 hora con el fin de eliminar el exceso de humedad, para luego proceder con el pesado de las mismas.

3.1.2.3.2.5 Ensayos de mojabilidad

Se depositó una gota de agua destilada con el goniómetro sobre la superficie sólida lo que permitió medir el ángulo formado por la gota al entrar en contacto con la superficie de la película.

3.1.2.3.2.6 Ensayos de propiedades antimicrobianas

La actividad antimicrobiana se desarrolló bajo las recomendaciones del Comité Nacional de Control de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS) [67]. Se cortaron en forma aséptica discos de 12 mm de diámetro de papel filtro, que se sumergieron en las soluciones de las respectivas películas y se colocaron en una placa de Petri conteniendo 100 ml de agar nutritivo (*Escherichia coli*) y Baird-Parker (*Staphylococcus aureus*), previamente sembradas con un césped bacteriano de la cepa en estudio. Como control del ensayo se utilizó una placa de Petri igualmente sembrada con la cepa respectiva. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Finalmente, con un modelo digital Vernier Mitutoyo MDC-1 "PX (Kawasaki-Shi, Kanagawa, Japón), se midió el diámetro de inhibición y con la siguiente Ecuación 1 se calculó el porcentaje de actividad antimicrobiana:

$$\% \text{halo de inhibición} = \frac{\text{diámetro final} - \text{diámetro inicial}}{\text{diámetro final}} \times 100$$

Ecuación 1 Halo de inhibición

3.1.2.3.2.7 Ensayos de biocompatibilidad *in vitro*

Ensayo de toxicidad AlamarBlue

Los fibroblastos se sembraron en placas multi-pocillo de 96 pocillos a una concentración celular de 8.000 células/pocillo. Posteriormente, las células se incubaron con distintas concentraciones del extracto de las películas durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Trascurrido el período de incubación se evaluó la

viabilidad celular mediante un ensayo colorimétrico con el reactivo AlamarBlue. Se midió la absorbancia a 570 nm y 655 nm. El AlamarBlue® es un indicador de la viabilidad celular demostrado, que utiliza el poder natural de la reducción de las células vivas para convertir resazurina a la molécula resorufin. El principio activo de AlamarBlue® (resazurina) es un compuesto no tóxico, la célula es permeable al colorante de color azul y no fluorescente de forma virtual. Al entrar en las células, se reduce la resazurina a resorufin, que produce un compuesto de color rojo. Las células viables convierten continuamente la resazurina a resorufin, generando así una medida cuantitativa de la viabilidad y citotoxicidad [187]. Dada la relación directa entre unidades de absorbancia y la viabilidad celular, el cálculo de la viabilidad se realiza respecto a las células control (sin tratamiento) mediante la siguiente Ecuación 2:

$$\%Viabilidad = \frac{Absorbancia_{muestra}}{Absorbancia_{control}} \times 100$$

Ecuación 2 Viabilidad celular

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de la materia prima

4.1.1 Fibroína de seda

4.1.1.1 *Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)*

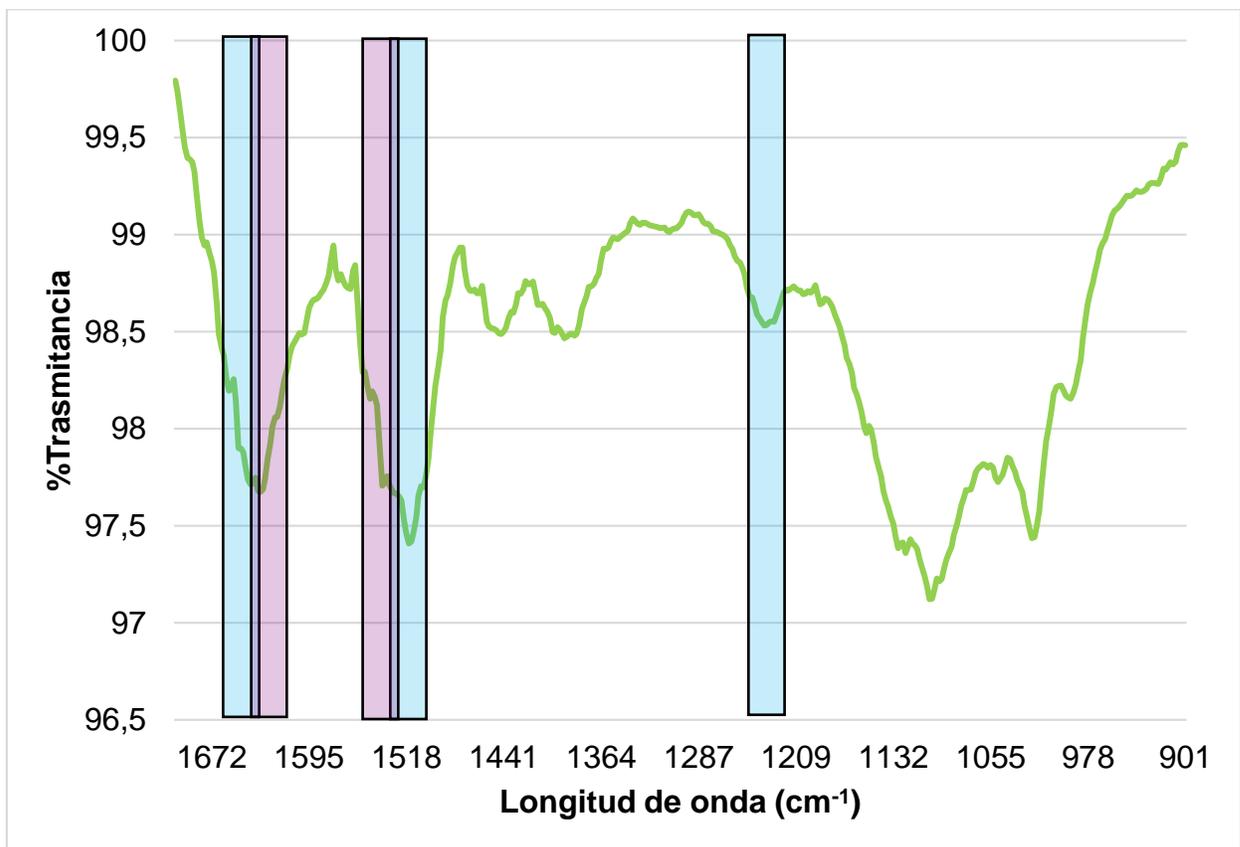


Figura 15. FTIR de scaffold de fibroína liofilizada a partir de la solución extraída. En azul las amidas correspondientes a la seda I t el morado las correspondientes a la seda II

Como se mencionó en el marco teórico la estructura de la fibroína consiste en una cadena de aminoácidos, pero al ser una proteína presenta gran variación en su organización que puede ser en laminillas que son las denominadas laminas β y se presentan normalmente cuando la fibroína se encuentra en forma de fibra o en

forma helicoidal juntos con aire o agua [32]. En la Figura 15, se presenta el espectro infrarrojo de la fibroína obtenida por el método de extracción descrito previamente, la región de interés para este tipo de material se encuentran generalmente entre 1000 cm^{-1} y 1800 cm^{-1} , puesto que es la zona característica de las amidas principales que caracterizan la estructura molecular de la fibroína, sin embargo, se tiene reporte de que en el rango de 1400 y 1650 cm^{-1} se presenta otra región de interés, donde es posible encontrar bandas características de sericina [184]. También es necesario indicar que dependiendo de la región donde se encuentre la banda de vibración en el espectro, se puede hablar de las estructuras de la fibroína, sea helicoidal conocida como seda I o láminas β denominada también como seda II. En la figura anterior, se evidencia que para seda la I o estructura helicoidal, la presencia de la amida I en aproximadamente 1647 cm^{-1} , la amida II alrededor de 1514 cm^{-1} y la amida III aproximadamente en 1233 cm^{-1} y para la seda II o láminas β se evidencia la presencia de las amidas I y II aproximadamente en 1634 y 1531 cm^{-1} respectivamente, la amida III normalmente se encuentra en 1265 de acuerdo con diferentes autores, sin embargo en el espectro mostrado no se diferencia, debido a que posiblemente esté un poco solapada con la banda de vibración de la amida III de la seda I, la cual se observa bastante amplia [32],[166],[186]. Así entonces La aparición principalmente de las amidas tanto de la seda I como II, indican que la organización de la fibroína obtenida coincide con lo reportado en la literatura para estructura helicoidal y láminas β , concluyendo así que el material fue extraído de manera satisfactoria [188].

4.1.2 Quitina y quitosano

4.1.2.1 *Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)*

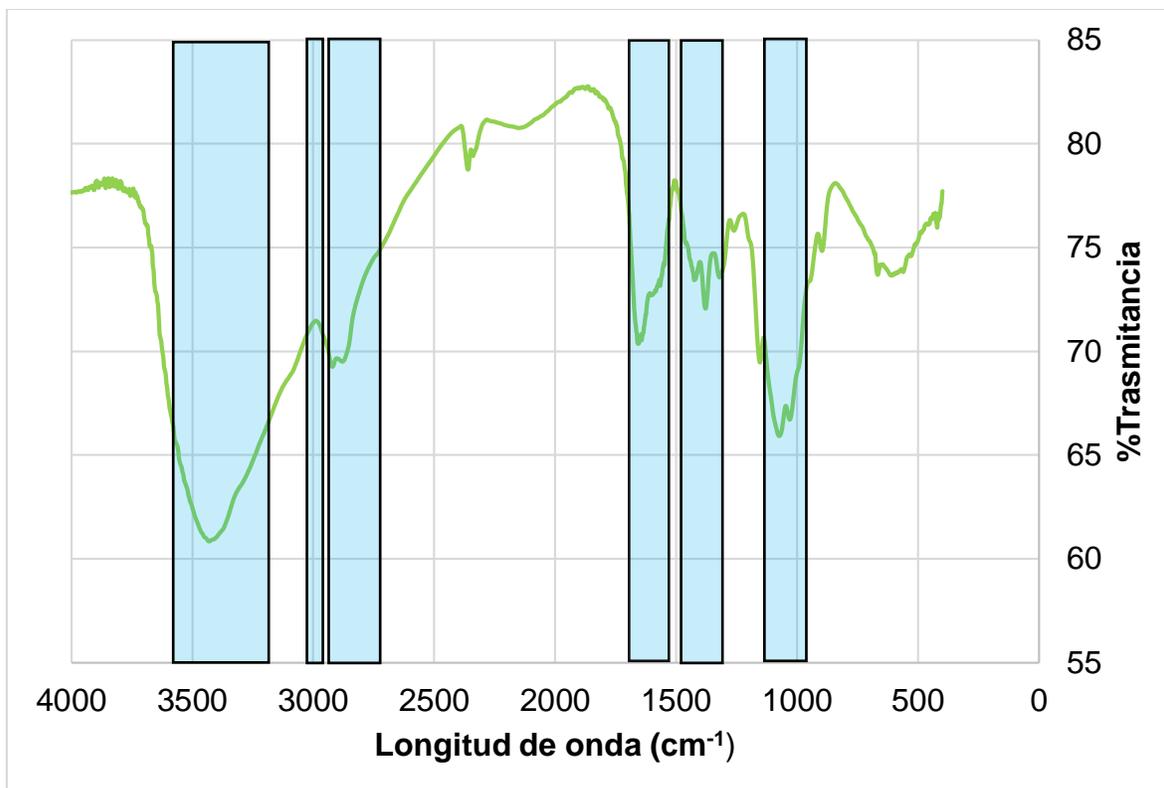


Figura 16. Espectro infrarrojo de absorción del polvo de quitosano

La Figura 16 muestra el espectro de absorción FTIR del quitosano comercial (Sigma Aldrich) con desacetilización del 75 % empleado para la fabricación de las películas poliméricas. Se evidencia una banda ancha asimétrica debida a vibraciones OH que se extiende desde 3670 a 2600 cm^{-1} . Bandas de modos de estiramiento NH a 3370 y 3300 cm^{-1} , así como los de grupos CH a 2930 y 2880 cm^{-1} aparecen superpuestos a la banda ancha OH; La banda con número de onda 1.600 cm^{-1} es característica de una amida I, y a 1590 cm^{-1} se puede observar la inflexión del grupo NH_2 . A 1250 cm^{-1} se encuentra la vibración de estiramiento C–N y las bandas entre 1250 y 800 cm^{-1} son estructuras de tipo sacárido del quitosano, tal como lo reporta Boonsongrit [189]. Si bien, el espectro de polvo de quitosano utilizado para la preparación de películas muestra las bandas características de este polisacárido informadas por otros autores [190],[191],[192].

Los espectros infrarrojos de transformada de Fourier del polímero de la quitina se muestran en la Figura 17. En primera instancia, es importante mencionar que, en base a su arreglo molecular, la quitina se encuentra presente en la naturaleza en tres formas cristalinas diferentes (α , β y γ) [193].

Los espectros revelan la presencia de los grupos hidroxilos que pertenecen a una banda ancha ubicada en 3620 cm^{-1} , acorde con lo reportado por otros autores [194],[88] siendo esta banda más pronunciada en la muestra de quitina que en el quitosano. De igual manera, se observan tres señales particulares del grupo funcional amida a 1554 , 1614 y 1668 cm^{-1} . Se ha reportado que los espectros de las quitinas se caracterizan por tres bandas, que corresponden al doble enlace C=O (para la transmitancia localizada en el número de onda 1668 cm^{-1}). La banda presente a 1554 cm^{-1} es promovida por la flexión del enlace N-H en el grupo amida [195]. Se debe indicar que la banda de 1668 cm^{-1} corresponde al grupo amida I, la cual es característica para quitinas con conformación cristalina tipo α [196]. Esta banda característica es usada para distinguir entre α -quitina y la β -quitina, ya que en el caso de la β -quitina una sola banda puede ser observada entre 1656 y 1668 cm^{-1} [197].

Por lo anterior, con la espectroscopia infrarroja, se comprobó la existencia de grupos funcionales reportados en el estándar de quitina en otras investigaciones [198], [199].

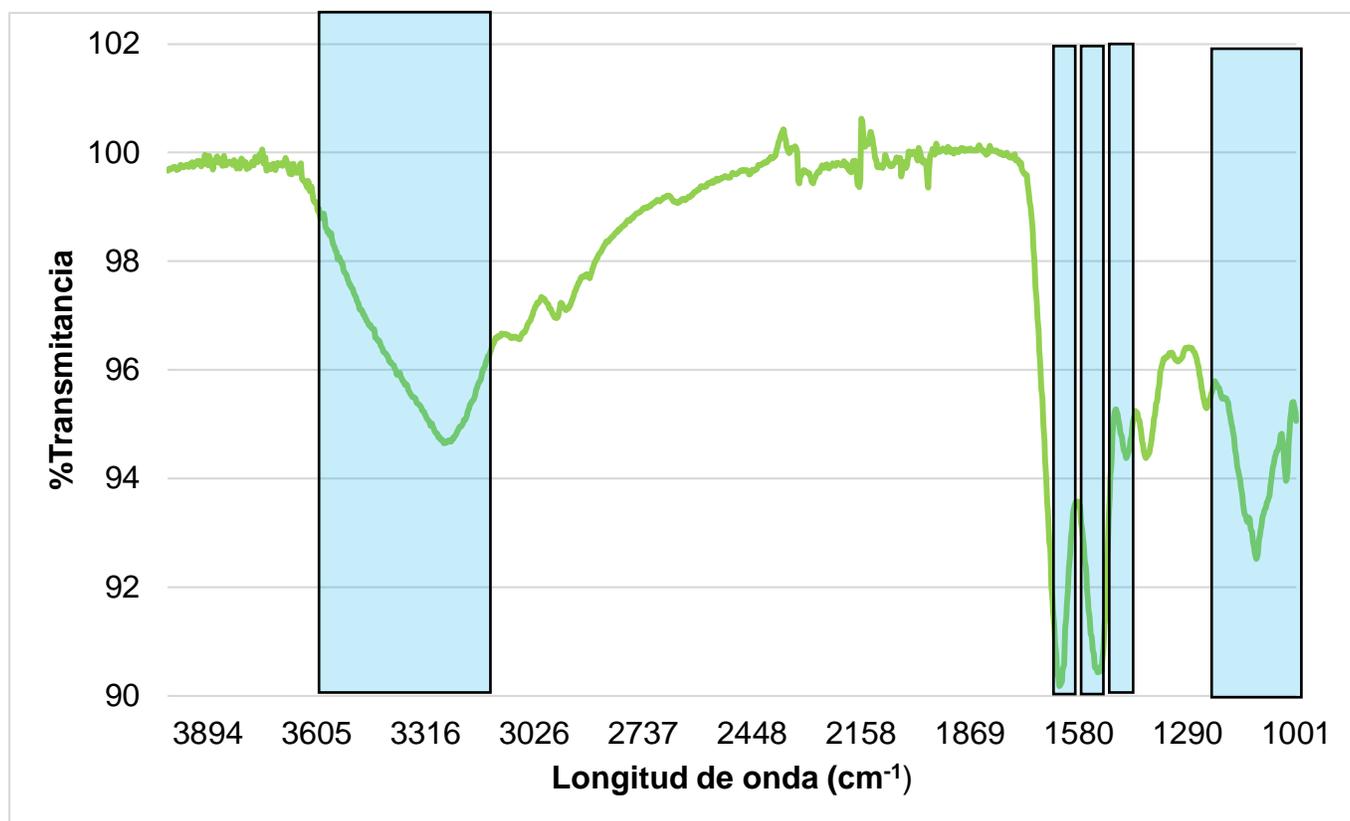


Figura 17. Espectro infrarrojo de absorción del polvo de quitosano

4.1.2.2 Difracción de rayos x (DRX)

En el difractograma del quitosano se observa un máximo de difracción más intenso aproximadamente a 20° (2θ), que el mostrado alrededor de 10° (2θ), como se presenta en la Figura 18. La forma hidratada del quitosano presenta dos reflexiones, a 10° y aproximadamente a 20° , la forma anhidra exhibe un pico en 2θ cerca de 15° [200]. Tras el análisis del espectro obtenido, se puede apreciar que la muestra de quitosano se caracteriza por poseer una fase cristalina y amorfa, lo cual coincide con lo reportado por Hidalgo et al.[201] y Prashant et al. [195]. De igual manera, en la Figura 19, se muestra el difractograma de la quitina donde se evidencia un pico principal de gran intensidad a $2\theta = 20.5^\circ$ y un pico secundario en $2\theta = 10^\circ$, siendo los mismos dos picos del quitosano, pero con una mayor intensidad. Ambas muestras presentan espectros similares a los reportados en la literatura [202],[203],[204]. Al igual que en la quitina, las moléculas de quitosano en estado sólido están organizadas en regiones

crystalinas, y coexisten con regiones amorfas, por lo que se demuestra la estabilidad de la estructura de los biopolímeros, así como lo refiere [205].

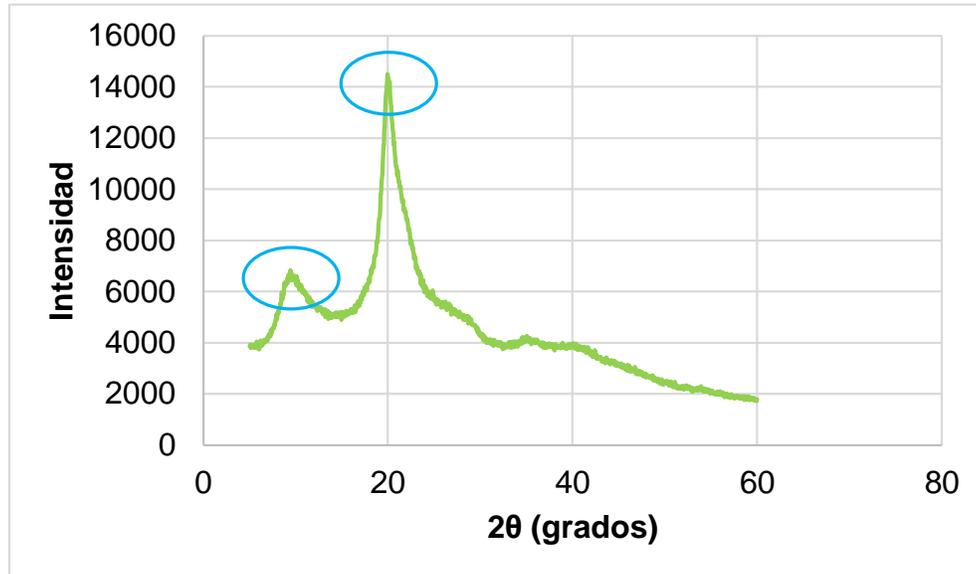


Figura 18. Difractograma de rayos-X del quitosano.

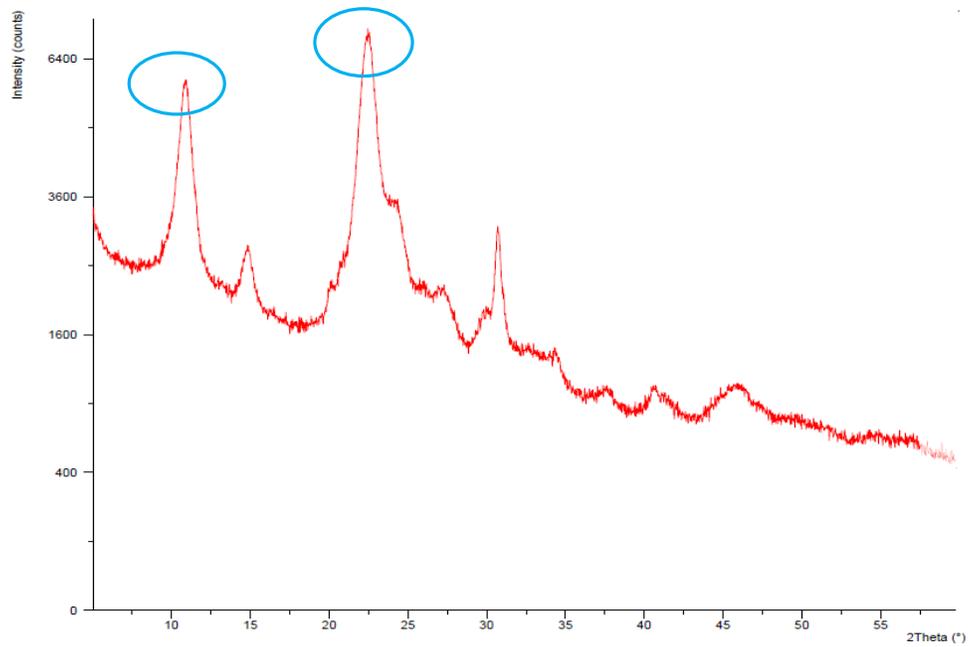


Figura 19. Difractograma de rayos-X de la quitina.

4.2 Síntesis de películas

4.2.1 Caracterización de películas

4.2.1.1 *Espesor de películas y morfología*

Las propiedades biológicas y la durabilidad de la vida útil de las películas se ven dramáticamente alteradas por este parámetro. Los valores encontrados en las mezclas previamente preparadas se observan en la Figura 20, además las imágenes de la Figura 21 obtenidas bajo SEM mostraron que la morfología y la topografía de la superficie de las 4 membranas eran considerablemente diferentes.

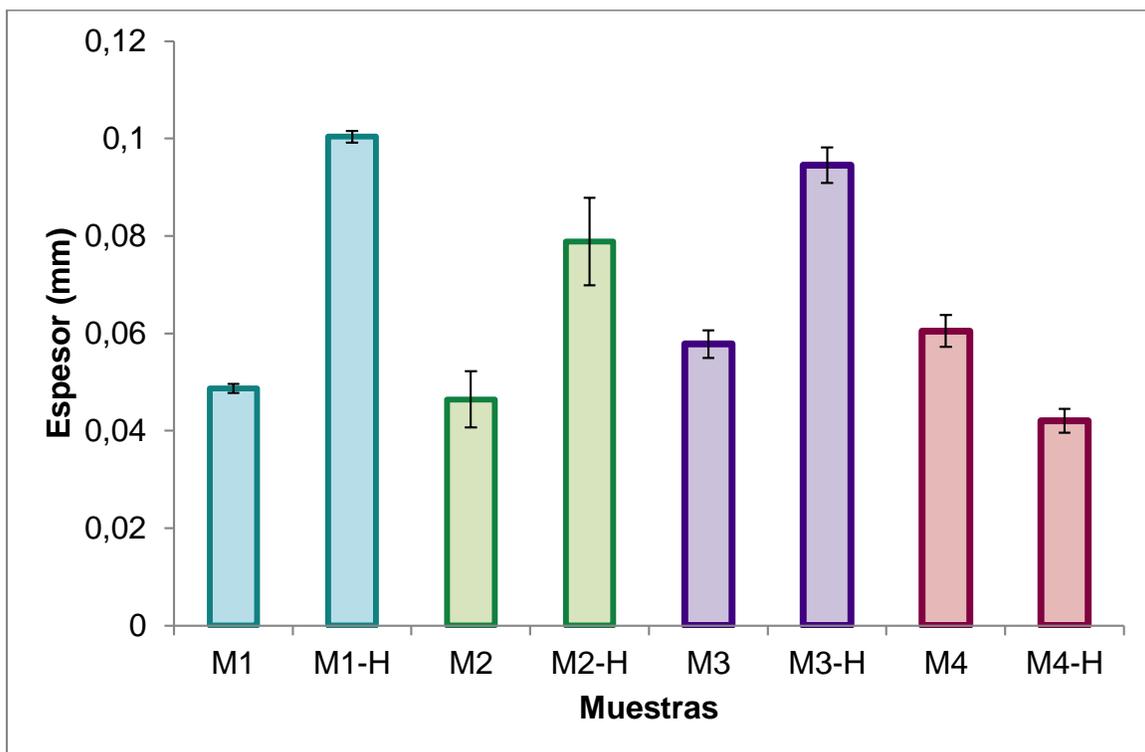


Figura 20. Espesor de las películas en los días 0 y 28

Los resultados del espesor fueron obtenidos en el día 0 y 28 en condiciones diferentes. Para el día 0 el espesor fue medido después de 72 horas de finalizado el proceso de secado de las películas. Por otro lado, el día 28 se realizó la medida después de estar inmersa en SBF.

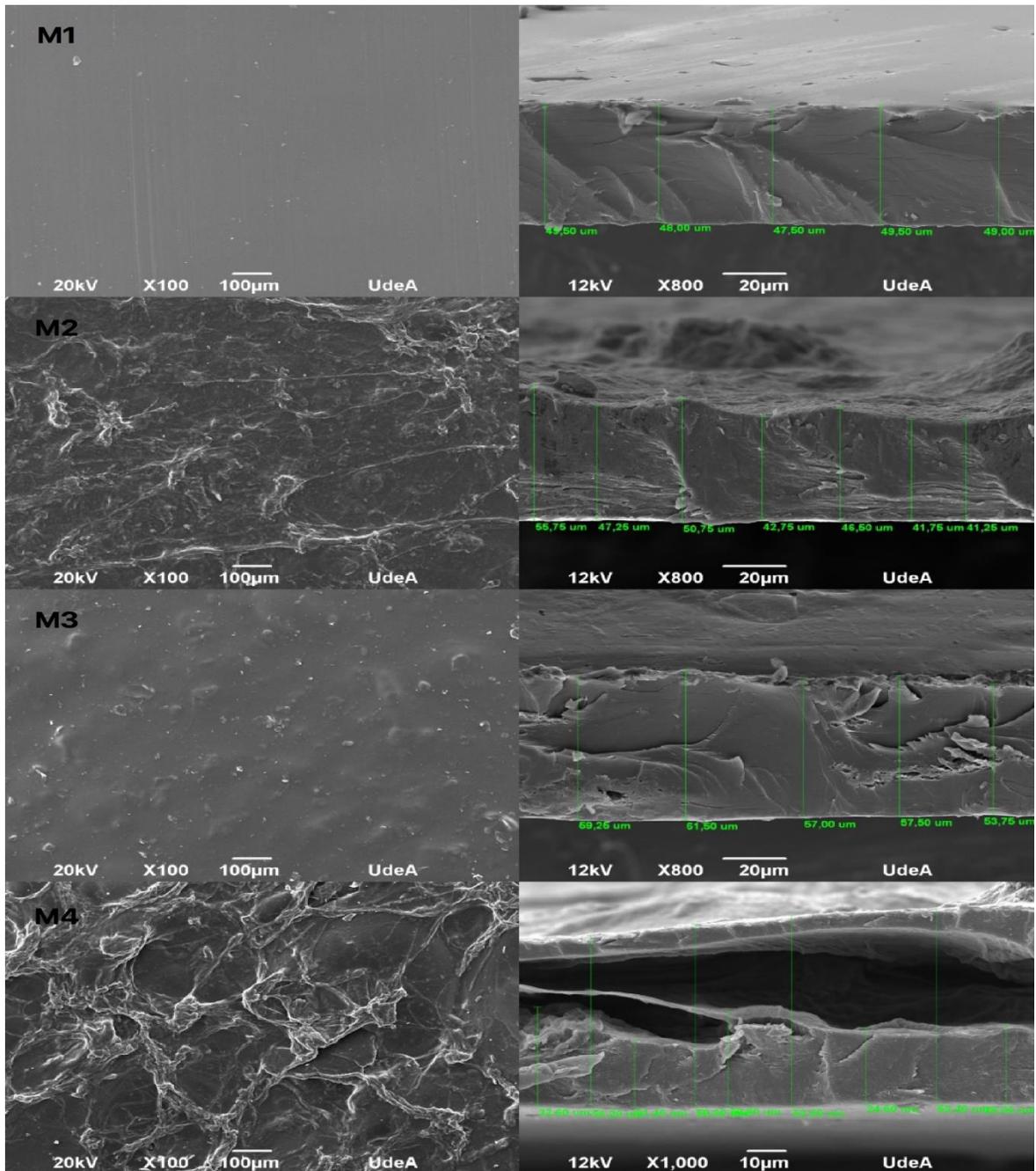


Figura 21. Micrografías de las películas preparadas.

Los valores promedio del espesor de las películas evaluadas al día 0 como se muestra en la Figura 20 presentaron una tendencia, que al poseer en su estructura más de un polímero el espesor de esta aumenta, la desviación está relacionada por la no homogeneidad de las películas en su superficie mostrando una

estructura heterogénea para el caso de las películas M2 y M4 tal como se observa en la Figura 21; pero al observar la película M1 su desviación es estrecha debido que la superficie superior e inferior es lisa, homogénea y sin poros visibles, por otro lado en la película M3 la superficie superior es lisa, con estructura poliédricas pequeñas y dispersas debido a la quitina. Cabe aclarar que las mezclas preparadas muestran heterogeneidades superficiales perceptibles, la razón de esta morfología superficial es que los polímeros no son totalmente solubles completamente entre sí, generando superficies rugosas (M2 y M4) que pueden causar la dispersión de la luz y la disminución de la transparencia.

Por otro lado, debido a una aceleración en el intercambio dinámico de humedad entre el ambiente y la muestra, las películas evaluadas a 28 días mostraron una relación entre el contenido de quitosano y espesor directamente proporcional.

Una característica deseable es el grosor similar a la duramadre humana, que se reporta cerca de 0.3 mm [8], aunque las películas no poseen un grosor similar, si se obtuvo una membrana más delgada que un sustituto de duramadre que se usa a menudo en la práctica clínica como DURAGEN que tiene espesor de 0.4mm [120].

Al poseer películas tan versátiles y con la función de incrementar el espesor para que sea más similar a la duramadre, se podría plantear membranas de dos capas entre las mismas películas obtenidas, con una porción porosa y una no porosa debido a que la heterogeneidad de la películas permite: (a) La porción porosa es importante porque en la ingeniería de tejidos, las estructuras de poro interconectadas permiten el paso de factores de crecimiento, migración celular y neo vascularización; sin embargo, estas estructuras no son muy resistentes ante las cargas, por lo que se rompen fácilmente. (b) La parte no porosa proporciona una mayor resistencia mecánica, y los injertos se pueden suturar para garantizar que permanezcan fijos [8]. La capa porosa estaría dada por la fibroína de seda que forma estructuras organizadas con patrones característicos, y la capa no

porosa por el quitosano que tiene una superficie relativamente lisa y plana y no tiene alta rugosidad.

Dado que un sustituto dural ideal debe de ser suturables, esta combinación permitiría un cierre hermético.

4.2.1.2 *Propiedades mecánicas*

La eficacia clínica de los sustitutos duros puede aumentarse a través de una mejor replicación mecánica del tejido dural endógeno, la similitud de las propiedades mecánicas es deseable para mejorar la imitación del tejido, que es necesario para soportar efectivamente las cargas *in vivo* [40]. Existe una escasez de estudios que detallan la respuesta mecánica de la membrana meníngea y las capas individuales [40]. Por el contrario, la duramadre del nervio óptico o la vaina del nervio óptico y el tejido de la duramadre de la médula espinal están relativamente bien estudiados, dado que es posible encontrar reportes que indican que estos tejidos se caracterizan por poseer un comportamiento anisotrópico y viscoelástico [206].

La resistencia a la tracción en términos de esfuerzo máximo y módulo de Young se midieron para la determinación de la resistencia de las diferentes muestras (M1 100CS, M2 50CS50SF, M3 100CS/quitina y M4 50CS50SF/quitina)

En la Figura 22 se presentan los resultados obtenidos del esfuerzo máximo soportado por las películas. Si bien, la resistencia mecánica a la tracción está estrechamente relacionada con la adición de la quitina. La quitina al tener partículas irregulares y textura rugosa en la superficie, permite incrementar el módulo de Young y la resistencia a la rotura [207]. Para las muestras M2 y M4 no se observa muy bien la diferencia de cambio de valores, no obstante, es posible evidenciar que la adición de quitina ayudó a disminuir la variabilidad de los datos y esto puede ser atribuido al aumento de los enlaces intermoleculares entre los grupos funcionales de la fibroína de seda y la quitina. Caso contrario sucede con

M1 y M3, que al agregar la quitina el esfuerzo máximo y el módulo de Young (Figura 22, Figura 23) se incrementó un 42% y 47% respectivamente.

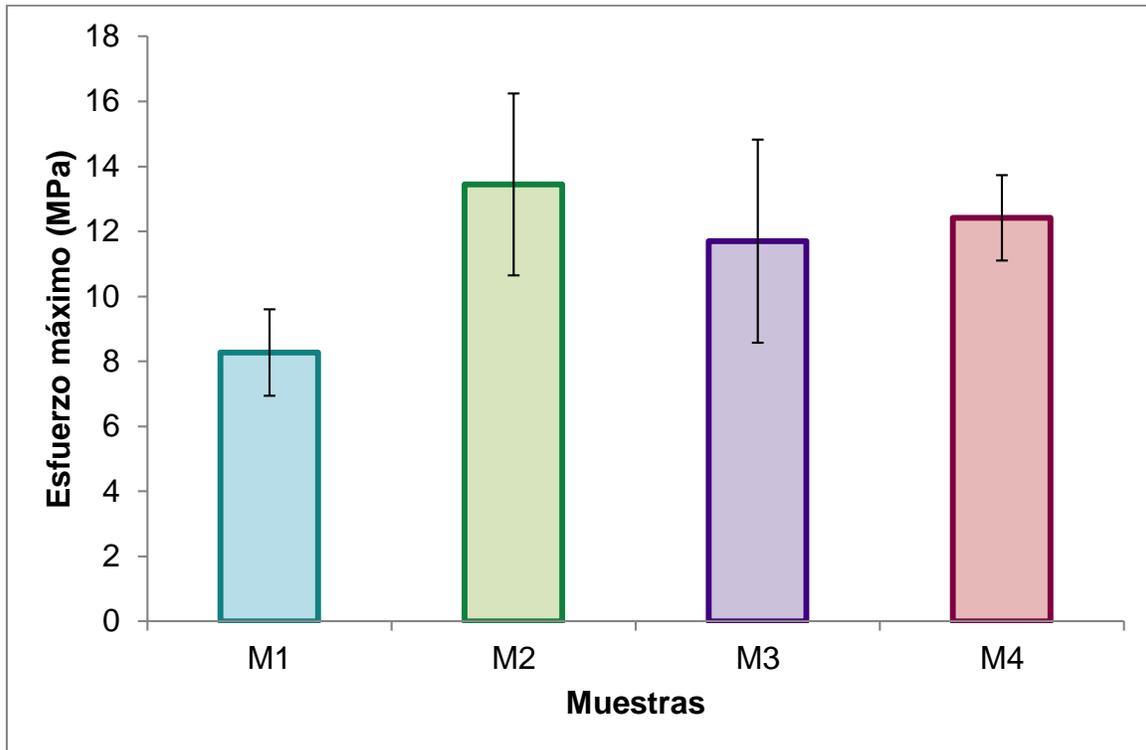


Figura 22. Esfuerzo máximo de las películas ensayadas

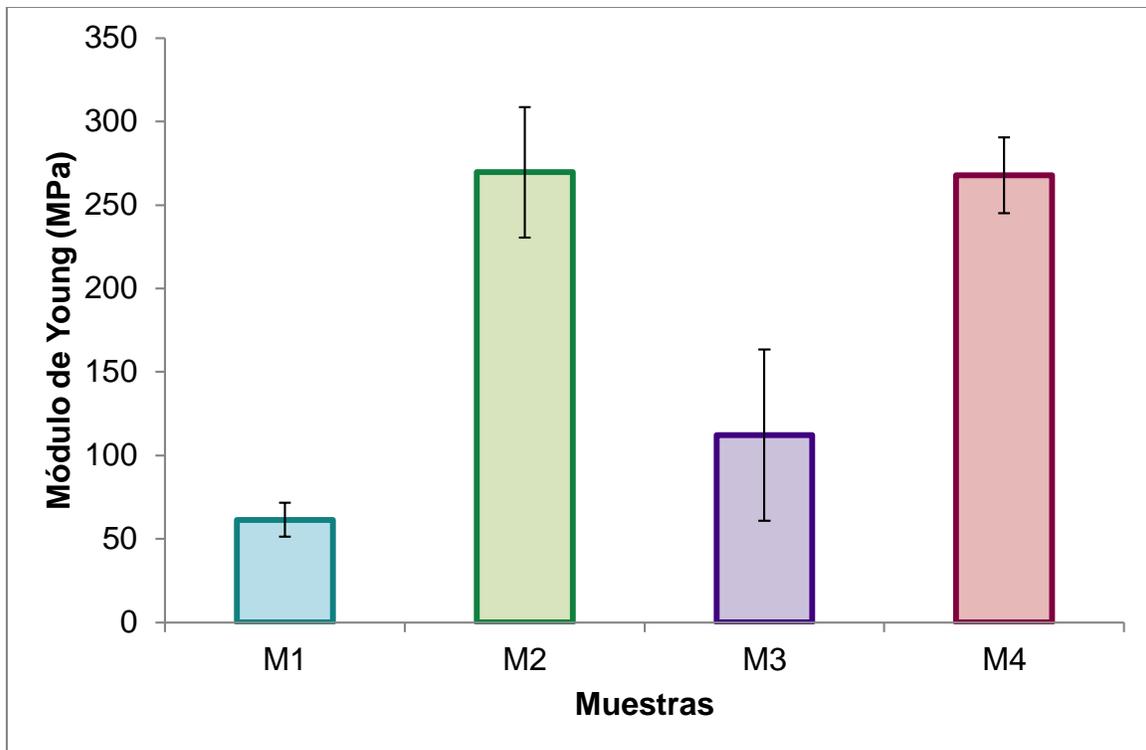


Figura 23. Módulo de elasticidad de las películas ensayadas

Las curvas de esfuerzo-deformación entre las películas M1 - M3 y M2 - M4 mostraron una forma similar observadas en la Figura 24, donde se logra evidenciar que las películas formadas son rígidas debido a que presenta alta resistencia a la deformación. Igualmente, se puede apreciar que se requiere de grandes esfuerzos para lograr deformar la probeta, lo cual da indicios de que el comportamiento mecánico de estas películas corresponde a un material rígido y frágil.

Dejando de lado la resistencia a la tensión, se debe considerar el aspecto de la deformación, ya que el propósito principal de incorporar el plastificante a la solución, radica en contribuir con el componente elástico del material, permitiendo porcentajes de deformación mayores para ser considerado un sustituto dural. Lo anterior con el fin de que a la hora de ser utilizados tengan la flexibilidad suficiente debido a que las fibras, en particular las elásticas, aportan propiedades viscoelásticas al saco dural. Un mayor estiramiento permite una compresión radial

sobre su circunferencia y facilita la acomodación de los cambios dinámicos de volumen de LCR [208].

La función principal de la inclusión de un plastificante es actuar como lubricante en la estructura del polímero, permitiendo una mejor fluidez del material cuando se le aplican esfuerzos, pero debido al mayor movimiento de cadenas en dirección del esfuerzo de tensión, la resistencia del material disminuye porque las cadenas moleculares “fluyen” en dirección de la fuerza aplicada [209]. Como un factor proporcional, a mayor cantidad de plastificante, más fluirán las cadenas y menor será la resistencia del material. No obstante, aunque el material está plastificado no fue suficiente para reducir su rigidez y aumentar su elasticidad.

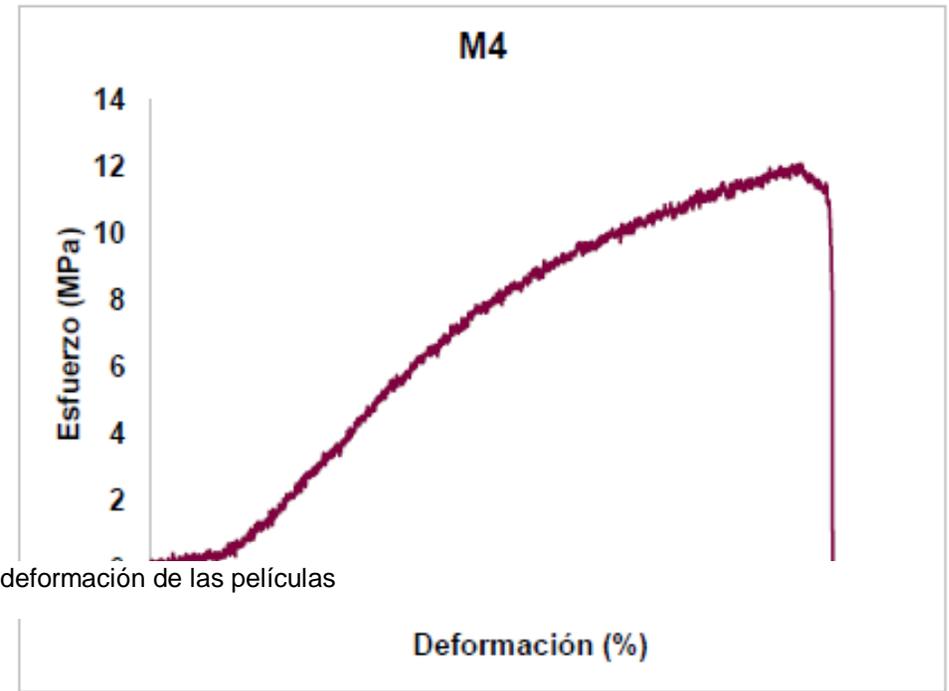
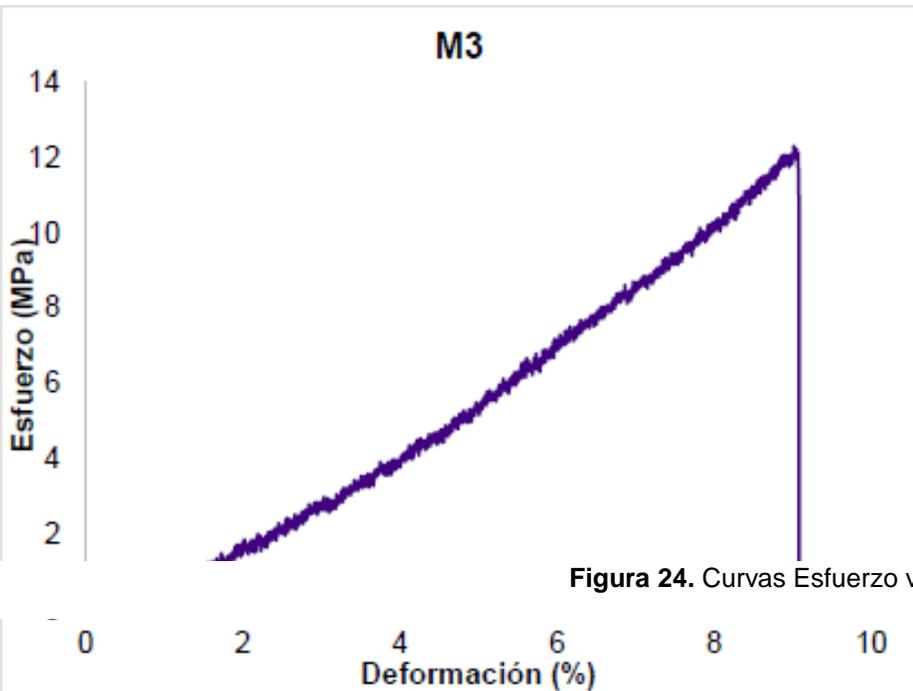
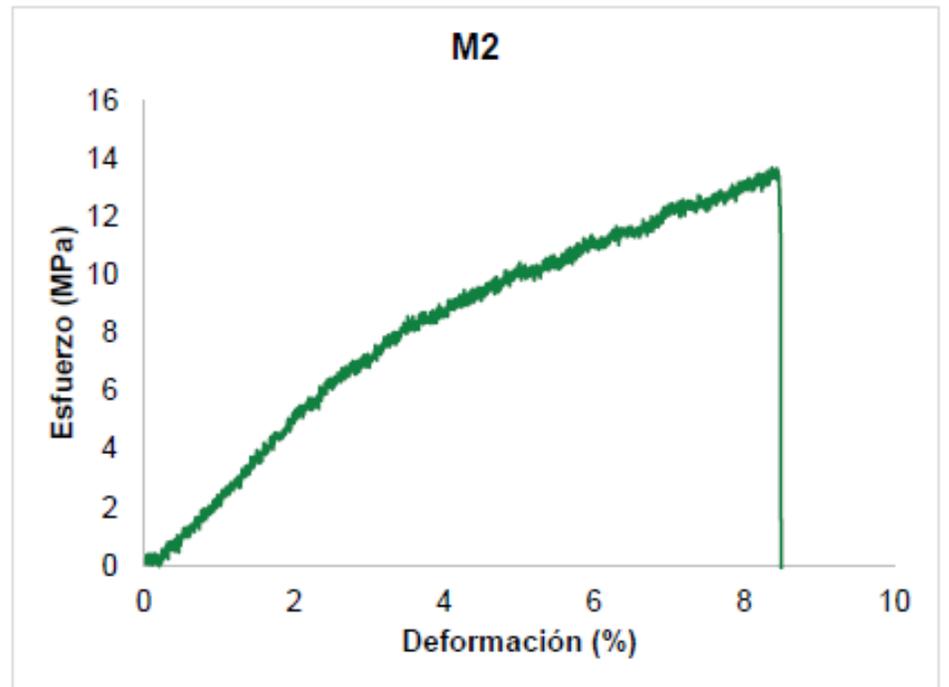
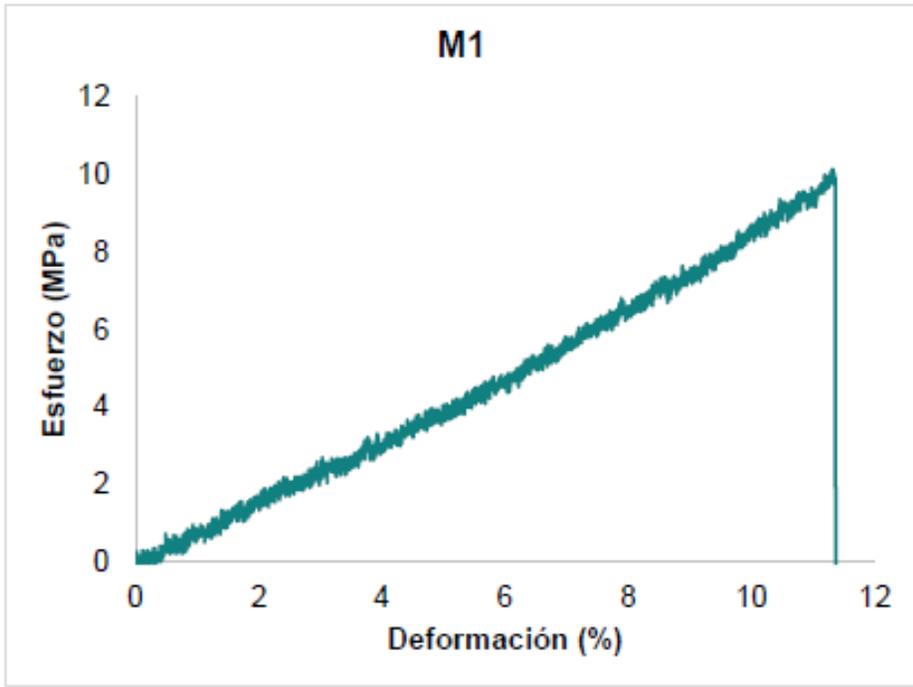


Figura 24. Curvas Esfuerzo vs deformación de las películas

Ahora, teniendo en cuenta los datos presentados en la Tabla 5, se evidencia que no existe una relación entre el espesor y las propiedades mecánicas, aunque se creería que, a mayor grosor, mayor fuerza se requiere para romper la película.

Tabla 5. Propiedades superficiales y mecánicas de las películas

Muestra	Espesor (mm)	Resistencia a la rotura (MPa)	Módulo de Young (MPa)
M1	0.0487 ± 0.0009	8,27 ± 1.1	61.53 ± 10.2
M2	0.0464 ± 0.0057	13.4 ± 2.8	269.5 ± 39.0
M3	0.0578 ± 0.0028	11.7 ± 3.1	112.2 ± 51.2
M4	0.0605 ± 0.0032	10.9 ± 1.3	203.7 ± 18.0
Duramadre	1-0.32 [208]	8.80±1.37 [170]	2.75 ±1.41 [170]

* Los datos presentados son el promedio de seis análisis con su respectiva desviación estándar.

Diferentes autores han enumerado las funciones mecánicas de la duramadre: ser una membrana protectora para el cerebro sensible, mientras que, por otro lado, protege los huesos del cráneo contra las pulsaciones del cerebro; para transferir tensiones de un hueso a otro, al menos en el cráneo adolescente con sus suturas no fusionadas; y para reducir las ondas de presión en el LCR mediante la compartimentación de la cavidad craneal [210]. El límite de resistencia a la tracción y la rigidez son mayores en sentido longitudinal que en sentido transversal y su capacidad de relajación que presenta este tejido demuestra sus propiedades viscoelásticas [208].

En general, se observó que las propiedades mecánicas de las películas de la mezcla son bajas. El bajo rendimiento mecánico se atribuye al método de fabricación

utilizado, podría deberse a la disminución de la homogeneidad de las mezclas después de la evaporación del disolvente y más fuerte que las interacciones repulsivas [211]. Basándose en el resultado de las propiedades mecánicas del compuesto general, es posible que el material pueda rediseñarse con mejores propiedades mecánicas en trabajos futuros.

4.2.1.3 *Evaluación de la bioactividad*

4.2.1.3.1 *Variación del peso*

Algunos polímeros naturales usados como biomateriales son caracterizados por su biodegradabilidad. Este término hace referencia a la transformación y deterioro que se produce debido a la acción de enzimas y/o microorganismos como bacterias, hongos y algas. La biodegradación puede ser parcial o total. La primera consiste en la alteración en la estructura química del material y la pérdida de propiedades específicas. En la total, el material es degradado totalmente por la acción de microorganismos con la producción de CO₂ (bajo condiciones aeróbicas) y metano (bajo condiciones anaeróbicas), agua, sales minerales, biomasa o temperatura [65], [212]. En este proceso se presenta comúnmente variaciones en el valor del pH y variación de masa. Así entonces, cuando se trata de un material que estará en contacto con el cuerpo, se debe tener especial cuidado con estas alteraciones, puesto que un cambio de masa induce a que el material libere partículas que podrían ser perjudiciales si están en contacto con el organismo [213].

En consecuencia, con lo anterior, los seres vivos poseen una compleja pero estructurada organización, que le permite identificar, rechazar o admitir cualquier cuerpo extraño introducido en él. Las interacciones de cualquier sustancia de origen natural o sintético con el medio fisiológico determinan el periodo necesario para su reconocimiento y la intensidad de la reacción del organismo para rechazar o asimilar el cuerpo extraño introducido y restablecer así el equilibrio interno [91], por lo tanto, en la Figura 25 se presenta los datos del ensayo de degradación, que permitieron

obtener información sobre la variación del peso, hinchamiento, y pérdida de material para cada una de las películas en los días 1, 7, 14, 21 y 28.

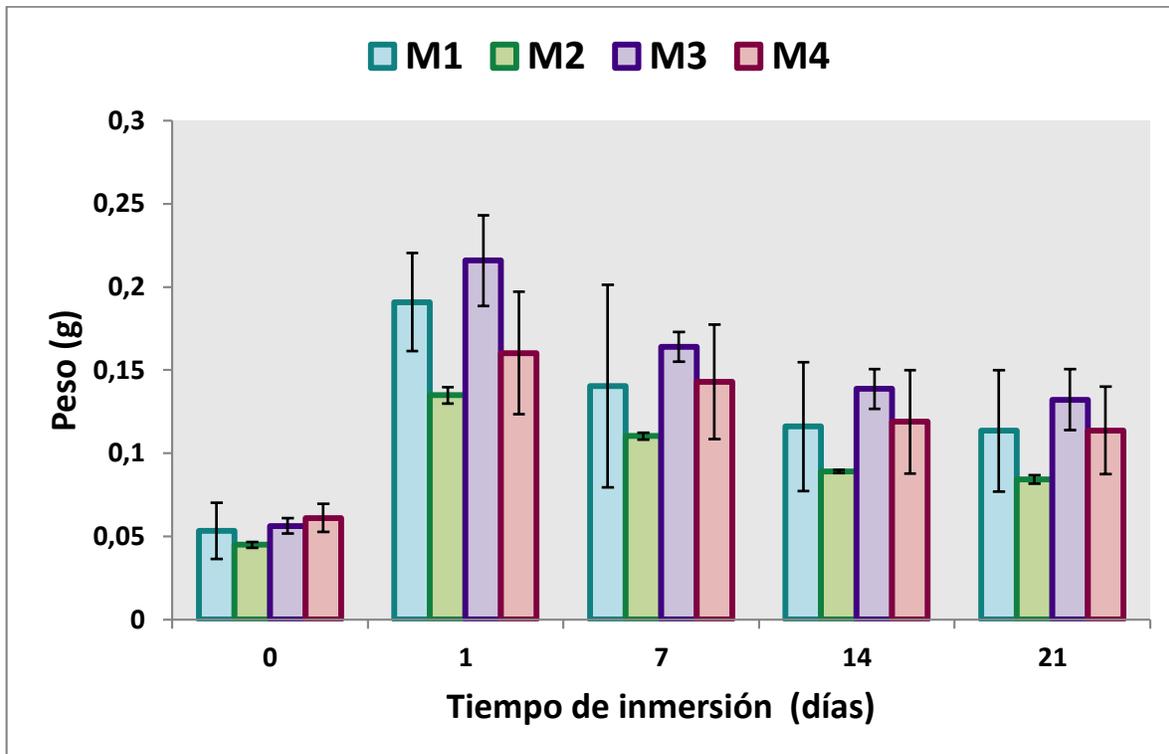


Figura 25. Variación del peso al estar las películas inmersas en SBF

El tiempo 0 corresponde al día en que las películas fueron sumergidas por primera vez en SBF, con esto se buscó evitar que se midiera un aumento en el peso causado por la absorción de agua de las muestras. Sin embargo, después de 24 horas, se evidencia variación de peso en todas las muestras y a partir del día 7, se presenta un estado estacionario. Este fenómeno permite inferir que el incremento de peso es debido a un comportamiento de hinchamiento sufrido por las películas al estar en contacto con el fluido, denotando además que, las muestras M1 y M3 conformadas por el mayor porcentaje del polisacárido (quitosano y quitina) presentan un aumento mucho más pronunciado respecto a M2 y M4 que además de tener 50% de quitosano, están formadas con fibroína, por lo tanto, resulta apropiado afirmar que

el aumento de masa está estrechamente relacionado con el aumento del porcentaje de quitosano.

A partir del día 14, en todas las muestras se presentan algunas áreas de degradación en la textura y deformación de la forma del contorno, especialmente en las formulaciones de M1 y M3, tal como se presenta en la Figura 26.



Figura 26. Degradación en el contorno de las películas en los días 7, 14 y 21.

Estos resultados son acordes con el estudio de degradación *in vivo* desarrollado por Pogorielov et al. [177] quienes en el injerto de quitina-quitosano usado para duraplastia, indican que la pérdida de material comenzó en los bordes de las muestras dentro de las dos semanas posteriores a la implantación, siendo estos más delgados (en un 10-15%) en comparación con la zona central.

El ensayo se prosiguió hasta después del día 28 para determinar el tiempo de pérdida completa de masa, pero aún después de este tiempo se corrobora delgadez de las esquinas de todas las películas y que la biodegradación había ocurrido. Sin embargo, no se había producido una degradación completa durante el experimento, por lo que sería necesario realizar un estudio más prolongado para observar la degradación completa de las películas fabricadas.

Teniendo en cuenta lo anterior, es posible indicar que las películas no sufren una disolución o degradación temprana al encontrarse sumergidas en SBF. En otras palabras, a mayores porcentajes de quitosano y mayor tiempo de inmersión hay una menor resistencia a la degradación o pérdida de material, lo que indica que el quitosano genera una rápida desintegración. Por lo tanto, es necesario que se encuentre un equilibrio entre la interacción molecular de los componentes de las películas y el medio fisiológico, para que las películas inicien su proceso de degradación y pérdida de masa.

Los resultados anteriores permiten considerar que probablemente las películas de quitosano posean una mayor afinidad a las moléculas de agua, debido a que la molécula del polisacárido en la película se encuentra protonada, ocasionando repulsión entre ellas mismas, disminuyendo las interacciones secundarias, tipo enlaces de hidrógeno intermoleculares, logrando por consiguiente, espacios vacíos en la red polimérica compuesta y en los cuales puede penetrar la molécula de agua [202]. Estos intersticios o espacios se corroboran también en las micrografías obtenidos por medio del SEM (Figura 21). Por otro lado, es significativo considerar que la capacidad de hinchamiento en las películas puede ser regulada por medio de procesos de entrecruzamiento, debido a la disminución de grupos aminos libres capaces de formar enlaces de hidrógeno [214]. Además, se debe considerar ante el comportamiento de las películas en el proceso de degradación, el carácter hidrofílico que proporciona el plastificante (glicerina) [215], que no solo se encarga de reducir las fuerzas de fricción entre cadenas poliméricas mejorando las propiedades mecánicas, sino que puede decirse que el efecto de plastificación con

glicerol o glicerina promueve la movilidad de las cadenas, facilitando la difusión de las moléculas de oxígeno e hidrogeno a través de la película, aumentando la capacidad de hinchamiento [216]. Por lo anterior, parece adecuado, de acuerdo con Rodríguez-Núñez *et al.* [217] informar que la adición de plastificantes en la preparación de películas es beneficiosa, causando que la solubilidad disminuya debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre el quitosano y el plastificante.

La facilidad de un biofilm para absorber agua es un aspecto muy importante al evaluar su propiedad para ingeniería de tejidos, por ello, resulta beneficioso que las películas fabricadas como potencial reemplazo dural presenten un proceso de hinchamiento en la degradación, puesto que demuestra su poder para absorber agua y esto provoca un cambio morfológico al darse la expansión y una tensión en las cadenas poliméricas, exponiendo características deseables como estabilidad en tamaño y forma durante el crecimiento celular. Esta propiedad hace alusión al agua presente en los poros pequeños y la que está unida a las cadenas hidrófilas del polímero [218]. Con esto, se denota que la capacidad de hinchamiento en el proceso de degradación de las películas desarrolladas es necesario en el reemplazo dural, dado que es útil para absorber los exudados de la herida y prevenir las infecciones en el sitio de la lesión, lo que podría acelerar la curación de la herida en una intervención de duraplastia [219], [220].

Además, un biofilm o apósito ideal para aplicaciones en reparación tisular (como el reemplazo de la duramadre) debe tener una tasa de biodegradación proporcional a la tasa de curación del tejido [221], por lo cual, se informa que los productos de degradación de la lisozima de la quitina/quitosano son glucosamina no tóxica y *N*-acetil glucosamina, sustancias que podrían acelerar la cicatrización a través del queratinocito en dirección al área de la herida. Los productos de biodegradación de la fibroína de seda son aminoácidos como la glicina y la alanina, que tienen un impacto significativo sobre la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) [222].

Por otro lado, las películas al estar formadas con fibroína de seda y con la presencia de una lámina beta altamente cristalina, tienen un mayor tiempo de degradación, lo que es ventajoso en ingeniería de tejidos, donde se requiere una lenta degradación y buena capacidad de carga [223]. Autores como Panjapheree *et al.* [224] refieren que la rápida degradación causa la migración de las células madre al exterior y reduce las señales hacia el interior del área del defecto.

Por último, la biodegradación lenta de los materiales basados en quitosano libera oligómeros que estimulan los fibroblastos [225]. Por lo tanto, es probable que las enzimas contenidas en el LCR catalicen la degradación de las membranas cerca de los bordes de la duramadre. Entonces, se espera que en una fase *in vivo*, los oligómeros de quitosano estimulen la migración de fibroblastos que liberan fibras de colágeno para reemplazar la película basada en fibroína, quitina y quitosano [176] y al mismo tiempo, se produzca crecimiento de capilares en la duramadre conduciendo directamente a la formación de tejido conectivo en el sitio del reemplazo dural.

4.2.1.3.2 Variación de pH

En la Figura 27 se presentan los valores obtenidos durante el periodo de estudio. El comportamiento observado en esta gráfica, se caracterizó por presentar tres regiones bien diferenciadas. En la primera y tercera región (correspondientes a la primera y última etapa del proceso de inmersión), el pH se mantiene relativamente constante; en la segunda región (correspondiente a la etapa intermedia del proceso), en la cual, se presenta una disminución en el pH.

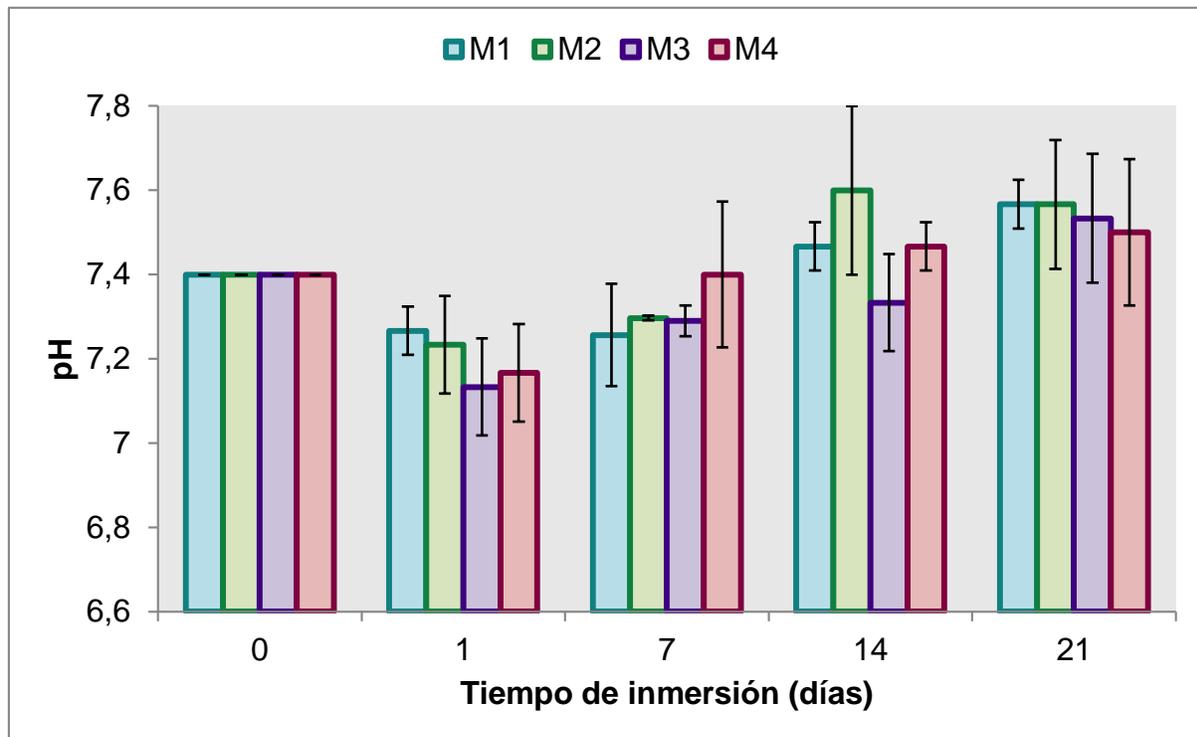


Figura 27. Evolución del pH durante los 21 días de inmersión

Así mismo, se puede determinar en esta figura, además, que los valores de pH de la solución de SBF permanecieron entre 7,4 (en las primeras semanas del proceso) hasta aproximadamente 7,56 (en las últimas semanas), de modo que, globalmente, el pH aumenta al menos una décima después de los 21 días de inmersión en SBF. Este comportamiento es indicativo de que la reacción de hidrólisis que se está llevando a cabo, aun cuando no se puede decir con certeza lo que ocurre realmente a nivel químico, tiene como productos de degradación especies neutras, siendo este un resultado favorable para futuros ensayos histológicos en duramadre.

La variación de pH no es muy elevada, posiblemente porque se cambió el SBF cada semana. En efecto, añadir un medio de pH igual a 7,4 cada 7 días, no permite a la concentración de protones alcanzar un nivel alto.

Adicionalmente, es conveniente destacar que la disminución en el pH de la solución en la primera semana toma lugar durante la misma semana en que se presentó mayor aumento de peso de las muestras, especialmente para M3 (Figura 28), la

cual fue asociada a la etapa del proceso de hidrólisis en que las zonas cristalinas del quitosano y la quitina fueron atacadas, como consecuencia de la mayor movilidad y menor grado de empaquetamiento de las cadenas poliméricas, una vez que los segmentos localizados en las zonas amorfas de la fibroína son atacados hidrolíticamente [226] .

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, los resultados son consistentes con el pH del LCR humano (pH= 7,36) valor reportado por diferentes autores [36],[227],[228].

4.2.1.4 *Ángulo de contacto*

El éxito de un biomaterial al estar en contacto con un cuerpo vivo requiere de propiedades superficiales adecuadas [229] para evitar respuestas no deseadas del huésped como reacciones inflamatorias, infecciones o trombosis [230],[231],[232],[233]. En el caso de los biopolímeros cuando se encuentran en condiciones biológicas, depende principalmente de varios factores, entre los cuales la humectabilidad es una propiedad fundamental para garantizar una respuesta biológica adecuada, como la interacción de las células y los tejidos con el sustrato [234]. En este sentido, la humectabilidad hace referencia a la facilidad de dispersión del líquido en la superficie, estando directamente relacionada con las fuerzas intermoleculares entre las fases y, en general, se estima mediante mediciones del ángulo de contacto.

Teniendo en cuenta lo anterior, la humectabilidad de las películas fabricadas juega un papel importante cuando se vislumbra como posible reemplazo dural. Por lo tanto, en la Figura 28 se presenta la cuantificación de esta característica de superficie de las películas poliméricas, con sus respectivas mediciones del ángulo de contacto.

Para el análisis se tuvo en cuenta las consideraciones de Bonn [235] quien expone que un ángulo de contacto superior a 90° indica que no se prefiere la humectación y el líquido permanece como un reborde en la superficie. El ángulo de contacto de 150° corresponde a una superficie súper hidrófoba que muestra el efecto de loto donde la gota cae inmediatamente y no hay contacto entre el líquido y la superficie. Así mismo, un ángulo de contacto menor a 90° , indica que se prefiere la humectación de la superficie y el líquido se extiende sobre la película, mostrando preferencia por dicho sustrato.

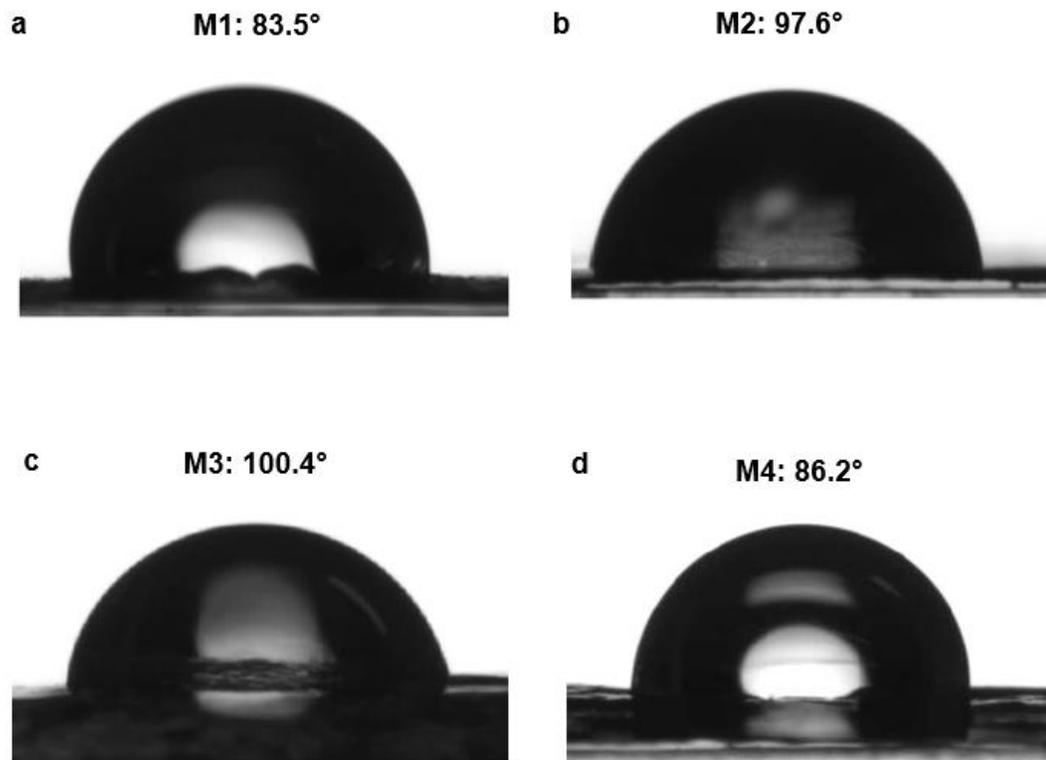


Figura 28. Valores de ángulo de contacto para películas de (a) 100% quitosano; (b) 50% quitosano-50% fibroína; (c) 100% quitosano- 20% quitina; (d) 50% quitosano- 50% fiborina-20% quitina

De acuerdo a los resultados obtenidos, vale la pena señalar que la muestra denominada como M1 (100% quitosano) posee el menor ángulo de contacto, lo que indica una mayor capacidad para absorber agua y una mayor hidrofiliicidad y

humectabilidad, lo que puede conllevar mejorar de la adhesión y proliferación celular para futuros ensayos histológicos. Por otro lado, la cantidad de enlaces de hidrogeno, disposición y orientación molecular de la fibroína de seda y la quitina, les confiere propiedades hidrófobas, por lo que el ángulo de contacto arrojado es mayor a 90° , presentando mala humectación para las muestras M2 y M3, posiblemente porque las gotas del líquido se mueven fácilmente por la superficie del sólido sin penetrar los poros [236].

Para la formulación de M4 que se encuentra fabricada con los tres polímeros (quitosano, fibroína y quitina) presenta un valor de ángulo de contacto de $86,2^\circ$, siendo este menor a 90° a pesar de que dos de sus componentes presentan características hidrófobas, siendo este el hallazgo más interesante que se puede extraer de este ensayo. Este comportamiento probablemente fue gracias a la unión de polisacáridos y polímeros proteínicos como la fibroína, que al estar unidos forman capas de fibras que permiten un mejor comportamiento de las propiedades químicas, físicas y superficiales en las películas fabricadas. Este resultado es coherente con el estudio de Du *et al* [237], quienes indican que la humectabilidad de la superficie de la mayoría de los andamios fibrosos tiende a ser hidrofílico y podría contribuir a la proliferación celular.

Si bien, estos resultados se encuentran estrechamente relacionados con el ensayo de cambio de peso en el tiempo, cuando las muestras se encuentran en contacto con SBF, indicando nuevamente que la capacidad de captación e hinchazón del agua es un parámetro importante en las películas, puesto que la libre difusión del agua determina el transporte de nutrientes y la excreción de desechos metabólicos [188]. Por lo tanto, una mayor relación de absorción de agua o menor ángulo de contacto y buena humectación, se traduce en estabilidad de la película, un mejor intercambio de materiales con el entorno y una interacción óptima con células y tejidos [238].

4.2.1.5 Estudio de hinchamiento

El grado de hinchamiento es un factor crucial para determinar la utilidad de los biomateriales. La facilidad de una película para absorber agua es un aspecto muy importante al evaluar su propiedad para ingeniería de tejidos, debido a que demuestra la capacidad de retención de agua, así como su estabilidad durante el crecimiento celular [239]. Esta propiedad hace alusión al agua presente en los poros pequeños y la que está unida a las cadenas hidrófilas del polímero.

Por esta razón, al determinar dicha propiedad se realizó un leve proceso de secado, por medio de papel absorbente, con lo cual se procuró eliminar el agua presente en los poros más grandes, debido a que esta no constituye la capacidad de absorción total de la película.

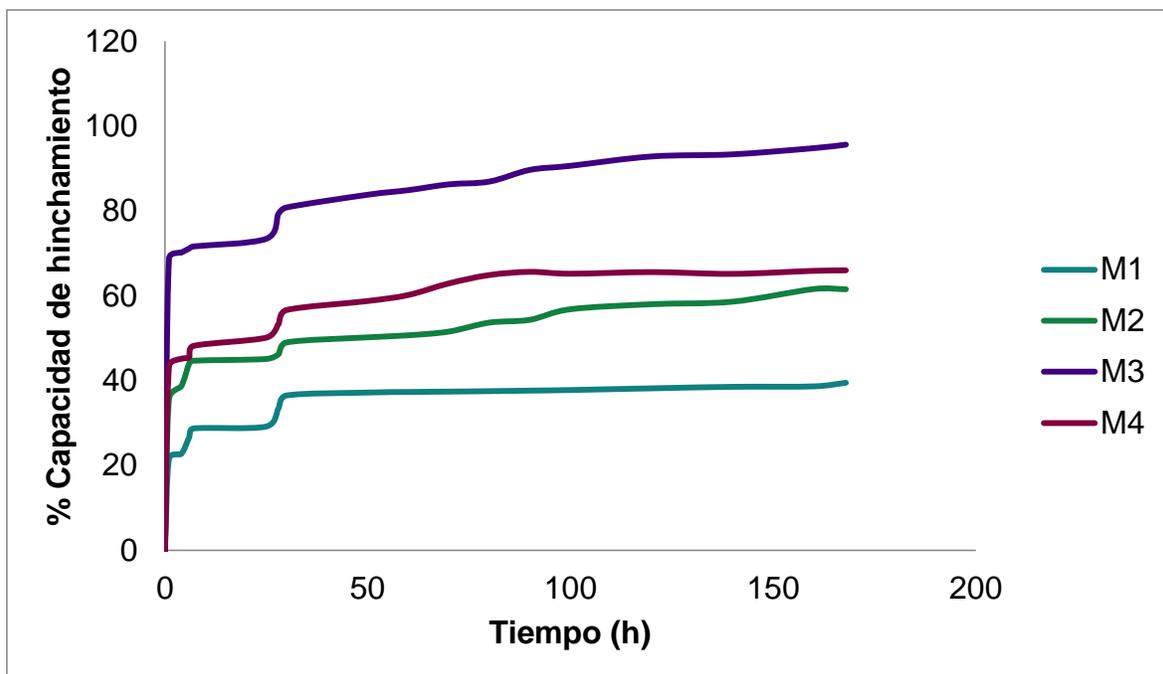


Figura 29. Capacidad de hinchamiento de las películas.

Dado que el comportamiento de hinchamiento es indicativo de reticulación, se midieron los valores de hinchamiento de las películas, lo que permitió analizar el efecto de los polímeros en las películas y las curvas de hinchamiento que se muestran en la Figura 29. En general, las películas se hinchan rápidamente en

tiempos cortos, sin embargo, esta tasa de hinchamiento disminuye en tiempos más largos teniendo a un estado de estabilidad para todas las muestras. Los resultados permiten evidenciar que el promedio para la muestra de soporte que está formada por 100% quitosano (M1), tuvo un aumento de casi 40% del peso inicial de la película, para el caso de M2 fue más de 50%, M3 llegó cerca del 100% y para la muestra M4, se presentó un aumento alrededor del 70% respecto a su valor inicial. En este punto, es importante denotar que, el quitosano posee más grupos hidrófilos libres capaces de formar enlaces de hidrogeno con las moléculas de agua del medio [240], de igual manera, el aumento del contenido de fibroína de seda en la película M4 mejora las propiedades de hinchamiento de las películas. Esta relación puede deberse a una mayor porosidad y un mayor tamaño de poro en la película, además la quitina, debido a los grupos funcionales hidroxilo que la caracterizan, podrían mejorar la hidrofiliidad de las películas fabricadas con el propósito de ser empleadas en el reemplazo de la duramadre [241] como se observa en la muestra M3, que fue la película con el grado más alto de hinchamiento. Los resultados de la captación de agua también mostraron, que las películas podrían absorber líquidos significativamente después de 24 horas, siendo este el tiempo crucial para el ensayo. Después de transcurrido este periodo, se evidencia que la tasa de hinchamiento de las todas las muestras estudiadas revelan que las películas son capaces de absorber volúmenes de líquido en tiempos más largos, manteniendo una estabilidad estructural y funcional. Por lo tanto, al obtener estas características en las películas poliméricas fabricadas como posible reemplazo dural, se espera que, en ensayos histológicos futuros, se reduzca la infección al absorber los fluidos alrededor de las heridas y mejorar la cicatrización en el proceso postoperatorio de la duraplastia [241].

Por otro lado, al darse un proceso de hinchamiento de las películas, resulta beneficioso el uso de los mismos, debido a que demuestra su poder para absorber agua y esto provoca un cambio morfológico al darse la expansión y una tensión en las cadenas poliméricas, haciendo posible que el material sea estable en tamaño y forma durante el cultivo celular [240]. Al tener valores de hinchamiento menores a

100% estas muestras están lejos de comportarse como hidrogel.

Cabe aclarar que, el comportamiento del quitosano es dependiente del pH de la solución empleada para dicha prueba y del grado de ionización del grupo amino de ese polisacárido [240].

De igual manera, es importante considerar que, la capacidad de hinchamiento se puede regular por medio de procesos de entrecruzamiento, debido a la disminución de grupos aminos libres capaces de formar enlaces de hidrogeno [241]. Vale la pena señalar que, las películas mantuvieron su integridad hasta el final de la prueba de hinchamiento y aun después de hidratadas presentaron un comportamiento flexible.

En general, una mayor extensión de la reticulación da como resultado una menor porosidad y la absorción de agua debido a la disminución de los grupos hidrófilos. Como se mencionó anteriormente, los cambios en las formas de los poros durante el procedimiento de reticulación causan la reducción de la porosidad que, como resultado, disminuye el volumen de almacenamiento y la capacidad de absorción de agua. Además, la baja tasa de hinchamiento reducirá el estrés en los tejidos cerebrales y la alta propiedad anti fugas desempeñará un papel importante en la prevención de fugas de líquido cefalorraquídeo [7].

4.2.1.6 *Actividad antimicrobiana*

Las infecciones microbianas que afecta al SNC hacen parte de una presentación clínica importante y relativamente frecuente en el cuidado de la salud. Es así como diferentes procedimientos neuroquirúrgicos comunes como craneotomías y duraplastias, se han asociado con una de las mayores tasas de infección por patógenos Gram negativos y Gram positivos, respecto a otras cirugías craneales [242],[243],[244],[103] debido principalmente a la exposición de la piel y tejido craneal, dehiscencia de la herida, presencia de fluido subdural, hinchazón o

laceraciones durales traumáticas y fugas del LCR, ocasionando procesos infecciosos que pueden conducir a una amplia gama de síndromes clínicos con posibles consecuencias devastadoras.

Por lo anterior, en esta investigación se estudió el efecto inhibitorio de las películas poliméricas fabricadas, sobre patógenos representativos asociados a las tasas de infección en el reemplazo de la duramadre. Los resultados de la actividad antimicrobiana determinada por el método de la zona de inhibición contra *E. coli* (Gram positivo) y *S. aureus* (Gram negativo) se muestra en la Figura 30 donde se proporciona una visión general del diámetro obtenido para cada muestra y en la Figura 31, se evidencia fotografías del tamaño de halo del crecimiento de la inhibición bacteriana.

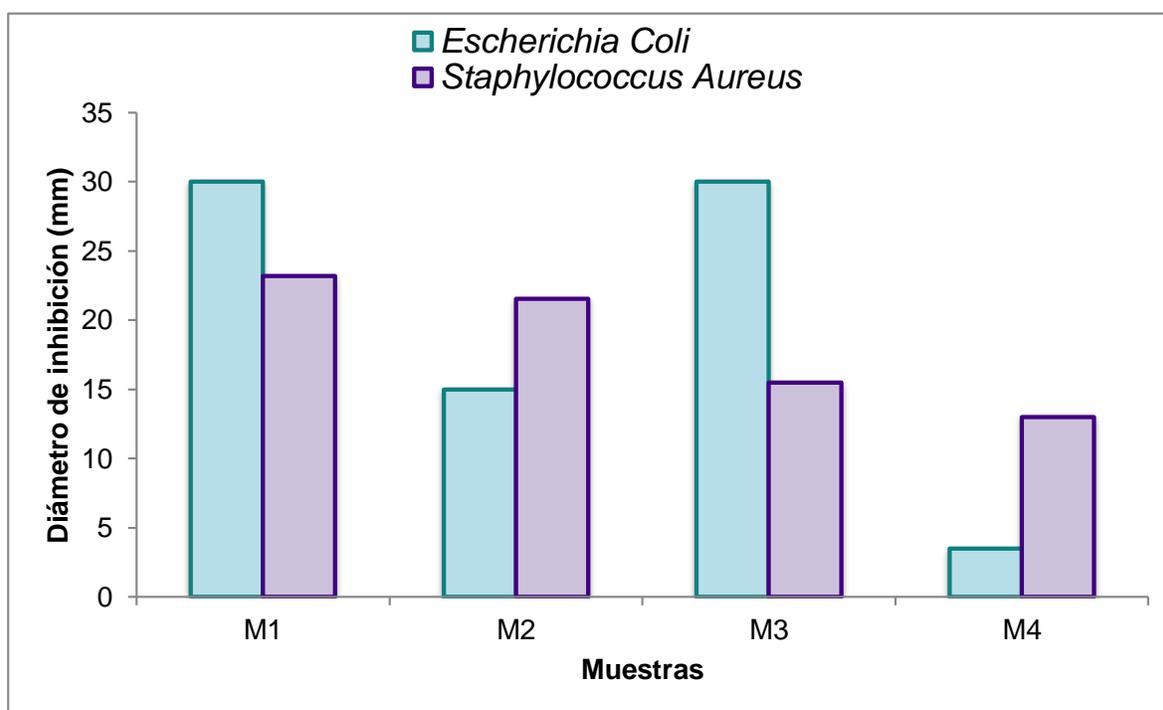


Figura 30. Histograma general de la zona de inhibición de las películas contra *E. Coli* y *S. Aureus*

Debido a las propiedades antimicrobianas intrínsecas relacionadas con la naturaleza catiónica del quitosano y sus derivados, se evidencia en las figuras anteriores una potente acción antimicrobiana frente a los patógenos estudiados para todas las muestras, a excepción de M4 con *E. coli*. Esto puede atribuirse a

diferentes mecanismos del polisacárido. Frente esto, algunos autores indican que la interacción entre el quitosano cargado positivamente y la pared celular microbiana cargada negativamente, conduce a la fuga de proteínas y otros componentes intracelulares aumentando la permeabilidad de la membrana, lo que conlleva a la lisis celular bacteriana [245],[246]. Así mismo, otras investigaciones sugieren que el mecanismo antibacteriano del quitosano se debe a la capacidad de penetración en los núcleos de los microorganismos, inhibiendo la síntesis del Ácido Ribonucleico Mensajero (ARNm) y proteínas, impidiendo que se transfiera el código genético y el crecimiento patógeno [247],[248],[249]. Fernández *et al.* [250] encontró que las moléculas de quitosano son capaces de atravesar la pared celular de las bacterias y llegar a la membrana plasmática evitando que los nutrientes ingresen, actuando como una barrera contra el oxígeno que pueden inhibir el crecimiento de bacterias aerobias y además, formar una barrera externa para quelar metales y provocar la supresión de nutrientes esenciales para el crecimiento microbiano [249].

De acuerdo a lo anterior, las muestras M1 y M3 que contienen mayor concentración de quitosano y partículas de quitina, exhiben un diámetro de inhibición mayor para *E. coli* exponiendo prominentes propiedades antibacterianas y demostrando las características mencionadas anteriormente del polisacárido. De igual manera, se denota que las películas cuando contiene fibroína (M2 y M4) inhiben en mayor diámetro el crecimiento contra patógenos Gram negativos. De acuerdo con Chen *et al.*[251], la fibroína de seda en su estado puro no poseen actividad antimicrobiana, pero al estar unida al quitosano es posible impartir la capacidad bactericida de las películas fabricadas, con el propósito de ser utilizadas como posible reemplazo de duramadre y así presentar propiedades contra la proliferación y adhesión bacteriana. A este mismo resultado llegó Chen *et al.* [251] y Wu [252] *et al*, quienes afirman que las películas desarrolladas con fibroína de seda y quitosano muestran mejor actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*, con capacidades antibacterianas de 84 y 92%, respectivamente.

Por otro lado, debido a la reducción de la tensión de oxígeno en las películas, las bacterias utilizadas al ser anaeróbicas facultativas, muestran mayores propiedades antibacterianas, por lo tanto, con el aumento del contenido de fibroína de seda en las mezclas, las propiedades microbianas están comprometidas [247]. Así mismo, se tiene evidencia de que al adicionar partículas sólidas ultra finas de derivados del quitosano (como la quitina), pueden producirse en modos distintivos la acción antibacteriana, penetrando en la pared celular de las bacterias y combinarse con el ADN e inhibir la síntesis del ARNm y la transcripción del ADN, [102] lo que hace que las partículas interactúen con la superficie celular y alteren la permeabilidad de la célula, bloqueando así el transporte de solutos esenciales de la bacteria, esto puede explicar el diámetro inhibitorio en la muestra M3 para *E. coli* mostrando una respuesta significativa en su modo de acción microbiano respecto a *S. aureus* en la misma muestra.

En general, la actividad de inhibición de las películas fabricadas con mayor concentración de quitosano es ligeramente superior contra *E. coli*, mientras que las muestras que contienen fibroína, poseen en cierto modo mayor potencial inhibitorio contra *S. aureus*, lo que concuerda con estudios anteriores [253] y además, este hecho se puede correlacionar estrechamente con las características de la superficie celular de cada uno de los patógenos, puesto que son estructuralmente complejos y químicamente heterogéneos.

Por último, de acuerdo con los parámetros establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), es posible determinar que la susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias Gram positivas y Gram negativas para las muestras M1, M2 y M3 son altamente sensibles a las concentraciones de polímeros que se utilizaron. En consecuencia con esto, cuando el valor de la zona de inhibición es inferior a 10 mm, el material se considera resistente al microorganismo correspondiente [254],[255], tal como se presenta en la muestra M4 para *E. coli*. No obstante, el experimento demostró que las películas compuestas

de quitosano, quitina y fibroína de seda tienen un amplio espectro de propiedades antimicrobianas.

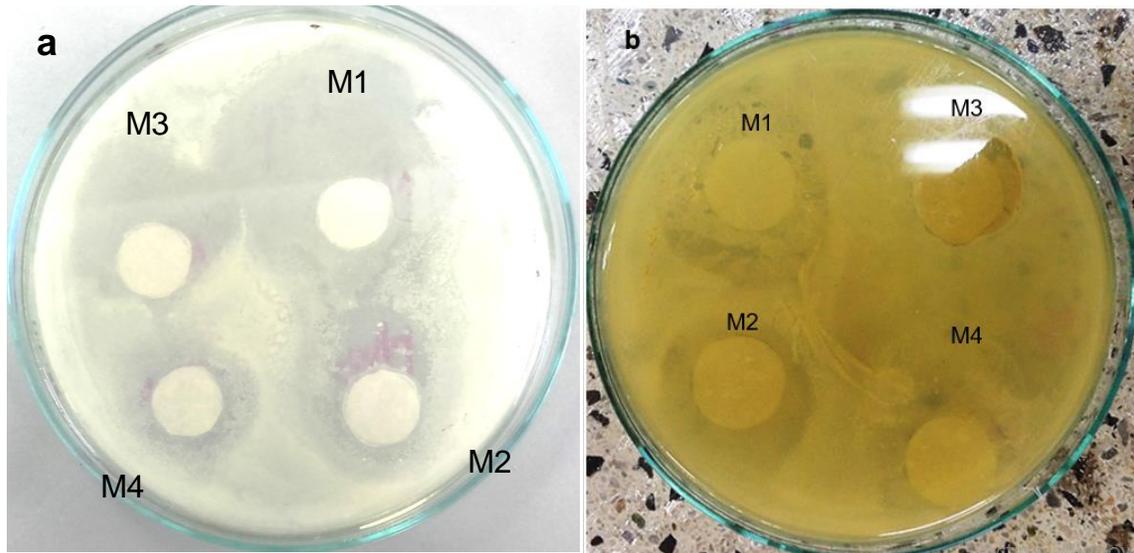


Figura 31. Zona de inhibición del crecimiento alrededor de las películas para (a) *E. coli* y (b) *S. aureus*

4.2.1.7 Citotoxicidad

El principal objetivo fue determinar el grado citotóxico del extracto con el fin de identificar que no presentara daño celular. Para ello se ha realizado el uso de un sistema *in vitro* por dos métodos basados en líneas celulares.

4.2.1.7.1 Ensayo de toxicidad AlamarBlue

Se evaluó la viabilidad celular después de la incubación con el extracto con las películas poliméricas para posible reemplazo dural, en la Figura 32 se observa el porcentaje de absorbancia donde se muestra la viabilidad en función de las muestras aplicadas sobre el modelo celular.

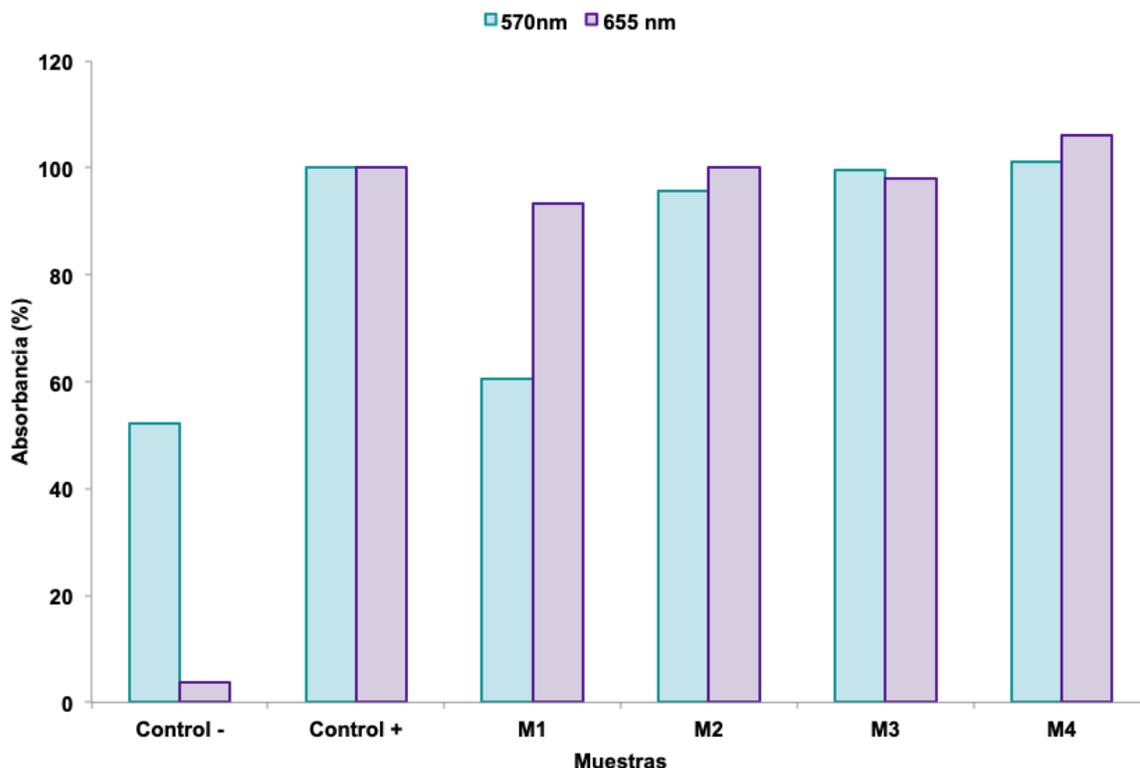


Figura 32. Porcentaje de absorbancia para las películas en diferentes longitudes de onda

En la Tabla 6 se observa el efecto tóxico o no tóxico para las películas para cada longitud de onda. Sin embargo al observar la concentración M1 hay contradicción en los resultados, mientras que las películas restantes se corrobora su viabilidad. Estos resultados no son completamente confiables debido a que el filtro de 655nm utilizado para medir la absorbancia no estaba en óptimas condiciones y la absorbancia de 570nm de longitud de onda no es recomendada por el fabricante.

Tabla 6 Estudio citotóxico de las películas M1, M2, M3 y M4

Muestras	Efecto	
	570 nm	655 nm
M1	Tóxico	Viable
M2	Viable	Viable
M3	Viable	Viable
M4	Viable	Viable

Tóxico: Se considera efecto tóxico cuando la viabilidad celular es inferior a 75%
 Viable: Se considera efecto viable cuando la viabilidad celular es superior a 75%

Sin embargo, cabe aclarar que los resultados no se pueden tomar como exactos, pero si aproximados debido a que el color del medio como se muestra en la Figura 33. *Extractos de las películas*, se mantuvo rosado por más de 24 horas y el pH estuvo en 7,4 para todas las muestras; Además al observar las células (Figura 34. *Células en contacto con el extracto de las películas 24 horas después.*), se puede determinar que a ellas les gusta el material, teniendo en cuenta esto se podría comprobar que las películas presentan una biocompatibilidad suficiente sin daños tóxicos.



Figura 33. Extractos de las películas

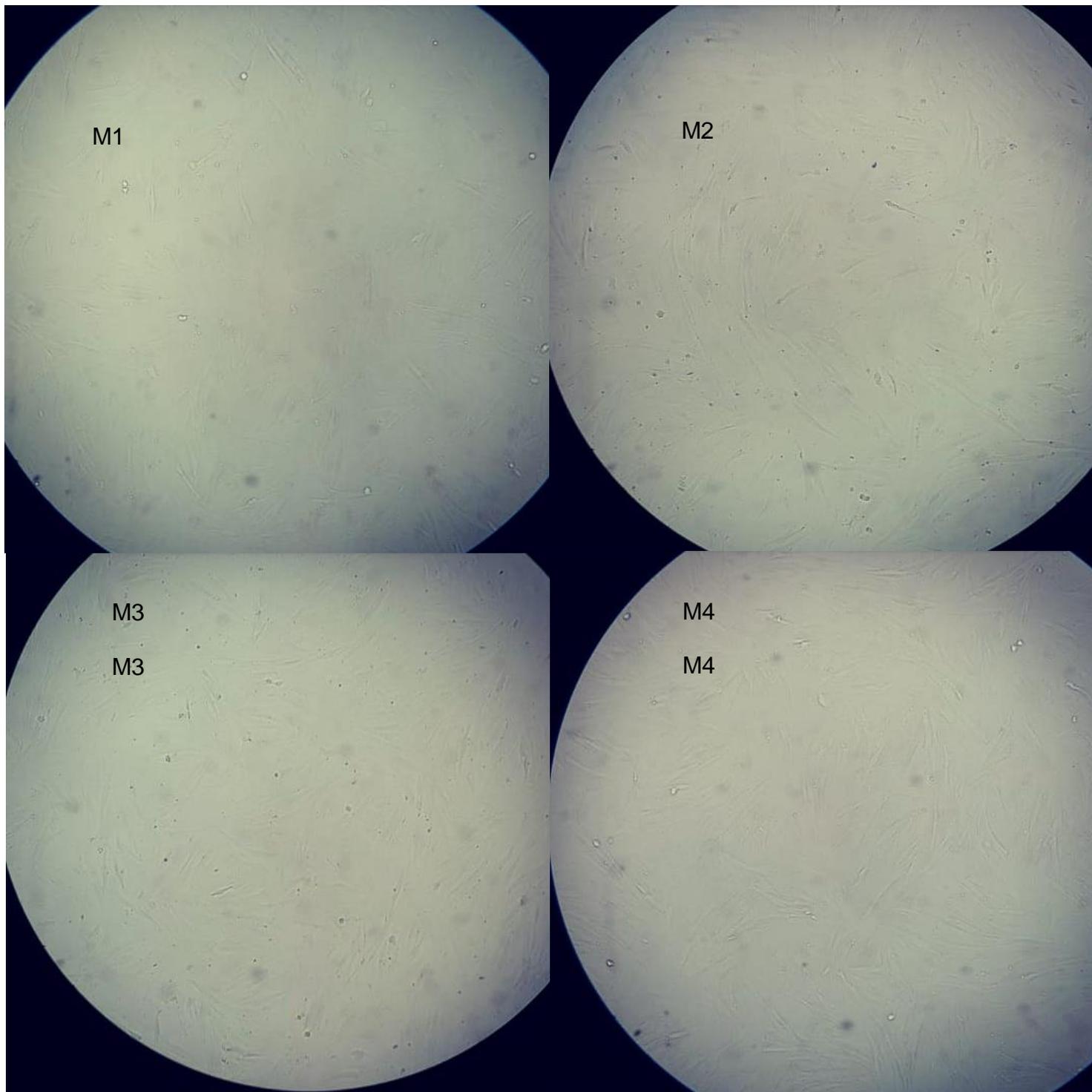


Figura 34. Células en contacto con el extracto de las películas 24 horas después.

4.3 Conclusiones

La investigación llevada a cabo en este trabajo de grado se realizó con el fin de desarrollar películas poliméricas a base de fibroína, quitina o quitosano, que pudiera ser una respuesta alternativa a los actuales implantes dúrales que son fabricados con materiales xenoinjertos o biosintéticos y tejidos autógenos que atribuyen efectos secundarios en el paciente, son costosos o difíciles de cosechar o preservar complicando de esta manera los procesos quirúrgicos y posoperatorios. Además, por medio de este estudio se buscaba, como fue planteado en el problema de investigación, conocer el potencial de las diferentes formulaciones compuestas de polisacáridos y polímeros proteínicos para aplicaciones como reemplazo de duramadre, que cumplieran con los requerimientos adecuados para su aplicación en neurocirugías. Dicho conocimiento fue adquirido por medio del estudio de las propiedades físicas, mecánicas, químicas y biológicas, obteniéndose resultados que son resumidos en las siguientes conclusiones:

- ✓ Síntesis y caracterización de los materiales usados para la fabricación de las películas

La fibroína de seda extraída a partir de los capullos del gusano *Bombyx mori*, por el procedimiento de preparación, separación, dilución y diálisis, mostró en el espectro infrarrojo las bandas de vibración de las amidas principales correspondientes a las estructuras helicoidal y láminas β características de la fibroína, sin embargo la amida III para láminas β no se observa, posiblemente porque la banda de vibración de la amida III para estructura helicoidal está muy amplia y puede estar solapada con esta. De igual manera, la caracterización por transformada de Fourier y dispersión de rayos X, permitió obtener curvas para la quitina y el quitosano con características similares reportadas en la literatura, corroborando entonces que las propiedades físicas y químicas de los materiales usados como materia prima, mostraron desde el inicio propiedades y características óptimas para su desempeño en de las películas fabricadas, donde entrarían en interacción entre ellos, con el plastificante (glicerina), el entrecruzante (glutaraldehído), las células y bacterias; cuyo excelente

desempeño fue confirmado por medio de los resultados obtenidos en el estudio de las películas poliméricas, como se sintetiza a continuación.

✓ Propiedades morfológicas

Las características morfológicas de la superficie de las películas de quitosano, fibroína de seda y quitina son diferentes. La capa superior de fibroína de seda está organizada en un patrón particular, mientras que el quitosano tiene una superficie relativamente lisa y plana y no contiene ningún síntoma de rugosidad de la superficie. Estos materiales al estar en contacto con la quinta, proporciona al quitosano rugosidad y se embebe en la fibroína de seda, generando enlaces intramoleculares. Si bien, se obtuvieron películas delgadas respecto al espesor de la duramadre natural, el valor en milímetros (mm) que se determinó es menor a los parches o sustitutos comerciales (siendo estos mayores a la duramadre nativa).

De acuerdo entonces con lo anterior, la naturaleza química y topográfica de la quitina y la fibroína para el desarrollo de las películas, posiblemente favorecerán la interacción célula-material, puesto que las uniones de estos materiales presentan una buena interconexión y una superficie hidrofílica, que ayudan a la adsorción de proteínas de unión para la subsecuente adhesión de las células a las biopelículas. Por lo tanto, es razonable concluir que una superficie rugosa es más favorable para generar una adecuada unión y crecimiento celular que una superficie lisa (proporciona por el quitosano). Si bien la rugosidad de las películas no fue el objetivo de este estudio, en las fotografías del SEM fue posible apreciar los diferentes tipos de superficie que presentaba los materiales y a mezcla de estos.

✓ Evaluación de bioactividad

La tasa de degradación de las películas fabricadas se encuentra estrechamente relacionada con la cantidad de quitosano y de quitina. Se evidenció que a mayores porcentajes de polisacárido y mayor tiempo de inmersión en SBF existe una mayor tendencia a la degradación o pérdida de material que inicia en los bordes, pero que

indirectamente provoca aumento de peso debido a la capacidad de absorber agua que caracteriza la estructura molecular del quitosano. Por lo tanto, la adición de fibroína de seda podría prolongar la biodegradabilidad de las películas y de esta manera, se pueda utilizar para ingeniería de tejidos cerebral. Así, estos resultados muestran que la degradación de las películas puede modificarse cambiando la concentración de quitosano o mediante la adición de fibroína de seda.

El plastificante también juega un papel importante en el aumento de peso y la degradación controlada de las películas, puesto que promueve la movilidad de las cadenas, facilitando la difusión de las moléculas de oxígeno e hidrogeno a través de la película aumentando la capacidad de hinchamiento, efecto potencial cuando se requiere reparar un defecto dural, ocasionando la migración y proliferación de las células madre al exterior y reduciendo las señales hacia el interior del área del defecto.

Por otro lado, este estudio ha demostrado que no hubo formación de subproducto ácido, manteniendo constantemente un comportamiento básico, aún después de 28 días de inmersión en SBF, evento favorable cuando se conoce por diversos estudios que el pH del LCR humano se encuentra alrededor de 7,36.

Respecto a la capacidad de humectabilidad de las películas, el ensayo de mojabilidad permite concluir que de acuerdo a la cantidad de quitosano, existe una mayor relación de absorción de agua o menor ángulo de contacto y buena humectación, lo que traduce en estabilidad de la película, un mejor intercambio de materiales con el entorno y una interacción óptima con células y tejidos en futuros ensayos *in vivo*. Uno de los hallazgos más importantes encontrados en este estudio es que la unión de dos materiales hidrófobos (quitina y fibroína de seda) y uno hidrofílico (quitosano), se obtiene como resultado un ángulo de contacto menor a 90°, echo que sorprende al presentar el formulado de la película con una muy buena mojabilidad y dispersión del líquido en la superficie, lo que garantizará una

respuesta biológica adecuada, como la interacción de las células y los tejidos en el reemplazo dural.

Los resultados de esta investigación demuestran que el grado de hinchamiento concuerdan con los datos arrojados en el análisis de degradación y ángulo de contacto, puesto que nuevamente se corrobora la capacidad de las películas fabricadas para captar agua, siendo esta una característica importante para la aplicación potencial de reemplazo dural, ya que la libre difusión del agua determina el transporte de nutrientes y la excreción de desechos metabólicos. Por lo tanto, una mayor relación de absorción de agua significa un mejor intercambio de materiales con el entorno.

La relación de hinchamiento refleja la hidrofilia y la estabilidad de la película, que es importante para la adhesión y demás actividades celulares. La fibroína de seda presenta una naturaleza hidrofóbica relativa, resultante de su lamita β , mientras que quitosano posee una alta capacidad de absorción de agua. Por lo tanto, la relación de hinchamiento aumentó con la adición de contenido del polisacárido en la solución de mezcla. En estas consideraciones, la relación de absorción de agua y la relación de hinchamiento de las películas podrían ajustarse mediante los parámetros técnicos de preparación y las respectivas concentraciones de los polímeros.

✓ Propiedades mecánicas

En la literatura, hay poca descripción de las propiedades mecánicas de prueba de la duramadre, dependiendo del sitio de muestreo, que podría ser extremadamente útil desde el punto de vista clínico. No obstante, teniendo en cuenta los escasos y antiguos datos reportados por algunos autores, el ensayo de resistencia a la tracción permite concluir que:

Las propiedades mecánicas obtenidas para todas las películas no poseen propiedades viscoelásticas como la duramadre y el aumento del esfuerzo máximo y el módulo de Young está estrechamente relacionado con la adición de la quitina. Sin embargo el bajo rendimiento mecánico se atribuye al método de fabricación utilizado, podría deberse a la disminución de la homogeneidad de las mezclas después de la evaporación del solvente.

✓ Actividad antimicrobiana

Es razonable concluir que, respecto a la capacidad antimicrobiana de las películas fabricadas, que a mayor concentración de quitosano existe un halo de inhibición ligeramente superior contra *E. Coli*, mientras que las muestras que se componen de fibroína de seda, poseen en cierto modo mayor potencial inhibitorio contra *S. aureus*. Este fenómeno se puede relacionar con las características de la superficie celular de cada uno de los patógenos, puesto que son estructuralmente complejos y químicamente heterogéneos. Si bien, este experimento permitió demostrar que las películas compuestas tienen un amplio espectro de propiedades antimicrobianas y que, además, proporcionó información valiosa para trabajos futuros y estrategias de mejorar y potencializar la respuesta antimicrobiana de la fibroína de seda cuando se encuentra unida a otros biomateriales.

✓ Citocompatibilidad

El ensayo de AlamarBlue y células de fibroblastos indicaron que estos podían adherirse y proliferar bien en todas las muestras menos en M1. Las películas poliméricas denominadas como M2, M3, y M4 tuvieron un comportamiento favorable hacia los fibroblastos, presentando su viabilidad celular mayor al 75%, por lo que se consideró que los sustitutos no fueron tóxicos con las células, lo cual fue corroborado mediante el SEM, donde se observaron las células en toda la superficie del material.

Los resultados anteriores concluyen que la composición química de la cual están fabricadas las películas poliméricas, no representa una amenaza tóxica contra los fibroblastos humanos, lo cual confirma el entrecruzamiento del glutaraldehído con la quitina, la fibroína y el quitosano, y que además no hubo trazas del entrecruzante en las películas que pudiera causar una muerte celular significativa.

Finalmente y como conclusión, se proporciona un breve resumen en la Tabla 7 donde se expone una visión general de las propiedades de las películas poliméricas aquí desarrolladas y el valor de cada una de ellas según las formulaciones estudiadas, teniendo en las características idóneas que debe poseer la duramadre natural, para así definir, cuál o cuáles de las muestras proporciona las mejores características para ser aplicaciones en remplazo de la integridad dural.

Tabla 7. Comparación de las propiedades de las películas poliméricas M1, M2, M3 y M4

Propiedad	Películas				Resultados esperados	
	M1	M2	M3	M4		
Espesor	0.05mm	0.05mm	0.06mm	0.06mm	1-0.32mm	
Morfología	-	++	+	+++	Mayor cohesividad	
Degradación	+	+++	-	++	Degradación lenta (día14)	
Variación de pH	++	+	+++	++	pH 7.36 (día)	
Ángulo de contacto	+++	++	-	++	=<90°	
Hinchamiento	+	+	+++	++	=<150%	
Propiedades mecánicas	% Deformación	+	-	-	Viscoelástico	
	Esfuerzo máximo	+++	-	+	8.80MPa	
Actividad antimicrobiana	<i>E. coli</i>	+++	+	+++	-	Inhíbe
	<i>S. aureus</i>	+++	+++	++	++	Inhíbe
Citocompatibilidad	-	+	++	+++	Viable >70%	

+++ Cumple nivel alto ++ Cumple nivel medio + Cumple nivel bajo – No cumple

De acuerdo a lo anterior, es posible determinar que la formulación de la película que más se acerca a cumplir con todas las propiedades evaluadas en esta tesis respecto a la duramadre humana es la muestra M4, correspondiente a la formulación que contiene 50% de quitosano, 50 de fibroína de seda, 20 de quitina respecto al

qitosano, 5% de entrecruzante (glutaraldehído) y 25% de plastificante (glicerina) respecto al qitosano, a pesar de presentar una baja capacidad antimicrobiana para cepas Gram positivas como E. coli y un porcentaje de deformación bajo, pero que sobre sale cuando se compara con los resultados obtenidos para M1, M2, y M3. Si bien, estas dos propiedades podrían potencializarse con el control del tiempo de agitación, el método de fabricación y la concentración de la quitina.

Por tanto, este hallazgo corrobora la hipótesis planteada en esta investigación, basado en el diseño presentado y los resultados experimentales concluyéndose finalmente, que la película M4 desarrollada en este trabajo de investigación, presenta propiedades que le confieren al material un alto potencial como un sistema de reparación dural que mejoraría las limitaciones y las complicaciones postoperatorias inducidas de los materiales y técnicas actuales de cierre dural.

RECOMENDACIONES FINALES

Debido al bajo porcentaje de deformación obtenido para todas las concentraciones estudiadas de las películas, sería interesante investigar la relación que existe entre el tiempo de agitación y el plastificante, de esta manera es posible que se presente una mejor interconexión molecular con los materiales y se pueda lograr obtener propiedades mecánicas cercanas a la duramadre natural. Así mismo, se recomienda evaluar el método de fabricación de las películas, puesto que este impide tener control total sobre la temperatura de secado, el moldeamiento en las placas, el desprendimiento de las películas y el corte, lo que posiblemente hace que se generen micro fisuras internas en los enlaces previamente entrecruzados y plastificados que conforman las biopelículas y no se obtenga la resistencia a la tracción requerida.

Para una mayor comprensión de los efectos antimicrobianos, se hace preciso evaluar la capacidad de la fibroína de seda para inhibir el crecimiento de patógenos y potencializar su acción, de esta manera, es posible mejorar la actividad ante bacterias Gram negativas, virus e infecciones latentes.

Los datos de citotoxicidad reflejan la clara necesidad de corroborar los resultados para obtener mayor certeza y confiabilidad, puesto que la evaluación biológica *in vitro* de las películas fabricadas es indispensable para determinar la interacción celular y por ende, su posible comportamiento en el cuerpo humano para futuros ensayos histológicos.

Por último, los datos presentados en la Tabla 7 proporcionan la idea futura de realizar una película bicapa con una sección porosa y otra lisa, con la unión o la combinación de las muestras M1, M2, M3 y M4, lo que permitiría que se complementen y se mejoren notablemente las características estudiadas. Al ser el quitosano un biopolímero versátil, permite la elaboración de película bicapa; la porción porosa es importante porque en la ingeniería de tejidos, las estructuras de

poros interconectados permiten el paso de los factores de crecimiento, la migración celular y la neovascularización; Sin embargo, estas estructuras no son muy resistentes al estrés, por lo que se rompen fácilmente. Por otro lado, la parte no porosa proporcionará una mayor resistencia al esfuerzo. Además, al tener al unir dos formulaciones se podría aumentar el grosor de las películas y aumentar sus cualidades hidrófilas, lo que podría proporcionar la ventaja adicional de tener un menor riesgo de compresión o efecto de masa en el tejido nervioso subyacente cuando se utiliza como sustituto de la duramadre. Por último, se verían aumentadas las propiedades antimicrobianas, puesto que cualquier combinación que se realice, estaría compuesta por mayor cantidad de quitosano que expone gran potencial bacteriológico

PERSPECTIVAS FUTURAS

Los autores de este trabajo esperan que durante los próximos 5 a 10 años, se desarrollen impulsos continuos en el desarrollo de sustitutos duros a base de materiales naturales, con un énfasis en la incorporación de componentes de diseño biomimético. Otros avances en nanotecnología, ciencia de materiales e ingeniería de tejidos ayudarán a promover el avance de este campo, y el resultado futuro puede ser injertos duraderos que sean más seguros, más efectivos y más asequibles financieramente que cualquier dispositivo disponible en la actualidad.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Septimus y J. D. Grossman, *Anatomía de los animales domésticos*. 200d. C.
- [2] D. E. Sakas, K. Charnvises, L. F. Borges, y N. T. Zervas, “Biologically inert synthetic dural substitutes. Appraisal of a medical-grade aliphatic polyurethane and a polysiloxane-carbonate block copolymer.”, *J. Neurosurg.*, vol. 73, núm. 6, pp. 936–41, 1990.
- [3] W. M. Coplin et al., “Safety and feasibility of craniectomy with duraplasty as the initial surgical intervention for severe traumatic brain injury”, *J. Trauma Acute Care Surg.*, vol. 50, núm. 6, pp. 1050–1059, 2001.
- [4] F. De Farmacia, B. Esther, y M. Noriego, “Procesos De Plasticidad Cerebral En Pacientes Con Daño Adquirido”, pp. 1–40, 2016.
- [5] M. C. Cardona Urrea, “Accidentes, causa de las alarmantes cifras de traumas craneoencefálicos en Colombia”, *El país*, 2017. .
- [6] K. R. von Wild, “Examination of the safety and efficacy of an absorbable dura mater substitute (Dura Patch) in normal applications in neurosurgery.”, *Surg. Neurol.*, vol. 52, núm. 4, p. 418–24; discussion 425, oct. 1999.
- [7] Q. Li et al., “A novel fish collagen scaffold as dural substitute”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 80, pp. 346–351, 2017.
- [8] J. H. Sandoval-Sánchez et al., “A new bilayer chitosan scaffolding as a dural substitute: experimental evaluation.”, *World Neurosurg.*, vol. 77, núm. 3–4, pp. 577–82.
- [9] T. A. Barbolt, M. Odin, M. Léger, L. Kangas, J. Hoiste, y S. H. Liu, “Biocompatibility evaluation of dura mater substitutes in an animal model.”, *Neurol. Res.*, vol. 23, núm. 8, pp. 813–20, dic. 2001.
- [10] A. Vakis, D. Koutentakis, D. Karabetsos, y G. Kalostos, “Use of polytetrafluoroethylene dural substitute as adhesion preventive material during craniectomies.”, *Clin. Neurol. Neurosurg.*, vol. 108, núm. 8, pp. 798–802, dic. 2006.

- [11] Y. Yin, D. Rassias, y A. Jain, “Polymeric Biomaterials for Medical Diagnostics in the Central Nervous System”, en *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, Elsevier, 2014, pp. 373–386.
- [12] A. Laun, J. C. Tonn, y C. Jerusalem, “Comparative study of lyophilized human dura mater and lyophilized bovine pericardium as dural substitutes in neurosurgery”, *Acta Neurochir. (Wien)*., vol. 107, núm. 1–2, pp. 16–21, 1990.
- [13] K. Yamada et al., “Clinical application of a new bioabsorbable artificial dura mater.”, *Acta Neurochir. (Wien)*., vol. 107, núm. 1–2, pp. 16–21, 2002.
- [14] K. Hida et al., “Nonsuture dural repair using polyglycolic acid mesh and fibrin glue: Clinical application to spinal surgery”, *Surg. Neurol.*, vol. 65, núm. 2, pp. 136–143, 2006.
- [15] R. De, K. Barbosa, R. Pereira, D. Tanajura, y A. Melo, “Reparación de la duramadre con poliesteruretano”, vol. 44, núm. 1, 2005.
- [16] T. D. McCall, D. W. Fults, y R. H. Schmidt, “Use of resorbable collagen dural substitutes in the presence of cranial and spinal infections-report of 3 cases”, *Surg. Neurol.*, vol. 70, núm. 1, pp. 92–96, 2008.
- [17] Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos - INVIMA, Sala especializada de medicamento sy productos biológicos. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social, 214d. C.
- [18] Colombia, “Resolución No 2015002552”, *Inst. Nac. Medicam. y Aliment.*, 2015.
- [19] Medirex, “Injertos de duramadre”, 2017. .
- [20] Nefromédicas, “Adhesivo Quirúrgico Biológico BioGlue”. .
- [21] Tissuemed, “TissuePatchDural”, 2018. .
- [22] DePuSynthes, “DURAFORM, Dural Graft Implant”, 2018. .
- [23] HEMISUR, “Parche Pericardio Bovino para Reparación Dural Dura-Guard.” .
- [24] F. Esposito, G. Grimod, L. M. Cavallo, L. Lanterna, F. Biroli, y P. Cappabianca, “Collagen-only biomatrix as dural substitute: What happened after a 5-year observational follow-up study”, *Clin. Neurol. Neurosurg.*, vol. 115, núm. 9, pp. 1735–1737, 2013.
- [25] R. You et al., “Regenerated egg white/silk fibroin composite films for

- biomedical applications”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 79, pp. 430–435, 2017.
- [26] K. KOJIMA et al., “Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing”, *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 66, núm. 12, pp. 1595–1598, 2004.
- [27] A. K. Azad, N. Sermsintham, S. Chandkrachang, y W. F. Stevens, “Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application”, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 69, núm. 2, pp. 216–222, 2004.
- [28] T. Kiyozumi et al., “Medium (DMEM/F12)-containing chitosan hydrogel as adhesive and dressing in autologous skin grafts and accelerator in the healing process.”, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 79, núm. 1, pp. 129–36, oct. 2006.
- [29] A. Anitha et al., “Chitin and chitosan in selected biomedical applications”, *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, núm. 9, pp. 1644–1667, 2014.
- [30] K. S. Chow y E. Khor, “Novel fabrication of open-pore chitin matrixes”, *Biomacromolecules*, vol. 1, núm. 1, pp. 61–67, 2000.
- [31] D.-W. Li et al., “From 2D to 3D: The morphology, proliferation and differentiation of MC3T3-E1 on silk fibroin/chitosan matrices”, *Carbohydr. Polym.*, vol. 178, pp. 69–77, 2017.
- [32] K. E. Park, S. Y. Jung, S. J. Lee, B.-M. Min, y W. H. Park, “Biomimetic nanofibrous scaffolds: preparation and characterization of chitin/silk fibroin blend nanofibers”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 38, núm. 3–5, pp. 165–173, 2006.
- [33] H. Laboratorio, P. L. Arce, A. A. Almagi, C. Anatom, y H. II, “PRINCIPIOS DE NEUROANATOMÍA Unidad 1 : Conceptos Básicos de Neuroanatomía”, pp. 1–45, 2012.
- [34] *Histología de Husmle.* .
- [35] E. Osuna Suárez, L. E. Caro Henao, y G. Patiño Fernández, “Neuroanatomía. Fundamentos de neuroanatomía, estructural, funcional y clínica.”, pp. 1–215, 2016.
- [36] F. H. Martini, “Anatomía Humana. 6ª. Edición. 2009. Editorial Pearson”, ISBN 978-847-829-099-4.

- [37] E.-R. Osuna Alfredo, “Dr. Edgar Osuna S. - Dr. Alfredo Rubiano C. 1”, *Guía Neuroanat. Estructural Y Func.*, p. 23.
- [38] D. E. Haines, *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access*. Elsevier Health Sciences, 2012.
- [39] D. E. Haines, H. L. Harkey, y O. Al-Mefty, “The ‘subdural’ space: a new look at an outdated concept”, *Neurosurgery*, vol. 32, núm. 1, pp. 111–120, 1993.
- [40] S. S. Shetye, M. M. Deault, y C. M. Puttlitz, “Biaxial response of ovine spinal cord dura mater”, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 34, pp. 146–153, 2014.
- [41] D. De Kegel, J. Vastmans, H. Fehervary, B. Depreitere, J. Vander Sloten, y N. Famaey, “Biomechanical characterization of human dura mater”, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 79, núm. December 2017, pp. 122–134, 2018.
- [42] A. K. Ommaya, “Mechanical properties of tissues of the nervous system”, *J. Biomech.*, vol. 1, núm. 2, pp. 127–138, jul. 1968.
- [43] V. A. Zerris, K. S. James, J. B. Roberts, E. Bell, y C. B. Heilman, “Repair of the dura mater with processed collagen devices.”, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 83, núm. 2, pp. 580–8, nov. 2007.
- [44] A. Turchan et al., “Duraplasty using amniotic membrane versus temporal muscle fascia: A clinical comparative study”, *J. Clin. Neurosci.*, 2018.
- [45] J. E. García Reyes, “Factores asociados a complicación de craneoplastía en pacientes post operados de craniectomía descompresiva en el departamento de neurocirugía del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen en el periodo 2003-2013”, 2014.
- [46] D. J. Cooper et al., “Decompressive Craniectomy in Diffuse Traumatic Brain Injury”, *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, núm. 16, pp. 1493–1502, abr. 2011.
- [47] B. P. Walcott et al., “Predictors of cranioplasty complications in stroke and trauma patients”, *J. Neurosurg.*, vol. 118, núm. 4, pp. 757–762, abr. 2013.
- [48] N. Krebs, S. Seidman, y K. Davis, *Tissue Engineering*. 2002.
- [49] L. E. Niklason y R. Langer, “Prospects for organ and tissue replacement”, *Jama*, vol. 285, núm. 5, pp. 573–576, 2001.
- [50] J. L. ORIVE, G., HERNÁNDEZ, R. M., R GARCÓN, A., Igartúa, M., & Pedríguez,

- “Ingeniería tisular: retos y realidades”, 2003.
- [51] C. M. Murphy, F. J. O'Brien, D. G. Little, y A. Schindeler, “Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad”, *Eur. Cells Mater.*, vol. 26, pp. 120–132, 2013.
- [52] M. Kim y D. Evans, “Tissue Engineering: The Future of Stem Cells”, *Top. Tissue Eng.*, vol. 2, pp. 1–22, 2005.
- [53] P. D. Dalton, A. R. Harvey, M. Oudega, y G. W. Plant, “Tissue engineering of the nervous system”, en *Tissue Engineering (Second Edition)*, Elsevier, 2015, pp. 583–625.
- [54] J. J. González-Murillo, “Ingeniería de Tejidos aplicada a la Regeneración Neuronal y Nerviosa”, núm. July, p. 16, 2014.
- [55] R. Bellamkonda y P. Aebischer, “Tissue engineering in the nervous system”, *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 43, pp. 543–554, 1994.
- [56] K. S. Straley, C. W. P. Foo, y S. C. Heilshorn, “Biomaterial design strategies for the treatment of spinal cord injuries”, *J. Neurotrauma*, vol. 27, núm. 1, pp. 1–19, 2010.
- [57] J. O. Hollinger, *An introduction to biomaterials*, 2nd Editio. Boca Ratón, 2012.
- [58] D. Banoriya, R. Purohit, y R. K. Dwivedi, “Advanced Application of Polymer based Biomaterials”, *Mater. Today Proc.*, vol. 4, núm. 2, pp. 3534–3541, 2017.
- [59] C. Bergmann y A. Stumpf, *Dental Ceramics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [60] J. Goode, “Use of International Standard ISO 10993-1, Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process”, *Dep. Heal. Hum. Serv. Food Drug Adm.*, p. 68, 2016.
- [61] M. Andrés Osorio-Delgado et al., “Biomedical applications of polymeric biomaterials”, *Dyna*, vol. 84, núm. 201, pp. 241–252, 2017.
- [62] A. Aravamudhan, D. M. Ramos, A. A. Nada, y S. G. Kumbar, *Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications*. Elsevier Inc., 2014.
- [63] T. J. Keane y S. F. Badylak, “Biomaterials for tissue engineering applications”, *Semin. Pediatr. Surg.*, vol. 23, núm. 3, pp. 112–118, 2014.

- [64] M. Andrés Osorio-Delgado et al., “Biomedical applications of polymeric biomaterials @BULLET”, *Dyna*, vol. 84, núm. 201, pp. 241–252, 2017.
- [65] L. S. Nair y C. T. Laurencin, “Biodegradable polymers as biomaterials”, *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, núm. 8–9, pp. 762–798, 2007.
- [66] X. Tang et al., *Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Elsevier Inc., 2014.
- [67] F. Khan y S. R. Ahmad, “Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application”, *Macromol. Biosci.*, vol. 13, núm. 4, pp. 395–421, 2013.
- [68] K. Yamada et al., “Development of a dural substitute from synthetic bioabsorbable polymers.”, *J. Neurosurg.*, vol. 86, núm. 6, pp. 1012–7, jun. 1997.
- [69] D. W. Hutmacher, “Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage”, en *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*, Elsevier, 2006, pp. 175–189.
- [70] J. Cuartero, “Materiales Compuestos”, núm. January 2002, 2003.
- [71] J. Park y R. S. Lakes, *Biomaterials: an introduction*. Springer Science & Business Media, 2007.
- [72] R. A. Pérez, J. E. Won, J. C. Knowles, y H. W. Kim, “Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, núm. 4, pp. 471–496, 2013.
- [73] L. D. Koh, J. Yeo, Y. Y. Lee, Q. Ong, M. Han, y B. C. K. Tee, “Advancing the frontiers of silk fibroin protein-based materials for futuristic electronics and clinical wound-healing (Invited review)”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 86, núm. January, pp. 151–172, 2018.
- [74] L. Caballero Mendez, J. Rivera Cano, D. Gaviria Arias, y D. G. Arias, “Evaluación de la Fibroína de Seda como Biomaterial de Soporte para el Crecimiento de Células Mesenquimales Estromales de Pulpa Dental”, *ARS MEDICA Rev. Ciencias Médicas*, vol. 41, núm. 1, p. 5, 2016.
- [75] Biblioteca Virtual Senior, “Historia de la seda”. .
- [76] N. Patiño Ospina, “EXTRACCION Y CARACTERIZACION DEL EXTRACTO PROTEICO DEL SUBPRODUCTO BISU DEL PROCESO DE OBTENCION

- DE SEDA”, Universidad Tecnológica de Pereira, 2008.
- [77] Y. Wang, H. J. Kim, G. Vunjak-Novakovic, y D. L. Kaplan, “Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials”, *Biomaterials*, vol. 27, núm. 36, pp. 6064–6082, 2006.
- [78] V. Kearns y A. MacIntosh, “Silk-based biomaterials for tissue engineering”, *Top. tissue Eng.*, vol. 4, núm. 114, pp. 1–19, 2008.
- [79] S. S. M. B. M. G. G. D. L. Kaplan, “Functionalized silk-based biomaterials for bone formation”, *J. Biomed. Mater.*, 2000.
- [80] D. Ma, Y. Wang, y W. Dai, “Silk fibroin-based biomaterials for musculoskeletal tissue engineering.”, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 89, pp. 456–469, ago. 2018.
- [81] C. L. Velásquez, “Quitina y quitosano : materiales del pasado para el presente y el futuro”, *Av. en Química*, vol. 1, núm. 2, pp. 15–21, 2006.
- [82] R. A. A. Muzzarelli y C. Muzzarelli, “Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences”, en *Polysaccharides I*, Springer, 2005, pp. 151–209.
- [83] T. Chandy y C. P. Sharma, “Chitosan-as a biomaterial”, *Biomater. Artif. cells Artif. organs*, vol. 18, núm. 1, pp. 1–24, 1990.
- [84] K. V. Harish Prashanth y R. N. Tharanathan, “Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview”, *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 18, núm. 3, pp. 117–131, 2007.
- [85] J. L. Cconislla Bello, “DESARROLLO DE MICROPARTICULAS DE QUITOSANO ENTRECruzADO Y CUATERNIZADO PARA LA ADSORCIÓN DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)”, Universidad Nacional de Ingeniería, 2017.
- [86] A. NAMESNY VALLESPiR, “Quitina y quitosano como subproductos de la pesca”, *Recubrimientos comestibles*, 2001. .
- [87] P. Martinez, “Generalidades de Quitina y Quitosano .pdf”. pp. 4–34, 2009.
- [88] K. Kurita, “Chemistry and application of chitin and chitosan”, *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 59, núm. 1–3, pp. 117–120, 1998.
- [89] L. Bedian, A. M. Villalba-Rodríguez, G. Hernández-Vargas, R. Parra-Saldivar, y H. M. N. Iqbal, “Bio-based materials with novel characteristics for tissue

- engineering applications—A review”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 98, pp. 837–846, 2017.
- [90] N. Singh et al., “Chitin and carbon nanotube composites as biocompatible scaffolds for neuron growth”, *Nanoscale*, vol. 8, núm. 15, pp. 8288–8299, 2016.
- [91] J. Beltrán-Patiño, “Extracción y caracterización de quitosano del camarón titi y su aplicación en la liberación controlada de un fármaco”, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, núm. 9, pp. 1689–1699, 2013.
- [92] R. P. Babu, K. O’connor, y R. Seeram, “Current progress on bio-based polymers and their future trends”, *Prog. Biomater.*, vol. 2, núm. 1, p. 8, 2013.
- [93] G. Crini, “Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment”, *Prog. Polym. Sci.*, vol. 30, núm. 1, pp. 38–70, 2005.
- [94] M. Sugimoto, M. Morimoto, H. Sashiwa, H. Saimoto, y Y. Shigemasa, “Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives”, *Carbohydr. Polym.*, vol. 36, núm. 1, pp. 49–59, 1998.
- [95] A. T. Rodríguez-Pedroso, M. A. Ramírez-Arrebato, ; D Rivero-González, E. Bosquez-Molina, L. L. Barrera-Necha, y ; S Bautista-Baños, “Propiedades Químico-Estructurales Y Actividad Biológica De La Quitosana En Microorganismos Fitopatógenos”, *Rev. Chapingo Ser. Hortic.*, vol. 15, núm. 3, pp. 307–317, 2009.
- [96] M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D. A. Saldaña-Koppel, y L. F. Quiñones-Olvera, “Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine”, *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [97] W. W. Thein-Han y R. D. K. Misra, “Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering”, *Acta Biomater.*, vol. 5, núm. 4, pp. 1182–1197, 2009.
- [98] A. Di Martino, M. Sittinger, y M. V Risbud, “Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering.”, *Biomaterials*, vol. 26, núm. 30, pp. 5983–90, oct. 2005.

- [99] N. Shanmugasundaram, P. Ravichandran, P. N. Reddy, N. Ramamurty, S. Pal, y K. P. Rao, "Collagen–chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells", *Biomaterials*, vol. 22, núm. 14, pp. 1943–1951, 2001.
- [100] J. Giraldo, "Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano", *Univ. Concepc.*, núm. MAY, 2015.
- [101] C. K. S. Pillai, W. Paul, y C. P. Sharma, "Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation", *Prog. Polym. Sci.*, vol. 34, núm. 7, pp. 641–678, 2009.
- [102] M. Kong, X. G. Chen, K. Xing, y H. J. Park, "Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review", *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 144, núm. 1, pp. 51–63, 2010.
- [103] D. Azzam et al., "Dural Repair in Cranial Surgery Is Associated with Moderate Rates of Complications with Both Autologous and Nonautologous Dural Substitutes.", *World Neurosurg.*, vol. 113, pp. 244–248, may 2018.
- [104] P. D. Costantino et al., "Human dural replacement with acellular dermis_ Clinical results and a review of the literature - Costantino - 2000 - Head & Neck - Wiley Online Library.pdf", núm. December, pp. 765–771, 2000.
- [105] H. H. A. BEACH, "Compound Comminuted Fracture of the Skull; Epilepsy for Five Years, Operation, Recovery", *Bost. Med. Surg. J.*, vol. 122, núm. 14, pp. 313–315, abr. 1890.
- [106] R. Abbe, "Rubber tissue for meningeal adhesions", *Trans Amer Surg Ass*, vol. 13, pp. 490–491, 1895.
- [107] J. T. Keller, S. B. Dunsker, J. M. McWhorter, C. M. Ongkiko, M. C. Saunders, y F. H. Mayfield, "The fate of autogenous grafts to the spinal dura: an experimental study", *J. Neurosurg.*, vol. 49, núm. 3, pp. 412–418, 1978.
- [108] J. T. Keller, C. M. Ongkiko Jr, M. C. Saunders, F. H. Mayfield, y S. B. Dunsker, "Repair of spinal dural defects: An experimental study", *J. Neurosurg.*, vol. 60, núm. 5, pp. 1022–1028, 1984.
- [109] L. Freeman, "III. The Use of Egg-Membrane in Trephining Operations upon the Skull", *Ann. Surg.*, vol. 28, núm. 4, p. 455, 1898.

- [110] L. Davis y L. J. Aries, "An experimental study upon the prevention of adhesions about repaired nerves and tendons", *Surgery*, vol. 2, núm. 6, pp. 877–888, 1937.
- [111] L. R. Mello, L. T. Feltrin, P. T. Fontes Neto, y F. A. P. Ferraz, "Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study", *J. Neurosurg.*, vol. 86, núm. 1, pp. 143–150, 1997.
- [112] W. V. Cone, R. H. Pudenz, y G. L. Odom, "An experimental study of the prevention of meningocerebral adhesions", *Trans. Amer. neurol. Ass*, vol. 194, pp. 117–120, 1942.
- [113] R. H. Pudenz y G. L. Odom, "Meningocerebral adhesions. An experimental study of the effect of human amniotic membrane, amnioplastin, beef allantoic membrane, Cargile membrane, tantalum foil and polyvinyl alcohol films", *Surgery*, vol. 12, pp. 318–344, 1942.
- [114] J. A. Anson y E. P. Marchand, "Bovine pericardium for dural grafts: clinical results in 35 patients", *Neurosurgery*, vol. 39, núm. 4, pp. 764–768, 1996.
- [115] J. Pařízek, P. Měříčka, J. Špaček, S. Němeček, P. Eliáš, y M. Šercl, "Xenogeneic pericardium as a dural substitute in reconstruction of suboccipital dura mater in children", *J. Neurosurg.*, vol. 70, núm. 6, pp. 905–909, 1989.
- [116] J. Pařízek et al., "Ovine pericardium as a new material for duraplasty", *J. Neurosurg.*, vol. 84, núm. 3, pp. 508–513, 1996.
- [117] A. Z. Zeman, R. S. Maurice-Williams, R. Luxton, A. Levene, E. J. Thompson, y P. Harvey, "Lymphocytic meningitis following insertion of a porcine dermis dural graft.", *Surg. Neurol.*, vol. 40, núm. 1, pp. 75–80, jul. 1993.
- [118] X. Bang-Zong et al., "Study and clinical application of a porcine biomembrane for the repair of dural defects", *J. Neurosurg.*, vol. 69, núm. 5, pp. 707–711, 1988.
- [119] R. L. L. Collins, D. Christiansen, G. A. Zazanis, y F. H. Silver, "Use of collagen film as a dural substitute: preliminary animal studies", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 25, núm. 2, pp. 267–276, 1991.
- [120] P. K. Narotam, J. R. van Dellen, y K. D. Bhoola, "A clinicopathological study of collagen sponge as a dural graft in neurosurgery.", *J. Neurosurg.*, vol. 82,

- núm. 3, pp. 406–12, mar. 1995.
- [121] J. G. Ramos, C. Cortez, O. Schwint, y G. Zúccaro, “Uso de pericardio humano en neurocirugía”, vol. 23, pp. 109–115, 2009.
- [122] Penfield, “Meningocerebral adhesions. A histological study of the results of cerebral incision and cranioplasty”, 1924.
- [123] M. A. Glaser y C. H. Thienes, “Dural defects: how important is their surgical repair: an experimental and clinical study upon heteroplastic and autoplasic dural grafts”, *Cal. West. Med.*, vol. 48, núm. 3, p. 163, 1938.
- [124] M. Malliti, P. Page, C. Gury, E. Chomette, F. Nataf, y F.-X. Roux, “Comparison of deep wound infection rates using a synthetic dural substitute (neuro-patch) or pericranium graft for dural closure: a clinical review of 1 year.”, *Neurosurgery*, vol. 54, núm. 3, pp. 599-603; discussion 603–4, mar. 2004.
- [125] F. C. Lam y E. Kasper, “Augmented autologous pericranium duraplasty in 100 posterior fossa surgeries—a retrospective case series”, *Oper. Neurosurg.*, vol. 71, núm. suppl_2, pp. ons302-ons307, 2012.
- [126] D. A. Hoover y A. Mahmood, “Ossification of autologous pericranium used in duraplasty: Case report”, *J. Neurosurg.*, vol. 95, núm. 2, pp. 350–352, 2001.
- [127] E. A. Stevens, A. K. Powers, T. A. Sweasey, S. B. Tatter, y R. G. Ojemann, “Simplified harvest of autologous pericranium for duraplasty in Chiari malformation Type I. Technical note.”, *J. Neurosurg. Spine*, vol. 11, núm. 1, pp. 80–3, jul. 2009.
- [128] G. Sabatino et al., “Autologous dural substitutes: a prospective study.”, *Clin. Neurol. Neurosurg.*, vol. 116, pp. 20–3, ene. 2014.
- [129] F. C. Lam, A. Penumaka, C. C. Chen, E. G. Fischer, y E. M. Kasper, “Fibrin sealant augmentation with autologous pericranium for duraplasty after suboccipital decompression in Chiari 1 patients: A case series.”, *Surg. Neurol. Int.*, vol. 4, p. 6, 2013.
- [130] M. A. Cobb, S. F. Badylak, W. Janas, A. Simmons-Byrd, y F. A. Boop, “Porcine small intestinal submucosa as a dural substitute.”, *Surg. Neurol.*, vol. 51, núm. 1, pp. 99–104, ene. 1999.
- [131] P. C. Sharkey, F. C. Usher, R. C. L. Robertson, y C. Pollard Jr, “Lyophilized

- human dura mater as a dural substitute”, *J. Neurosurg.*, vol. 15, núm. 2, pp. 192–198, 1958.
- [132] G. Cantore, B. Guidetti, y R. Delfini, “Neurosurgical use of human dura mater sterilized by gamma rays and stored in alcohol: long-term results”, *J. Neurosurg.*, vol. 66, núm. 1, pp. 93–95, 1987.
- [133] J. B. CAMPBELL, C. A. BASSETT, y J. W. ROBERTSON, “Clinical use of freeze-dried human dura mater.”, *J. Neurosurg.*, vol. 15, núm. 2, pp. 207–14, mar. 1958.
- [134] V. Thadani et al., “Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft: case report”, *J. Neurosurg.*, vol. 69, núm. 5, pp. 766–769, 1988.
- [135] S. Tanaka y M. Fukushima, “Size of Creutzfeldt-Jakob disease epidemic associated with cadaveric dura transplantation.”, *Neuroepidemiology*, vol. 34, núm. 4, pp. 232–7, 2010.
- [136] C. Ishida, S. Okino, T. Kitamoto, y M. Yamada, “Involvement of the peripheral nervous system in human prion diseases including dural graft associated Creutzfeldt–Jakob disease”, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 76, núm. 3, pp. 325–329, 2005.
- [137] A. P. Ostendorf y A. M. Connolly, “Medical management of eosinophilic meningitis following bovine graft duraplasty for Chiari malformation Type I repair: case report.”, *J. Neurosurg. Pediatr.*, vol. 12, núm. 4, pp. 357–9, oct. 2013.
- [138] P. Cappabianca et al., “Natura abhorret a vacuo—use of fibrin glue as a filler and sealant in neurosurgical ‘dead spaces’. Technical note”, *Acta Neurochir. (Wien)*, vol. 152, núm. 5, pp. 897–904, 2010.
- [139] T. Tomita et al., “New dried human amniotic membrane is useful as a substitute for dural repair after skull base surgery.”, *J. Neurol. Surg. B. Skull Base*, vol. 73, núm. 5, pp. 302–7, oct. 2012.
- [140] M. H. Brown, J. H. Grindlay, y W. M. Craig, “The Use of Polythene Film as a Dural Substitute”, *J. Neurosurg.*, vol. 4, núm. 6, pp. 505–507, nov. 1947.
- [141] E. BUSCH, J. BING, y E. H. HANSEN, “Gelatine and polythene film as dura

- substitutes and polythene plates as bone substitute in skull defects.”, *Acta Chir. Scand.*, vol. 97, núm. 5, pp. 410–6, feb. 1949.
- [142] F. D. INGRAHAM, E. Alexander, y D. D. MATSON, “Polyethylene, a new synthetic plastic for use in surgery: experimental applications in neurosurgery”, *J. Am. Med. Assoc.*, vol. 135, núm. 2, pp. 82–87, 1947.
- [143] G. Morello, “Un nuovo materiale per plastica durale. Il politene”, *Min Chir*, vol. 5, pp. 211–213, 1950.
- [144] D. Thompson, W. Taylor, y R. Hayward, “Haemorrhage associated with silastic dural substitute.”, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 57, núm. 5, pp. 646–8, may 1994.
- [145] J. F. Lee, G. L. Odom, y G. T. Tindall, “Experimental evaluation of silicone-coated Dacron and collagen fabric-film laminate as dural substitutes”, *J. Neurosurg.*, vol. 27, núm. 6, pp. 558–564, 1967.
- [146] M. S. Albin, A. N. D’Agostino, R. J. White, y J. H. Grindlay, “Nonsuture Sealing of a Dural Substitute Utilizing a Plastic Adhesive, Methyl 2-Cyanoacrylate”, *J. Neurosurg.*, vol. 19, núm. 7, pp. 545–550, jul. 1962.
- [147] P. Teng y C. Papatheodorou, “The use of Teflon as a dural substitute and its other neurosurgical applications”, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 26, núm. 3, p. 244, 1963.
- [148] N. Ohbayashi, T. Inagawa, Y. Katoh, K. Kumano, R. Nagasako, y H. Hada, “Complication of silastic dural substitute 20 years after dural plasty”, *Surg. Neurol.*, vol. 41, núm. 4, pp. 338–341, 1994.
- [149] T. Banerjee, J. N. Meagher, y W. E. Hunt, “Unusual complications with use of Silastic dural substitute”, *Am. Surg*, vol. 40, p. 434, 1974.
- [150] J. F. Lee, G. L. Odom, y G. T. Tindall, “Experimental Evaluation of Silicone-Coated Dacron and Collagen Fabric-Film Laminate as Dural Substitutes*”, *J. Neurosurg.*, vol. 27, núm. 6, pp. 558–564, 1967.
- [151] S. C. Robertson y A. H. Menezes, “Hemorrhagic complications in association with silastic dural substitute: pediatric and adult case reports with a review of the literature”, *Neurosurgery*, vol. 40, núm. 1, pp. 201–206, 1997.
- [152] S. Bhatia et al., “A synthetic dural prosthesis constructed from

- hydroxyethylmethacrylate hydrogels”, *J. Neurosurg.*, vol. 83, núm. 5, pp. 897–902, 1995.
- [153] M. A. Cobb, S. F. Badylak, W. Janas, A. Simmons-Byrd, y F. A. Boop, “Porcine small intestinal submucosa as a dural substitute”, *World Neurosurg.*, vol. 51, núm. 1, pp. 99–104, 1999.
- [154] A. B. Adegbite, K. W. E. Paine, y B. Rozdilsky, “The role of neomembranes in formation of hematoma around Silastic dura substitute: case report”, *J. Neurosurg.*, vol. 58, núm. 2, pp. 295–297, 1983.
- [155] R. Fontana, G. Talamonti, V. D’Angelo, O. Arena, V. Monte, y M. Collice, “Spontaneous haematoma as unusual complication of silastic dural substitute. Report of 2 cases.”, *Acta Neurochir. (Wien)*., vol. 115, núm. 1–2, pp. 64–6, 1992.
- [156] D. Siccardi y A. Ventimiglia, “Fibrotic-haemorrhagic reaction to synthetic dural substitute.”, *Acta Neurochir. (Wien)*., vol. 132, núm. 1–3, pp. 148–9, 1995.
- [157] C. A. Bowers, C. Brimley, C. Cole, W. Gluf, y R. H. Schmidt, “AlloDerm for duraplasty in Chiari malformation: superior outcomes.”, *Acta Neurochir. (Wien)*., vol. 157, núm. 3, pp. 507–11, mar. 2015.
- [158] J. H. Sherman, N. Pouratian, D. O. Okonkwo, J. A. Jane, y E. R. Laws, “Reconstruction of the sellar dura in transsphenoidal surgery using an expanded polytetrafluoroethylene dural substitute.”, *Surg. Neurol.*, vol. 69, núm. 1, p. 73–6; discussion 76, ene. 2008.
- [159] A. R. Cohen, S. Aleksic, y J. Ransohoff, “Inflammatory reaction to synthetic dural substitute: Case report”, *J. Neurosurg.*, vol. 70, núm. 4, pp. 633–635, 1989.
- [160] D. Simpson y A. Robson, “Recurrent subarachnoid bleeding in association with dural substitute: Report of three cases”, *J. Neurosurg.*, vol. 60, núm. 2, pp. 408–409, 1984.
- [161] K. Kataoka et al., “Alginate, a bioresorbable material derived from brown seaweed, enhances elongation of amputated axons of spinal cord in infant rats”, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 54, núm. 3, pp. 373–384, 2001.
- [162] K. Suzuki, Y. Suzuki, K. Ohnishi, K. Endo, M. Tanihara, y Y. Nishimura,

- “Regeneration of transected spinal cord in young adult rats using freeze-dried alginate gel”, *Neuroreport*, vol. 10, núm. 14, pp. 2891–2894, 1999.
- [163] W. Bai, X. Wang, W. Yuan, H. Wang, y Z. Wang, “Application of PLGA/type I collagen/chitosan artificial composite dura mater in the treatment of dural injury.”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, núm. 9, pp. 2247–54, sep. 2013.
- [164] F. Esposito et al., “A new bilayer chitosan scaffolding as a dural substitute: Experimental evaluation”, *Clin. Neurol. Neurosurg.*, vol. 77, núm. 4, pp. 577–582, 2008.
- [165] D. W. Kim et al., “A transparent artificial dura mater made of silk fibroin as an inhibitor of inflammation in craniotomized rats”, *J. Neurosurg.*, vol. 114, núm. 2, pp. 485–490, 2011.
- [166] H. Kweon, H. C. Ha, I. C. Um, y Y. H. Park, “Physical properties of silk fibroin/chitosan blend films”, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 80, núm. 7, pp. 928–934, may 2001.
- [167] D.-H. Roh et al., “Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat.”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, núm. 6, pp. 547–52, jun. 2006.
- [168] M. Santin, A. Motta, G. Freddi, y M. Cannas, “In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin”, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 46, núm. 3, pp. 382–389, 1999.
- [169] C. Vepari y D. L. Kaplan, “Silk as a Biomaterial.”, *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, núm. 8–9, pp. 991–1007, 2007.
- [170] K. E. Flanagan, L. W. Tien, R. Elia, J. Wu, y D. Kaplan, “Development of a sutureless dural substitute from Bombyx mori silk fibroin.”, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 103, núm. 3, pp. 485–94, abr. 2015.
- [171] K. M. K. Bottomley, D. Bradshaw, y J. S. Nixon, *Metalloproteinases as Targets for Anti-Inflammatory Drugs*, Ilustrada. 2012.
- [172] K. Tomihata y Y. Ikada, “In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives”, *Biomaterials*, vol. 18, núm. 7, pp. 567–575, 1997.
- [173] R. Muzzarelli, R. Tarsi, O. Filippini, E. Giovanetti, G. Biagini, y P. E. Varaldo, “Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan.”, *Antimicrob. Agents*

- Chemother., vol. 34, núm. 10, pp. 2019–23, oct. 1990.
- [174] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. T. Sudheesh Kumar, S. V Nair, y H. Tamura, “Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications.”, *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, núm. 3, pp. 322–37.
- [175] E. García-Gareta, M. J. Coathup, y G. W. Blunn, “Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration.”, *Bone*, vol. 81, pp. 112–121, dic. 2015.
- [176] W. Guo, Q. Guo, S. Zhang, y J. Li, “Manufacturing of artificial dura mater with chitosan polylactic acid”, *Chin J Clin Rehabil*, vol. 9, pp. 24–25, 2005.
- [177] M. Pogorielov et al., “Experimental evaluation of new chitin–chitosan graft for duraplasty”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 28, núm. 2, pp. 0–1, 2017.
- [178] M. Belgacem y A. Gandini, Eds., *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Elsevier Science, 2008.
- [179] A. Sionkowska y A. Płancka, “Surface properties of thin films based on the mixtures of chitosan and silk fibroin”, *J. Mol. Liq.*, vol. 186, pp. 157–162, oct. 2013.
- [180] C. R. Yoo et al., “Effect of chitin/silk fibroin nanofibrous bicomponent structures on interaction with human epidermal keratinocytes.”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 42, núm. 4, pp. 324–34, may 2008.
- [181] and S. G. E. Echeverri, D. Grajales, “Obtención de una solución de fibroína libre de sericina a partir de seda de *Bombyx mori*, con aplicaciones en ingeniería de tejidos. (Fase II). Proyecto Integrativo de Semestre”, Universidad de Antioquia, 2013.
- [182] and S. G. E. Echeverri, D. Grajales, “Obtención, purificación y evaluación de una solución de fibroína a partir de la seda del gusano *Bombix mori*. (Fase III). Proyecto Integrativo de Semestre,”, Universidad de Antioquia, 2014.
- [183] J. G. Melo altamirano, “Obtención de fibras submicrométricas de fibroína de seda con sangre de drago (*croton lechleri müll*) para aplicaciones biomédicas a través de la técnica de electrohilado”, Elsevier, 2018.
- [184] J. G. Melo altamirano, “Obtención de fibras submicrométricas de fibroína de seda con sangre de drago (*croton lechleri müll*) para aplicaciones biomédicas

- a través de la técnica de electrohilado”, Universidad de las Fuerzas Armadas, 2018.
- [185] D. N. Rockwood, R. C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M. L. Lovett, y D. L. Kaplan, “Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin”, *Nat. Protoc.*, vol. 6, núm. 10, pp. 1612–1631, 2011.
- [186] L. S. Wray et al., “Effect of processing on silk-based biomaterials: Reproducibility and biocompatibility”, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 99 B, núm. 1, pp. 89–101, 2011.
- [187] Thermo Fisher Scientific, “AlamarBlue- Reliable and Accurate Cell Health Indicator”. [En línea]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alarblue-rapid-and-accurate-cell-health-indicator.html#how>. [Consultado: 18-nov-2018].
- [188] D. W. Li et al., “Silk fibroin/chitosan scaffold with tunable properties and low inflammatory response assists the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 105, pp. 584–597, 2017.
- [189] Y. Boonsongrit, B. W. Mueller, y A. Mitrevej, “Characterization of drug–chitosan interaction by ¹H NMR, FTIR and isothermal titration calorimetry”, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 69, núm. 1, pp. 388–395, 2008.
- [190] J. Brugnerotto, J. Lizardi, F. M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrieres, y M. Rinaudo, “An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization”, *Polymer (Guildf.)*, vol. 42, núm. 8, pp. 3569–3580, 2001.
- [191] M. Rinaudo, “Chitin and chitosan: Properties and applications”, *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, núm. 7, pp. 603–632, 2006.
- [192] S. Mima, M. Miya, R. Iwamoto, y S. Yoshikawa, “Highly deacetylated chitosan and its properties”, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 28, núm. 6, pp. 1909–1917, 1983.
- [193] M. Kaya et al., “Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta)”, *Biotechnol. bioprocess Eng.*, vol. 20, núm. 1, pp. 168–179, 2015.
- [194] D. M. E. Sierra, C. P. O. Orozco, M. A. Q. Rodríguez, y W. A. O. Villa, “Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde

- caparazones de crustáceos”, *Sci. Tech.*, vol. 18, núm. 1, pp. 260–266, 2013.
- [195] F. S. Kittur, K. V. H. Prashanth, K. U. Sankar, y R. N. Tharanathan, “Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry”, *Carbohydr. Polym.*, vol. 49, núm. 2, pp. 185–193, 2002.
- [196] B. Focher, A. Naggi, G. Torri, A. Cosani, y M. Terbojevich, “Structural differences between chitin polymorphs and their precipitates from solutions—evidence from CP-MAS ¹³C-NMR, FT-IR and FT-Raman spectroscopy”, *Carbohydr. Polym.*, vol. 17, núm. 2, pp. 97–102, 1992.
- [197] E. Marcia, J. Malespín, M. Sánchez, y M. Benavente, “Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos”, *Nexo Rev. Científica*, vol. 24, núm. 1, pp. 33–42, 2011.
- [198] I. Barros, L. Guzmán, y A. Tarón, “Extracción y comparación de la quitina obtenida a partir del caparazón de *Callinectes sapidus* y *Penaeus vannamei*”, *Rev. UDCA Actual. Divulg. Científica*, vol. 18, núm. 1, 2015.
- [199] J. G. Monter-Miranda et al., “Extracción y caracterización de propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de quitina y quitosano de *Brachystola magna* (Girard)”, *Rev. Mex. Ing. Química*, vol. 15, núm. 3, 2016.
- [200] C. Peniche, “Estudios sobre quitina y quitosana”, *Univ. la Habana. Fac. Química*, pp. 36–57, 2006.
- [201] C. Hidalgo, M. Fernández, O. M. Nieto, A. A. Paneque, G. Fernández, y J. C. LLópez, “Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta”, *Rev. Iberoam. Polím*, vol. 10, pp. 1–17, 2009.
- [202] M. F. Cervera et al., “Solid-state characterization of chitosans derived from lobster chitin”, *Carbohydr. Polym.*, vol. 58, núm. 4, pp. 401–408, 2004.
- [203] C. L. Rosen et al., “Results of the prospective, randomized, multicenter clinical trial evaluating a biosynthesized cellulose graft for repair of dural defects.”, *Neurosurgery*, vol. 69, núm. 5, pp. 1093-103; discussion 1103–4, nov. 2011.
- [204] M. Á. Ramirez, A. T. Rodriguez, L. Alfonso, y C. Peniche, “La quitina y sus derivados, biopolimeros con potencialidades de aplicacion agricola”, *Biotechnol. Apl.*, vol. 27, núm. 4, pp. 262–269, 2010.

- [205] N. de la Paz et al., “Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta”, *Rev. Iberoam. polímeros*, vol. 13, núm. 3, pp. 103–116, 2012.
- [206] D. R. Walsh et al., “Regional mechanical and biochemical properties of the porcine cortical meninges.”, *Acta Biomater.*, vol. 80, pp. 237–246, oct. 2018.
- [207] W. Luangbudnark, J. Viyoch, W. Laupattarakasem, P. Surakunprapha, y P. Laupattarakasem, “Properties and biocompatibility of chitosan and silk fibroin blend films for application in skin tissue engineering.”, *ScientificWorldJournal.*, vol. 2012, p. 697201, 2012.
- [208] M. A. Reina y D. P. Pulido, “El saco dural humano . Origen del espacio subdural espinal”, *Rev. Argentina Anestesiol.*, vol. 65, núm. 3, pp. 167–84, 2007.
- [209] N. Valderrama Bohórquez, “Evaluación del comportamiento de películas comestibles de quitosano almacenadas bajo condiciones controladas”, Universidad Nacional, 2014.
- [210] Brigitte Demes, “Mechanical Functions of the Dura Mater”, *Biomech. Primate Skull Base. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, vol. 94, 1985.
- [211] A. Sionkowska, K. Lewandowska, y A. Płancka, “Miscibility and physical properties of chitosan and silk fibroin mixtures”, *J. Mol. Liq.*, vol. 198, pp. 354–357, oct. 2014.
- [212] A. E. Porter, L. W. Hobbs, V. B. Rosen, y M. Spector, “The ultrastructure of the plasma-sprayed hydroxyapatite–bone interface predisposing to bone bonding”, *Biomaterials*, vol. 23, núm. 3, pp. 725–733, 2002.
- [213] I. Barrios de Arenas, M. Vásquez, U. Spadavecchia, S. Camero, y G. González, “Estudio comparativo de la bioactividad de diferentes materiales cerámicos sumergidos en fluido simulado del cuerpo”, *Rev. Latinoam. Metal. y Mater.*, vol. 25, núm. 1–2, pp. 23–31, 2005.
- [214] M. A. Hayat, “Glutaraldehyde: role in electron microscopy”, *Micron Microsc. Acta*, vol. 17, núm. Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., pp. 115–135, 1986.
- [215] I. Leceta, P. Guerrero, y K. De La Caba, “Functional properties of chitosan-

- based films”, *Carbohydr. Polym.*, vol. 93, núm. 1, pp. 339–346, 2013.
- [216] N. E. Suyatma, L. Tighzert, A. Copinet, y V. Coma, “Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films”, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, núm. 10, pp. 3950–3957, 2005.
- [217] J. R. Rodríguez-Núñez, T. J. Madera-Santana, D. I. Sánchez-Machado, J. López-Cervantes, y H. S. Valdez, “Chitosan/hydrophilic plasticizer-based films: preparation, physicochemical and antimicrobial properties”, *J. Polym. Environ.*, vol. 22, núm. 1, pp. 41–51, 2014.
- [218] J. Ma, H. Wang, B. He, y J. Chen, “A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts”, *Biomaterials*, vol. 22, núm. 4, pp. 331–336, 2001.
- [219] G. Li, W. Li, H. Deng, y Y. Du, “Structure and properties of chitin/alginate blend membranes from NaOH/urea aqueous solution”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 51, núm. 5, pp. 1121–1126, 2012.
- [220] S. Li, L. Li, C. Guo, H. Qin, y X. Yu, “A promising wound dressing material with excellent cytocompatibility and proangiogenesis action for wound healing: Strontium loaded Silk fibroin/Sodium alginate (SF/SA) blend films”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 104, pp. 969–978, 2017.
- [221] S. Srinivasan, P. T. Kumar, S. V Nair, S. V Nair, K. P. Chennazhi, y R. Jayakumar, “Antibacterial and bioactive α - and β -chitin hydrogel/nanobioactive glass ceramic/nano silver composite scaffolds for periodontal regeneration”, *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 9, núm. 11, pp. 1803–1816, 2013.
- [222] P. T. Kumar, V.-K. Lakshmanan, R. Biswas, S. V Nair, y R. Jayakumar, “Synthesis and biological evaluation of chitin hydrogel/nano ZnO composite bandage as antibacterial wound dressing”, *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 8, núm. 6, pp. 891–900, 2012.
- [223] M. Rajput et al., “Nano-patterned honey incorporated silk fibroin membranes for improving cellular compatibility”, *RSC Adv.*, vol. 4, núm. 84, pp. 44674–44688, 2014.
- [224] K. Panjapheree, S. Kamonmattayakul, y J. Meesane, “Biphasic scaffolds of

- silk fibroin film affixed to silk fibroin/chitosan sponge based on surgical design for cartilage defect in osteoarthritis”, *Mater. Des.*, vol. 141, pp. 323–332, 2018.
- [225] H. Kim, C. H. Tator, y M. S. Shoichet, “Chitosan implants in the rat spinal cord: biocompatibility and biodegradation”, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 97, núm. 4, pp. 395–404, 2011.
- [226] M. A. Sabino, D. Morales, G. Ronca, y L. Feijoo, “Estudio de la degradación hidrolítica de un copolímero biodegradable”, núm. January, 2003.
- [227] C. Ferrari y M. Bertone, “Neurociencia Funcional y Aplicada”.
- [228] M. Matamoros Ruiz, “Líquido cefalorraquídeo: función en la salud y la enfermedad”, vol. 2.
- [229] A. E. Engberg et al., “Prediction of inflammatory responses induced by biomaterials in contact with human blood using protein fingerprint from plasma”, *Biomaterials*, vol. 36, pp. 55–65, 2015.
- [230] W.-T. Wu, M. A. Jamiolkowski, W. R. Wagner, N. Aubry, M. Massoudi, y J. F. Antaki, “Multi-constituent simulation of thrombus deposition”, *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 42720, 2017.
- [231] H. Wei, L. Han, Y. Tang, J. Ren, Z. Zhao, y L. Jia, “Highly flexible heparin-modified chitosan/graphene oxide hybrid hydrogel as a super bilirubin adsorbent with excellent hemocompatibility”, *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, núm. 8, pp. 1646–1654, 2015.
- [232] T. Lin et al., “Chronic inflammation in biomaterial-induced periprosthetic osteolysis: NF- κ B as a therapeutic target”, *Acta Biomater.*, vol. 10, núm. 1, pp. 1–10, 2014.
- [233] C. R. Arciola, D. Campoccia, S. Ravaioli, y L. Montanaro, “Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 5, p. 7, 2015.
- [234] S. Martino y D. Francesco, “Angelo F, Armentano I, Kenny JM, Orlacchio A”, *Stem cell-biomaterial Interact. Regen. Med. Biotechnol. Adv.*, vol. 30, pp. 338–351, 2012.
- [235] D. Bonn, “D. Bonn, J. Eggers, J. Indekeu, J. Meunier, and E. Rolley, *Rev. Mod. Phys.* 81, 739 (2009).”, *Rev. Mod. Phys.*, vol. 81, p. 739, 2009.

- [236] G. Agrawal, Y. S. Negi, S. Pradhan, M. Dash, y S. K. Samal, *Wettability and contact angle of polymeric biomaterials*. Elsevier Ltd., 2017.
- [237] J. Du et al., “Potential applications of three-dimensional structure of silk fibroin/poly(ester-urethane) urea nanofibrous scaffold in heart valve tissue engineering”, *Appl. Surf. Sci.*, vol. 447, pp. 269–278, 2018.
- [238] S. Banerjee et al., “Antimicrobial and biocompatible fluorescent hydroxyapatite-chitosan nanocomposite films for biomedical applications”, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 171, núm. July, pp. 300–307, 2018.
- [239] F.-C. Liang et al., “Thermally deposited silk fibroin as the gate dielectric layer in organic thin-film transistors based on conjugated polymer”, *React. Funct. Polym.*, vol. 131, pp. 368–377, oct. 2018.
- [240] V. Zamora Mora y J. Vega Baudrit, “Diseño de un biofilm a partir de colágeno de pieles de Tilapia y de quitosano de camarón como soporte para Aplicaciones en ingeniería de tejidos”, *Rev. Iberoam. Polim.*, vol. 11, núm. 7, pp. 607–619, 2010.
- [241] J. Uranga, A. I. Puertas, A. Etxabide, M. T. Dueñas, P. Guerrero, y K. de la Caba, “Citric acid-incorporated fish gelatin/chitosan composite films”, *Food Hydrocoll.*, vol. 86, pp. 95–103, ene. 2019.
- [242] D. Wachter, K. Reineke, T. Behm, y V. Rohde, “Cranioplasty after decompressive hemicraniectomy: Underestimated surgery-associated complications?”, *Clin. Neurol. Neurosurg.*, vol. 115, núm. 8, pp. 1293–1297, 2013.
- [243] C. Le et al., “Lower complication rates for cranioplasty with peri-operative bundle”, *Clin. Neurol. Neurosurg.*, vol. 120, pp. 41–44, 2014.
- [244] S. Honeybul, “Complications of decompressive craniectomy for head injury”, *J. Clin. Neurosci.*, vol. 17, núm. 4, pp. 430–435, 2010.
- [245] Y. C. Vera, M. A. Delgado, Y. Roa, y G. Mora, “Antimicrobial effect of the quitosano and rind of orange in the treatment of waste water”, vol. 19, pp. 381–388, 2017.
- [246] Z. Li, F. Yang, y R. Yang, “Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups”, *Int. J. Biol. Macromol.*,

- vol. 75, pp. 378–387, 2015.
- [247] N. Bhardwaj y S. C. Kundu, “Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications”, *Carbohydr. Polym.*, vol. 85, núm. 2, pp. 325–333, 2011.
- [248] D. Raafat, K. Von Bargen, A. Haas, y H.-G. Sahl, “Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, núm. 12, pp. 3764–3773, 2008.
- [249] G. Yuan, H. Lv, W. Tang, X. Zhang, y H. Sun, “Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage”, *Food Control*, vol. 59, pp. 818–823, 2016.
- [250] L. Fernandez-de Castro et al., “Films of chitosan and chitosan-oligosaccharide neutralized and thermally treated: Effects on its antibacterial and other activities”, *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 73, pp. 368–374, 2016.
- [251] J. Chen et al., “Journal of Colloid and Interface Science Enhanced physical and biological properties of silk fibroin nanofibers by layer-by-layer deposition of chitosan and rectorite”, *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 523, pp. 208–216, 2018.
- [252] Y. Wu et al., “Production of thick uniform-coating films containing rectorite on nanofibers through the use of an automated coating machine”, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 149, pp. 271–279, 2017.
- [253] X. Wang, Y. Du, J. Luo, J. Yang, W. Wang, y J. F. Kennedy, “A novel biopolymer/rectorite nanocomposite with antimicrobial activity”, *Carbohydr. Polym.*, vol. 77, núm. 3, pp. 449–456, 2009.
- [254] A. Abdal-hay, J. Lim, M. S. Hassan, y J. K. Lim, “Ultrathin conformal coating of apatite nanostructures onto electrospun nylon 6 nanofibers: mimicking the extracellular matrix”, *Chem. Eng. J.*, vol. 228, pp. 708–716, 2013.
- [255] GREBO, “Manual de Actualización en Resistencia Bacteriana y Normas CLSI M100 - S20”, pp. 1–78, 2010.