



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

**ANDAMIOS POLIMÉRICOS PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA
REGENERACIÓN DE ESFÍNTER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:

ALIDA OSPINA OREJARENA

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. RICARDO VERA GRAZIANO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. ATLÁNTIDA MARGARITA RAYA RIVERA

Dr. DIEGO RICARDO ESQUILIANO RENDÓN

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La idea no es vivir para siempre.

La idea es crear algo que sí lo haga.

Andy Warhol

DEDICATORIA

A mi madre Rosa, mi guerrera invencible. fuente de inspiración para el tema de esta investigación. Todos mis logros honraran tu presencia en este mundo. ¡Te amo!

A mis hermanas Surley, y Bellanire por el gran amor que les tengo y por ser mi ejemplo a seguir cada día.

A mi Shenoa, luz de mi vida.

A mi Padre Carlos, por todas las enseñanzas recibidas.

A Evelyn Coronilla por todo el amor que me brindas cada día.

Y A ti mama Oti que sigues en mi corazón y memoria.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones en Materiales por permitirme ser parte de su comunidad, por la formación tanto académica como profesional que durante este tiempo adquirí y por el apoyo brindado para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A mi hermosa familia por todo su amor y apoyo a pesar de la distancia que nos separa, por motivarme cada día a sacar adelante esta tesis doctoral a pesar de los momentos difíciles que pase a nivel personal, me quedó sin palabras para expresarles mis infinitos agradecimientos.

A Evelyn Coronilla, por motivarme, por creer en mi, por brindarme todo su amor y apoyo incondicional para culminar esta tesis doctoral, mil gracias.

Al Dr. Ricardo Vera Graziano por su amistad, por creer en que sí podía lograrlo, por su excelente asesoría, por su apoyo incondicional en todo momento, por su confianza, por permitirme ser parte del grupo de investigación desde que llegue a realizar la maestría, por encaminarme cuando me sentía perdida, mil gracias.

A la Dra. Atlántida Raya Rivera por creer en mi, por su confianza, por creer en el proyecto de investigación, por su asesoría, por recibirme en su laboratorio y brindarme todo su apoyo incondicional para desarrollar la caracterización de los andamios a nivel *in vitro* e *in vivo*, por demostrarme que es posible todo sí se realiza con esfuerzo a pesar de cualquier dificultad, mil gracias.

Al Dr. Diego Esquiliano Rendón por toda su asesoría, por su confianza, por todo su apoyo en las cirugías de los conejos, mil gracias.

Al Dr. Alfredo Maciel Cerda, por su valiosa amistad durante todos estos años desde que lo conocí en Perú, porque llegue a México gracias a su apoyo, por su asesoría, por su confianza, por estar al pendiente de mi y de mi desempeño en todo momento, por todo su apoyo en el laboratorio, mil gracias.

A la Dra. Laura Vargas Ulloa, Patricia Oropeza Murillo, y Margarita Navarrete por su tiempo, comentarios y valioso apoyo en la preparación de la presentación de mi protocolo de investigación para la candidatura al grado de Doctora.

A la Dra. Guillermina Burillo Amezcua, Al Dr. Raúl Montiel Campos, Al Dr. Federico Barceló Santana, y al Dr. Emilio Bucio y a la Dra. Atlántida Raya Rivera por aceptar ser parte de mi jurado para el examen de candidatura al grado de Doctora y por sus valiosas aportaciones al protocolo de investigación.

Al Dr. Omar Novelo y Josué por su enorme disposición y gran apoyo en las sesiones de microscopía electrónica de barrido.

A Damaris Cabrero y Karla Reyes por su apoyo en el análisis de muestras por calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico.

Al Dr. Francisco Sánchez Arévalo por su valioso apoyo en las pruebas de tensión uniaxial de los andamios.

Al Dr. Genaro Patiño López por su valioso apoyo en el análisis de muestras por medio del microscopio confocal.

Al M. en C. Miguel Canseco por su colaboración en la toma de espectros de infrarrojo.

A la M. en C. Marisol Garnica Palafox por su amistad, por creer en mi y por su valioso apoyo en las pruebas de tensión uniaxial de los andamios.

Al Ing. Ulises Espinoza Nava por su amistad y su valioso apoyo en el diseño y construcción de los colectores para el equipo de electrohilado.

Al Dr. Filiberto Rivera Torres, por su amistad, por su asesoría y por su apoyo en el análisis de muestras por medio del ángulo de contacto.

Al Dr. Andrés Castell Rodríguez por su confianza, por su asesoría, por su tiempo y apoyo en el análisis de los cortes histológicos y por sus valiosas aportaciones en la revisión de la tesis de grado, mil gracias.

Al Dr. Raúl Rosales Ibañez por su confianza, por su tiempo y valiosas aportaciones en la revisión de la tesis de grado.

Al Dr. Emilio Bucio Carrillo y Roberto Olayo González por su tiempo y valiosas aportaciones en la revisión de la tesis de grado.

Al Dr. Heriberto Pfeiffer, Isabel, Diana y Esther por su gran colaboración en todos los trámites realizados en el posgrado y apoyos otorgados para la participación en congresos.

A la Lic. Teresa Vázquez por su colaboración en los trámites de la Biblioteca del IIM.

A Conacyt por la beca de doctorado otorgada.

A la secretaria de la defensa nacional por el apoyo económico otorgado en el periodo extra de mi doctorado.

A mis amigos: Aurora, Rodolfo, Lizeth, Selene, Abel, Marissa, Angélica, Diana, Daniela, Maru, Stefi, Pedro, Ulises, Gaby, y a los amigos visitantes de Colombia: Eduard, Carolina, Ángela, Sandra y Paola que siguieron por diferentes caminos pero que hicieron parte de mi estancia en el laboratorio de nanofibras poliméricas del IIM, por su valioso apoyo, asesoría, charlas, salidas y colaboración en cada una de las etapas que estuvieron conmigo durante el desarrollo de mi tesis doctoral, mil gracias.

A mis amigos Josué, Nadia, Linda, Denisse, Andrés, Erick, Vladimir, Eliseo, Alan, Rodrigo y Ángel que aún siguen en el laboratorio de nanofibras poliméricas del IIM, por su gran apoyo, asesoría, charlas, salidas y valiosa colaboración durante el desarrollo de mi tesis doctoral, mil gracias.

A mis amigos Teresa, Noé, y Misael del laboratorio de ingeniería de tejidos del HIMFG por su apoyo incondicional, charlas, salidas y por colaborar en todos los experimentos, mil gracias.

A Sonia Reyes Gómez que aunque no llegamos juntas al final de este camino, mil gracias por todo el apoyo brindado durante gran parte del desarrollo de esta tesis doctoral.

A mis amigos Carolina Caicedo, Johana Galindo, Nelson Cala y Alejandra Frago por todo su apoyo incondicional, por su motivación, porque siempre estuvieron en todo momento aún en los momentos más difíciles e hicieron posible la culminación de esta tesis doctoral.

A todos los que se me escapan, y que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de esta tesis doctoral, mis más sinceros agradecimientos y excusas.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	21
1.1	INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	21
1.1.1	ANDAMIO.....	21
1.1.2	POLÍMEROS EMPLEADOS PARA LA FABRICACIÓN DE ANDAMIOS.....	21
1.1.3	ELECTROHILADO.....	23
1.2	ANATOMÍA ANORECTAL.....	24
1.3	INCONTINENCIA FECAL.....	26
1.3.1	PREVALENCIA Y COSTOS DE LA INCONTINENCIA FECAL.....	27
1.3.2	FACTORES DE RIESGO.....	29
1.3.3	TRATAMIENTOS QUIRÚRGICOS PARA LA INCONTINENCIA FECAL.....	29
1.3.3.1	ESFINTEROPLASTÍA.....	29
1.3.3.2	NEUROESTIMULACIÓN DE LAS RAÍCES SACRAS.....	30
1.3.3.3	AGENTES DE RELLENO.....	30
1.3.3.4	GRACILOPLASTIA.....	31
1.3.3.5	ESFÍNTER ANAL ARTIFICIAL.....	31
1.3.4	ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN LA REGENERACIÓN DEL ESFÍNTER ANAL.....	33
1.3.4.1	TERAPIA CON CÉLULAS TRONCALES.....	33
1.3.4.2	INGENIERÍA DE TEJIDOS COLO-RECTAL.....	34
2	JUSTIFICACIÓN.....	35
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	36
4.1	MATERIALES.....	36
4.1.1	REACTIVOS USADOS PARA LA FABRICACIÓN DE ANDAMIOS.....	36
4.1.2	REACTIVOS USADOS EN EL CULTIVO CELULAR.....	36
4.2	FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS.....	37
4.2.1	FABRICACIÓN DE ANDAMIOS (PRIMERA ETAPA).....	37
4.2.2	FABRICACIÓN DE ANDAMIOS (SEGUNDA ETAPA).....	39

4.2.3	<i>FABRICACIÓN DE ANDAMIOS (TERCERA ETAPA)</i>	42
4.2.4	<i>CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS</i>	42
4.2.4.1	<i>ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (ATR-FTIR)</i>	42
4.2.4.2	<i>CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)</i>	43
4.2.4.3	<i>ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)</i>	43
4.2.4.4	<i>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)</i>	43
4.2.4.5	<i>ENSAYO DE TENSIÓN</i>	43
4.2.4.6	<i>ÁNGULO DE CONTACTO</i>	44
4.2.4.7	<i>LÍMITE DE HINCHAMIENTO</i>	44
4.3	<i>ESTUDIOS IN VITRO</i>	44
4.3.1	<i>OBTENCIÓN DEL CULTIVO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS AISLADAS DE LA VEJIGA DE CONEJOS NEOZELANDESES</i>	44
4.3.2	<i>SUBCULTIVO DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE VEJIGA DE CONEJO NEOZELANDÉS</i>	45
4.3.3	<i>CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS POR MEDIO DE INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA</i> ...	46
4.3.3.1	<i>INMUNOHISTOQUÍMICA</i>	46
4.3.3.2	<i>INMUNOFLUORESCENCIA</i>	47
4.3.4	<i>EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE VEJIGA DE CONEJO NEOZELANDÉS POR MEDIO DEL ENSAYO DE MTT</i>	48
4.3.4.1	<i>DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE SENSIBILIDAD DEL ENSAYO</i> .	48
4.3.4.2	<i>DETERMINACIÓN DEL NÚMERO INICIAL DE CÉLULAS Y LA DURACIÓN DEL ENSAYO</i>	49
4.3.4.3	<i>EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS EN LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS MEDIANTE EL ENSAYO DE MTT</i>	51
4.3.5	<i>EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS EN LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS POR MEDIO DE LA REACCIÓN DE LA CALCEINA ACETOXIMETILADA</i>	53
4.3.6	<i>CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS EN LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS POR MEDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA</i>	53

4.3.7	<i>CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS SEMBRADOS CON CÉLULAS MUSCULARES LISAS POR MEDIO DE MEB</i>	54
4.3.8	<i>IMPLANTE SUBCUTÁNEO (Estudio Piloto)</i>	55
4.3.8.1	<i>Análisis de los implantes recuperados</i>	55
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
5.1	<i>ESTUDIO DE LAS VARIABLES DEL PROCESO SOBRE LA MORFOLOGÍA DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS DE PLA</i>	56
5.2	<i>ESTUDIO DE LAS VARIABLES DEL PROCESO DE ELECTROHILADO SOBRE LA MORFOLOGÍA DE ANDAMIOS DE PCU</i>	64
5.3	<i>ELECTROHILADO DE SOLUCIONES DE PLA CON COLÁGENA Y ELASTINA</i> ..	67
5.3.1	<i>CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS DE PLA CON COLÁGENA Y ELASTINA</i>	69
5.3.1.1	<i>Morfología por MEB</i>	69
5.3.1.2	<i>Composición química por FTIR</i>	70
5.3.1.3	<i>Propiedades térmicas</i>	72
5.3.1.4	<i>Ángulo de contacto</i>	75
5.3.1.5	<i>Propiedades mecánicas en tensión uniaxial</i>	77
5.4	<i>CULTIVO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS AISLADAS DE LA VEJIGA DE CONEJO NEOZELANDÉS</i>	79
5.4.1	<i>CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS POR MEB</i>	81
5.4.2	<i>CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA</i>	82
5.4.3	<i>CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS AISLADAS DE VEJIGA DE CONEJO POR INMUNOFLUORESCENCIA</i>	83
5.4.4	<i>DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE SENSIBILIDAD DEL ENSAYO DE MTT</i> 85	
5.4.5	<i>DETERMINACIÓN DEL NÚMERO INICIAL DE CÉLULAS Y LA DURACIÓN DEL ENSAYO DE MTT</i>	87
5.5	<i>CULTIVO IN VITRO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS EN ANDAMIOS ELECTROHILADOS DE PLA CON COLÁGENA Y ELASTINA</i>	89
5.5.1	<i>EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE EL ENSAYO DE MTT</i>	89

5.5.2	<i>CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS CULTIVADOS IN VITRO POR MEB</i>	91
5.6	<i>ANDAMIOS ELECTROHILADOS DE PCU Y PLA CON COLÁGENA Y ELASTINA CON FIBRAS AL AZAR</i>	93
5.6.1	<i>MORFOLOGÍA POR MEB</i>	94
5.6.2	<i>ANÁLISIS QUÍMICO POR FTIR</i>	97
5.6.3	<i>PROPIEDADES TÉRMICAS</i>	99
5.6.4	<i>ÁNGULO DE CONTACTO</i>	102
5.6.5	<i>DETERMINACIÓN DEL % DE HINCHAMIENTO</i>	103
5.6.6	<i>PROPIEDADES MECÁNICAS DE ANDAMIOS DE PLA-COL-ELAS:PCU</i>	104
5.6.7	<i>EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS EN LOS ANDAMIOS MEDIANTE EL ENSAYO DE MTT</i>	106
5.6.8	<i>CARACTERIZACIÓN DE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS SEMBRADAS EN LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS</i>	109
5.6.9	<i>CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS CULTIVADOS IN VITRO POR MEDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA</i>	112
5.7	<i>FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS DE PCU Y PLA CON COLÁGENA Y ELASTINA CON FIBRAS ALINEADAS</i>	117
5.7.1	<i>MORFOLOGÍA POR MEB</i>	120
5.7.2	<i>ÁNGULO DE CONTACTO</i>	121
5.7.3	<i>PROPIEDADES TÉRMICAS</i>	121
5.7.4	<i>PROPIEDADES MECÁNICAS</i>	124
5.7.5	<i>COMPARACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN ANDAMIOS CON FIBRAS AL AZAR Y ALINEADAS</i>	125
5.7.5.1	<i>Ensayo de MTT</i>	125
5.7.5.2	<i>Ensayo de viabilidad mediante la reacción de la calceína acetoximetilada en andamios con fibras al azar y alineadas a siete días de cultivo</i>	127
5.7.6	<i>CARACTERIZACIÓN DE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS SEMBRADAS EN LOS ANDAMIOS CON FIBRAS ALINEADAS</i>	128
5.7.7	<i>CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS CON FIBRAS ALINEADAS CULTIVADOS IN VITRO DURANTE SIETE DÍAS POR MEDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA</i>	129

5.7.8	ENSAYO DE VIABILIDAD MEDIANTE LA REACCIÓN DE LA CALCEINA ACETOXIMETILADA EN ANDAMIOS CON FIBRAS ALINEADAS A VEINTIÚN DÍAS DE CULTIVO.....	131
5.7.9	CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS CON FIBRAS ALINEADAS CULTIVADOS IN VITRO DURANTE VEINTIÚN DÍAS POR MEDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA	132
5.8	IMPLANTE SUBCUTÁNEO (ESTUDIO PILOTO).....	134
6	CONCLUSIONES.....	138
7	PERSPECTIVAS.....	139
8	REFERENCIAS.....	140

LISTA DE FIGURAS

Figura 1..	26
Figura 2. Esfínter anal artificial	32
Figura 3. Esfínter anal artificial. Erosión perineal	32
Figura 4. Equipo de electrohilado IIM-UNAM	38
Figura 5. Colector estático	32
Figura 6. Colector dinámico	38
Figura 7. Colector con cilindro rotatorio. Diseño y construcción por Alida Ospina Orejarena y Ulises Edmundo Espinoza Nava.	40
Figura 8. Montaje sistema de electrohilado con inyección simultánea	40
Figura 9. Electrohilado con sistema de inyección simultánea	41
Figura 10. Rotulación de la placa de 96 pocillos, C1= 100000, C2:50000, C3= 25000, C4= 12500, C5= 6250, C6= 3125, C7= 1562.5, C8= 781.25, C9= 390.625, C10= 195.3125, B=0 cel/pozo	48
Figura 11. Rotulación de la placa de 24 pocillos, C= Concentración, B=Medio de cultivo sin células	50
Figura 12. Micrografías de fibras de PCU (1000X) utilizando diferentes relaciones de DMF:THF [v/v]: a) 100, b) 90:10, c) 80:20, d) 70:30 y e) 60:40.	65
Figura 13. Micrografías de MEB(5000x) de andamios electrohilados de: a) PLA, b) PLA-COL, c) PLA-ELAS y d) PLA-COL-ELAS.	70
Figura 14. Espectro FTIR de: a) COL (M), (b) ELAS (M), (c) PLA(A), d) PLA-COL (A), e) PLA-ELAS (A) y f) PLA-COL-ELAS (A). A=andamio, M=masa	71
Figura 15. Termogramas de DSC para: a) COL(B), b)ELAS(B), c)PLA(B), d)PLA(A), e)PLA-COL(A), f) PLA-ELAS(A) y g) PLA-COL-ELAS(A). A=andamio, M=masa.	73

Figura 16. Ángulo de contacto de andamios de PLA con colágena y elastina.....	77
Figura 17. Propiedades mecánicas de los andamios de PLA con colágena y elastina	78
Figura 18. Biopsia y disgregación enzimática de la vejiga de un conejo neozelandés.	80
Figura 19. Micrografía en campo claro (10x) de células musculares lisas aisladas de la vejiga de conejo neozelandés.	80
Figura 20. Micrografías de MEB de células musculares lisas aisladas de la vejiga de conejo neozelandés a diferentes aumentos: a)-b) 250x y c)-d)500x	81
Figura 21. Resultados representativos de la inmunohistoquímica de las células de vejiga de conejo para marcadores fenotípicos de células de musculo liso: a) α -actina, b) mosina, c) caldesmona y d) calponina. Fotos tomadas a 20x en un microscopio Leica DMIRE2 en campo claro.	82
Figura 22. Marcaje para F-actina con dilución de faloidina conjugada con Alexa 488: a) 1:50, b) 1:100. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP8 a 63x.....	83
Figura 23. Marcaje para α -actina con dilución de Alexa 488: a) 1:200, b)1:400 y c) 1:600. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP8 a 63x.....	84
Figura 24. Marcaje para α -actina con dilución de Alexa 594: a) 1:200 y b) 1:400. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP8 a 63x.....	85
Figura 25. Curva absorbancia vs número de células con 10 μ L de MTT y 50 μ L de DMSO.	86
Figura 26. Curva absorbancia vs número de células con 20 μ L de MTT y 50 μ L de DMSO.	86
Figura 27. Curva absorbancia vs número de células con 10 μ L de MTT y 100 μ L de DMSO.	87
Figura 28. Curva absorbancia vs número de células con 20 μ L de MTT y 100 μ L de DMSO.	87

Figura 29. Curva absorbancia vs tiempo para células cultivadas sin andamio a diferentes concentraciones.	88
Figura 30. Curva absorbancia vs tiempo para células cultivadas en andamio de PLA-ELAS a diferentes concentraciones.	88
Figura 31. Viabilidad y proliferación de células musculares lisas en andamios de PLA con colágena y elastina.....	90
Figura 32. Micrografías de MEB(500x) de andamios de: a)-c) PLA, d)-f)PLA-COL, g)-i)PLA-ELAS y j)-l) PLA-COL-ELAS cultivados con células musculares lisas durante 7 días.....	92
Figura 33. Sistemas de electrohilado simultáneo lado-lado y lados opuestos	94
Figura 34. Repulsión de jets en el sistema de electrohilado simultáneo lado-lado	94
Figura 35. Análisis del depósito de fibras en el sistema de electrohilado simultáneo por lados opuestos de soluciones de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes porcentajes de Vti: a) 100:0, b) 75:25, c) 50:50, d) 25:75 y e) 0:100. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP5.	94
Figura 36. Micrografías de MEB(5000x) de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación %Vti) con la distribución de diámetros de las fibras: a) 0:100, b) 25:75,c) 50:50 y d) 75:25.	96
Figura 37. Espectros FTIR de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes porcentajes de Vti: a) 0:100, b)25:75 y c) 50:50	97
Figura 38. Espectros FTIR de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes porcentajes de Vti: a) 75:25 y b)100:0	98
Figura 39. Termogramas de DSC de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU(Relación%vti): a)0:100, b)25:75, c)50:50 y d)75:25.	100
Figura 40. Termogramas de TGA de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU(Relación%vti): a)0:100, b)25:75, c)50:50 y d)75:25.	101

Figura 41. Ángulo de contacto de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes porcentajes de Vti.....	102
Figura 42. Cambio en las dimensiones de los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU(Relación% Vti) después de 7 días de incubación con medio suplementado a 37°C.....	103
Figura 43. Curva de hinchamiento de los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU durante 7 días de incubación con medio suplementado a 37°C.	104
Figura 44. Modulo de elasticidad de los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes % de Vti.	105
Figura 45. Resistencia a la tensión de los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes % de Vti.	106
Figura 46. Viabilidad y proliferación de células musculares lisas en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti).	107
Figura 47. Micrografías de MEB a 2500x y 200x a 1 día de cultivo en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti): a),e) 50:50; b),f) 25:75; c),g) 75:25; y d),h) 0:100.	110
Figura 48. Micrografías de MEB a 50x,200x y 2500x a 7 días de cultivo en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti): a)-c) 50:50, d)-f)75:25, g)-i)0:100, y j)-l) 25:75.	112
Figura 49. Marcaje para F y α -actina de células musculares lisas sembradas en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) con fibras al azar a 1 día de cultivo: a)-c) 50:50, d)-f)25:75, g)-i)75:25, j)-l) 0:100 y m)-o) Control sin andamio. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP8 a 40x.....	114
Figura 50. Marcaje para F y α -actina de células musculares lisas sembradas en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) con fibras al azar a 7 días de cultivo: a)-c) 50:50, d)-f)25:75, g)-i)75:25, j)-l) 0:100 y m)-o) Control sin andamio. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP8 a 40x.....	115

Figura 51. Proyección en Z del marcaje para F-actina en los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras al azar (Relación de %Vti) a 7 días de cultivo: a)50:50, b)25:75, c) 75:25 y d) 0:100.	116
Figura 52. Micrografías de MEB(5000x) de andamios de PCU variando las revoluciones por minuto del colector rotacional: a) 1020 rpm, b)1510 rpm, c)2520 rpm y d) 3000 rpm.	117
Figura 53. Micrografías de MEB(5000x) de andamios de PLA-COL-ELAS variando las revoluciones por minuto del colector rotacional: a) 1020 rpm, b)1510 rpm, c)2520 rpm y d) 3000 rpm.	118
Figura 54. Micrografías de MEB(5000X) de electrohilado simultáneo de PLA-COL-ELAS:PCU(50:50 %Vti) variando las revoluciones por minuto del colector rotacional:a) 3800 rpm, b)4200 rpm, c)5000 rpm y d) 6000 rpm.....	119
Figura 55. Micrografías de MEB(1000X y 5000x) de andamios con fibras alineadas de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes % de Vti: a-b) 50:50 y c)-d) 0:100.	120
Figura 56. Ángulo de contacto de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación%Vti) con fibras alineadas.	121
Figura 57. Termogramas de DSC de andamios con fibras alineadas de PLA-COL-ELAS:PCU(Relación%Vti) de: a) 0:100 y b)50:50.....	122
Figura 58 Termogramas de TGA de andamios con fibras alineadas de PLA-COL-ELAS:PCU(Relación%Vti) de: a) 0:100 y b)50:50.....	123
Figura 59 Modulo de elasticidad de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas.	124
Figura 60 Resistencia a la tensión de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas.	125
Figura 61 Viabilidad y proliferación de células musculares lisas en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) con fibras alineadas(A) y al azar (NA).	125

Figura 62. Viabilidad celular por medio de la reacción de la calceína acetoximetilada en los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) con fibras alineadas y al azar: a)-c) 50:50(NA), d)-f) 50:50(A), g)-i)0:100(NA) y j)-l) 0:100(A). Fotos tomadas a 10x en un microscopio de epifluorescencia Leica DMIRE2.	128
Figura 63. Micrografías de MEB a 2500x y 200x a 1 día y 7 días de cultivo en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas (Relación de %Vti): a)-d) 50:50 y e)-h) 0:100.	129
Figura 64. Micrografías de inmunofluorescencia a 10X de la expresión de F y α -actina en los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) con fibras alineadas a 7 días de cultivo: a)-b) 50:50 y c)-d) 0:100. Fotos tomadas a 10x en un microscopio de epifluorescencia Leica DMIRE2.	130
Figura 65. Viabilidad celular por medio de la reacción de la calceína acetoximetilada en los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) con fibras alineadas a 14 días de cultivo: a)-c) 50:50, d)-f) 0:100 y 21 días de cultivo: g)-i)50:50 y j)-l) 0:100. Fotos tomadas a 10x en un microscopio de epifluorescencia Leica DMIRE2.	132
Figura 66. Marcaje para F-actina de células musculares lisas sembradas en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas (Relación de %Vti) a 14 días de cultivo: a)50:50, b)0:100 y 21 días de cultivo: c)50:50 y d) 0:100. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP8 a 40x.....	133
Figura 67. Proyección en Z para el marcaje de F-actina de células musculares lisas sembradas en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas (Relación de %Vti) a 14 días de cultivo: a)50:50, b)0:100 y 21 días de cultivo: c)50:50 y d) 0:100.	134
Figura 68. Esquema del procedimiento realizado para el implante de los andamios de de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas (Relación de %Vti) 50:50 y 0:100 en el dorso de un conejo neozelandés: a) Biopsia de una parte de la vejiga del conejo, b) Aislamiento de las células musculares lisas, c) Siembra de las células musculares lisas en los andamios con fibras alineadas y d) Implante con suturas no absorbibles de los andamios a cada lado del conejo.	135

Figura 69. Evolución del cierre de la incisión que se realizó en el lugar del implante de los andamios: a) 0 días, b) 7 días y c) 30 días. 136

Figura 70. Tinciones de hematoxilina y eosina de las muestras post-implante de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU: a-b)0:100(10x-40x) y c)-d)50:50(10x-40x). A: andamio(0:100), B: capilar congestivo, C: Linfocito, D: Macrófago, E: Célula gigante de Langhans y F: andamio(50:50). 137

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Comparación entre polímeros sintéticos y naturales.....	22
Tabla 2 Resumen de estudios de prevalencia de la IF en la población general.	28
Tabla 3 Variación de la concentración de PLA.....	57
Tabla 4 Variación del voltaje aplicado	58
Tabla 5 Variación de la distancia entre aguja y colector	59
Tabla 6 Variación del flujo de inyección	60
Tabla 7 Variación del diámetro de la aguja	61
Tabla 8 Variación del disolvente.....	62
Tabla 9 Variación del % de humedad relativa	63
Tabla 10 Conductividad eléctrica de las relaciones de DMF:THF[v/v]	65
Tabla 11 Diámetro promedio de las fibras de PCU variando relación de DMF:THF [v/v] ..	66
Tabla 12 Variación de la concentración de PCU	67
Tabla 13 Condiciones óptimas de electrohilado y propiedades de la solución	68
Tabla 14 Propiedades térmicas de los andamios de PLA con colágena y elastina.	74
Tabla 15. Rapidez de proliferación celular en andamios de PLA con colágena y elastina.	90
Tabla 16 Rapidez de proliferación celular en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU.	107
Tabla 17 Rapidez de proliferación celular en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas(A) y al azar (NA).	126

1 INTRODUCCIÓN

1.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que combina los principios de la ingeniería, biología, ciencia de los materiales y la medicina con el propósito de mejorar, reparar o reemplazar la función de un tejido u órgano [1]–[3]. Esta se basa en la combinación de tres componentes básicos: células (fuentes: biopsia de órganos, tejidos, embriones o de células mesenquimales de diferente origen), andamios construidos con diferentes materiales y señales moleculares (citocinas y factores de crecimiento).

1.1.1 ANDAMIO

Un andamio para ingeniería de tejidos es un soporte o estructura donde las células son colocadas y cultivadas con objeto de que se organicen en una manera lo más parecida al tejido u órgano que se construirá. Las características más importantes para tener en cuenta a la hora de la fabricación de un andamio para ingeniería de tejidos es la selección del material y su arquitectura [4].

El primer requisito para seleccionar el material para la fabricación de un andamio, es que este sea biocompatible y promueva el crecimiento y diferenciación celular. En segundo lugar, el material no debe promover o iniciar ninguna reacción adversa en el tejido [5]. Por otro lado, el material debe posibilitar la adherencia celular.

En relación con la arquitectura del andamio, este debe tratar de recrear la morfología de una matriz extracelular nativa de un tejido u órgano determinado, la cual está compuesta por diferentes fibras ordenadas en una estructura que promueve el crecimiento celular en las tres dimensiones [6].

Además, para el éxito clínico y comercial, la fabricación de estos andamios debe ser simple y lo suficientemente versátil para producir una gran variedad de configuraciones que se acomoden al tamaño, forma, resistencia y otras complejidades del tejido u órgano a construir.

1.1.2 POLÍMEROS EMPLEADOS PARA LA FABRICACIÓN DE ANDAMIOS

Los andamios pueden ser construidos a partir de cualquiera de las tres familias de materiales: metales, cerámicos y polímeros. Sin embargo, los materiales poliméricos son los que se han utilizado con mayor frecuencia y preferencia [7].

Los polímeros utilizados en ingeniería de tejidos pueden ser de origen natural o sintético o la combinación de ambos [8]. Existen ventajas y desventajas para los dos tipos de polímeros cuando se utilizan para construir andamios en ingeniería de tejidos [9]. Estas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1 Comparación entre polímeros sintéticos y naturales

POLÍMERO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Sintético	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil procesamiento en diversas estructuras • Producción a bajo costo y reproducible • Control preciso de sus propiedades fisicoquímicas (peso molecular, degradación, propiedades mecánicas, entre otras) • Degradación generalmente por hidrólisis lo que garantiza tasas de degradación uniformes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de actividad biológica • Los productos de degradación pueden ser tóxicos o alterar el microambiente local (ej. pH) • Hidrofobicidad
Natural	<ul style="list-style-type: none"> • Alta Actividad biológica • Degradación enzimática • Hidrofilicidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Escaso debido a su alto costo • Control limitado sobre sus propiedades fisicoquímicas • Susceptibles a contaminación de virus desconocidos o enfermedades no deseadas • Propiedades mecánicas bajas

1.1.3 ELECTROHILADO

La técnica de electrohilado fue establecida en el año de 1930. Formhals diseñó un aparato para producir microfibras de polímeros con fuerzas electrostáticas, el cual fue patentado en 1934 [10]. Actualmente, esta técnica puede producir fibras poliméricas con diámetros desde 3 nm a 6 μ m. A pesar de que el concepto de electrohilado ha sido conocido desde entonces, las nanofibras poliméricas producidas por electrohilado se convirtieron en un tópico de gran interés solamente hasta la década de los noventas. Las nanofibras tienen gran área superficial y porosidad, lo cual permite interacciones favorables a nivel celular y, por lo tanto, las hacen candidatas potenciales para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Otras aplicaciones incluyen membranas de filtración, catálisis y sensores [11].

La alta productividad, sencillez y el bajo costo de los equipos de electrohilado los hacen altamente atractivos tanto para la academia como para la industria. Los componentes básicos del equipo de electrohilado consisten de una bomba de inyección, una fuente de alto voltaje y un colector. El proceso central consiste en la aplicación de un alto potencial eléctrico (varios kV) a una gota colgante de una solución polimérica o un polímero fundido, para formar una fibra delgada. Específicamente se aplica un voltaje a la aguja de la jeringa cargada de polímero dirigido a un colector conductor que sirve como contraelectrodo. La resultante del campo eléctrico externo aplicado produce un esfuerzo en dirección tangencial sobre la solución del polímero. Esto causa una deformación de la gota en forma cónica llamada “cono de Taylor”. Cuando la tensión superficial de la solución polimérica es superada por el campo eléctrico, el líquido conductor es dirigido desde el cono de Taylor hacia el colector, lo que permite la formación de un chorro fibroso. Durante ese trayecto, el disolvente se evapora y las fibras secas se depositan en el colector [12]–[15].

Las nanofibras resultantes pueden ser alineadas o no alineadas, dependiendo del tipo de colector utilizado. Las nanofibras no alineadas se caracterizan por tener grandes poros interconectados, que pueden ser utilizadas para aplicaciones en liberación de fármacos, para imitar a la matriz extracelular o como membranas. Por otra parte, las fibras alineadas pueden promover el agrupamiento y relaciones celulares, así como la dirección en que las células se posicionan [16]–[18].

La preparación de la solución polimérica y los parámetros del equipo de electrohilado pueden afectar las propiedades finales de las nanofibras. Así, el proceso de electrohilado es afectado por dos grupos de parámetros: los parámetros del sistema y los parámetros del proceso. (1) Los parámetros del sistema pueden ser el peso molecular, la distribución del peso molecular y la arquitectura del polímero. Por otra parte, las propiedades de la solución polimérica pueden ser la viscosidad, la tensión superficial y la conductividad [2]. Algunos de los parámetros del proceso que se deben considerar son: el diámetro del orificio de salida del polímero, el flujo y concentración de la solución polimérica, el potencial eléctrico, la distancia entre el orificio de salida del polímero y el colector de metal, las condiciones ambientales (temperatura, humedad y velocidad del aire en la cámara) y el movimiento del colector. Con la manipulación de estos parámetros es posible obtener diferentes variaciones en la morfología de las nanofibras.

1.2 ANATOMÍA ANORECTAL

La anatomía anorectal se presenta en la Figura 1. El recto es una víscera tubular con dos capas musculares continuas, una longitudinal externa que se entrelaza y otra circular interna. Esta disposición anatómica permite que el recto sirva como reservorio de las heces y como una bomba de vaciado de las mismas.

El ano es un tubo muscular de 2 a 4 cm de largo, que en reposo forman un ángulo con el eje del recto. En reposo, el ángulo anorrectal es aproximadamente de 90 grados, durante el aumento voluntario de la presión del esfínter anal externo este ángulo se hace agudo hasta de 70°, y durante la defecación se vuelve obtuso, entre 110–130° [19].

El esfínter anal interno (EAI), es una extensión de espesor de 0.3–0.5 cm de la capa circular del músculo liso del recto. El esfínter anal externo (EAE) es una expansión de espesor de 0.6 a 1 cm del músculo elevador del ano. Morfológicamente, ambos esfínteres están separados y son heterogéneos [20].

El ano esta normalmente cerrado por la actividad tónica del EAI y esta barrera se ve reforzada por el esfínter anal externo durante el cierre voluntario del ano. Los pliegues de la mucosa anal junto con las almohadillas vasculares anales proporcionan un sello hermético. Estas barreras mecánicas aumentan por el músculo puborrectal, que hace un efecto de válvula [21].

El anorrecto se encuentra inervado por fibras sensoriales y motoras y así como por el sistema nervioso entérico. El nervio principal es el nervio pudendo, que se origina de la segunda, tercera y cuarta raíz sacra e inerva al esfínter anal externo, la mucosa anal y la pared anorrectal. Este es un nervio mixto sensorial y motor. Es probable que el contenido rectal periódicamente sea captado por el proceso de "muestreo anorrectal". Este proceso puede facilitarse mediante relajaciones transitorias del EAI (reflejo rectoanal inhibitorio espontáneo) que permite el movimiento de las heces o gas desde el recto hacia el canal anal superior en que puedan estar en contacto con los órganos sensoriales especializados como los bulbos de Krause, órganos de Golgi–Mazzoni, corpúsculos genitales, corpúsculos de Meissner y corpúsculos de Pacini. A las fibras nerviosas aferentes de tacto, frío, tensión y fricción inervan a estas estructuras [22].

En contraste, el epitelio rectal muestra terminaciones nerviosas libres, fibras nerviosas mielinizadas y no mielinizadas están presentes adyacentes a la mucosa rectal, la submucosa y el plexo mientérico. Estas fibras proporcionan sensación de distensión estiramiento y median la respuesta víscero-visceral, el reflejo inhibitorio rectoanal y la respuesta contráctil. La sensación de distensión rectal viaja a lo largo del sistema parasimpático S2, S3 y S4. Así, los nervios sacros están íntimamente involucrados con la función sensorial, motora y autonómica del anorrecto así como de mantener la continencia.

El canal anal también recibe inervación de fibras simpáticas y parasimpáticas. Ambos inhiben el EAI. El esfínter externo recibe inervación de la rama perineal del nervio sacro cuarto y la rama rectal inferior del nervio pudendo interno. El músculo elevador del ano es inervado por ramas de los nervios pudendo, inferior rectal, perineal y sacros (S3 y S4). La sensación del canal anal proviene del nervio rectal inferior, también una rama del nervio pudendo. El epitelio del canal anal es ampliamente inervado hasta 2 cm proximal a la línea dentada [23].

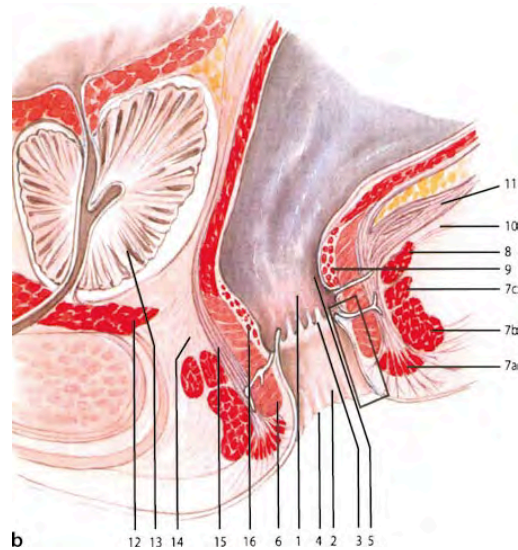


Figura 1. Sección sagital del anorecto en un hombre. 1 recto, 2 canal anal, 3 criptas anales, 4 línea ano cutánea, 5 unión anorectal, 6 esfínter anal interno, 7 esfínter anal externo, 8 músculo puborrectal, 9 cuerpo cavernoso del recto, 10 ligamento anococcígeo, 11 músculo elevador del ano, 12 músculo perineal, 13 próstata, 14 fibras musculares prerectales, 15 músculo corrugado del ano, 16 músculo de canal anal. [24]

En resumen, los mecanismos de continencia fecal requieren de un trabajo coordinado entre el piso pélvico, recto, EAI y externo.

1.3 INCONTINENCIA FECAL

La incontinencia fecal (**IF**) es una patología que puede ser devastadora para quienes la padecen, asociándose a una disminución de la autoestima y reducción de la calidad de vida de los pacientes. Aunque no existe un consenso en la definición, generalmente se acepta como el paso incontrolable continuo o recurrente de deposiciones (>10 mL) de consistencia sólida, líquida y gases por períodos de al menos un mes, en pacientes mayores de 4 años. Se reconocen tres subtipos por valoración clínica: a) incontinencia pasiva (descarga involuntaria de heces o gas sin tener conciencia de ello), b) incontinencia de urgencia (descarga de materia fecal a pesar de intentos voluntarios para evitarlo) y c) escape fecal (fuga de materia fecal después de una defecación normal) [25]–[27].

Aunque se trata de una patología frecuente, su prevalencia es variable dependiendo de la definición utilizada y de la población estudiada. Las cifras son difíciles de obtener por la reticencia y vergüenza de las/los pacientes que presentan este problema. Sólo un 1/3 de los pacientes con IF son capaces de discutir su sintomatología con su médico tratante. Estudios recientes muestran una prevalencia en la comunidad en rangos de 2 a 24%,

dependiendo del grupo estudiado. La edad es un factor a considerar al momento de evaluar la prevalencia de esta patología llegando desde un 2.6% en personas entre 20 a 29 años hasta un 15% en personas mayores de 70 años. Asimismo, entre niños en edad escolar se estima una prevalencia aproximada de 1 a 2%. Sin embargo, en atendidos en instituciones de seguridad social, los estudios tanto internacionales como nacionales describen una frecuencia del 30 al 45% en diferentes grupos de edad. Por otra parte, aunque el impacto económico de este trastorno es difícil de calcular, se ha estimado que el costo total promedio anual (reportado en el año 2010) de la IF es de \$4,110 USD por persona.

Además de la edad, han sido identificados otros factores de riesgo para desarrollar IF, destacando la presencia de un estado de salud deteriorado, limitaciones físicas generales, quimioterapia, radioterapia pelviana, alteraciones neurológicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de intestino irritable, incontinencia urinaria, diarrea crónica, cirugía anorrectal en pacientes con cáncer de recto y/o ano, y malformaciones anorrectales. En pacientes con cáncer de recto y/o ano, la IF puede aparecer por un daño post quirúrgico tanto muscular como de las estructuras vecinas, como las inervaciones. Por otra parte, las malformaciones anorrectales son alteraciones congénitas que afectan a 1 de cada 3,000 a 5,000 nacidos vivos. Son más frecuentes en varones e incluyen anomalías menores reparables con cirugía simple y lesiones complejas muy difíciles de corregir [28].

1.3.1 PREVALENCIA Y COSTOS DE LA INCONTINENCIA FECAL

Por los diversos estudios de la IF se deduce una elevada prevalencia en la población general y que ésta tiene una gran repercusión en diversos aspectos de la vida de los que la padecen. Sin embargo, su frecuencia real no se conoce.

Tal como se puede apreciar en la Tabla 2, la prevalencia descrita para la IF oscila entre un rango que va desde el 1,4 al 46%. Esta variación puede explicarse en gran parte por las diferentes poblaciones estudiadas, el tipo de encuesta, la herramienta de medida y los tamaños de la muestra. Pese a ello, hay algunos hechos que se repiten, como que su incidencia aumenta de forma significativa en pacientes de edad avanzada o atendidos en instituciones de salud pública. De hecho, en estos casos más del 50% de la población presentan algún tipo de IF [29].

El hecho de que, todavía hoy en día, la IF siga siendo un tabú y que el paciente no relate sus síntomas fácilmente al médico que le atiende, hace pensar que exista una cierta infraestimación de la prevalencia, y sea éste también uno de los motivos de esta gran variabilidad.

Para obtener datos aproximados de la prevalencia de la IF se pueden analizar los diversos estudios referentes al tema, algunos de los cuáles quedan resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2 Resumen de estudios de prevalencia de la IF en la población general[29].

Autor / país / año	Origen y edad de la	Herramienta de	IF a	Tamaño	Prevalencia
Kalantar / Australia / 2002 ⁸⁵	Listas electorales (>18 a)	Encuesta por correo	No	642	11,2 11,6 ♀/10,8 ♂
Perry / Reino Unido / 2002 ⁷⁵	Registro de salud (>40 a)	Encuesta por correo	No	10226	1,4 (IF mayor) 1,7 (IF menor)
Melville / EUA / 2005 ⁸⁶	Mujeres de una corporación de salud (30-90 a)	Encuesta por correo	No	3536	7,2
Ho / Australia / 2005 ⁸⁷	CCEE de ginecología y cirugía colorectal (>18)	Encuesta escrita	No	435	20,7
Quander / EUA / 2005 ⁸⁸	Estudio de salud (>65 a)	Entrevista directa	NC	6099	9,6
Martínez-Espinoza / México / 2006 ⁸⁹	Mujeres de zona metropolitana (>15 a)	Entrevista directa	Sí	352	3,4
Varma / EUA / 2006 ⁹⁰	Mujeres de programa de atención médica (40-69 a)	Encuesta escrita	Sí	2106	24
Nygaard / EUA / 2008 ⁹¹	Encuesta de salud a mujeres (>20 a)	Entrevista Directa	No	1961	9
Amaro / Brasil / 2009 ⁹²	Mujeres (>20 a)	Encuesta por correo y entrevista directa	No	685	2
Aitola / Finlandia / 2009 ⁹³	Registro nacional (30-81 a)	Encuesta por correo	Sí	3163	10,6 (1 año) 19,5 (gases)
Whitehead / EUA / 2009 ⁹⁴	Encuesta de salud (>20 a)	Entrevista directa	Sí	4308	8,3 48,5 (gases)
Hughes / EUA / 2009 ⁷⁶	Medicina interna de 3 hospitales (18-85 a)	Entrevista directa	No	199	46
Sharma / Nueva Zelanda / 2011 ⁹⁰	Listas electorales (>18)	Encuesta por correo	No	1169	12,4
Bottero / Australia / 2011 ⁹⁵	Mujeres de listas electorales (26-82 a)	Encuesta por correo	No	442	20,7
Alsheik / EUA / 2011 ⁹⁶	CCEE de gastroenterología (17-84 a)	Entrevista directa y estudio retrospectivo ⁹	Sí	500 500 ⁹	11,6 2,4 ⁹

1.3.2 FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo más importantes por los cuales se puede desarrollar la IF se enlistan a continuación [30]:

- Obstétrica (Parto vaginal).
- Enfermedad coló-rectal, ano-rectal: Hemorroides, colitis.
- Cirugía anorectal: En pacientes con cáncer de recto y/o ano, la IF puede aparecer por un daño post quirúrgico tanto muscular como de las estructuras vecinas, como de las inervaciones.
- Radioterapia (radiación pélvica).
- Malformaciones anorectales: 1 de cada 3,000 a 5,000 nacidos vivos. Incluyen anomalías menores reparables con cirugía simple y lesiones complejas muy difíciles de corregir.
- Accidentes o traumatismos.
- Edad.
- Obesidad.

1.3.3 TRATAMIENTOS QUIRÚRGICOS PARA LA INCONTINENCIA FECAL

Las distintas técnicas quirúrgicas existentes para el tratamiento de la incontinencia fecal se pueden clasificar en intervenciones diseñadas para corregir anomalías del suelo pélvico, neuroestimulación de las raíces sacras y, finalmente intervenciones para corregir anomalías del esfínter anal. A continuación se explicaran en detalle algunas de estas técnicas [31] .

1.3.3.1 ESFINTEROPLASTÍA

La esfinteroplastia fue inicialmente descrita por Lockhart-Mummary en 1923, reportando la aposición de los cabos del esfínter externo dañado. Posteriormente, esta técnica se popularizó gracias a la publicación de Parks, quien describió por primera vez la técnica de “superposición” muscular. Desde entonces, se ha considerado a esta técnica quirúrgica el tratamiento de elección en pacientes con daño esfinteriano.

Sin embargo, los trabajos de seguimiento a largo plazo demuestran un deterioro funcional con el paso del tiempo, disminuyendo su efectividad inicial. Es así como las publicaciones

con seguimientos a corto plazo alcanzan el 70 al 90% de éxito. En las publicaciones con seguimiento a más de 5 años la efectividad de la técnica disminuye hasta el 50%. Esto demostraría la importancia de otros factores en la continencia fecal, aparte de la indemnidad anatómica esfinteriana.

La esfinteroplastia es usualmente indicada en IF asociada a daño esfinteriano secundario a trauma obstétrico o a lesiones iatrogénicas post cirugía proctológica (ej: fístulas complejas). Se ha tratado de determinar cuáles serían los mejores candidatos para este tipo de cirugía, publicándose que los pacientes con peor resultado son aquellos con grandes defectos anatómicos (defecto esfinteriano mayor de 120°) y en pacientes portadores de neuropatía del pudendo. Asimismo, los pacientes mayores de 50 años tendrían un peor pronóstico funcional a largo plazo [32].

1.3.3.2 NEUROESTIMULACIÓN DE LAS RAÍCES SACRAS

Consiste en la estimulación eléctrica de las raíces sacras mediante la colocación de un electrodo en el plexo sacro. Este tratamiento está indicado en pacientes con IF neurogénica, esfínteres intactos o fracaso en la reparación esfinteriana y contraindicado si existe pérdida muscular perianal significativa. Se ha señalado una mejoría clínica de la IF consiguiendo un porcentaje de buena respuesta (reducción del 50% en los episodios de IF) del 85%. Se han descrito complicaciones en el 13% como dolor, migración del electrodo, infección superficial y ruptura del sistema. Sin embargo, su comorbilidad, la respuesta a largo plazo y la eficacia están aún por ser definidos [33].

1.3.3.3 AGENTES DE RELLENO

En el tratamiento de pacientes con incontinencia fecal, el uso de la inyección de agentes de relleno fue descrito por primera vez por Shafik en 1993, utilizando poli(tetrafluoroetileno) en 11 pacientes. Esta terapia estaría indicada en pacientes con defecto del esfínter anal interno o en pacientes con debilidad del aparato esfinteriano sin daño anatómico. Desde ese primer reporte se han utilizado diversos agentes con el fin de aumentar la presión de reposo en la zona submucosa anal. Hay alrededor de 10 agentes descritos, siendo los más frecuentes el PTQ ® y el Durasphere ®.

La forma de administrarlo, varía según el estudio analizado, reportándose grupos de trabajo que inyectan la sustancia de forma totalmente ambulatoria, hasta protocolos que lo hacen con los pacientes bajo anestesia general.

La técnica de inyección se puede clasificar entre las que inyectan el material en el espacio submucoso, espacio interesfintérico o directamente en la zona del defecto esfinteriano.

En una revisión sistemática publicada el año 2011, con 39 estudios, de los cuales 5 eran estudios aleatorios controlados, se describe que en el seguimiento a corto plazo (hasta 3 meses), un 56% de los pacientes refirió mejoría de su sintomatología. En el seguimiento a largo plazo (más de 12 meses) hay escasos reportes, manteniendo una buena respuesta solamente en el 45% de los pacientes. Se destaca como factor de riesgo el uso de anestésico local en la aplicación del agente de relleno. En esta revisión los efectos adversos alcanzaron a un 13,5% de los pacientes, siendo el dolor (6,5%) y la filtración de material inyectado los más frecuentes. Otros efectos adversos son la formación de abscesos de la zona de la inyección, eventos hemorrágicos de la zona de la inyección, hipersensibilidad, reacción a cuerpo extraño y prurito persistente de la zona. La vía de administración interesfintérica se asoció con mayor posibilidad de eventos adversos [34].

1.3.3.4 GRACILOPLASTIA

El uso de la reconstrucción del aparato esfinteriano con músculo gracilis estimulado fue descrito por primera vez por Baeten y colaboradores en 1988. El procedimiento, denominado Graciloplastia dinámica consiste en posicionar el músculo gracilis alrededor del aparato esfinteriano dañado o no existente, creando un neo esfínter muscular y posteriormente estimularlo eléctricamente con un generador eléctrico programable, de manera de transformar las fibras musculares originales, tipo II en fibras de actividad prolongada o tónicas tipo I. Esta técnica ha caído en desuso por la complejidad, costo y alto porcentaje de morbilidad y bajo porcentaje de éxito a largo plazo [35].

1.3.3.5 ESFÍNTER ANAL ARTIFICIAL

La implantación de un esfínter artificial (Figura 2) es considerada en aquellos pacientes en quienes han fracasado tratamientos menos invasivos y en quienes no cuentan con un sustrato anatómico adecuado para la cirugía reconstructiva. Esta terapia estaría indicada para lograr la restitución anatómica y funcional anorrectal en casos de malformaciones anorrectales, cirugía reconstructiva oncológica y trauma anorrectal. Las experiencias publicadas corresponden a series de bajo volumen, en trabajos no aleatorios, mostrando morbilidad importante, especialmente relacionada con el riesgo de infección y erosión por el dispositivo (Figura 3) y la necesidad de explantarlo. La literatura muestra que

aproximadamente un tercio de los pacientes requirieron explantación del esfínter al término del período de seguimiento. Esta cifra se acerca al 50% en series con seguimientos de al menos 5 años [36].



Figura 2. Esfínter anal artificial[37]



Figura 3. Esfínter anal artificial. Erosión perineal[31]

Por lo tanto, el tratamiento quirúrgico para el manejo de la incontinencia fecal representa un reto para el cirujano, y desafortunadamente, el resultado a largo plazo no es satisfactorio, ya que la tasa de curación es inferior al cincuenta por ciento después de cinco años [30].

1.3.4 ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN LA REGENERACIÓN DEL ESFÍNTER ANAL

El tratamiento quirúrgico para el manejo de la incontinencia fecal representa un reto para el cirujano, y desafortunadamente, el resultado a largo plazo no es satisfactorio, ya que la tasa de curación es inferior al cincuenta por ciento después de cinco años.

Es por ello que la terapia con células troncales y la ingeniería de tejidos representan un enfoque prometedor para reemplazar, reparar o mejorar las funciones biológicas de un esfínter dañado.

1.3.4.1 TERAPIA CON CÉLULAS TRONCALES

Las células troncales mesenquimales son capaces de desempeñar tres funciones importantes con habilidades únicas:

- Plasticidad: su potencial para transformarse en otros tipos celulares.
- Retorno: su capacidad migratoria hacia sitios de inflamación.
- Prendimiento: su capacidad para adherirse al tejido dañado.

Los tejidos de donde frecuentemente se obtienen células troncales para terapia celular son extraídas de médula ósea, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo y muscular. Las células madre mesenquimales tienen la habilidad de diferenciarse en células óseas, musculares, adiposas, neuronales, y cartilaginosa. Las células troncales adultas autólogas, extraídas de tejidos maduros de los pacientes, muestran la misma morfología, fenotipo y capacidad de diferenciación que las células madre obtenidas de la sangre del cordón umbilical. Están fuera del debate ético y provienen generalmente de un tipo de tejido que es abundante y de fácil acceso (médula ósea y tejido adiposo). Una sola muestra de tejido adiposo puede producir más de 200 millones de células troncales de las cuales 95% son células troncales mesenquimales [38].

En el año 2008 apareció en la literatura el primer trabajo sobre el uso de células troncales autólogas en la reparación de lesiones del esfínter anal. El estudio experimental se realizó en ratas sometidas a lesión del esfínter anal en las cuales se inyectaron células mesenquimales extraídas del músculo gastrocnemio. Los resultados mostraron una mayor

amplitud de contracción del esfínter [39] en el grupo experimental comparado contra el control.

Eberli y cols. propusieron inyectar células autólogas precursoras de músculo en el esfínter anal dañado para que en el sitio de implantación se forme nuevo tejido muscular funcional [40].

Con relación a estudios clínicos, en 2010, Frudinger A. y colaboradores [39] publicaron un estudio realizado en pacientes con incontinencia fecal por traumatismo obstétrico en el que inyectaron mioblastos autólogos. El estudio concluyó que la inyección de mioblastos autólogos es segura, bien tolerada y mejora significativamente los síntomas de la incontinencia anal, en el caso del traumatismo obstétrico.

González Q.H y colaboradores realizaron un estudio piloto donde implantaron células de músculo estriado para el tratamiento de la incontinencia fecal, los resultados fueron favorables para daños en el esfínter anal menor al 25%.

Hoy en día diversos grupos trabajan en definir el mejor método y tipo de células madre para usar en pacientes con IF [38].

1.3.4.2 INGENIERÍA DE TEJIDOS COLO-RECTAL

Bitar N.K. y cols [41] estudiaron la fisiopatología de los desórdenes del esfínter anal interno en los humanos. Para ello han construido modelos de anillos esfintéricos *in vitro*, cultivando células musculares lisas aisladas del esfínter anal interno de humano en moldes de fibrina de 5 mm de diámetro. El modelo construido de células musculares lisas ha sido implantado en el tejido subcutáneo de ratones de 8 semanas de edad. Los resultados han mostrado que no hay rechazo ni inflamación. Asimismo, agregaron el factor de crecimiento fibroblástico, mostrando una gran significancia con relación a la viabilidad del músculo, vascularización y supervivencia en comparación con el grupo control.

Así, los trabajos más prometedores en el campo de la ingeniería de tejidos para la reconstrucción de un esfínter anal dañado corresponderán al estudio y uso de un soporte, matriz o andamio donde se cultivaran las células, de manera que se pueda recuperar tanto estructura como función, ya que hasta el momento en la literatura no se ha reportado.

2 JUSTIFICACIÓN

La incontinencia fecal es una condición que genera graves problemas físicos y sociales a los pacientes que la padecen y, desafortunadamente en la actualidad no hay soluciones exitosas a largo plazo para ellos. Además, hasta el momento en la literatura no se ha reportado el uso de andamios poliméricos biocompatibles que simulen la estructura y función característica de un esfínter, para el tratamiento de esta enfermedad. Por lo tanto, es de gran importancia poder desarrollar y evaluar nuevas formulaciones de andamios poliméricos para su potencial aplicación en el diseño de un esfínter bioartificial para que cumpla con las funciones fisiológicas requeridas y que no produzca ningún rechazo, así se podrá dar inicio a una nueva alternativa para el manejo de esta grave enfermedad.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar constructos tisulares a partir de polímeros de poli(carbonato-uretano) (PCU), poli(ácido láctico) (PLA), colágena (COL) y elastina (ELAS) y células musculares lisas para su potencial aplicación en la regeneración tisular del esfínter anal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener andamios de poli(ácido láctico), colágena, elastina y poli(carbonato-uretano) con fibras al azar y alineadas mediante la técnica de electrohilado con sistema de inyección simple y simultánea.
- Caracterizar fisicoquímica y mecánicamente los andamios electrohilados con fibras al azar y alineadas.
- Caracterizar el fenotipo de las células musculares lisas aisladas de la vejiga de conejo por medio de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.
- Evaluar *in vitro* la viabilidad y proliferación de células musculares lisas en los andamios electrohilados con fibras al azar y alineadas.
- Evaluar por medio de inmunofluorescencia el fenotipo de las células musculares lisas sembradas en los andamios electrohilados con fibras al azar y alineadas.

- Determinar la biocompatibilidad de los constructos (andamios + células musculares lisas) formados *in vitro*, implantándolos subcutáneamente en un modelo animal *in vivo*.

4 PARTE EXPERIMENTAL

Este trabajo fue un estudio experimental y exploratorio que se llevó a cabo en el Laboratorio de Nanofibras Poliméricas del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM y en el laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Hospital Infantil de México Federico Gómez con número de protocolo aprobado HIM/2013/025.

4.1 MATERIALES

4.1.1 REACTIVOS USADOS PARA LA FABRICACIÓN DE ANDAMIOS

Poli (ácido láctico) (PLA) (Natureworks 2002D) y poli(carbonato-uretano) (Bionate II 55D, DSM Biomedical Company). Colágena (COL) tipo I extraída de piel de bovino y elastina (ELAS) de ligamento de bovino (Elastin Products Company, Inc.). Dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), trifluoroetanol (TFE), dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma Aldrich).

4.1.2 REACTIVOS USADOS EN EL CULTIVO CELULAR

Solución amortiguadora (1X) pH 7.4 (PBS), medio de cultivo Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino (SFB), antibiótico y antimicótico (100x) (AA), colagenasa tipo I, tripsina(10x), y solución salina balanceada de Hanks (1x) (Gibco®). Kit para inmunohistoquímica DAKO EnVision™ + System, Peroxidase (DAKO EnVision™+ System, HRP), anticuerpos primarios monoclonales de ratón (alfa actina de músculo liso, miosina de músculo liso SMMMS-1, caldesmona y calponina) (Dako). Anticuerpo primario monoclonal de ratón para alfa actina de músculo liso (Abcam), anticuerpos secundarios (Alexa fluor 488 y 594), Oregon Green 488 faloidina, slowfade gold antifade mountain with DAPI, azul tripano (0.4%) y calceína acetoximetilada (Life technologies). Paraformaldehído, bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT), etanol absoluto, acetona, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, albumina de bovino, tritón X-100 y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma- Aldrich).

4.2 FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS

A continuación, se presenta un esquema general de los procedimientos que se llevaron a cabo:



Esquema 1. Procedimientos generales de la experimentación

4.2.1 FABRICACIÓN DE ANDAMIOS (PRIMERA ETAPA)

El equipo de electrohilado utilizado se muestra en la Figura 4. En esta etapa se utilizaron dos tipos de colectores de fibras, el clásico colector estático (Figura 5) y además se realizó el diseño y fabricación de un colector dinámico con movimientos en x y y con la colaboración del Ing. Ulises Edmundo Espinoza Nava (Figura 6). Se optimizaron los parámetros de electrohilado de las siguientes soluciones poliméricas:

- PLA
- PLA-COL
- PLA-ELAS
- PLA-COL-ELAS

➤ PCU

En las siguientes figuras se presenta el equipo de electrohilado y colectores que se utilizaron:

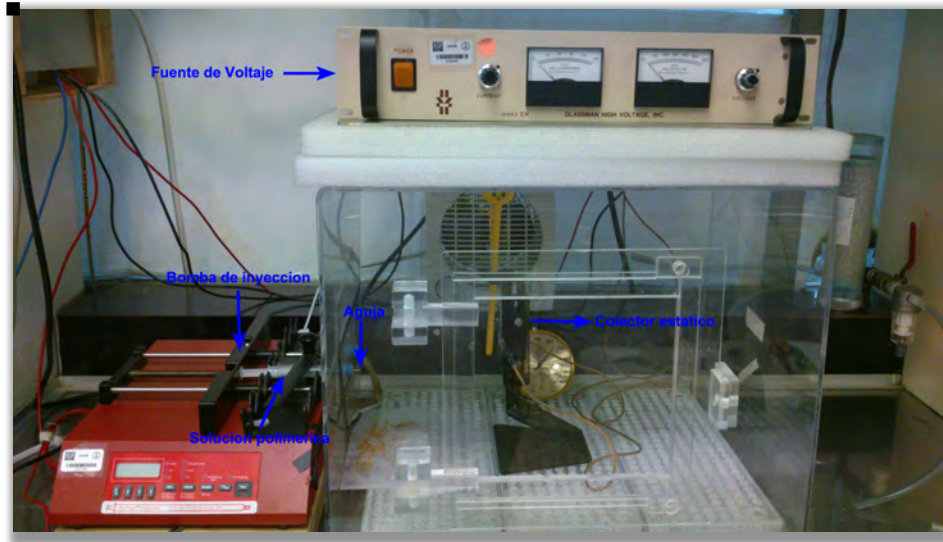


Figura 4. Equipo de electrohilado IIM-UNAM

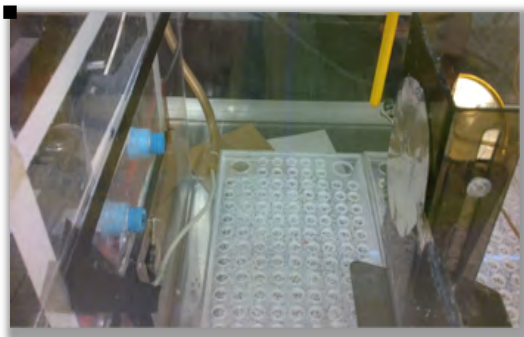


Figura 5. Colector estático

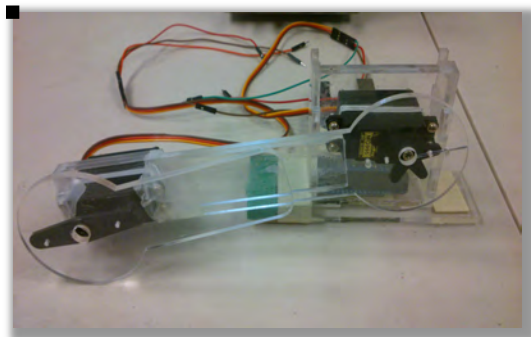
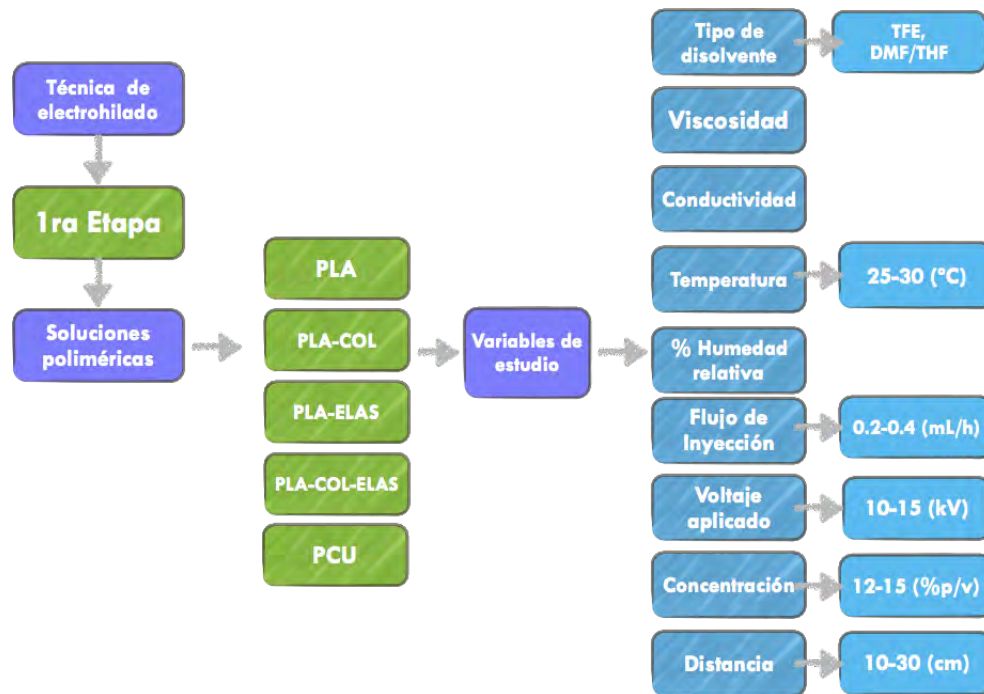


Figura 6. Colector dinámico

A continuación, se presenta el esquema del proceso realizado:



Esquema 2. Procedimientos de la primera etapa de fabricación de andamios

4.2.2 FABRICACIÓN DE ANDAMIOS (SEGUNDA ETAPA)

En esta etapa se realizó el diseño y fabricación de un colector de fibras utilizando cilindros rotatorios con la colaboración del Ing. Ulises Edmundo Espinoza Nava (Figura 7). Se utilizó un sistema de inyección simple y además se implementó el sistema de inyección simultáneo (Figuras 8 y 9). Posteriormente, se optimizaron los parámetros de electrohilado para las siguientes soluciones poliméricas de acuerdo al volumen total inyectado (%Vti) y al andamio seleccionado de la etapa 1 (AE1):

- PCU(25%Vti), AE1(75%Vti)=A6
- PCU(50%Vti), AE1(50%Vti)=A7
- PCU(75% Vti), AE1(25% Vti)=A8
- PCU(100%Vti)=A9

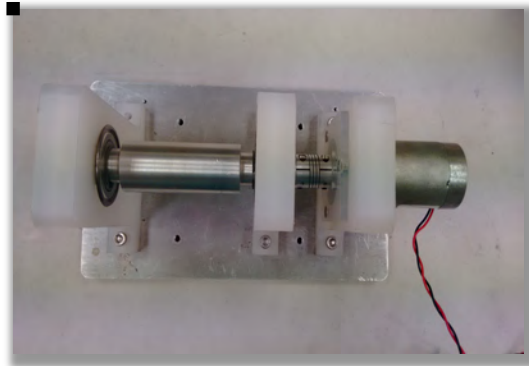


Figura 7. Colector con cilindro rotatorio. Diseño y construcción por Alida Ospina Orejarena y Ulises Edmundo Espinoza Nava.

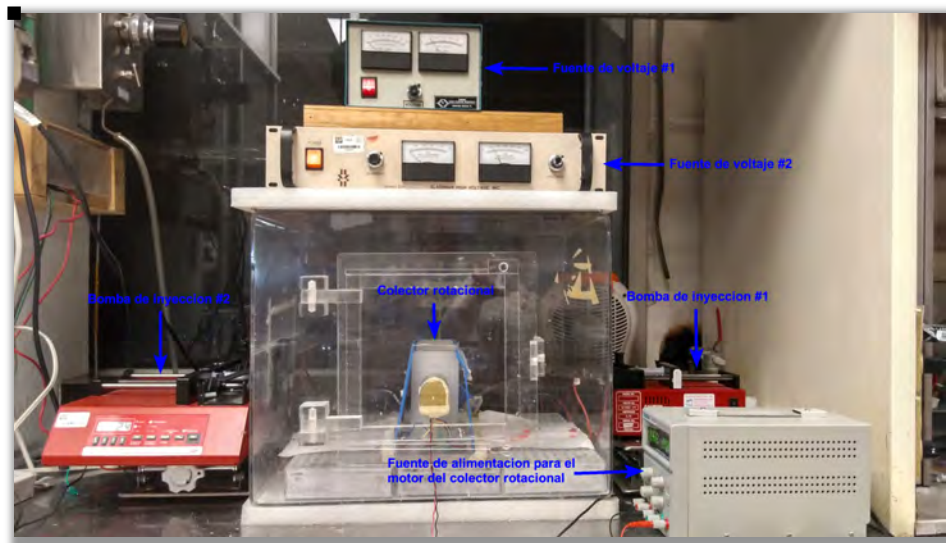


Figura 8. Montaje sistema de electrohilado con inyección simultánea.

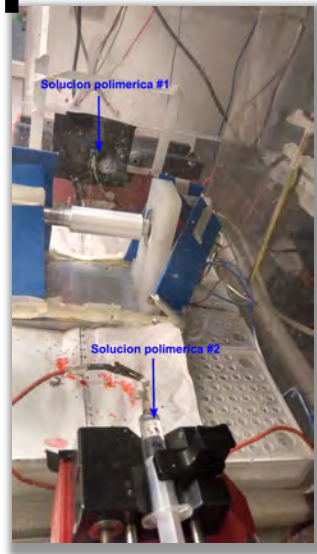
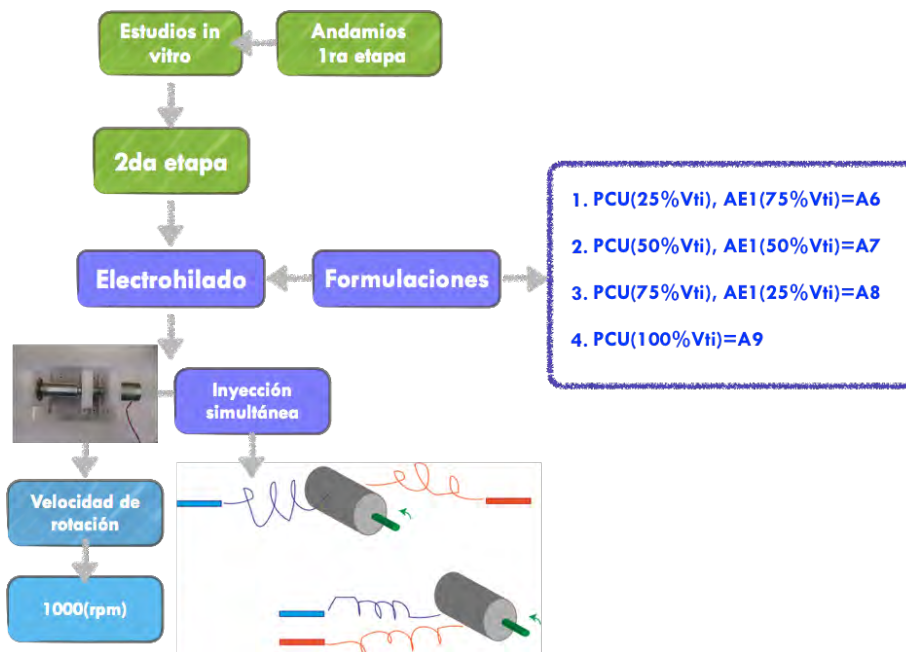


Figura 9. Electrohilado con sistema de inyección simultánea

A continuación, se presenta el esquema del proceso realizado:

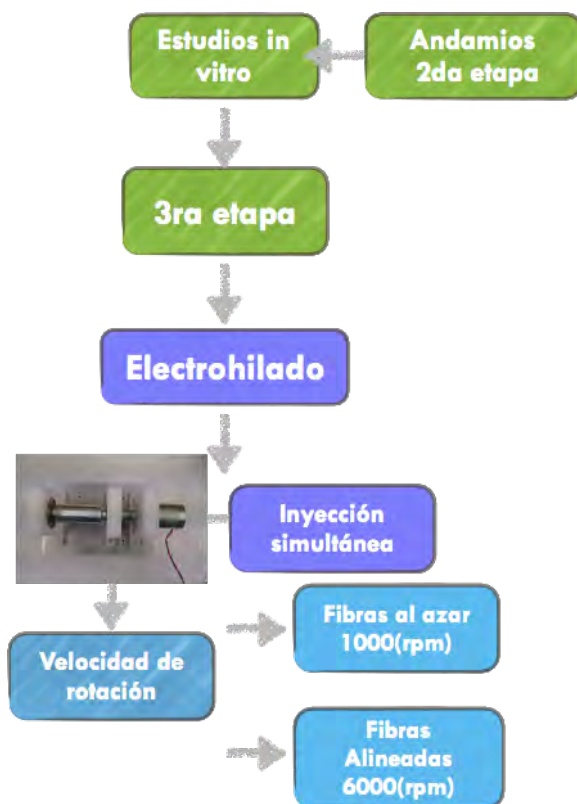


Esquema 3. Procedimientos de la segunda etapa de la fabricación de andamios

4.2.3 FABRICACIÓN DE ANDAMIOS (TERCERA ETAPA)

En esta etapa se fabricaron andamios de la formulación seleccionada en la etapa 2 (AE2) con fibras alineadas y al azar mediante la manipulación de la velocidad de rotación del cilindro y se utilizó el sistema de inyección simple y simultáneo.

A continuación, se presenta el esquema del proceso que se llevó a cabo:



Esquema 4. Procedimientos de la tercera etapa de fabricación de andamios

4.2.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS

4.2.4.1 ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO (ATR-FTIR)

La composición química de los andamios fue determinada mediante esta técnica. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en el intervalo de 4000-550 cm^{-1} , con un espectrómetro ATR-FTIR, Thermo Scientific Nicolet 6700.

4.2.4.2 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

La temperatura de transición vítrea (T_g), la temperatura de cristalización (T_c) y la temperatura de fusión (T_f) de los andamios fueron determinadas por medio de la técnica de calorimetría diferencial de barrido en un equipo Q2000 TA Instruments. Las muestras fueron llevadas hasta 200 °C a una velocidad de calentamiento de 10°C /min.

4.2.4.3 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

Las curvas termogravimétricas se obtuvieron en un equipo Q5000 IR. Las muestras, aproximadamente de 2 mg, fueron sometidas a calentamiento desde 25 hasta 400 °C, a 10°C/min bajo atmósfera de nitrógeno. A través de esta técnica se determinó la degradación y estabilidad térmica de cada una de las muestras de andamios.

4.2.4.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

La morfología de los andamios electrohilados fue observada mediante esta técnica en un microscopio Jeol modelo 7600f, equipado con filamento de tungsteno (W). Las muestras fueron previamente recubiertas con oro por medio de pulverización catódica asistida por plasma. La distribución de diámetros, el diámetro promedio y el porcentaje de área porosa ($\% \phi$) se calcularon a partir de las micrografías obtenidas con ayuda del software ImageJ 1.44p.

4.2.4.5 ENSAYO DE TENSIÓN

Se realizó en un equipo ensamblado en el laboratorio del Dr. Francisco Sánchez Arévalo del Instituto de investigaciones en Materiales de la UNAM el cual ha sido calibrado y validado para ensayos micromecánicos de tensión uniaxial, con una celda de carga de 110 N, una carrera de 50 mm y mordazas diseñadas para evitar desplazamientos en la probeta durante la prueba. La velocidad de deformación utilizada fue de 0.16 mm/s y una distancia entre mordazas de 13 mm. Las probetas fueron cortadas con medidas de 1 cm de ancho y 3 cm de largo, teniendo en cuenta la norma ASTM D882-02. Cada una de las probetas fueron esterilizadas e incubadas con medio de cultivo suplementado a 37°C durante 24 horas antes del ensayo. Se utilizaron cinco probetas por cada muestra.

4.2.4.6 ÁNGULO DE CONTACTO

El ángulo de contacto de cada uno de los andamios se midió utilizando un goniómetro Rame-hart inc modelo 100-07-00, adaptado con un sistema óptico para observar la interacción de la gota del líquido evaluado con la superficie del andamio. El análisis de imágenes se realizó mediante el plugin Drop analysis LB-ADSA del programa Image J. La muestra evaluada fue de 2x2 cm² de área y fue previamente esterilizada mediante irradiación UV de 254 nm de longitud de onda. Se realizaron cinco mediciones por muestra.

4.2.4.7 LÍMITE DE HINCHAMIENTO

Se cortaron andamios de 1x1 cm² y se esterilizaron mediante irradiación UV de 254 nm de longitud de onda por 1 h. Posteriormente, se incubaron con 500 µL de medio de cultivo DMEM suplementado con 1% de AA y 10% de SFB a 37°C. A intervalos determinados se extrajeron las muestras incubadas de cada andamio, a las cuales se le retiró el medio no absorbido mediante un papel filtro (Whatman) e inmediatamente se pesaron por medio de una balanza analítica (Radwag AS220/C/2) y luego fueron regresadas al contenedor con medio de cultivo del que fueron extraídas. La evaluación del % de hinchamiento se evaluó mediante la siguiente ecuación[42]:

$$H(\%) = \frac{W_h - W_s}{W_s} \times 100$$

Donde H es el porcentaje de líquido atrapado en el andamio, W_h es el peso de la muestra húmeda y W_s es el peso de la muestra en seco.

4.3 ESTUDIOS IN VITRO

4.3.1 OBTENCIÓN DEL CULTIVO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS AISLADAS DE LA VEJIGA DE CONEJOS NEOZELANDESES

Se extrajo mediante cirugía la vejiga de un conejo neozelandés previamente sedado, teniendo en cuenta los protocolos de manejo con animales y con los procedimientos indicados en el protocolo del proyecto aprobado número HIM/2013/025 por el comité de ética del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se retiró el líquido interno y se retiraron las venas circundantes al tejido. A continuación, se introdujo el tejido a un tubo

que contenía 25 mL de medio DMEM para transportar. Luego se retiró el medio de transporte y se agregó PBS 1X para lavar mediante centrifugación por 7 minutos a 2,000 rpm. Al término de este tiempo se retiró el tejido de la solución de PBS y se introdujo a una caja de cultivo para retirar la mucosa interna de la vejiga que contiene células epiteliales que no eran de nuestro interés. Luego se lavó dos veces con medio DMEM mediante centrifugación por 7 minutos a 2000 rpm. Finalmente, se trozo el tejido en una caja de cultivo y se agregaron 10 mL de colagenasa tipo I para disgregar la matriz extracelular que contiene las células, y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas, los trozos de tejido con la enzima se extrajeron de la incubadora y se agregaron a un tubo de centrifuga de 50 mL y se agregaron medio DMEM hasta completar 25 mL y se resuspendió la solución por 5 min. Luego se llevó a la centrifuga por 7 min a 2,000 rpm. Terminado el tiempo se retiró el sobrenadante y se agregaron 5 mL de medio DMEM y se llevó de nuevo a la centrifuga. Luego se extrajo el tubo, se retiró el sobrenadante y se agregaron 4 mL de medio DMEM. Se tomó 1 mL de la suspensión celular y se agregó a cuatro cajas de cultivo, a las cuales se completó con 9mL de medio DMEM y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 7 días para que las células musculares lisas migraran del tejido y se adhirieran a la placa.

4.3.2 SUBCULTIVO DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE VEJIGA DE CONEJO NEOZELANDÉS

Se observó el cultivo al microscopio para comprobar el estado de las células, una vez que las células se encontraron confluentes, se retiró el medio de cultivo de cada caja y se añadió 8 mL de una solución de PBS+EDTA y se incubó a 37°C por 3 min. Luego se retiró el PBS+EDTA y se agregó 8 mL de una solución de tripsina+EDTA precalentada a 37°C y se incubó por 5 min. Pasado los 5 min se retiraron las cajas y se golpearon ligeramente contra la palma de la mano para separar las células de la superficie y se comprobó en el microscopio que las células se desprendieran de la superficie de cultivo. Posteriormente, se añadió 16 mL de medio de cultivo a cada caja donde se realizó la tripsinización y se lavó, tomando el medio de cultivo y proyectándolo sobre la capa de células para favorecer su separación de la caja. En seguida, se recogió la suspensión de células y se colocó en un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2000 rpm por 7 min. Se retiró el sobrenadante y se añadió 5 mL de medio de cultivo para re-suspender las células. Finalmente, se estimó la viabilidad mediante el método de azul tripano utilizando un contador de células automático

(Life technologies) y se tomó 1 mL de la suspensión celular y se agregó a cinco cajas de cultivo, a las cuales se le había agregado 9 mL de medio de cultivo. Se marcaron las cajas con el número de pase, y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

4.3.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS POR MEDIO DE INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA

Se validó el fenotipo característico de las células musculares lisas obtenidas de la vejiga de conejo mediante el marcaje de la expresión de los antígenos característicos de este tipo de células los cuales son: α -actina, miosina, calponina y caldesmona. Para ello se sembraron células musculares lisas en placas Labtek de 8 pozos (sistema de cámara de cultivo sobre portaobjetos) a una concentración de 5000 células/ pozo. Una vez que las células estaban confluentes, se procedió a realizar la caracterización por medio de la técnica de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, a continuación, se detallan los pasos realizados:

4.3.3.1 INMUNOHISTOQUÍMICA

- Se retiró el medio de cultivo y se lavaron 2 veces con PBS 1X.
- Se fijaron las células con 400 μ L de una solución 1:1 (v/v) de metanol-acetona por 5 min a 4°C.
- Se retiró el fijador y se lavó tres veces con 400 μ L de PBS 1X.
- Se agregaron gotas del bloqueador de peroxidasa hasta cubrir la monocapa de células y se dejó actuar por 10 min.
- Se retiró el bloqueador y se lavó con 300 μ L de Triton X-100 al 0.01%(v/v) en PBS 1X.
- Se agregaron 100 μ L del anticuerpo primario diluido 1:100 (v/v) en una solución de albumina de bovino al 1%(v/v) en PBS 1X y se dejó incubando por 30 min.
- Se retiró el anticuerpo y se lavó con 300 μ L de Triton X-100 al 0.01%(v/v) en PBS 1X.
- Se aplicó suficiente LABELLED POLYMER-HRP ANTIMOUSE (cubriendo perfectamente la monocapa) y se incubo por 30 min.
- Se retiró el anticuerpo y se lavó con 300 μ L de Triton X-100 al 0.01% (v/v) en PBS 1X.

- Se eliminó el exceso de líquido y se aplicó suficiente DAB+ sustrato-cromógeno (cubriendo perfectamente la monocapa), se incubó por 7 min a temperatura ambiente.
- Se retiró y se lavó con agua destilada.
- Se agregó agua amoniacal a 0.037 mol/L por 2 segundos, y se lavó con suficiente agua destilada.
- Se deshidrató la preparación, usando etanol al 50%v/v durante 5 min, posteriormente etanol al 70%v/v (5 min), etanol al 80%v/v (5 min), etanol al 90%v/v (5 min), etanol absoluto(5min), etanol-xilol (1:1, v/v) (5 min) y finalmente se transfirió a xilol (5 min).
- Se despegó la cámara del portaobjetos y se colocó suficiente medio de montaje en cada recuadro, y se colocó un cubreobjetos. Finalmente se selló la preparación con esmalte y se observó en el microscopio Leica en campo claro.

4.3.3.2 INMUNOFLUORESCENCIA

- Se fijaron las células con metanol: acetona 1:1(v/v) por 5 min o formaldehído al 4% en PBS por 15 min para seleccionar el mejor fijador.
- Se retiró el fijador y se lavó 2 veces con PBS 1X.
- Se agregaron 250 µL de Triton X-100 al 0.01% (v/v) por 15 min para permeabilizar.
- Se retiró el permeabilizante y se lavó 2 veces con PBS 1X.
- Se agregó 250 µL de albumina de bovino al 1%(v/v) en PBS 1X por 30 min para bloquear.
- Se retiró el bloqueador y se agregó la solución del anticuerpo primario en albumina de bovino al 1%(v/v) en PBS 1X a diferentes diluciones para seleccionar la mejor concentración y se incubó por 1 h.
- Se retiró el anticuerpo primario y se lavó 3 veces con PBS 1X.
- Se agregó la solución del anticuerpo secundario (Alexa flúor 488, Alexa 594 o faloidina según el caso) en albumina de bovino al 1%(v/v) en PBS 1X a diferentes diluciones para seleccionar la mejor concentración y se incubó por 1 h.
- Se retiró el anticuerpo secundario y se lavó 3 veces con PBS 1X.
- Se retiró la cámara del portaobjetos y se colocó suficiente medio de montaje con DAPI en cada recuadro, y se colocó un cubreobjetos. Finalmente se selló la preparación con esmalte y se observó en el microscopio de epifluorescencia o confocal.

4.3.4 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE VEJIGA DE CONEJO NEOZELANDÉS POR MEDIO DEL ENSAYO DE MTT

4.3.4.1 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE SENSIBILIDAD DEL ENSAYO

Preparación de la disolución de MTT:

- Se añadió la cantidad de MTT necesaria para obtener una disolución de 5mg/ml en PBS 1X.
- Se filtró a través de un filtro con poros de 0.22 μm de diámetro para esterilizar y para eliminar los residuos insolubles.
- Se guardó a 4°C protegido de la luz.

Siembra de las células:

- Se preparó una suspensión de células musculares lisas en medio de cultivo a 5×10^5 cel/mL y a partir de esta se realizaron diluciones consecutivas.
- Se adicionaron, con una micropipeta, 200 μL de la suspensión celular de cada concentración.
- Se rotuló la placa como se indica en la siguiente figura:

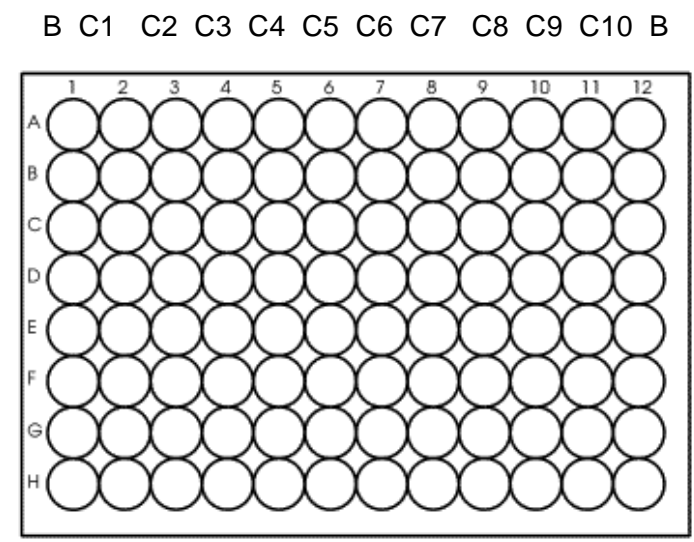


Figura 10. Rotulación de la placa de 96 pocillos, C1= 100000, C2=50000, C3= 25000, C4= 12500, C5= 6250, C6= 3125, C7= 1562.5, C8= 781.25, C9= 390.625, C10= 195.3125, B=0 cel/pozo.

- Se agitó la placa en un agitador orbital para que las células se distribuyeran uniformemente.
- Se incubó por 24 h a 37°C y 5% de CO₂.

Ensayo MTT:

- Se observó la placa al microscopio para revisar las células.
- Se quitó el medio de cultivo de todos los pocillos y se reemplazó por 200 µL de medio fresco.
- Se añadió la disolución de MTT (Volumen variado).
- Se incubó en oscuridad durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. La placa se cubrió con papel aluminio.
- Solubilización del formazan:
 - i. Se retiró todo el medio de cultivo.
 - ii. Se añadió DMSO (Volumen variado).
- Se agitó la placa en un agitador orbital para solubilizar el formazan.
- Se midió la absorbancia en un lector de placas a una longitud de 540 y 690 nm (como longitud de onda de referencia para eliminar el fondo).

4.3.4.2 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO INICIAL DE CÉLULAS Y LA DURACIÓN DEL ENSAYO

- Se preparó una suspensión de células musculares lisas en medio de cultivo a 5×10^4 cel/mL y a partir de esta se realizaron dos diluciones consecutivas.
- Se adicionaron, con una micropipeta, 500 µL de la suspensión celular de cada concentración.
- Se utilizaron dos tipos de placa, una con solo células y la otra con un andamio control.
- Se rotuló cada placa como se indica en la siguiente figura:

B C3:25000 C2:12500 C1:6250 B B cel/pozo

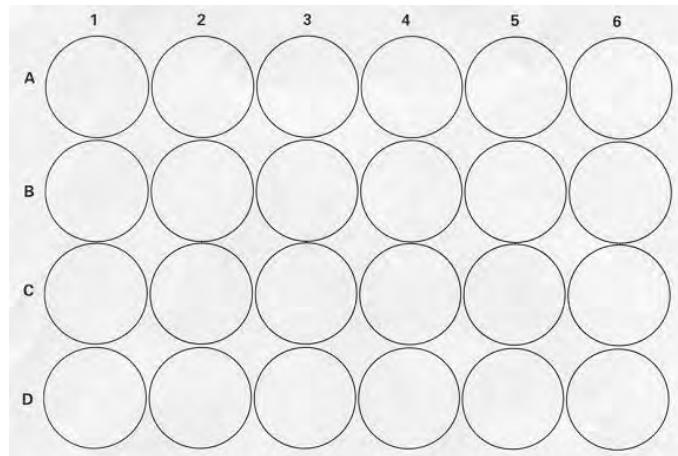


Figura 11. Rotulación de la placa de 24 pocillos, C= Concentración, B=Medio de cultivo sin células.

- Se agitó cada placa en un agitador orbital para que las células se distribuyeran uniformemente.
- Se tomaron lecturas a diferentes tiempos (24, 72, 168 horas) por lo que se prepararon 6 placas de 24 pocillos con el procedimiento descrito anteriormente.
- Se Incubaron (24, 72, 168) h a 37°C con un 5% de CO₂.

Ensayo MTT:

Para cada lectura se procedió a realizar los siguientes pasos:

- Se observó la placa al microscopio para revisar las células.
- Se retiró el medio de cultivo de todos los pocillos y se reemplazó con 200 µL de medio fresco.
- Se añadieron 40 µL de la disolución de MTT.
- Se incubó en oscuridad durante 4 horas a 37°C con un 5% de CO₂. (la placa se cubrió con papel aluminio)
- Solubilización del formazan:
 - i. Se retiró todo el medio de cultivo.
 - ii. Se añadieron 200 µL de DMSO.
- Se agitó la placa en un agitador orbital para solubilizar el formazan.
- Se tomaron 200 µL de cada pocillo y se transfirieron a una placa de 96 pocillos.

- Se midió la absorbancia en un lector de placas a una longitud de 492, 540 y 690 nm.

4.3.4.3 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS EN LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS MEDIANTE EL ENSAYO DE MTT

Una vez seleccionado el número inicial de células y la duración del ensayo se procedió a evaluar la viabilidad y proliferación celular de los siguientes andamios:

Primera etapa

Se evaluaron los siguientes andamios con fibras al azar:

- PLA= A1
- PLA-COL =A2
- PLA-ELAS =A3
- PLA-COL-ELAS =A4

Segunda Etapa

Se seleccionó el mejor andamio de la primera etapa (AE1) de acuerdo a los resultados de viabilidad y se utilizó para evaluar los siguientes andamios que se fabricaron por medio de un electrohilado simultáneo con fibras al azar:

- PCU(25%Vti), AE1(75%Vti)=A5
- PCU(50%Vti), AE1(50%Vti)=A6
- PCU(75% Vti), AE1(25% Vti)=A7
- PCU(100%Vti)=A8

Tercera Etapa

Se seleccionó el mejor andamio de la segunda etapa (AE2) y se utilizó para evaluar los siguientes andamios que se fabricaron por medio de un electrohilado simultáneo con fibras al azar y orientadas:

- AE2 con fibras al azar=A9
- AE2 con fibras orientadas= A10

Para cada una de las etapas se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

Siembra de las células musculares lisas en los andamios:

- Se cortaron muestras de 1x1 cm² de cada uno de los andamios a evaluar.
- Los andamios cortados se depositaron en cada uno de los pocillos de una placa de 24, la cual se irradió con una lámpara de UV (longitud de onda de 254 nm) por 1 h. Se dio vuelta a cada cara de la muestra a los 30 min transcurridos.
- Una vez que los andamios se encontraban esterilizados, se agregó un soporte de titanio previamente esterilizado para evitar que flotaran. Posteriormente, se agregaron 400 µL de medio de cultivo y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 2h para que se hidrataran.
- Se preparó una suspensión de células musculares lisas en medio de cultivo a la concentración determinada.
- Se retiró el medio de cultivo al transcurrir las 2 h.
- Se adicionó 150 µL de la suspensión de células a cada pocillo con el andamio y se pipeteo para mezclar y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 2h.
- Se agregó 250 µL de medio de cultivo pasadas las 2 horas para completar el volumen de siembra.
- Se utilizó como control positivo (C⁺) medio con células sin andamio y como control negativo(C⁻) medio sin células con andamio.
- Se usaron tres replicas para el ensayo.
- Se agitó en un agitador orbital para que las células se distribuyan uniformemente en la placa.
- Se incubaron (24, 72 y 168)h a 37°C con un 5% de CO₂.

Ensayo de MTT en los andamios:

Para cada lectura de cada una de las etapas se realizó el procedimiento descrito en la sección anterior. Sin embargo, para los andamios se tuvo que dejar actuar un mayor

intervalo de tiempo el DMSO para solubilizar el formazan, ya que no se disolvía tan rápido como en el caso de las células sembradas sin andamio.

4.3.5 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS EN LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS POR MEDIO DE LA REACCIÓN DE LA CALCEINA ACETOXIMETILADA.

Para la segunda y tercera etapa se realizó este ensayo. La siembra de las células se realizó de acuerdo a los pasos mencionados en la sección anterior.

Posteriormente, se llevó a cabo los siguientes pasos:

- Se preparó una solución de calceina 4 μ M en solución de Hank 1X.
- Al tiempo determinado, se retiraron las placas de la incubadora.
- Se retiró el medio de cultivo y se lavó 2 veces con PBS 1X + 1%(v/v) de AA.
- Se agregó 200 μ L de la solución de calceina por cada pocillo y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ por 45 min.
- Se retiró la solución de calceina y se lavó dos veces con PBS 1X .
- Se agregó 200 μ L de solución de Hanks a cada pocillo.
- Cada muestra se retiró del pocillo y se colocó en un portaobjetos y se agregaron unas gotas de la solución de Hank y se cubrió con un cubreobjetos.
- Finalmente, se procedió a observar la preparación en el microscopio de epifluorescencia Leica DMIRE2.

4.3.6 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS EN LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS POR MEDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA.

Para la segunda y tercera etapa se realizó este ensayo. Se realizó la siembra de las células musculares lisas a la concentración determinada en los andamios siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.3.4.3.

Posteriormente se llevó a cabo los siguientes pasos:

- Al tiempo determinado, se retiraron las placas de la incubadora.
- Se retiró el medio y se lavaron 2 veces con PBS 1X.

- Se fijaron las células con formaldehído al 4% en PBS por 15 min.
- Se retiró el fijador y se retiró el soporte de titanio de cada uno de los andamios.
- Se lavó 3 veces con PBS 1X.
- Se agregaron 250 μ L de Triton X-100 al 0.01% (v/v) por 15 min para permeabilizar.
- Se retiró el permeabilizante y se lavó 2 veces con PBS 1X.
- Se agregó 250 μ L de albumina de bovino al 1%(v/v) en PBS 1X por 30 min para bloquear.
- Se retiró el bloqueador y se agregó la solución del anticuerpo primario (actina o miosina) en albumina de bovino al 1%(v/v) en PBS 1X se incubó por 1 h.
- Se retiró el anticuerpo primario y se lavó 3 veces con PBS 1X.
- Se agregó la solución del anticuerpo secundario (Alexa flúor 488, Alexa 594 o faloidina según el caso) en albumina de bovino al 1%(v/v) en PBS 1X y se incubó por 1 h.
- Se retiró el anticuerpo secundario y se lavó 3 veces con PBS 1X.
- Se retiró el andamio del pozo y se colocó sobre un cubre objetos. Posteriormente, se agregaron unas gotas de medio de montaje con DAPI en cada andamio, y se colocó un cubreobjetos. Finalmente se selló la preparación con esmalte y se observó en el microscopio de epifluorescencia y/o confocal.

4.3.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS SEMBRADOS CON CÉLULAS MUSCULARES LISAS POR MEDIO DE MEB

Para cada una de las etapas, las células musculares lisas fueron sembradas a la concentración determinada en los andamios por medio del procedimiento descrito en la sección 4.3.4.3.

Posteriormente se llevó a cabo los siguientes pasos:

- Al tiempo determinado, se retiraron las placas de la incubadora.
- Se retiró el medio y se lavaron 2 veces con PBS 1X.
- Se fijaron las células con glutaraldehído al 3% (v/v) por 2 h a 4°C.
- Se retiró el fijador y se lavaron 2 veces con PBS 1X
- Se deshidrataron las muestras con una serie de alcoholes:
 - Etanol al 50%(v/v) por 5 min.
 - Etanol al 70%(v/v) por 5 min.
 - Etanol al 80%(v/v) por 5 min.

- Etanol al 90%(v/v) por 5 min.
- Etanol absoluto por 5 min (2x).
- Las muestras se dejaron secar durante 24h.
- Se cortó una muestra de cada andamio y se colocó en el portamuestras y se recubrieron con oro para ser observadas en el microscopio electrónico de barrido.

4.3.8 IMPLANTE SUBCUTÁNEO (Estudio Piloto)

Se siguieron los procedimientos indicados en el protocolo del proyecto aprobado número HIM/2013/025 por el comité de ética del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se realizó la biopsia de la vejiga del conejo a implantar para aislar las células musculares lisas siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.3.1. De acuerdo a los resultados del comportamiento de los andamios *in vitro*, se seleccionó dos tipos de andamios. Posteriormente, las muestras de andamios se esterilizaron con plasma de gas de peróxido de hidrógeno a baja temperatura y se cortaron muestras de 1 cm de largo por 1.5 cm de ancho. Seguidamente, se introdujeron a una placa de 12 pozos y se sembraron células musculares lisas a cada una de las muestras y se mantuvieron en cultivo *in vitro* durante siete días en un sistema estático a 37°C y 5% de CO₂. Al término de los siete días de cultivo, cada uno de los constructos (andamio+ células musculares lisas) se lavaron con solución salina y luego se implantaron subcutáneamente de manera autóloga en el conejo. Para tal efecto, el conejo se anestesió con la dosis establecida (Ketamina [10 mg/kg] y Pentobarbital sódico [30 mg/kg] vía intravenosa). A continuación, se realizó la asepsia del dorso del conejo, rasurando y lavando la piel con solución Isodine, y luego se realizó una incisión por arriba de la cadera y cada constructo se fijó al músculo con sutura no absorbible y se terminó suturando con Vicryl 3-0.

4.3.8.1 Análisis de los implantes recuperados

Los implantes se recuperaron a las 4 semanas de haberlos implantado y se procesaron para evaluar histológicamente su estructura con la tinción de hematoxilina eosina.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

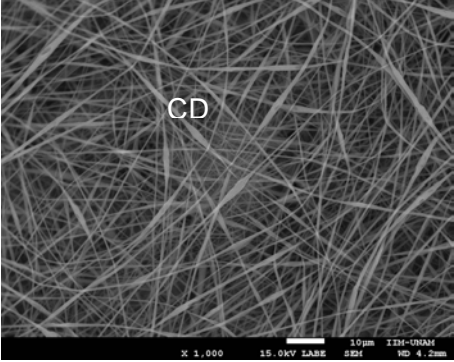
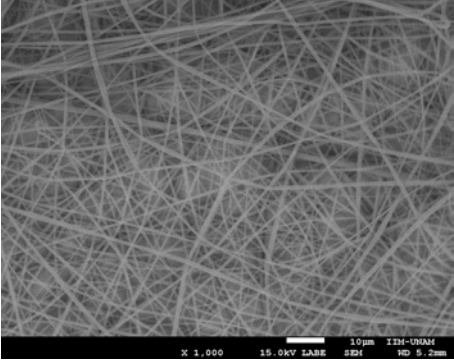
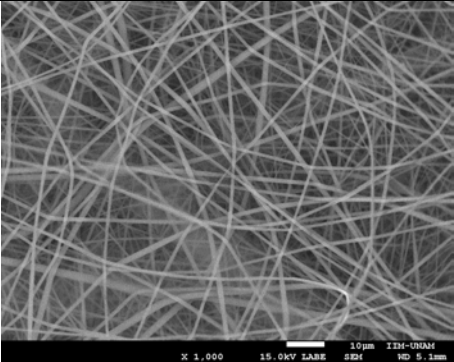
5.1 ESTUDIO DE LAS VARIABLES DEL PROCESO SOBRE LA MORFOLOGÍA DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS DE PLA

Numerosos polímeros de origen natural y sintético han sido utilizados para producir andamios a través de la técnica de electrohilado para diversas aplicaciones [43]. Sin embargo de las diferentes publicaciones que existen en la literatura [44]–[46]; la relación específica entre los parámetros del proceso de electrohilado y la morfología de las fibras aún no está del todo clara y varía drásticamente con el tipo de polímero. Es por ello que en este trabajo se tuvo que realizar pruebas de electrohilado de cada uno de los polímeros a utilizar para la fabricación de andamios de forma individual como primera aproximación. Por lo tanto, en esta sección se presentan los resultados obtenidos en el estudio de las variables del proceso de electrohilado de soluciones poliméricas de PLA sobre el diámetro promedio de las fibras y la aparición de cúmulos de disolvente utilizando como colector una placa estática de aluminio.

Las variables estudiadas fueron concentración de la solución(C)(%p/v), voltaje aplicado(V)[kV], distancia entre aguja y colector(d)[cm], flujo de inyección(F)[mL/h], diámetro de aguja(ϕ_a)[mm], tipo de disolvente [S1=TFE; S2=TFE:DMF(90:10 v/v); S3=TFE:DMF(80:20 v/v)] y % de humedad relativa[%HR].

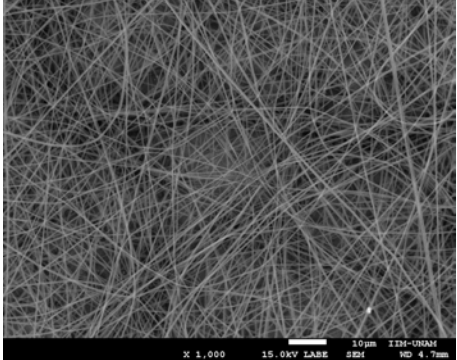
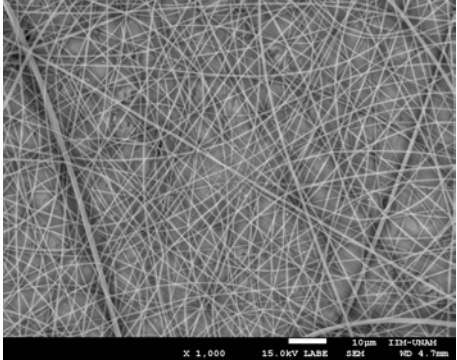
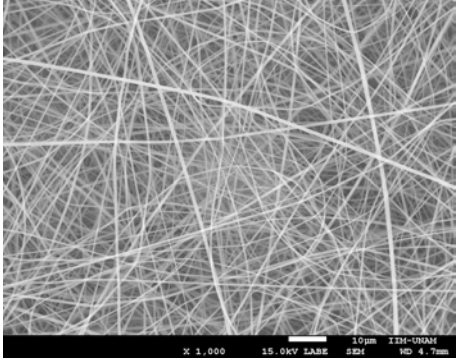
En las siguientes tablas se reportan las diferentes variaciones de los parámetros del proceso que se realizaron, junto con el resultado del diámetro promedio($\phi_{promedio}$)[nm] encontrado y las respectivas micrografías de MEB.

Tabla 3 Variación de la concentración de PLA

Constantes: S1, V, F, d, ϕ_a	C[%p/v]	$\phi_{promedio}$ [nm]
Micrografías de MEB(1000X)		
	12	CD.333±171
	12.5	446±286
	13	716±263

CD: Aparición de cúmulos de disolvente.

Tabla 4 Variación del voltaje aplicado

Constantes: S2, C, F, d, ϕ_a	V[kV]	$\phi_{promedio}$ [nm]
Micrografías de MEB(1000X)		
	10	379±89
	12.5	371±141
	15	Q.353±118

Q: Fibras quebradas.

Tabla 5 Variación de la distancia entre aguja y colector

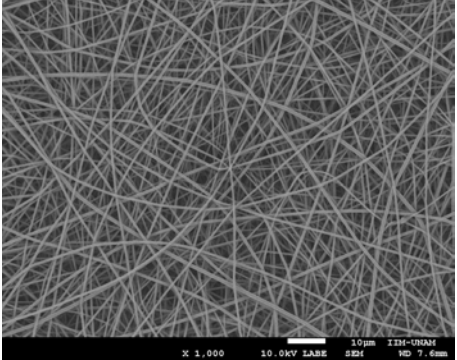
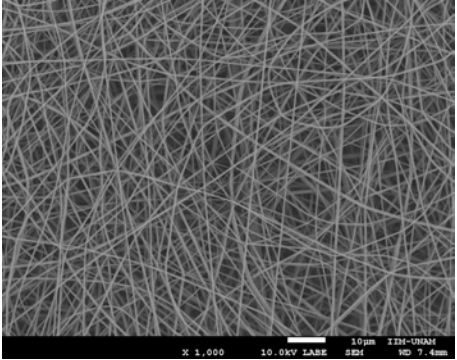
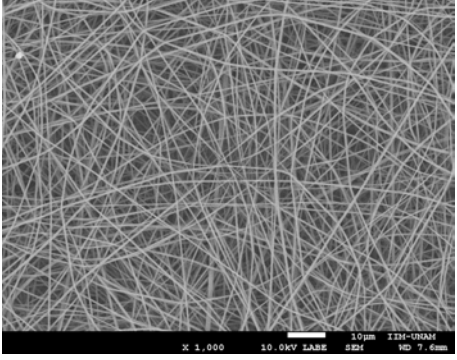
Constantes: S2, C, F, V, ϕ_a	d[cm]	$\phi_{promedio}$ [nm]
Micrografías de MEB(1000X)		
 <p>SEM micrograph showing a dense network of nanofibers. The image includes a scale bar of 10 μm and technical data: X 1,000, 10.0KV LAMB, SEM, IIM-UNAM, WD 7.6mm.</p>	30	508±100
 <p>SEM micrograph showing a dense network of nanofibers. The image includes a scale bar of 10 μm and technical data: X 1,000, 10.0KV LAMB, SEM, IIM-UNAM, WD 7.6mm.</p>	35	449±87
 <p>SEM micrograph showing a dense network of nanofibers. The image includes a scale bar of 10 μm and technical data: X 1,000, 10.0KV LAMB, SEM, IIM-UNAM, WD 7.6mm.</p>	40	370±76

Tabla 6 Variación del flujo de inyección

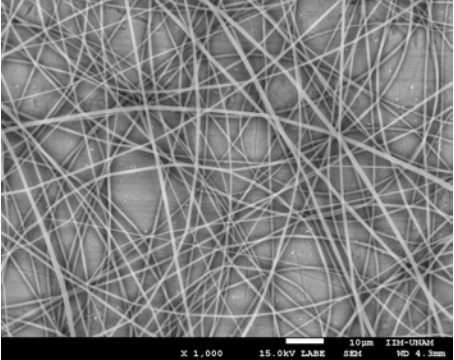
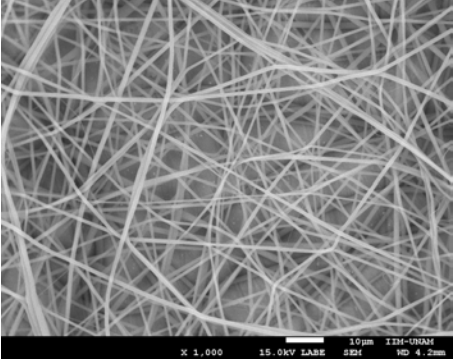
Constantes: S1,C, V, d, ϕ_a	F[mL/h]	$\phi_{promedio}$ [nm]
Micrografías de MEB(1000X)		
	0.3	511±189
	0.4	604±185

Tabla 7 Variación del diámetro de la aguja

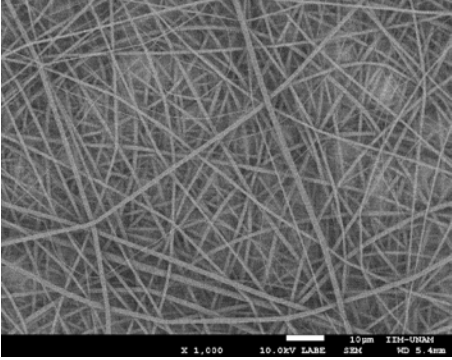
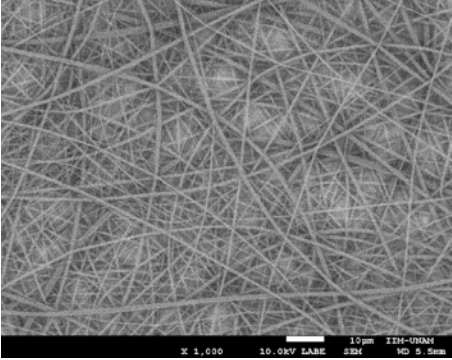
Constantes: S1,C, V, F, d	ϕ_a [mm]	$\phi_{promedio}$ [nm]
Micrografías de MEB(1000X)		
	0.3	424±312
	0.6	409±238

Tabla 8 Variación del disolvente

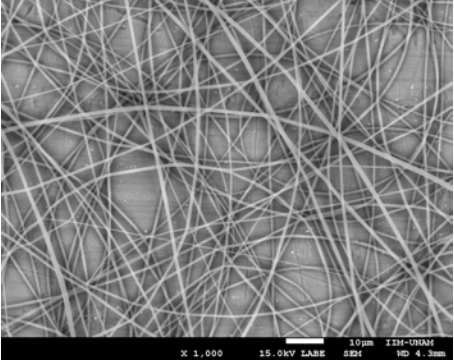
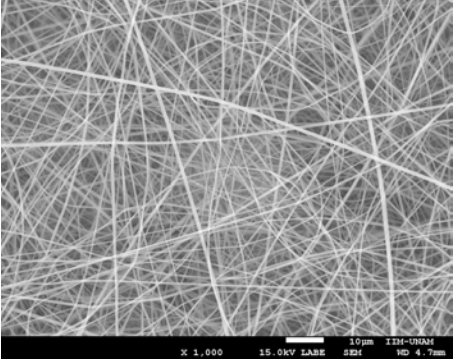
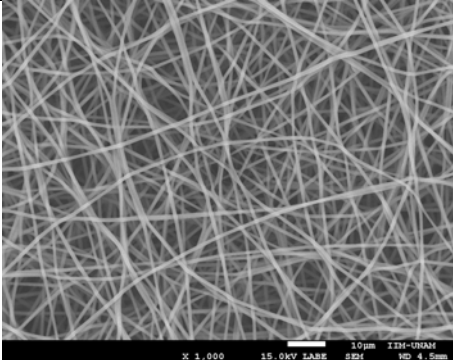
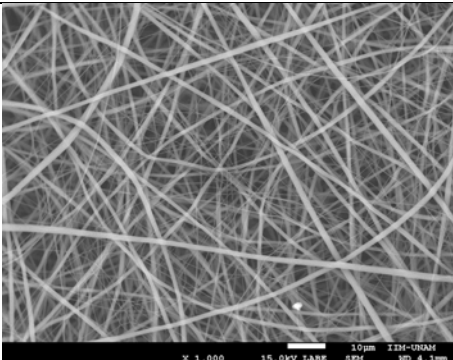
Constantes: C, V, F, d, ϕ_a	S[TFE/DMF]	$\phi_{promedio}$ [nm]
Micrografías de MEB(1000X)		
 <p>SEM image of S1(100) showing a dense network of nanofibers. The image includes a scale bar of 10µm and technical parameters: X 1,000, 15.0KV X400, SEM, TTM-000AM, WD 4.7mm.</p>	S1(100)	511±189
 <p>SEM image of S2(90/10) showing a dense network of nanofibers. The image includes a scale bar of 10µm and technical parameters: X 1,000, 15.0KV X400, SEM, TTM-000AM, WD 4.7mm.</p>	S2(90/10)	353±118
-----	S3(80/20)	No disolvió

Tabla 9 Variación del % de humedad relativa

Constantes: S1,C, V, F, d, ϕ_a	%HR	$\phi_{promedio}[nm]$
Micrografías de MEB(1000X)		
	13	742±9
	37	352±297

Los resultados de la Tabla 3 demuestran que la aparición de cúmulos de disolvente depende primordialmente de la concentración de la solución polimérica. Con respecto a la variación del voltaje aplicado (Tabla 4) y flujo de inyección (Tabla 6), no se aprecian cambios significativos en el diámetro promedio de las fibras; sin embargo, cabe resaltar que al utilizar un voltaje igual o mayor a 15 kV, se promueve la aparición de fibras quebradas. De la Tabla 5 se aprecia que, aumentando la distancia entre la aguja y el colector, se obtienen fibras con diámetros menores. Por otra parte, la Tabla 7 resalta que la variación del diámetro de la aguja no es un parámetro que influye drásticamente en el diámetro promedio de las fibras.

En la Tabla 8, se observa que la DMF promueve el adelgazamiento de las fibras, generando diámetros alrededor de 300 nm en comparación con la utilización de sólo TFE como disolvente, donde se pueden encontrar diámetros de hasta 700 nm. Además, de las Tablas 4 y 5 donde se utilizó como disolvente una relación de TFE:DMF (90:10 [v/v]), la desviación estándar del diámetro promedio no fue tan alta como la observada en las fibras obtenidas utilizando como disolvente solo TFE. Sin embargo, el límite de solubilidad del PLA utilizando como disolvente TFE:DMF es bajo, ya que se puede observar en la Tabla 8, que al utilizar una relación de TFE:DMF (80/20 [v/v]) no se logró solubilizar el polímero. Finalmente, de la Tabla 9 se puede apreciar que, al disminuir la humedad relativa del sistema, se pueden encontrar fibras homogéneas, esto en referencia a la variación del diámetro, ya que se encontró una desviación estándar casi nula.

5.2 ESTUDIO DE LAS VARIABLES DEL PROCESO DE ELECTROHILADO SOBRE LA MORFOLOGÍA DE ANDAMIOS DE PCU

El poli(carbonato-uretano)[47] es otro de los polímeros con los cuales se desarrolló este trabajo, y por ello se realizaron pruebas de hilado usando diferentes parámetros, para establecer los rangos de trabajo en los cuales se podían fabricar andamios. Por lo tanto, en esta sección se presentan los resultados obtenidos en el proceso de electrohilado de soluciones poliméricas de PCU donde se analizó la influencia de las siguientes variables: tipo de disolvente, conductividad y volatilidad del disolvente, concentración de la solución polimérica (C)[%p/v], tipo de colector y voltaje aplicado(V)[kV] sobre el diámetro promedio de las fibras y la aparición de cúmulos de disolvente. El tipo de colector usado fue una placa de aluminio estática. En primera instancia se realizó la medición de la conductividad

eléctrica(σ)[$\mu\text{S}/\text{cm}$] de las diferentes relaciones de DMF:THF[v/v] que se usaron como disolvente, debido a que es una propiedad del disolvente que influye en el diámetro de las fibras. En la sección anterior no se realizó esta medición porque no se contaba con el equipo en ese momento. La siguiente tabla presenta los resultados encontrados.

Tabla 10 Conductividad eléctrica de las relaciones de DMF:THF[v/v]

DMF:THF[v/v]	Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
100	2.38
90:10	2.17
80:20	1.99
70:30	1.78
60:40	1.44

En la siguiente figura se presentan las micrografías de MEB obtenidas del electrohilado de soluciones de PCU al 13% [p/v] a F,d y V constantes, utilizando las diferentes relaciones de DMF:THF [v/v] y en la Tabla 11 el resultado del diámetro promedio de las fibras.

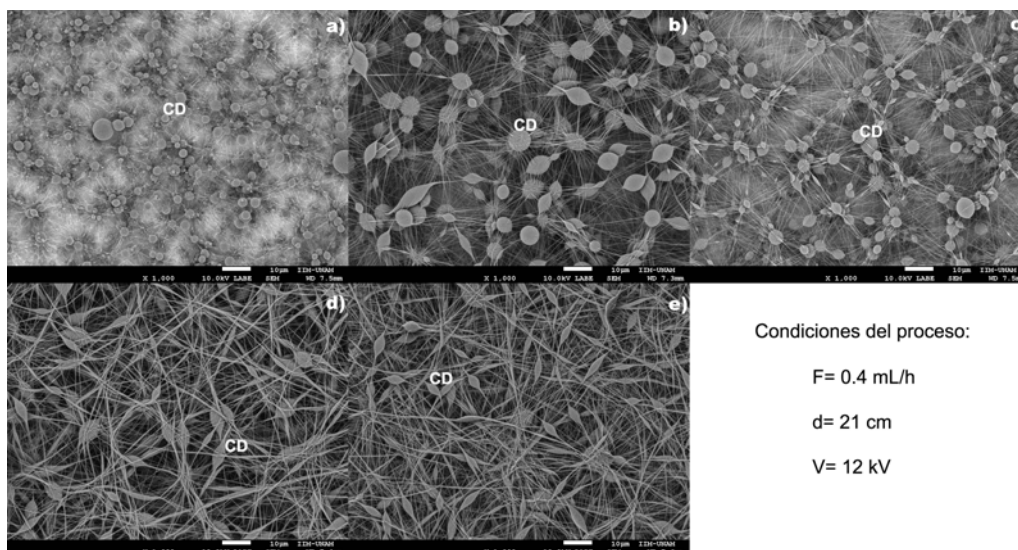


Figura 12. Micrografías de fibras de PCU (1000X) utilizando diferentes relaciones de DMF:THF [v/v]: a) 100, b) 90:10, c) 80:20, d) 70:30 y e) 60:40.

Tabla 11 Diámetro promedio de las fibras de PCU variando relación de DMF:THF [v/v].

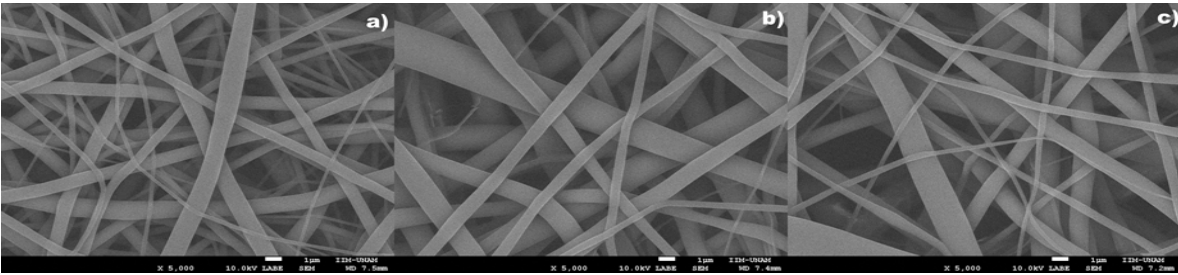
DMF:THF [v/v]	$\phi_{\text{promedio}}[\text{nm}]$
100	CD.-
90:10	CD.117 ± 35
80:20	CD.102 ± 27
70:30	CD.259 ± 63
60:40	CD.268 ± 14

CD: Aparición de cúmulos de disolvente.

En la Figura 12 y en la Tabla 11, se observa que en todas las condiciones hubo presencia de cúmulos de disolvente y que estos disminuyen al aumentar la concentración de THF en la mezcla, lo cual aumenta la volatilidad de la solución y permite una mayor evaporación del disolvente en el trayecto que la fibra realiza hacia el colector. Además, el diámetro promedio de las fibras disminuye al aumentar la conductividad eléctrica del disolvente, debido a que aumentan las cargas eléctricas en la solución y esto permite que el cono de Taylor se adelgace y se generen fibras delgadas .

De acuerdo a estos resultados se decidió aumentar la concentración de la solución y se seleccionó la relación de DMF:THF (70:30 [v/v]) ya que con esta relación de disolventes se observó la formación de fibras y la solución era más estable en comparación con la de DMF:THF (60:40 [v/v]). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 12. Se observa que al aumentar la concentración [%p/v] de PCU no se promovió la generación de cúmulos de disolvente, ya que ninguna de las condiciones presenta este tipo de defecto. Finalmente, al aumentar la concentración [%p/v] aumenta el diámetro promedio de las fibras, sin embargo no se observó una diferencia significativa entre las medias de cada una de las muestras. Por lo tanto se seleccionó la concentración de PCU de 14 [%p/v] y la relación de DMF:THF (70:30 [v/v]) para hilar las soluciones de PCU en las siguientes etapas.

Tabla 12 Variación de la concentración de PCU

Constantes: V, F, d, ϕ_a, S=70:30 [v/v]		
Micrografías de MEB (5000x)		
		
C[%p/v]		
14	15	16
ϕ promedio[nm]		
934 ± 392	1194 ± 434	1380 ± 697

5.3 ELECTROHILADO DE SOLUCIONES DE PLA CON COLÁGENA Y ELASTINA

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en el estudio de las condiciones óptimas para el electrohilado de soluciones de PLA con colágena(COL) y elastina(ELAS) utilizando como disolvente TFE, ya que al agregar otro tipo de polímero las propiedades de las soluciones cambian y por ende las condiciones favorables para hilar la solución. Asimismo, para hilar estas soluciones se utilizó un colector con movimientos en X y Y para lograr un mayor porcentaje de área cubierta en la placa de aluminio y una distribución de diámetros de las fibras más homogénea. Por lo tanto, se estudiaron diferentes variables del proceso como trayectoria del colector, concentración(C)[%p/v], distancia(d)[cm], voltaje aplicado(V)[kV] y flujo de inyección(F)[mL/h]. Además, se midieron las propiedades de cada solución polimérica como la conductividad eléctrica(σ)[μ S/cm] y viscosidad(μ)[cP], esta última no se había medido en las etapas

anteriores debido a que no se contaba con el equipo . Estas propiedades nos permiten caracterizar mejor las soluciones poliméricas a electrohilar y determinar la influencia de estas en el diámetro promedio de las fibras.

Con base en los resultados de la optimización de los parámetros de electrohilado para el PLA utilizando un colector estático, presentados en la sección 5.1, se tomó como punto de partida la concentración del PLA al 13% p/v y como disolvente el TFE debido a que puede disolver tanto a la colágena como a la elastina. Se seleccionó la distancia entre la aguja y colector de 21 cm de acuerdo al espacio que permitía el colector X-Y en la cabina. Además, se eligió el flujo de 0.4 mL/h, diámetro de la aguja de 0.6 mm y 11 kV de voltaje a aplicar. Por lo tanto, se hicieron variaciones en la concentración del PLA, para obtener las condiciones óptimas de electrohilado de las soluciones de PLA con colágena y elastina utilizando un colector X-Y.

En la Tabla 13 se presentan las condiciones óptimas de electrohilado encontradas y las propiedades de cada solución:

Tabla 13 Condiciones óptimas de electrohilado y propiedades de la solución

Solución polimérica	Relación [p:p]	C [%p/v]	μ [cP]	σ [μS/cm]
PLA	-	13	499.6	0.62
	-	15	896.7	0.58
PLA:COL	30:1	13	459.3	8.05
PLA:ELAS	35:1	15	798.5	5.67
PLA:COL:ELAS	70:1:1	15	768	5.89

F= 0.4 [mL/h], d=21 [cm], V=11 kV para todas las soluciones.

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 13, podemos ver que la conductividad eléctrica de la solución de PLA, aumenta debido a la presencia de colágena y elastina, pero en mayor proporción cuando se encuentra la colágena en la solución. Este comportamiento es debido a que la colágena tienen una mayor cantidad de aminoácidos en su estructura que la elastina y por ende mayores cargas eléctricas. En cuanto a los valores de viscosidad, la presencia de colágena y elastina tiende a reducir ligeramente la viscosidad de la solución de PLA, estos efectos en la conductividad

eléctrica y viscosidad se verán reflejados en el diámetro promedio de las fibras de los andamios que se fabricaron.

5.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS DE PLA CON COLÁGENA Y ELASTINA

5.3.1.1 Morfología por MEB

En la Figura 13 se observan las micrografías de MEB de los andamios fabricados de PLA con colágena y elastina con la respectiva distribución de diámetros de las fibras. De acuerdo a estos resultados, se puede ver que el diámetro promedio de las fibras tiene dependencia con la viscosidad y conductividad eléctrica de la solución, siendo la conductividad eléctrica el factor que más influyó para disminuir el diámetro de las fibras.

De la Tabla 13, la solución de PLA y PLA-COL tienen el menor y mayor valor de conductividad eléctrica respectivamente. Es por ello, que el andamio de PLA (Figura 3a) tiene el mayor valor del diámetro promedio de fibra, y el andamio de PLA-COL es el que presenta menor valor del diámetro promedio de las fibras (Figura 13b). Por lo cual, podemos indicar que la colágena es una proteína que aporta más cargas eléctricas en comparación con la elastina, esto debido a su estructura química, ya que presenta mayor cantidad de aminoácidos y una estructura de triple hélice[48]. Además, este aumento en la conductividad eléctrica permite una distribución de diámetros más homogénea en las fibras de los andamios que contienen colágena en comparación con los que contienen elastina (Figura 3c-d). Asimismo, se observa que al disminuir la viscosidad de la solución disminuye el diámetro promedio de las fibras en los andamios.

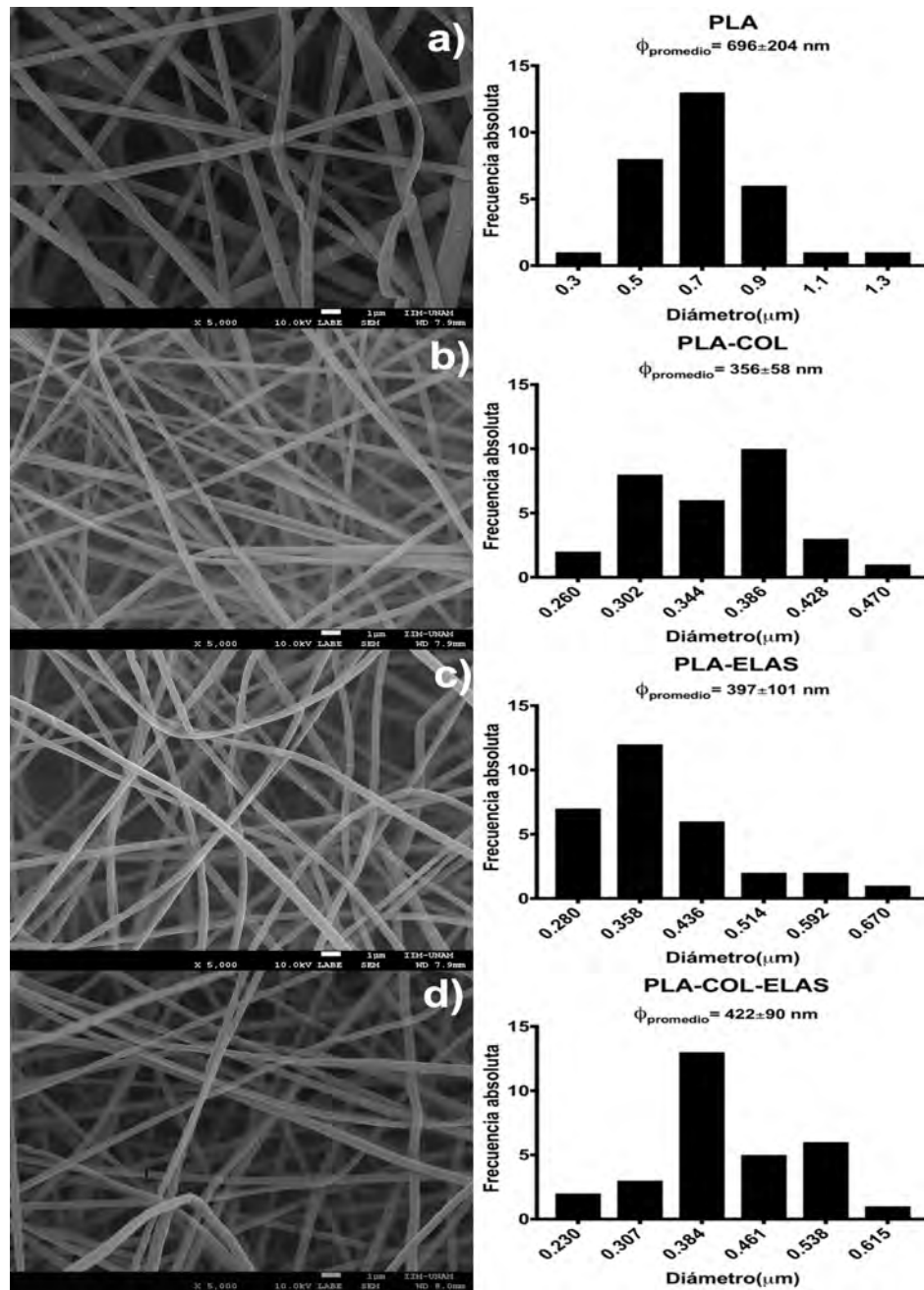


Figura 13. Micrografías de MEB(5000x) de andamios electrohilados de: a) PLA, b) PLA-COL, c) PLA-ELAS y d) PLA-COL-ELAS.

5.3.1.2 Composición química por FTIR

En la Figura 14 se presentan los espectros FTIR de los polímeros en masa (M) utilizados y de los andamios (A) de PLA con colágena y elastina. En la Figura 14a se presenta el espectro para el andamio de PLA, donde se puede apreciar un doblete a 2998 y 2948

cm^{-1} debido a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica del C-H en el grupo metilo de la cadena del PLA. Otra de las bandas características del PLA es la presentada a 1752 cm^{-1} debido a la vibración de tensión del carbonilo (C=O) [49]–[51]. Por otra parte, en la Figura 14b y 14c se presentan los espectros de colágena y elastina, donde se pueden apreciar dos bandas a 3275 y 3065 cm^{-1} debido a la vibración de tensión simétrica del N-H libre, características de los grupos amida que se encuentran en las moléculas de estos polímeros. También, se observan otras dos bandas características de los grupos amida a 1632 cm^{-1} debido a la vibración de tensión del carbonilo (banda amida I) y a 1529 cm^{-1} (banda amida II) debido a la absorción de deformación o flexión del N-H, siendo estas absorciones características de las amidas secundarias. A 1446 cm^{-1} aparece la banda denominada amida III debido a la vibración de tensión del C-N [52]–[54].

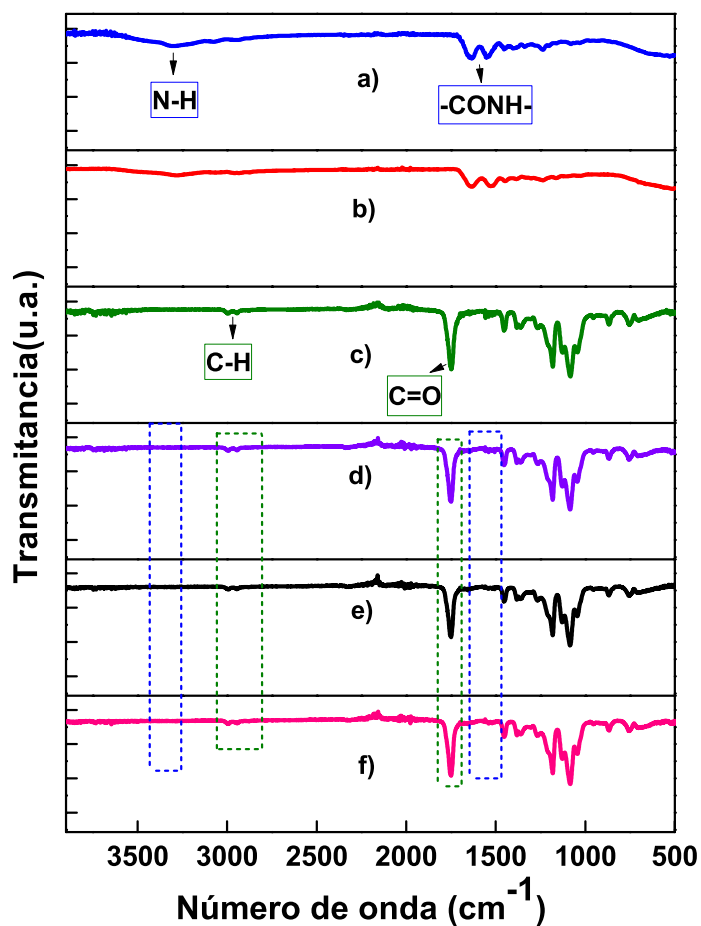


Figura 14. Espectro FTIR de: a) COL (M), (b) ELAS (M), (c) PLA(A), d) PLA-COL (A), e) PLA-ELAS (A) y f) PLA-COL-ELAS (A). A=andamio, M=masa.

Por otra parte, comparando los espectros obtenidos de los andamios de PLA-COL (Figura 14d), PLA-ELAS (Figura 14e) y PLA-COL-ELAS (Figura 14f) se puede apreciar claramente las bandas características del PLA mencionadas anteriormente, sin embargo se puede observar la aparición de dos bandas a 1649 y 1538 cm^{-1} características de los grupos amida que también se observaron en los espectros para la colágena y elastina. Estas bandas se observan débiles debido a la baja concentración de colágena y elastina en los andamios. Además, se observa un leve corrimiento de estas bandas debido a la interacción de las moléculas de PLA con la colágena y/o elastina. Adicionalmente, la banda de tensión del grupo carbonilo aparece a 1754 cm^{-1} , y comparando con el espectro del PLA, también hay un leve corrimiento debido a la presencia de los grupos carbonilos en los grupos amida presentes en la colágena y elastina. Por lo tanto, con estos resultados se puede corroborar la presencia de PLA, colágena y elastina en los andamios, y además precisar que existe una interacción entre estos polímeros en cada uno de los andamios, lo cual es un factor importante en su comportamiento en el cultivo celular.

5.3.1.3 Propiedades térmicas

La caracterización del comportamiento térmico de los andamios se llevó a cabo por medio de las técnicas de calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico. Por medio de estos resultados se pudo obtener los valores de las diferentes transiciones térmicas que ocurren en el andamio y al mismo tiempo se evaluó la estabilidad térmica de estos y se analizó si la presencia de colágena y/o elastina tienen influencia en estos valores, comparándolos con los obtenidos para el PLA. Adicionalmente se evaluaron los termogramas de los polímeros en masa.

Los termogramas obtenidos por DSC se presentan en la Figura 15. En el termograma para la colágena (Figura 15a) y elastina (Figura 15b) se observa solo un tipo de transición, la cual se atribuye a la desnaturalización de estas proteínas. El rango de temperatura reportado para este tipo de transición en estas proteínas puede estar en un intervalo de 60°C a 250°C dependiendo de la cantidad de agua u otras moléculas presentes[55]. La temperatura de desnaturalización encontrada para la colágena fue de 111.79°C y de 83.13 para la elastina, los cuales concuerdan con lo mencionado anteriormente. En el termograma de DSC para el PLA en masa (Figura 15c), se observa la transición vítrea en un intervalo de temperatura de 64.9 a 65.78°C y seguidamente la fusión en un intervalo de temperatura de 145.82 a 153.35°C .

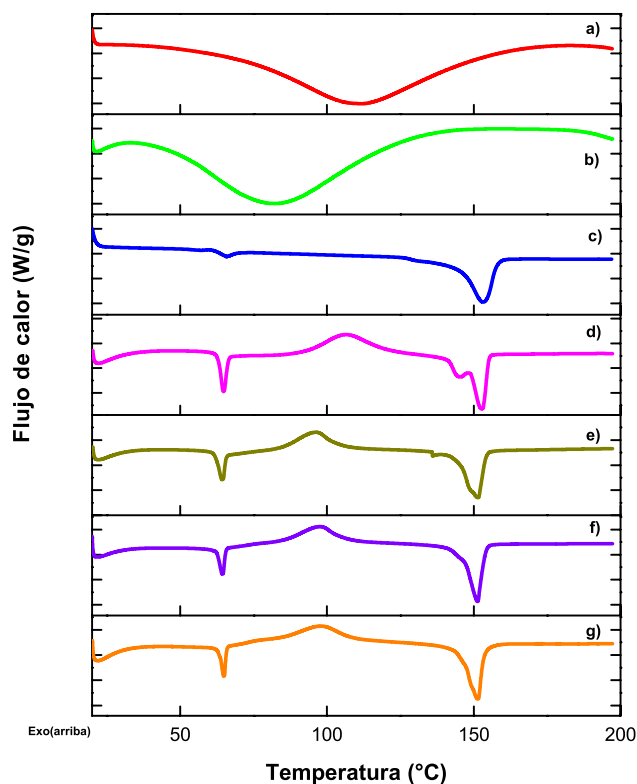


Figura 15. Termogramas de DSC para: a) COL(B), b)ELAS(B), c)PLA(B), d)PLA(A), e)PLA-COL(A), f) PLA-ELAS(A) y g) PLA-COL-ELAS(A). A=andamio, M=masa.

Por otra parte en los termogramas de DSC de los andamios de PLA (Figura 15d), PLA-COL (Figura 15e), PLA-ELAS (Figura 15f) y PLA-COL-ELAS (Figura 15g) se observa inicialmente la transición vítrea alrededor de los 64°C y la fusión alrededor de los 151°C. Sin embargo, comparando estos termogramas con el del PLA en masa (Figura 15c), podemos apreciar la aparición de un pico endotérmico pronunciado aproximadamente a los 65°C, el cual se traslapa con la transición vítrea, y el cual se debe a un tipo de relajación entálpica debido a la rápida velocidad de solidificación que ocurre en el proceso de electrohilado [56]. Además, también se observa la aparición de un nuevo pico exotérmico entre 98°C y 108°C correspondiente a una cristalización. Sin embargo, este pico no se aprecia en el PLA en bulto. Este comportamiento se debe a que en gran parte la estructura de las nanofibras es amorfa pero cristalizable, ya que en el proceso de electrohilado las nanofibras adquieren un alto grado de orientación molecular [57], [58]. Por lo tanto, la cristalización exotérmica en frío obtenida durante el calentamiento posterior a la T_g, indica una reorganización de las cadenas durante este calentamiento donde la estructura inicialmente amorfa está cristalizándose. Asimismo, en la fusión se

presenta un doble pico, lo cual se debe a la fusión de la fracción cristalina inicial y a las regiones cristalinas recién desarrolladas. Sin embargo, este doble pico va disminuyendo con la presencia de la colágena y elastina, y se ve más atenuado en los andamios de PLA.

Tabla 14 Propiedades térmicas de los andamios de PLA con colágena y elastina.

Muestra	Tg(°C)	Tc(°C)	ΔH_c (J/g)	Tf(°C)	ΔH_f (J/g)	Tdn(°C)	ΔH_{dn}	Td(°C)
PLA(B)	65.78	-----	-----	153.19	33.25	-----	-----	366.98
PLA(A)	64.77	105.96	20.52	152.83	23.99	-----	-----	360.6
PLA-COL(A)	64.30	96.19	14.87	151.57	22.34	-----	-----	346.45
PLA-ELAS(A)	64.46	97.59	14.66	151.28	13.31	-----	-----	350
PLA-COL-ELAS(A)	64.71	98.37	8.69	151.49	18.74	-----	-----	354.99
COL(B)	-----	-----	-----	-----	-----	111.89	353.4	307.79
ELAS(B)	-----	-----	-----	-----	-----	83.57	208.9	318.7

Tg= Temperatura de transición vítrea, **Tc**= Temperatura de cristalización, **ΔH_c** =Entalpia de cristalización, **Tf**= Temperatura de fusión, **ΔH_f** = Entalpia de fusión, **Tdn**=Temperatura de desnaturalización, **ΔH_{dn}** = Entalpia de desnaturalización, **Td**= Temperatura de degradación.

En la Tabla 14 se listan los datos obtenidos en los termogramas de DSC y TGA para los polímeros en bulto y para los diferentes andamios. Comparando los resultados para la Tg, se observa que el valor obtenido para el PLA en masa es mayor en comparación con los andamios de PLA, PLA-COL, PLA-ELAS y PLA-COL-ELAS. Esta disminución es debido probablemente a que las nanofibras de los andamios tienen una relación área superficial/volumen mayor comparada con los pellets del PLA en masa [57]. Asimismo, esta relación aumenta al disminuir el diámetro promedio de las fibras, es por ello que el menor valor obtenido para la Tg es para los andamios de PLA-COL, ya que presentaron el menor diámetro promedio de fibras como se mencionó en la sección anterior. Para los andamios de PLA-ELAS Y PLA-COL-ELAS aumenta el valor de la Tg en comparación con la del andamio de PLA-COL ya que aumenta el valor del diámetro promedio de las fibras. Además, podemos inferir que, al disminuir el diámetro promedio de las fibras, aumenta la movilidad de las cadenas poliméricas en los andamios. Para los valores obtenidos en la Tc, se puede también indicar, que su valor se reduce al disminuir el diámetro promedio de las fibras en los andamios, el cual está relacionado con las propiedades físicas de la

solución que varían de acuerdo a la presencia de la colágena y elastina como se indicó en la Tabla 13. De igual forma, se puede observar en los valores de la entalpía de cristalización que disminuyen con la presencia de colágena y elastina, y más aún cuando está presente la elastina. En la temperatura de fusión, comparando el valor para el PLA en masa con el andamio de PLA, disminuye, debido a que se reduce la fracción cristalina cuando se forman las nanofibras, lo cual también se puede corroborar con los valores de la entalpía de fusión, donde el valor es mayor para el PLA en masa que para el andamio de PLA. Según estudios realizados con microscopía electrónica de transmisión, en las nanofibras se encuentra una estructura de núcleo y coraza, siendo el núcleo la fase amorfa y la coraza la fase cristalina [56], revalidando así el comportamiento descrito anteriormente. Por otra parte, se observa que la T_f disminuye con la presencia de colágena y elastina en los andamios, y más aún con la presencia de elastina. Considerando los valores para la entalpía de fusión de los andamios, se observa que el mayor valor es para los andamios de PLA y el menor para los andamios de PLA-ELAS, y en un punto intermedio para los andamios de PLA-COL y PLA-COL-ELAS. Por lo cual, podemos decir que la colágena participa en mayor proporción a la formación de fases cristalinas comparada con la elastina, debido a su estructura de triple hélice. Este comportamiento también se puede relacionar con los valores obtenidos para la entalpía de desnaturalización que es mayor para la colágena que para la elastina.

Finalmente, en cuanto a los valores encontrados para la T_d por TGA de los polímeros en masa y para los andamios, se observa que el PLA en masa tiene la mayor estabilidad térmica comparado con la colágena, elastina y andamios. El andamio de PLA-COL tiene el menor valor de la T_d , debido a que la colágena tiene la menor estabilidad térmica. La estabilidad térmica del andamio de PLA-ELAS es mayor a la del PLA-COL, debido a que la elastina tiene mayor estabilidad térmica. El valor de la T_d para el andamio de PLA-COL-ELAS es mayor que para el PLA-COL y PLA-ELAS, debido a que la proporción de colágena y elastina disminuye en este andamio y por ende la estabilidad térmica está marcada por las propiedades del PLA, que tiene mayor estabilidad térmica que los demás componentes.

5.3.1.4 Ángulo de contacto

Se midió el ángulo de contacto con medio de cultivo DMEM de los andamios de PLA con colágena y/o elastina para determinar el carácter hidrofílico de estos, ya que es un factor

importante a la hora del empleo de estos en ingeniería de tejidos. Además, para establecer la relación de este con la presencia de proteínas como colágena y elastina y del diámetro promedio de las fibras.

En la Figura 16 se presentan los valores del ángulo de contacto encontrados para cada uno de los andamios evaluados. El ángulo de contacto encontrado para cada uno de los andamios tiene valores mayores a los 90° , esto nos indica que todos tienen un carácter hidrófobo, esto debido a la alta relación del área superficial/ volumen que tienen las fibras de cada uno de los andamios, debido a que el diámetro promedio está alrededor de menos de 1 micra, lo cual da a estas superficies una mayor rugosidad, en comparación a la superficie de un material en forma de película [13], [59]. Por otra parte, el ángulo de contacto también está influenciado por la composición química de la superficie a evaluar, donde la afinidad de las moléculas de la superficie con las moléculas de la gota de líquido, permitirá que el ángulo disminuya si hay una mayor afinidad, o aumentará si no hay una suficiente afinidad química [60]. Por lo tanto, de acuerdo a los valores encontrados del ángulo de contacto para los andamios, podemos ver que este está influenciado tanto por el diámetro promedio de las nanofibras de los andamios como de la presencia de colágena y elastina. Sin embargo, cabe mencionar que las variaciones en el valor del ángulo de contacto en los diferentes andamios son reducidas, esto debido a que la concentración de colágena y/o elastina es baja, y por tanto las propiedades del PLA tienen una gran influencia en todos los andamios. El mayor valor en el ángulo de contacto lo presentó el andamio de PLA, esto debido a su moderada afinidad química con el agua, a pesar de que el diámetro promedio de las fibras en este andamio es mayor comparado con los otros andamios. El menor valor en el ángulo de contacto fue observado para el andamio de PLA-COL, demostrando que la colágena es una molécula que tiene bastante afinidad química con el agua, debido a sus grupos amida y como se observó en los valores de la conductividad eléctrica de las soluciones en la Tabla 13, la colágena le brinda mayores cargas electrostáticas a la solución y por ende a la superficie del andamio. El valor del ángulo de contacto para el andamio de PLA-ELAS resultó mayor que para el del PLA-COL, pero relativamente menor que el del PLA, esto también debido a la afinidad de los grupos funcionales de las moléculas presentes en la elastina con el agua, sin embargo como se puede observar en el valor de la conductividad eléctrica de las soluciones en la Tabla 13, la conductividad eléctrica de esta solución es menor comparada con la encontrada para PLA-COL, esto debido a que la colágena en su

estructura química presenta mayores grupos de aminoácidos, haciéndola una molécula más compleja que la elastina. Finalmente, el valor para el andamio de PLA-COL-ELAS, es menor comparado con el del PLA, pero mayor comparado con el del PLA-COL, esto debido a que se redujo la concentración de colágena y está presente la elastina, además es posible que también el ángulo de contacto en este caso este influenciado por el diámetro promedio de las fibras, siendo mayor para las fibras del andamio de PLA-COL-ELAS comparado con las fibras del andamio de PLA-ELAS, brindando una menor relación entre el área superficial/volumen. Estos resultados son relevantes para el análisis de la viabilidad celular de las células musculares lisas en los andamios que se describe en una sección posterior.

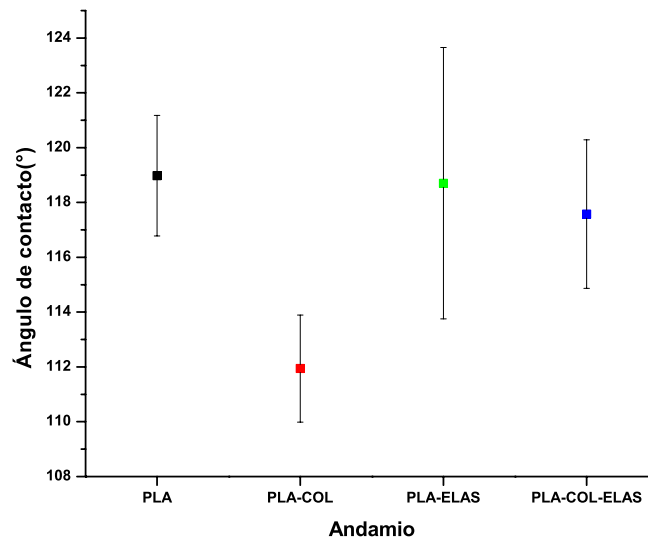


Figura 16. Ángulo de contacto de andamios de PLA con colágena y elastina.

5.3.1.5 Propiedades mecánicas en tensión uniaxial

En esta sección se determinaron las propiedades mecánicas de los andamios electrohilados de PLA con colágena y elastina tales como módulo de elasticidad, resistencia a la tensión y % de deformación máxima. El ensayo fue realizado con los andamios esterilizados y previamente puestos en incubación con medio de cultivo para asemejar las condiciones de cultivo a las cuales se van a aplicar.

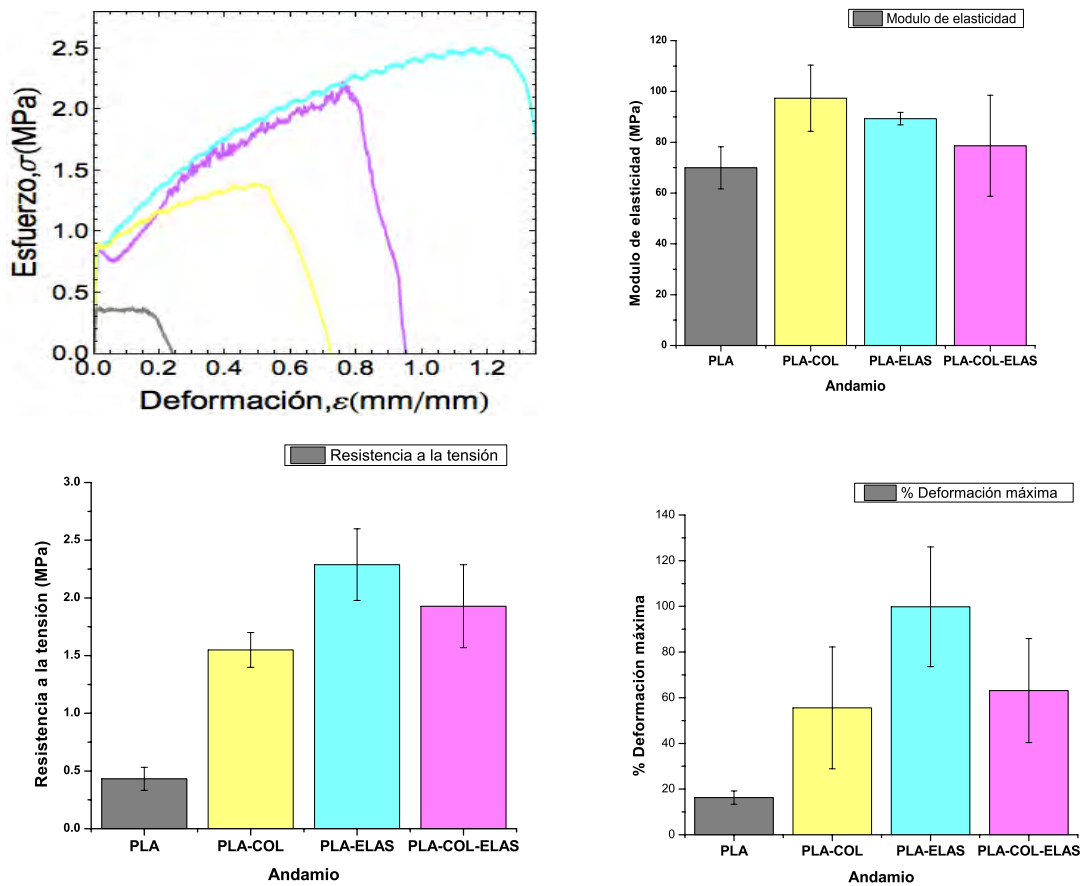


Figura 17. Propiedades mecánicas de los andamios de PLA con colágena y elastina

En la Figura 17 se presentan los resultados de las propiedades mecánicas obtenidas de los andamios en el ensayo de tensión uniaxial.

De acuerdo a los resultados del módulo de elasticidad, se observa que el valor para el andamio de PLA, es menor con respecto al de los andamios de PLA-COL, PLA-ELAS y PLA-COL-ELAS, lo que infiere que las moléculas de colágena y elastina refuerzan la zona elástica de los andamios. Sin embargo, el mayor valor es para el andamio de PLA-COL ya que la colágena aporta mayor rigidez al andamio. El valor para el andamio de PLA-COL-ELAS es menor que para el PLA-COL y PLA-ELAS, debido a que la colágena y elastina están en menor concentración.

En cuanto a la resistencia a la tensión el mayor valor es para el andamio de PLA-ELAS, lo cual nos indica que puede soportar más carga que los demás antes de romperse, este

comportamiento puede deberse a que la elastina, es un material menos rígido que la colágena. Por otra parte, el valor para el andamio de PLA es menor comparado con los otros andamios, lo cual se debe posiblemente a que la radiación UV ocasionó que algunas cadenas poliméricas se hallan roto y entrecruzado la colágena y la elastina.

Finalmente, en cuanto a los valores de deformación máxima, podemos ver que el menor valor es para el andamio de PLA, en un punto intermedio se encuentra el de PLA-COL-ELAS, seguido del andamio de PLA-COL y el mayor valor es para el de PLA-ELAS, esto debido a que la elastina es un material más elongable que el PLA y la colágena más rígida. De acuerdo a estos resultados, vemos que en el andamio de PLA-COL-ELAS, la colágena y elastina tienen efecto en las propiedades globales del andamio, brindándole unas características intermedias entre las que tienen los dos polímeros individualmente.

5.4 CULTIVO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS AISLADAS DE LA VEJIGA DE CONEJO NEOZELANDÉS

Las células musculares lisas fueron aisladas por medio de la disgregación enzimática de la vejiga de un conejo neozelandés. En la Figura 18 se puede observar el momento de la toma de la biopsia de la vejiga del conejo (Figura 18a), la cual fue tratada con colagenasa tipo I e incubada a condiciones estándar de cultivo (Figura 18b), y posteriormente podemos ver como las células migran del tejido a la placa de cultivo (Figura 18c). Una vez establecido el cultivo primario, las células musculares lisas se expandieron y se mantuvieron en condiciones estándares de cultivo.

En la Figura 19 se muestra un cultivo de células musculares lisas sembradas en cajas de cultivo, las cuales fueron utilizadas en el transcurso de este trabajo. Las células presentaron una morfología fusiforme alargada con finos extremos aguzados, lo cual está de acuerdo a lo descrito en la literatura para este tipo celular [61]–[63].

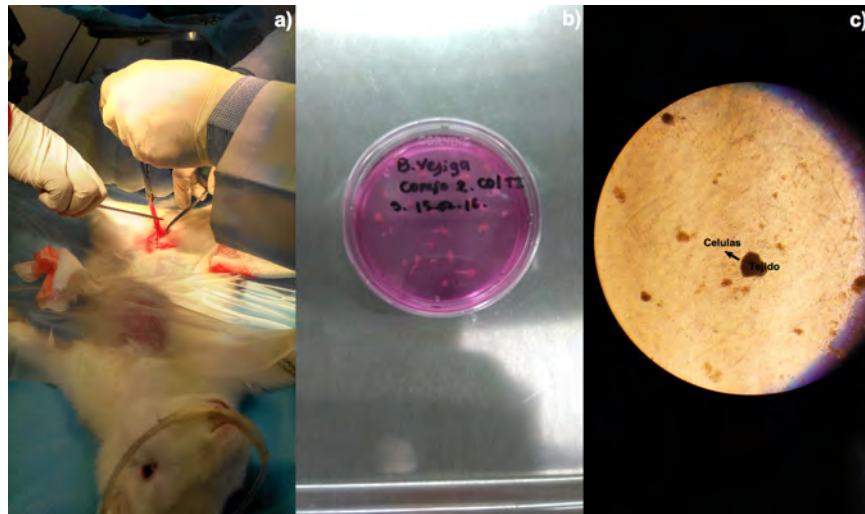


Figura 18. Biopsia y disgregación enzimática de la vejiga de un conejo neozelandés.

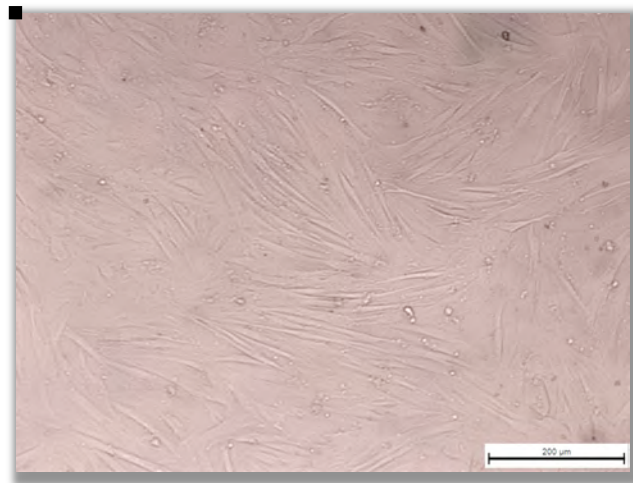


Figura 19. Micrografía en campo claro (10x) de células musculares lisas aisladas de la vejiga de conejo neozelandés.

Finalmente, cuando las células estuvieron confluentes se tripsinizarón para ser sembradas. En cada una de las etapas de este trabajo se sembraron las células musculares lisas en pase 2 y 3.

5.4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS POR MEB

Las células aisladas de la vejiga del conejo neozelandés fueron caracterizadas por microscopia electrónica de barrido, esto con el fin de observar más a fondo su morfología.

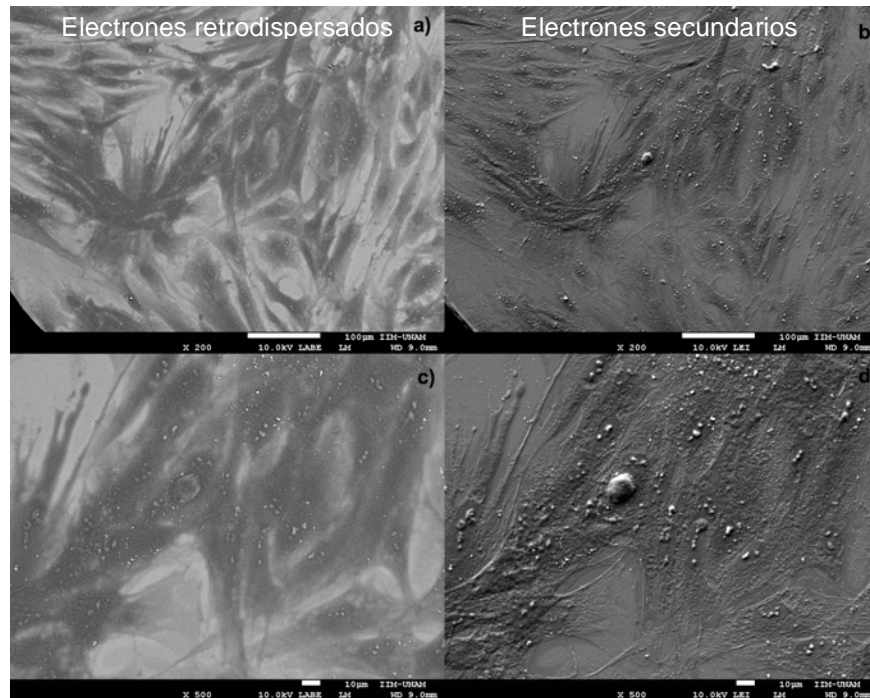


Figura 20. Micrografías de MEB de células musculares lisas aisladas de la vejiga de conejo neozelandés a diferentes aumentos: a)-b) 250x y c)-d)500x

En la Figura 20 podemos observar que las células presentan una morfología fusiforme alargada con finos extremos aguzados, corroborando lo encontrado en la sección anterior. En las micrografías también se puede detallar el núcleo y el citoplasma de cada una de las células. Asimismo, al cambiar de detector se puede detallar aún mejor la morfología de la célula, mientras que con el detector de electrones retrodispersados (Figura 20a y 20c) se observan las células solo superficialmente, con el detector de electrones secundarios (Figura 20b y 20d) se observa con mayor profundidad cada una de las células. Finalmente podemos decir que las células tienen una longitud promedio de 110 μm y un diámetro promedio de 25 μm .

5.4.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA.

Las células aisladas de la vejiga del conejo neozelandés fueron caracterizadas por medio de la técnica de inmunohistoquímica, esto con el fin de validar su fenotipo, ya que se partía de un cultivo primario, cabe resaltar que no se realizó citometría de flujo para caracterizar las células porque no se tenía acceso disponible a los instrumentos. Los marcadores evaluados fueron α -actina de musculo liso, miosina de musculo liso, caldesmona y calponina, los cuales son los más utilizados para describir el estado fenotípico de las células musculares lisas contráctiles [61][64].

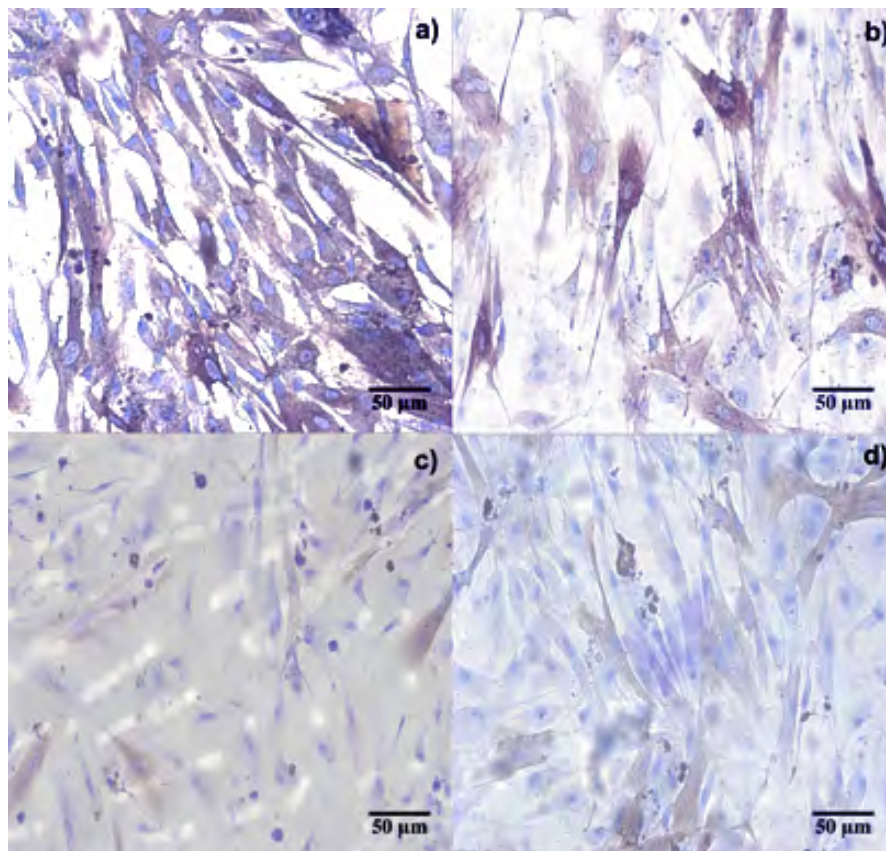


Figura 21. Resultados representativos de la inmunohistoquímica de las células de vejiga de conejo para marcadores fenotípicos de células de musculo liso: a) α -actina, b) mosina, c) caldesmona y d) calponina. Fotos tomadas a 20x en un microscopio Leica DMIRE2 en campo claro.

En la Figura 21 se presentan los resultados de la inmunohistoquímica realizada. Se puede observar que las células en su mayoría fueron positivas para α -actina (Figura 21a) y miosina (Figura 21b). Por otra parte, las células expresaron moderadamente caldesmona (Figura 21c) y calponina (Figura 21d). Las variaciones en la intensidad del marcaje solo se deben a la naturaleza del tejido de origen de las células o la técnica realizada, sin embargo, han expresado todos los marcadores evaluados y confirmamos el fenotipo de musculo liso para las células aisladas de la vejiga de conejo. Asimismo, podemos relacionar los resultados encontrados con lo reportado en la caracterización fenotípica de células aisladas de vejiga de humano y rata [65].

5.4.3 CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS AISLADAS DE VEJIGA DE CONEJO POR INMUNOFLUORESCENCIA.

La técnica de inmunofluorescencia nos permite también analizar la expresión de marcadores de diferenciación celular para las células musculares lisas aisladas en este trabajo. Es por ello que para complementar la técnica mencionada en la sección anterior se realizaron marcajes para α -actina y F-actina para caracterizar el fenotipo de las células musculares lisas. Para ello se llevaron a cabo diferentes diluciones de los anticuerpos para encontrar la concentración más adecuada.

En las siguientes figuras se presentan los resultados encontrados:

Faloidina conjugada con Alexa 488

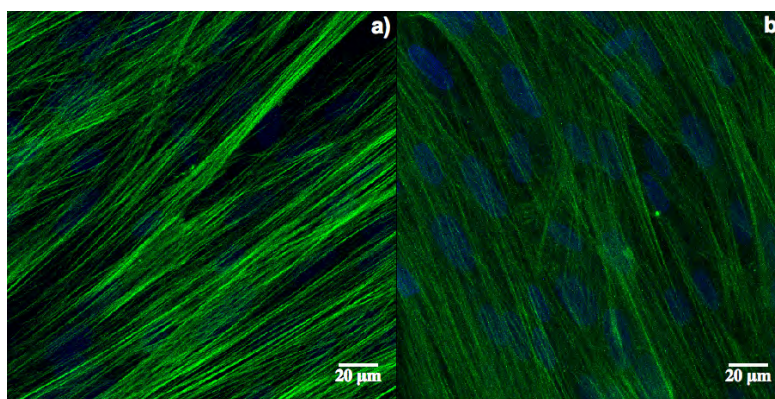


Figura 22. Marcaje para F-actina con dilución de faloidina conjugada con Alexa 488: a) 1:50, b) 1:100. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP8 a 63x.

En la Figura 22, podemos observar que las células aisladas de la vejiga de conejo son positivas para F-actina utilizando como anticuerpo faloidina conjugada con Alexa 488. Además, al variar la concentración de este, la intensidad de la fluorescencia disminuye relativamente. Por lo tanto, se seleccionó una dilución de 1:100 de este anticuerpo para utilizar en los experimentos posteriores.

Alexa 488(para α -actina)

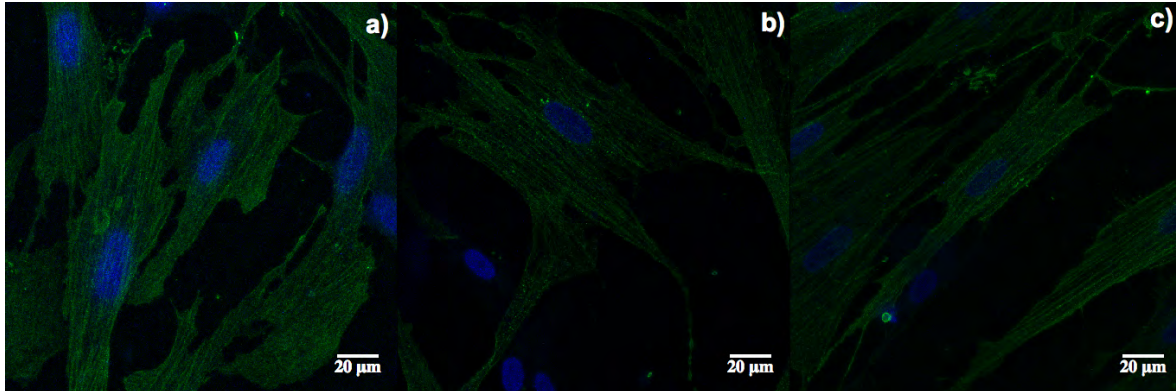


Figura 23. Marcaje para α -actina con dilución de Alexa 488: a) 1:200, b)1:400 y c) 1:600. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP8 a 63x.

En la Figura 23, podemos observar que las células aisladas de la vejiga de conejo son positivas para α -actina utilizando como anticuerpo secundario Alexa 488. Además, al disminuir la concentración de este no hay cambios significativos en la intensidad de la fluorescencia. Por lo tanto, se seleccionó una dilución de 1:300 de este anticuerpo para utilizar en los experimentos posteriores.

Alexa 594(para α -actina)

En la Figura 24, podemos observar que las células aisladas de la vejiga de conejo son positivas para α -actina utilizando como anticuerpo secundario Alexa 594. Además, al disminuir la concentración de este no hay cambios significativos en la intensidad de la fluorescencia. Por lo tanto, se seleccionó una dilución de 1:300 de este anticuerpo para utilizar en los experimentos posteriores. Finalmente, de acuerdo a estos resultados, las células aisladas de la vejiga de conejo expresaron uno de los marcadores característicos para musculo liso [66], lo cual corrobora el fenotipo de células musculares lisas y complementa los estudios anteriores de inmunohistoquímica.

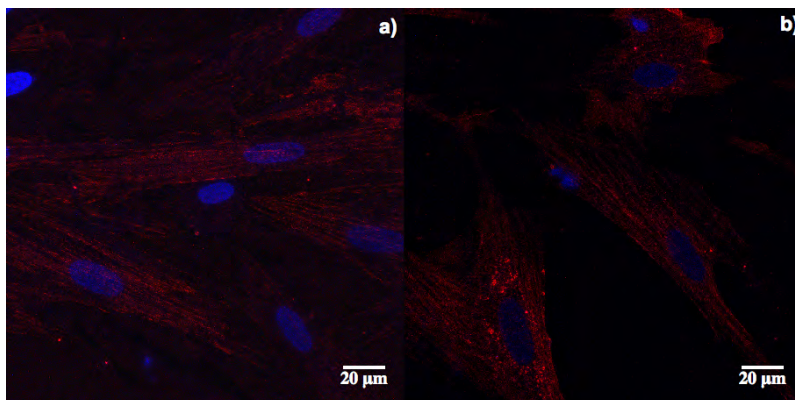


Figura 24. Marcaje para α -actina con dilución de Alexa 594: a) 1:200 y b) 1:400. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP8 a 63x.

5.4.4 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE SENSIBILIDAD DEL ENSAYO DE MTT

En la determinación de los límites de sensibilidad del ensayo de MTT [67], se realizaron diferentes ensayos para conocer el rango en que la absorbancia es directamente proporcional al número de células musculares lisas, y además la concentración de MTT y el volumen de DMSO adecuados para obtener una mejor linealidad en la curva [68]. A continuación, se presentan los resultados.

En la Figura 25 observamos que al utilizar 10 μ L de MTT y 50 μ L de DMSO, la curva a partir de 10,000 células, no es lineal, por lo cual se puede inferir que la concentración del reactivo aún no es suficiente para reaccionar con todas las células vivas presentes en el cultivo o el DMSO no es suficiente para solubilizar todo el formazan formado.

En la Figura 26 se observa que al utilizar 20 μ L de MTT y 50 μ L de DMSO, el reactivo es suficiente, pero posiblemente el DMSO no es suficiente para lisar todas las células que reaccionaron, ya que a 25,000 células disminuye la absorbancia.

Al aumentar el volumen de DMSO (Figura 27 y 28), podemos ver que la linealidad de la curva mejora, y se puede ver que la concentración de células vivas es directamente proporcional a la absorbancia. Sin embargo, cuando utilizamos 20 μ L de MTT y 100 μ L de

DMSO, los puntos se acercan a un más a la linealidad, dando una mejor regresión. Por lo tanto, se seleccionó esta concentración para los experimentos posteriores de viabilidad celular en los andamios electrohilados.

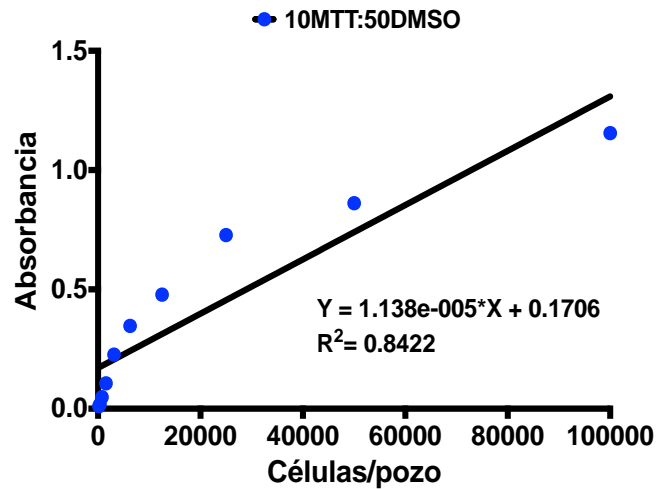


Figura 25. Curva absorbancia vs número de células con 10 μ L de MTT y 50 μ L de DMSO.

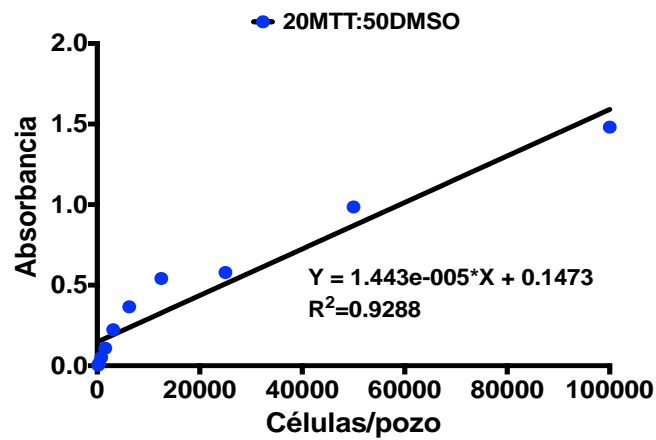


Figura 26. Curva absorbancia vs número de células con 20 μ L de MTT y 50 μ L de DMSO.

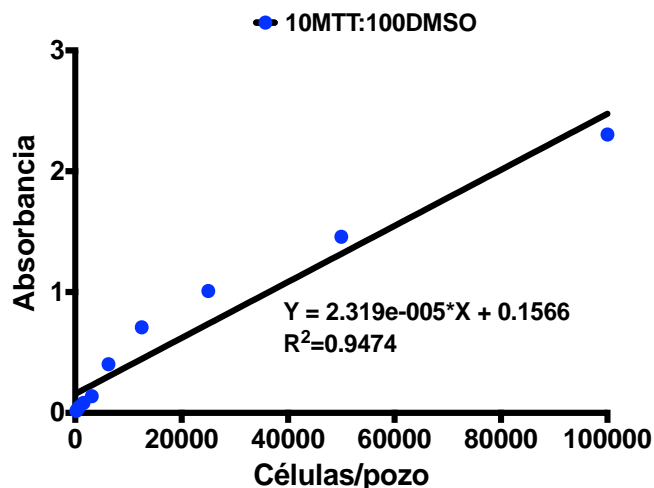


Figura 27. Curva absorbancia vs número de células con 10 μ L de MTT y 100 μ L de DMSO.

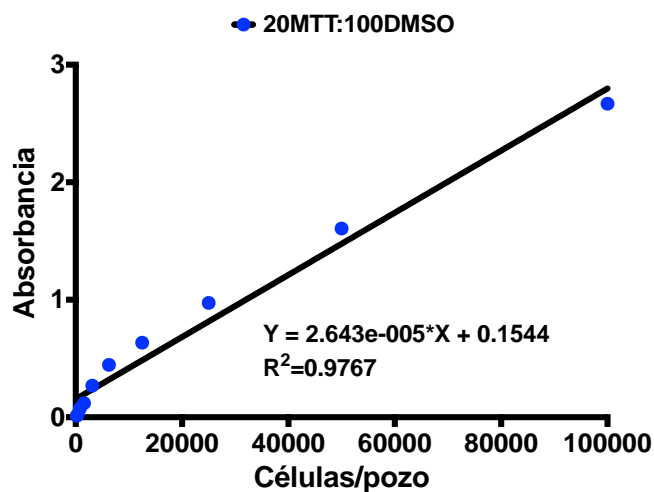


Figura 28. Curva absorbancia vs número de células con 20 μ L de MTT y 100 μ L de DMSO.

5.4.5 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO INICIAL DE CÉLULAS Y LA DURACIÓN DEL ENSAYO DE MTT

La determinación del número inicial de células y la duración del ensayo se realizó por medio de la evaluación de tres diferentes concentraciones celulares, las cuales fueron sembradas en placas de 24 pozos sin andamio y otras sembradas en el andamio de PLA-

ELAS para comparación. La selección de la concentración inicial de las células se basó en encontrar la concentración tal que, durante los 7 días del ensayo presentara un comportamiento de crecimiento celular exponencial.

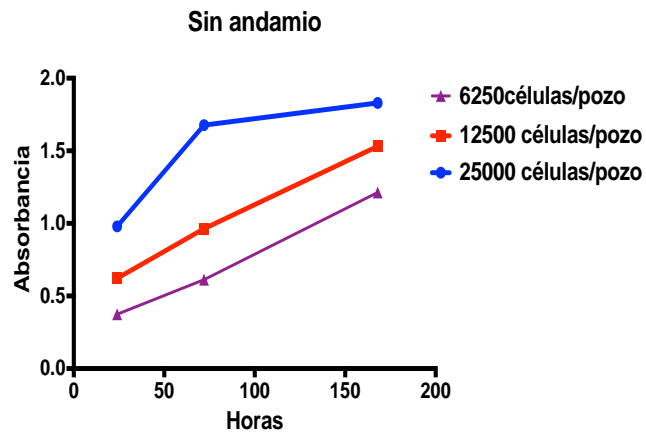


Figura 29. Curva absorbancia vs tiempo para células cultivadas sin andamio a diferentes concentraciones.

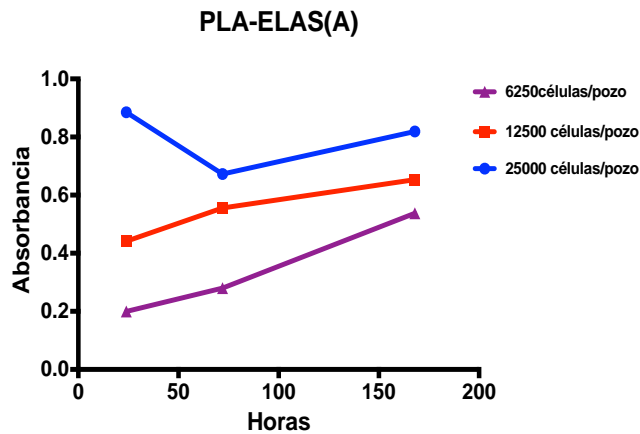


Figura 30. Curva absorbancia vs tiempo para células cultivadas en andamio de PLA-ELAS a diferentes concentraciones.

En la Figura 29, se presenta la curva de absorbancia vs tiempo para células musculares lisas sembradas en placa de cultivo a diferentes concentraciones iniciales, se observa que para una concentración inicial de 6,250 y 12,500 células, el crecimiento celular es lineal durante los 7 días, y la absorbancia es directamente proporcional al tiempo de cultivo, sin embargo para una concentración inicial de 25,000 células, el crecimiento deja de ser lineal, y de 3 a 7 días no hay un aumento significativo, y las células se encuentran en fase estacionaria. Por otra parte, en las curvas de la siembra en andamios (Figura 30), se tiene que el crecimiento es lineal para una concentración inicial de 6,250 y 12,500, sin embargo, para la concentración inicial de 6,250, el crecimiento es más exponencial durante los siete días. Además, podemos ver que para una concentración inicial de 25,000 células la absorbancia disminuye al tercer día y luego aumenta para el séptimo día, indicando que la concentración de MTT pudo agotarse, o las células se saturaron en el andamio. Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados, para los experimentos posteriores de viabilidad y proliferación celular en los andamios electrohilados, se seleccionó una concentración inicial entre 6,250 y 12,500 células.

5.5 CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS EN ANDAMIOS ELECTROHILADOS DE PLA CON COLÁGENA Y ELASTINA

5.5.1 *EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE EL ENSAYO DE MTT*

Las células musculares lisas fueron sembradas en los andamios electrohilados de PLA con colágena y elastina, donde se evaluó la viabilidad y proliferación celular a siete días mediante el ensayo de MTT, para determinar las diferencias entre cada una de las composiciones de los andamios respecto al crecimiento celular. En este experimento la concentración inicial de células fue de 6,250 células/pozo.

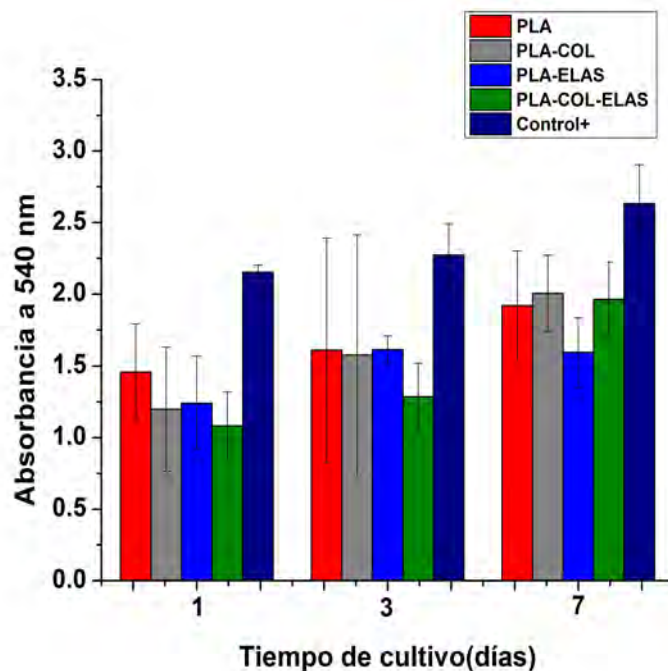


Figura 31. Viabilidad y proliferación de células musculares lisas en andamios de PLA con colágena y elastina por medio del ensayo de MTT.

Tabla 15. Rapidez de proliferación celular en andamios de PLA con colágena y elastina.

Andamio	$\Delta A/\Delta t$
PLA	0.0032
PLA-COL	0.0054
PLA-ELAS	0.0021
PLA-COL-ELAS	0.0063
Control +	0.0034

En la Figura 31 se presentan los resultados de los valores de absorbancia con respecto al tiempo para cada uno de los andamios evaluados. De acuerdo al principio del ensayo de MTT, al aumentar el número de células en el cultivo, el valor de la absorbancia aumentará dentro de un cierto valor, por lo que la absorbancia será directamente proporcional al número de células vivas. Por lo tanto, graficando los datos de absorbancia para cada uno

de los andamios, se ajustaron a una regresión lineal, obteniendo la pendiente de la recta, la cual, la relacionamos con la rapidez de proliferación celular ($\Delta A/\Delta t$), la cual se lista en la Tabla 15 para cada uno de los andamios. Al primer día de cultivo, podemos ver que en todos los andamios hubo una buena viabilidad celular, demostrando que los materiales no son citotóxicos para las células musculares lisas. Al séptimo día de cultivo, se observa que, en el andamio de PLA, hubo un 32% más de crecimiento celular (tomando como base la absorbancia al primer día de cultivo), mientras que en los andamios de PLA-COL, PLA-ELAS y PLA-COL-ELAS de 67, 28 y 82% respectivamente. De acuerdo a estos resultados, se infiere que al agregar colágena al PLA promueve la proliferación de las células musculares lisas. Este aumento en la proliferación celular es consistente con estudios previos que mostraron que al agregar colágena al poliuretano mejoró la adhesión y proliferación de células musculares lisas [69]. Además, de acuerdo a resultados anteriores, la colágena aporta al andamio una superficie reactiva, debido a su alta conductividad eléctrica. Por otra parte, comparando el andamio de PLA con el de PLA-ELAS, no se observa diferencia significativa en la proliferación celular. Finalmente, el andamio de PLA-COL-ELAS, presenta la mayor rapidez de proliferación celular, por lo que al combinar la colágena y elastina, estimula en mayor proporción el crecimiento de células musculares lisas. Este comportamiento se correlaciona con el encontrado al agregar colágena y elastina al poliuretano en el crecimiento de células musculares lisas de arteria coronaria de humano. Por lo tanto, la estimulación de la proliferación celular de las células musculares lisas, no solo está gobernada por el diámetro promedio de las fibras o de la hidrofiliidad de los andamios, sino por la combinación de muchos factores que ocurren internamente y que aún son difíciles de aclarar.

5.5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS CULTIVADOS *IN VITRO* POR MEB

Los andamios de PLA con colágena y elastina cultivados *in vitro* con células musculares lisas fueron caracterizados por medio de MEB para observar la morfología y adhesión de las células musculares lisas.

A continuación, se presentan las micrografías de MEB de cada uno de los andamios a diferentes tiempos de cultivo:

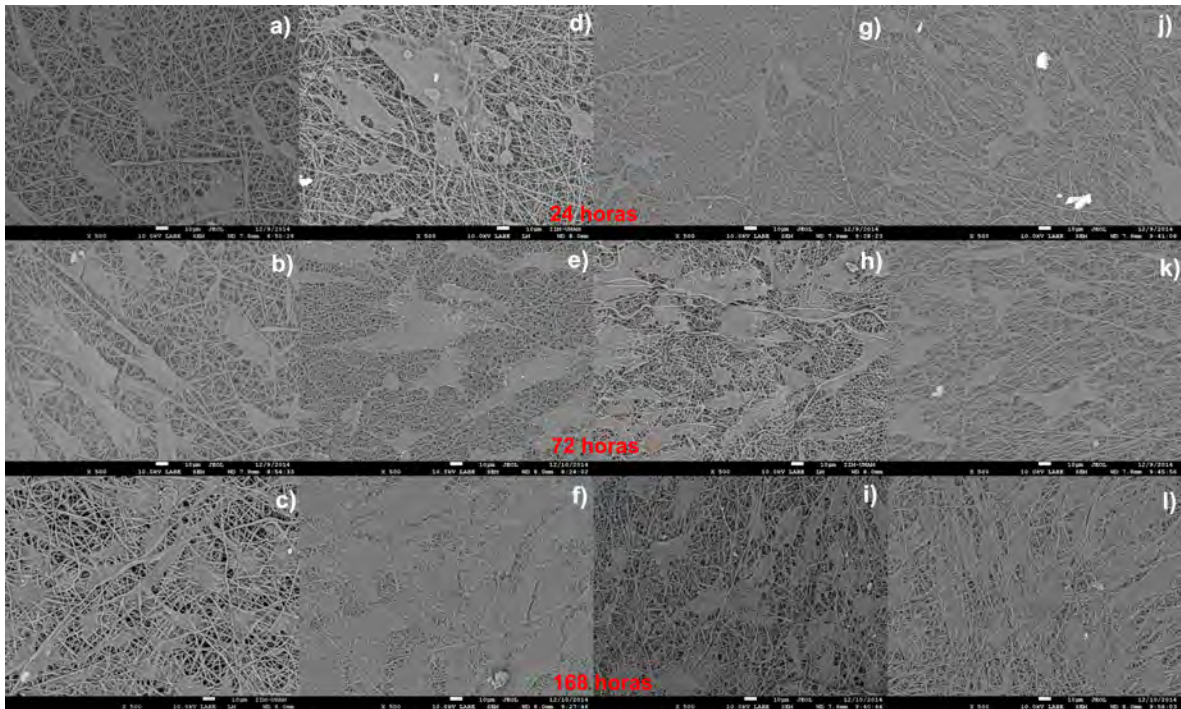


Figura 32. Micrografías de MEB(500x) de andamios de: a)-c) PLA, d)-f)PLA-COL, g)-i)PLA-ELAS y j)-l) PLA-COL-ELAS cultivados con células musculares lisas durante 7 días.

La capacidad de las células de adherirse a la superficie de un andamio es un factor importante para la ingeniería de tejidos [70]. En la Figura 32 podemos observar que todos los andamios presentaron buena adhesión celular desde el primer día al séptimo día de cultivo. Las células se adhirieron con una morfología poligonal bien extendida a lo largo de las fibras de cada uno de los andamios, presentando conexiones entre ellas. Además, cubrieron un gran porcentaje de área de los andamios al avanzar el tiempo de cultivo. A los siete días de cultivo ya se observa la formación de matriz extracelular y una cantidad mayor de células adheridas en los andamios de PLA-COL y PLA-COL-ELAS, en comparación con los andamios de PLA y PLA-ELAS. Sin embargo, en el andamio de PLA-COL-ELAS visualmente, hay un mayor índice de porcentaje de área cubierta por células. Asimismo, la infiltración de las células en alguno de los andamios fue observada. Por lo tanto, podemos decir que el andamio de PLA-COL y PLA-COL-ELAS presentan una buena compatibilidad celular y favorecen la adhesión y crecimiento de las células musculares lisas.

5.6 ANDAMIOS ELECTROHILADOS DE PCU Y PLA CON COLÁGENA Y ELASTINA CON FIBRAS AL AZAR.

De acuerdo a los resultados de la sección anterior se seleccionó la solución de PLA-COL-ELAS ya que los andamios fabricados con esta solución presentaron el mejor comportamiento en la viabilidad, proliferación y adhesión de células musculares lisas. Por lo tanto, en esta etapa se realizó el montaje de un sistema de electrohilado simultáneo[71] de las soluciones de PCU al 14% [p/v] ($\mu= 3744$ cP y $\sigma= 0.78\mu\text{S/cm}$) y PLA-COL-ELAS[70:1:1,p/p] al 15% [p/v] en base al peso del PLA. Este sistema de inyección se realizó debido a que dichas soluciones no son miscibles por lo tanto se ideó la forma de que en el andamio pudieran coexistir los dos tipos de fibras. Se probaron los sistemas lado a lado y lados opuestos como se presenta en la Figura 33. El sistema lado a lado no permitía que las fibras de cada solución se mezclaran al llegar al colector, ya que los jets de cada solución se repelían y las fibras de cada solución se depositaban a un extremo del colector, dejando la parte central en blanco como se representa en la Figura 34. Por el contrario, al utilizar un sistema de lados opuestos no se observaba repulsión en los jets y toda la superficie del colector presentaba fibras.

Para poder analizar la presencia de las fibras de cada una de las soluciones de polímeros se añadió fluoresceína como fluorocromo a la solución de PLA-COL-ELAS para poder visualizar y distinguir en un microscopio confocal la distribución de fibras en el andamio de acuerdo a los diferentes porcentajes de volumen inyectado de las soluciones. Los resultados encontrados se presentan en la Figura 35. De acuerdo a ello podemos ver como va disminuyendo la aparición de fibras fluorescentes de PLA-COL-ELAS, al cambiar de una relación de 75:25 (Figura 35c) donde las fibras fluorescentes son las mayoría, a 25:75 (Figura 35d) donde se aprecia en un menor porcentaje las fibras fluorescentes. De tal manera, se corroboró la presencia de los dos tipos de fibras en los andamios y las diferencias en concentración de acuerdo al volumen inyectado de cada una de las soluciones.

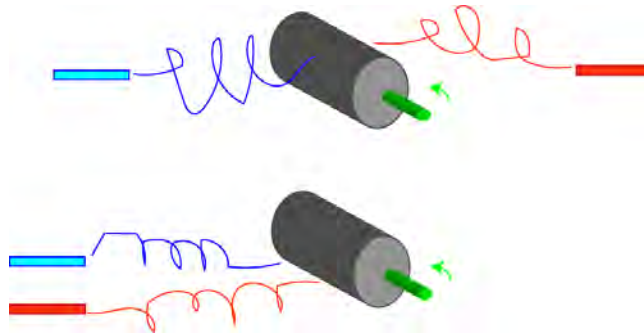


Figura 33. Sistemas de electrohilado simultáneo lado-lado y lados opuestos

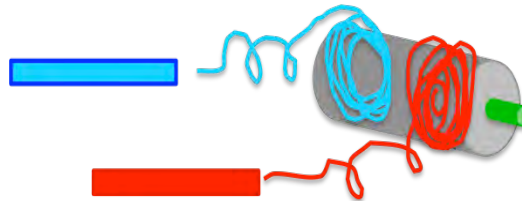


Figura 34. Repulsión de jets en el sistema de electrohilado simultáneo lado-lado

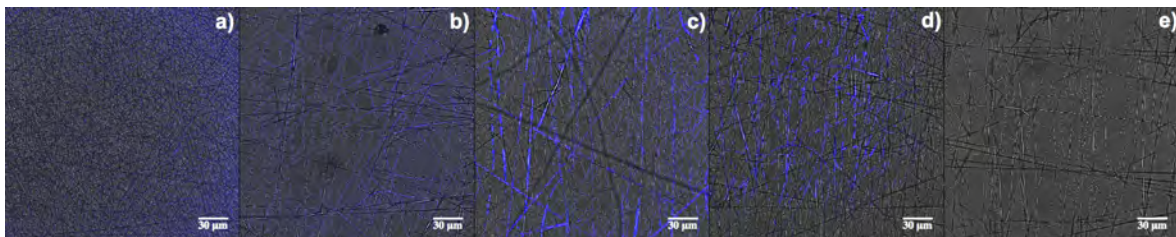


Figura 35. Análisis del depósito de fibras en el sistema de electrohilado simultáneo por lados opuestos de soluciones de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes porcentajes de Vti: a) 100:0, b) 75:25, c) 50:50, d) 25:75 y e) 0:100. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP5.

5.6.1 MORFOLOGÍA POR MEB

La Figura 36 presenta las micrografías de MEB obtenidas de los diferentes andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes porcentajes de Vti y la distribución de los diámetros de las fibras. En todos los andamios se observan fibras libres de bulbos de disolvente y sin la

presencia de precipitados. Se puede observar que el andamio de 100% PCU (Figura 35a) presenta fibras de mayor diámetro en comparación con los otros andamios, esto es debido a que esta solución presenta una alta viscosidad debido a sus características reológicas [72]. El diámetro promedio de las fibras de este andamio fue de 1145 ± 260 nm.

Al adicionar fibras de PLA-COL-ELAS como se observa en el andamio de 25:75 (Figura 35b), podemos ver que ya hay presencia de fibras de menor diámetro, las cuales son características de la solución de PLA-COL-ELAS y por tanto el diámetro promedio de las fibras de este andamio disminuyó a 982 ± 301 . Para el andamio de 50:50 (Figura 35c) se puede ver claramente la presencia de los dos tipos de fibras debido al electrohilado simultáneo de las dos soluciones, podemos ver fibras gruesas debido al PCU y fibras delgadas debido a la solución de PLA-COL-ELAS, por lo que en el diagrama de distribución de frecuencias se puede ver un comportamiento bimodal. El diámetro promedio de las fibras fue de 773 ± 390 .

Finalmente, en el andamio de 75:25 (Figura 35d) las características de las fibras en su mayoría son debido a la solución de PLA-COL-ELAS, con poca presencia ya de fibras gruesas características de la solución de PCU. El diámetro promedio fue de 496 ± 111 . Cabe resaltar que la presencia de dos tipos de fibras puede promover una mayor adhesión y proliferación en los andamios, como lo menciona la literatura [73].

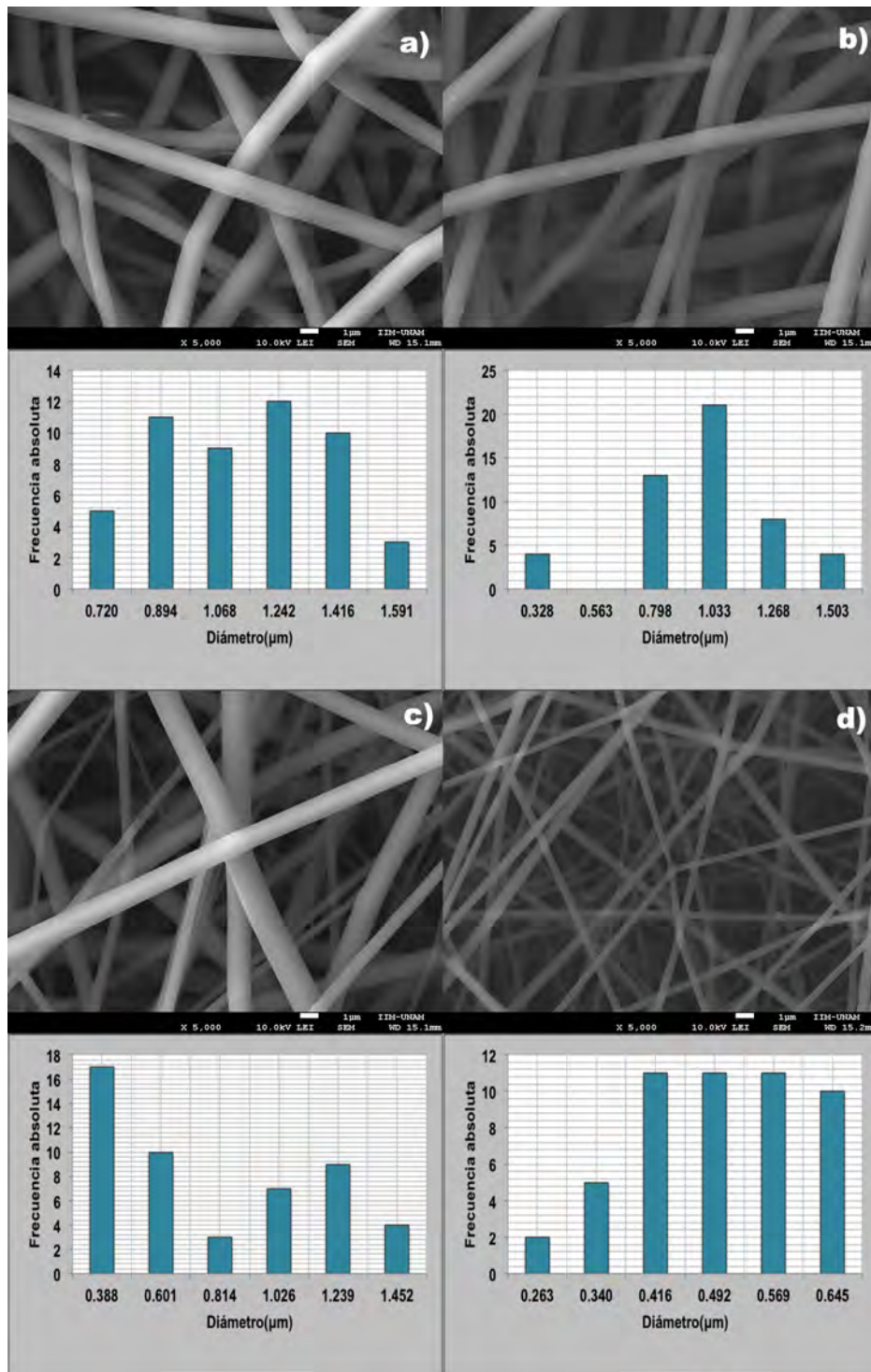


Figura 36. Micrografías de MEB(5000x) de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación %Vti) con la distribución de diámetros de las fibras: a) 0:100, b) 25:75,c) 50:50 y d) 75:25.

5.6.2 ANÁLISIS QUÍMICO POR FTIR

A continuación, se presentan los espectros de FTIR obtenidos de los andamios fabricados en esta etapa.

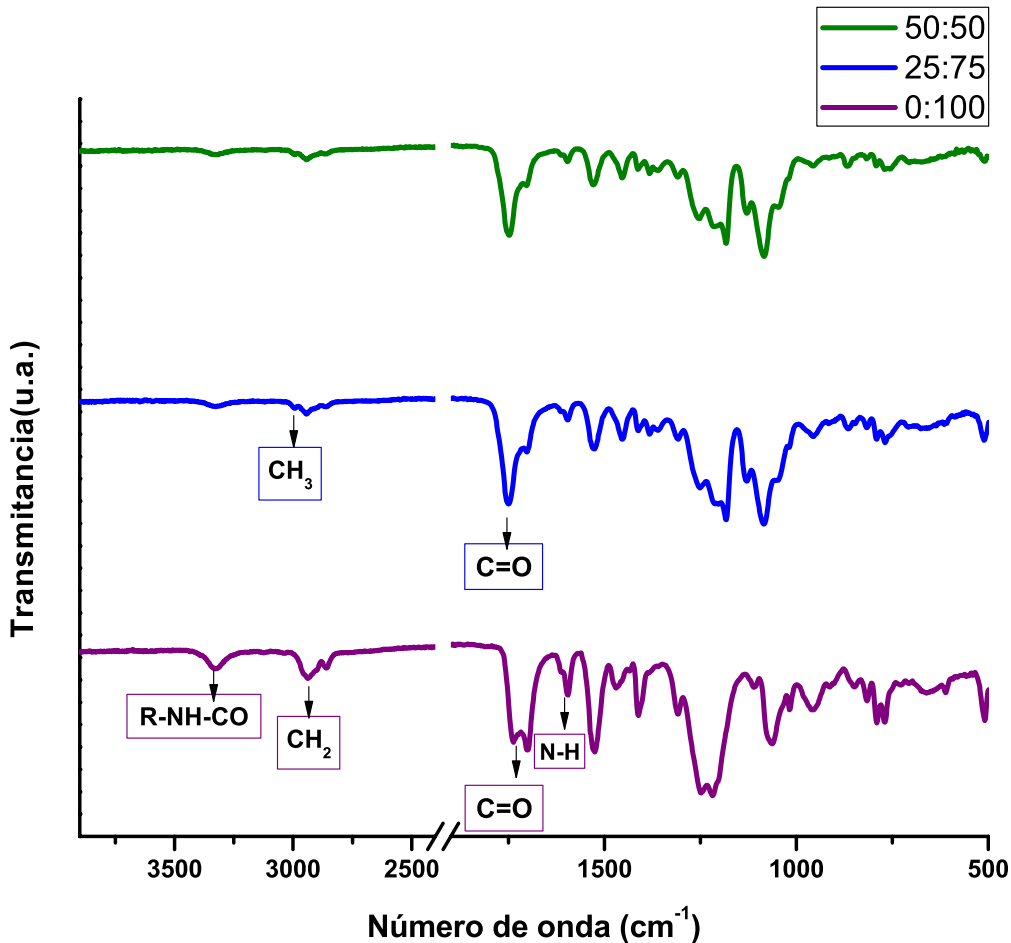


Figura 37. Espectros FTIR de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes porcentajes de Vti: a) 0:100, b)25:75 y c) 50:50

En la Figura 37a podemos observar el espectro para el poli(carbonato-uretano). Se encuentra que a 3328 cm⁻¹ aparece una banda de tensión simétrica del N-H con enlace de hidrogeno. A 2937 y 2859 cm⁻¹ se encuentran dos bandas debido a la vibración asimétrica y simétrica del átomo de hidrógeno en el grupo -CH₂-. A 1735 y 1701 cm⁻¹ aparecen dos bandas debido a la vibración de tensión del C=O en el grupo éster y en el grupo amida respectivamente. A 1526 cm⁻¹ presenta una banda debido a la deformación o flexión del enlace N-H en el grupo amida [52]. En los espectros para los andamios de 25:75(Figura 37b) y 50:50(Figura 37c) se observan las bandas características del PCU, mencionadas

anteriormente, sin embargo al agregar fibras de PLA-COL-ELAS podemos apreciar la aparición de la banda a 2993 cm^{-1} , la cual, como se menciona en la sección 5.3.1.2 pertenece a la vibración de tensión del enlace C-H en el grupo metilo característico del PLA. Además, la banda del enlace C=O correspondiente a los grupos éster, aumenta y se desplaza a 1743 cm^{-1} debido a la presencia de los grupos éster del PLA.

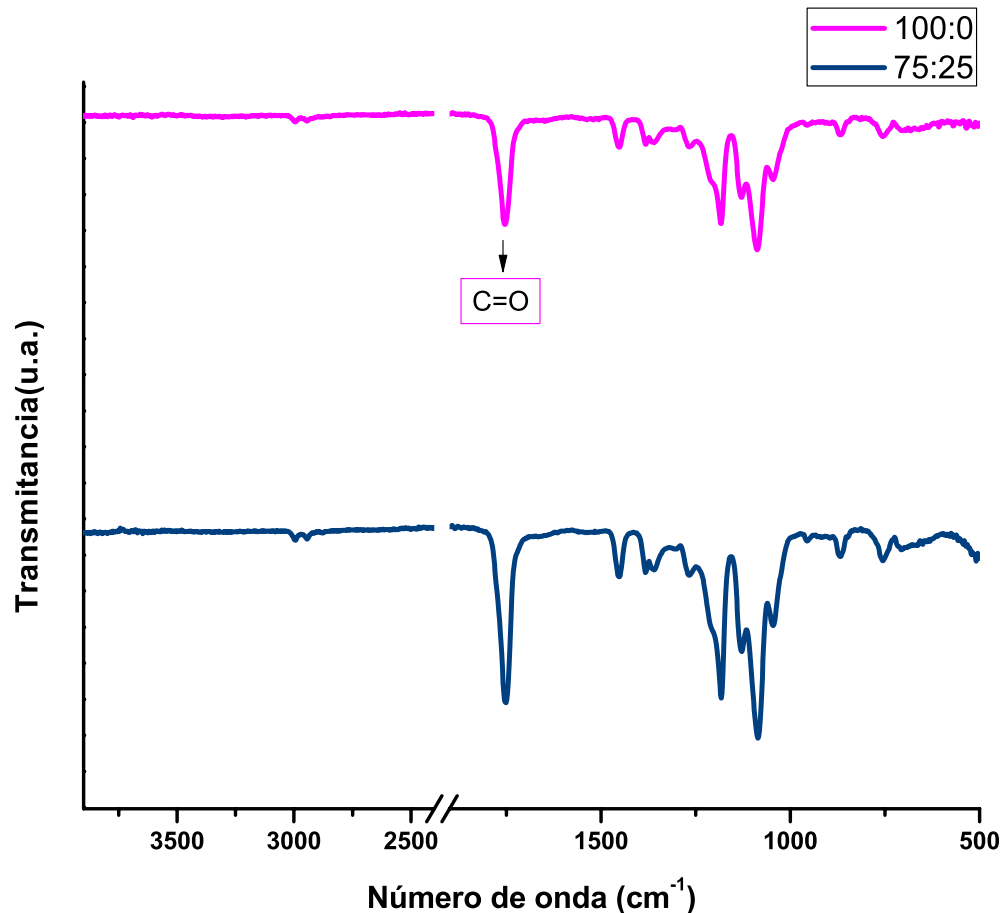


Figura 38. Espectros FTIR de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes porcentajes de Vti: a) 75:25 y b)100:0

Por otra parte, en la Figura 37 podemos observar la comparación del espectro del andamio de 100% PLA-COL-ELAS(Figura 38a) y del andamio de 75:25(Figura 38b), en el cual se aprecian las bandas características del PLA y además las de los grupos amida de la colágena y elastina, descritas en la sección 5.3.1.2. Sin embargo se observan unas bandas a 2947 cm^{-1} y 2848 cm^{-1} debido a los grupos $-\text{CH}_2-$ del PCU, las cuales son débiles debido a la baja concentración del PCU en el andamio. Con estos resultados, podemos confirmar la presencia de los dos tipos de fibras en los andamios, y como varia

la aparición e intensidad de cada una de las bandas características de acuerdo a los diferentes porcentajes de Vti de las soluciones poliméricas.

5.6.3 PROPIEDADES TÉRMICAS

La caracterización del comportamiento térmico de los andamios electrohilados en esta etapa, se llevo a cabo por medio de las técnicas de calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico. Por medio de estos resultados, se determinaron los valores de las diferentes transiciones térmicas que ocurren en cada uno de ellos. Además, observar el cambio en los termogramas de acuerdo a la variación en la composición de las fibras de PLA-COL-ELAS y PCU en los andamios.

Los termogramas obtenidos por DSC se presentan en la Figura 39. Cabe resaltar, que el PCU, es un polímero denominado elastómero, donde su estructura esta compuesta por dos fases, un segmento duro(uretano) y un segmento blando(carbonato), donde los microdominios de los segmentos duros están dispersos en una matriz de segmentos suaves[74]. Esta particular estructura es la responsable de la versatilidad de sus propiedades físicas y mecánicas. Teniendo en cuenta lo anterior, en el termograma para el andamio de PLA-COL-ELAS-PCU(Relación %Vti) (0:100) o andamio de PCU (Figura 39a) se observa a -22.27°C la temperatura de transición vítrea del segmento suave y a -3.03°C la temperatura de transición vítrea del segmento rígido. Seguidamente, un pico endotérmico a 66.30°C debido a la fusión del segmento suave. Finalmente, a 177.12°C aparece otro pico endotérmico debido a la fusión del segmento duro.

En el termograma para el andamio de 25:75 (Relación %Vti)(Figura 39b) se observan las mismas transiciones térmicas descritas para el termograma del andamio de PCU con un leve corrimiento de la temperatura de fusión del segmento suave a 65.43°C , y la aparición de un pico endotérmico ligeramente pronunciado a 152.58°C debido a la fusión de las fibras de PLA-COL-ELAS. En la Figura 39c, se encuentra el termograma para el andamio de 50:50 (Relación % Vti), donde no se puede distinguir claramente las temperaturas de transición vítrea de las fases del PCU, y aparece la temperatura de transición vítrea del PLA-COL-ELAS a 65.43 que se traslapa con el pico endotérmico de la fusión del segmento suave del PCU. Asimismo, se observa la aparición de un nuevo pico exotérmico a 97.22°C debido a una cristalización por parte del PLA-COL-ELAS, comportamiento que se describió en la sección 5.3.1.3. De igual forma se observa un pico endotérmico mas pronunciado a 151.9°C debido a la fusión de las fibras de PLA-COL-ELAS, que en este

caso se encuentran en mayor cantidad que en el andamio anterior y por ende podemos observar con más claridad las transiciones térmicas debido a las fibras de PLA-COL-ELAS. De igual forma, se sigue observando la temperatura de fusión del segmento duro del PCU a 177.48°C. Finalmente, en el termograma para el andamio de 75:25(Relación %Vti)(Figura 39d), se observan las transiciones térmicas del PCU atenuadas debido a la baja cantidad de fibras de PCU que se encuentran en este andamio, por el contrario se observan claramente las transiciones térmicas de las fibras de PLA-COL-ELAS, a 65.01°C la temperatura de transición vítrea, seguido de un pico exotérmico a 97.36°C debido a la cristalización de la fase amorfa cristalizable de la estructura de las fibras de PLA-COL-ELAS y un pico endotérmico bastante pronunciado a 151.47°C. Con estos resultados podemos corroborar la presencia de los dos tipos de fibras en los andamios y como varían las transiciones térmicas de estos de acuerdo a la composición de cada uno de ellos.

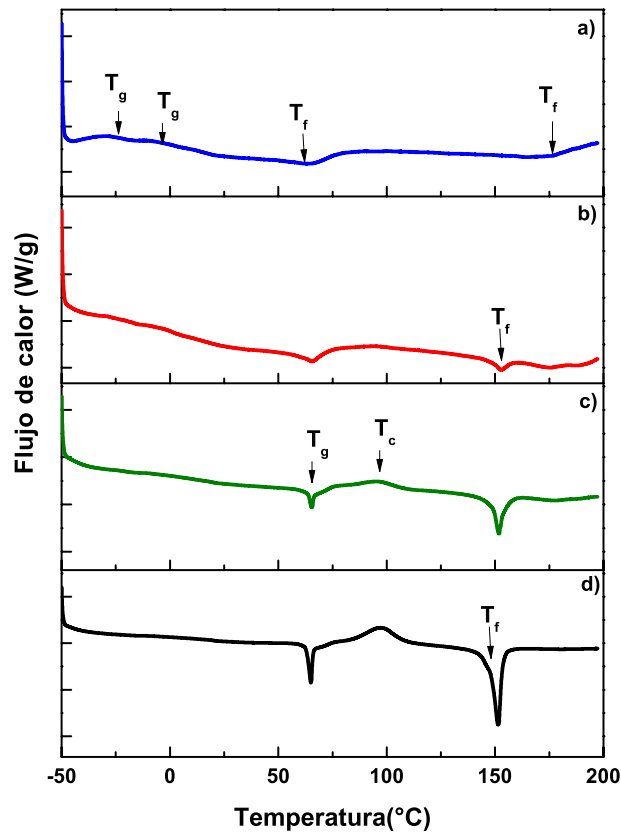


Figura 39. Termogramas de DSC de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU(Relación%vti): a)0:100, b)25:75, c)50:50 y d)75:25.

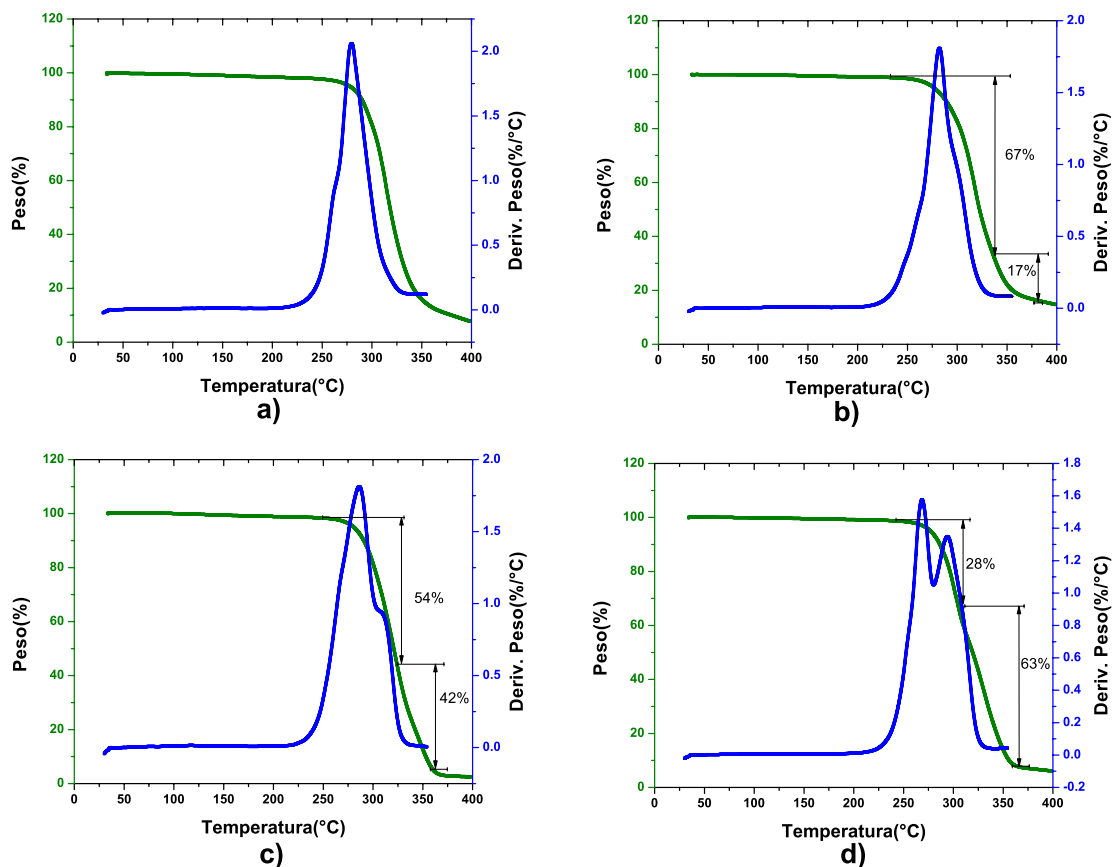


Figura 40. Termogramas de TGA de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU(Relación%vti): a)0:100, b)25:75, c)50:50 y d)75:25.

En cuanto al análisis termogravimetrico de las muestras de andamios, se tiene para el andamio de PCU(Figura 40a) una Td de 314.47°C y solo se observa un cambio de peso. En el andamio de 25:75(Relación %Vti)(Figura40b) se observan dos cambios de peso, como se esperaba, ya que en el andamio se encuentran dos tipos de fibras. El primer cambio de peso correspondiente a las fibras de PCU(Td= 317.58°C, 67% de perdida de peso del total de muestra) y el segundo correspondiente a las fibras de PLA-COL-ELAS(Td=337.74°C, 17% de perdida de peso), congruente con las relaciones establecidas para la muestra. En el termograma para el andamio de 50:50(Relación %Vti)(Figura 40c), también se observan dos cambios mas significativos que en la muestra anterior. El primero para las fibras de PCU(Td=322.47, 54% de pérdida de peso) y el segundo para las fibras de PLA-COL-ELAS (Td=348.73°C, 42% de pérdida de peso). En el termograma para el andamio de 75:25 (Figura 40c) también se observa los dos

cambios de peso, el primero para las fibras de PCU en menor proporción ($T_d=302.31$, 28% de pérdida de peso) y el segundo para las fibras de PLA-COL-ELAS (331.02°C , 63% de pérdida de peso). Por lo tanto podemos ver como varia la estabilidad térmica de los andamios de acuerdo a la composición, siendo mayor para las fibras de PLA-COL-ELAS en comparación las fibras de PCU.

5.6.4 **ÁNGULO DE CONTACTO**

Se midió el ángulo de contacto con medio de cultivo DMEM de los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación %Vti) para determinar el carácter hidrofílico de estos. Además, para establecer la relación de este con la composición de fibras de cada uno de los andamios.

En la Figura 41 se presentan los valores del ángulo de contacto encontrados para cada uno de los andamios evaluados. El ángulo de contacto encontrado para cada uno de los andamios tiene valores mayores a los 90° , esto nos indica que todos tienen un carácter hidrófobo, como se menciona en la sección 5.3.1.4. Se observa que a medida que aumenta la cantidad de fibras de PCU aumenta el valor del ángulo de contacto de las muestras. Por lo cual podemos decir que las fibras de PCU le aportan a cada uno de los andamios un carácter hidrofóbico y las fibras de PLA-COL-ELAS un carácter ciertamente menos hidrofóbico, debido a la presencia de colágena y elastina .

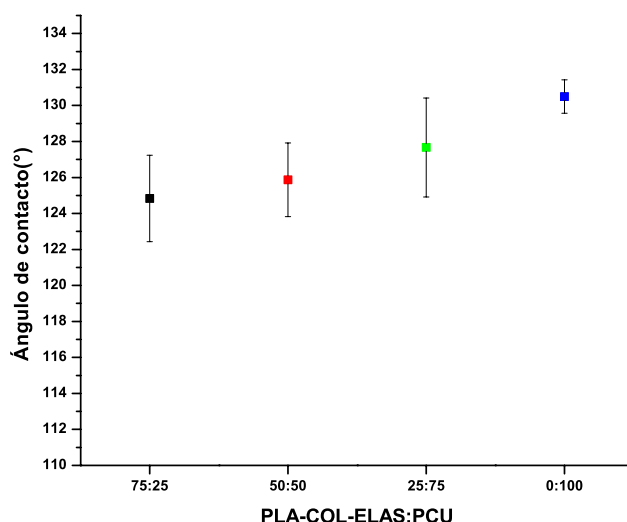


Figura 41. Ángulo de contacto de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes porcentajes de Vti.

5.6.5 DETERMINACIÓN DEL % DE HINCHAMIENTO

El % de hinchamiento de cada uno de los andamios fue determinado mediante la incubación de estos en medio DMEM suplementado a 37°C para conocer su comportamiento a las condiciones que iban a ser expuestos en el cultivo celular. Los datos de cambio de peso fueron recolectados durante 7 días. La Figura 42 presenta una fotografía de los andamios en el tiempo 0 y al cabo de 7 días.

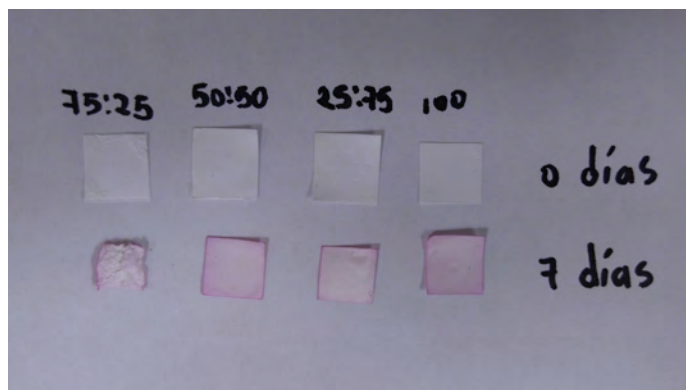


Figura 42. Cambio en las dimensiones de los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU(Relación% Vti) después de 7 días de incubación con medio suplementado a 37°C.

De la Figura 42, podemos observar que no se evidencian alteraciones en las dimensiones de los andamios de 50:50, 25:75 y 0:100. Sin embargo el andamio de 75:25 presenta cambio en sus dimensiones debido a la absorción de agua, que le ha provocado una reducción y estrechamiento en sus dimensiones, lo cual hace ver, que posiblemente no sería un buen candidato para el cultivo celular ya que no presenta una estabilidad dimensional durante los días de incubación.

En la Figura 43 se presenta la curva de hinchamiento de los andamios a lo largo de 7 días. Se puede observar que el andamio de 75:25 presentó el mayor porcentaje de hinchamiento durante los primeros días, con lo cual podemos inferir que la presencia en mayor proporción de colágena y elastina brinda al andamio una mayor capacidad de absorción de líquido, al tener una superficie más reactiva. Al ir disminuyendo la cantidad de fibras de PLA-COL-ELAS en los andamios, el porcentaje de hinchamiento disminuye, podemos entonces inferir que el PCU tiene un carácter hidrofóbico, como se observó en el análisis del ángulo de contacto en la sección anterior. Pasadas las 40 horas se observa

que los andamios llegan a su equilibrio y ya no ocurre mas absorción del medio de cultivo. Podemos ver entonces, que este comportamiento es independiente del diámetro promedio de las fibras de los andamios y esta mas influenciado por la composición química de los andamios y a su vez por el ángulo de contacto. Finalmente, en secciones posteriores podemos relacionar este resultado con el comportamiento de los andamios en el cultivo celular.

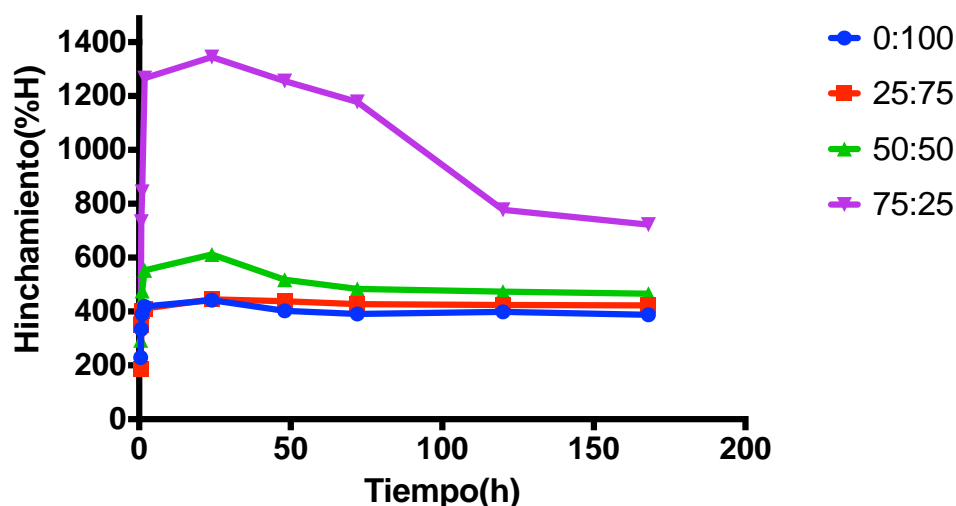


Figura 43. Curva de hinchamiento de los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU(Relación %Vti) durante 7 días de incubación con medio suplementado a 37°C.

5.6.6 PROPIEDADES MECÁNICAS DE ANDAMIOS DE PLA-COL-ELAS:PCU

En la Figura 44 se presentan los resultados del modulo de elasticidad de los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes porcentajes de Vti. Se observa que el andamio de 75:25 (59.82 ± 19.98 MPa) presenta el mayor valor en el modulo de elasticidad, pero con la mayor desviación estándar y el de 25:75(18.34 ± 3.24 MPa) el de menor valor. La presencia de fibras de PLA-COL-ELAS en el andamio brinda un mayor aporte en la rigidez del andamio, ya que el andamio de PLA-COL-ELAS como se vio en la sección 5.3.1.5 tiene un modulo de elasticidad más alto comparado con el del andamio de PCU(21.67 ± 6.47 MPa). Por otra parte el valor del modulo de elasticidad del andamio de

25:75 resultó ser menor al del andamio de PCU, por lo que en este caso las fibras de PLA-COL-ELAS pudieron comportarse como un defecto o no tuvieron participación en la carga y solo tuvieron influencia las fibras de PCU, por lo que podemos relacionar este resultado con el diámetro promedio de las fibras, siendo menor para las fibras del andamio de 25:75, comparado con el de las fibras de PCU y por ende un menor valor en el modulo elástico. El andamio de 50:50(26.28 ± 6.47 MPa) presenta un valor del modulo relativamente intermedio, debido a la presencia equitativa de fibras de PCU y de PLA-COL-ELAS, lo que le brinda propiedades intermedias entre los dos tipos de fibras, sin embargo el valor del modulo se desplaza hacia las características del PLA-COL-ELAS, lo cual es lo que se estaba buscando, aumentar el modulo de elasticidad del andamio en comparación al del PCU.

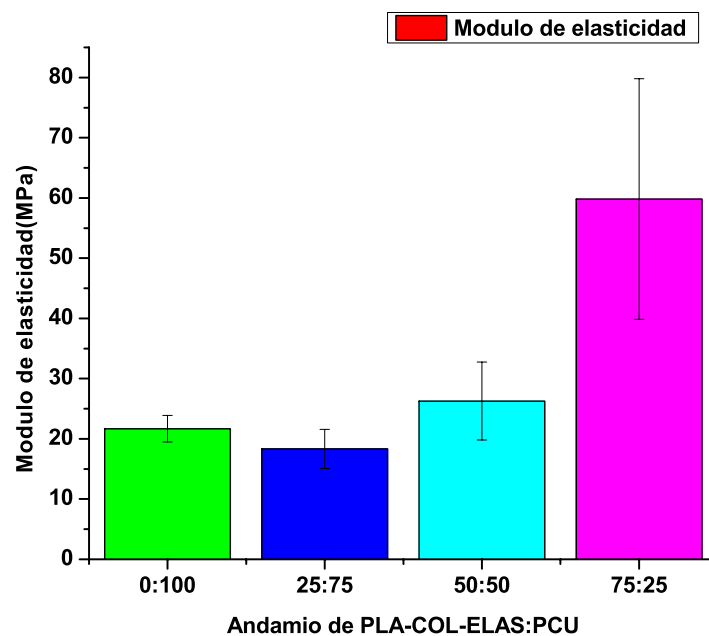


Figura 44. Modulo de elasticidad de los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes % de Vti.

En la Figura 45 se presentan los resultados de la resistencia a la tensión de los andamios. Se puede observar que el andamio de 0:100(4.67 ± 0.56 MPa) presenta el mayor valor, debido a su naturaleza elastómerica, podemos ver que las fibras de PCU soportan el valor mayor de carga antes de romperse en su totalidad, lo cual le brinda una mayor estabilidad mecánica, cuando se somete a esfuerzos. Por otra parte uno de los menores valores lo presenta el andamio de 75:25(2.95 ± 0.89 MPa), lo cual corrobora lo encontrado para el

andamio de PLA-COL-ELAS en la sección 5.3.1.5 y se puede relacionar con el análisis del porcentaje de hinchamiento, donde este andamio presento cambio en sus dimensiones debido a una contracción y reducción de las fibras, por lo cual nos indica su baja estabilidad mecánica en el medio de cultivo. La resistencia a la tensión del andamio de 50:50(3.54±0.35MPa) obtuvo un valor mayor que el del andamio de 75:25 y menor que el andamio de PCU, por lo que podemos ver que el andamio al tener igual proporción de fibras de ambos tipos de polímeros, sus propiedades se asemejan tanto al uno como al otro, sin embargo en este caso se desplaza hacia el comportamiento del PCU. Por otra parte, el andamio de 25:75(2.62 ± 0.18 MPa) presento el menor valor, corroborando que este puede presentar defectos en su entramado. Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados, vemos como esta influenciado el comportamiento mecánico de los andamios con las variaciones en la composición de los diferentes tipos de fibras, y que de alguna forma el diámetro promedio de las fibras también, sin embargo al ser de diferente composición química , no se puede definir una tendencia.

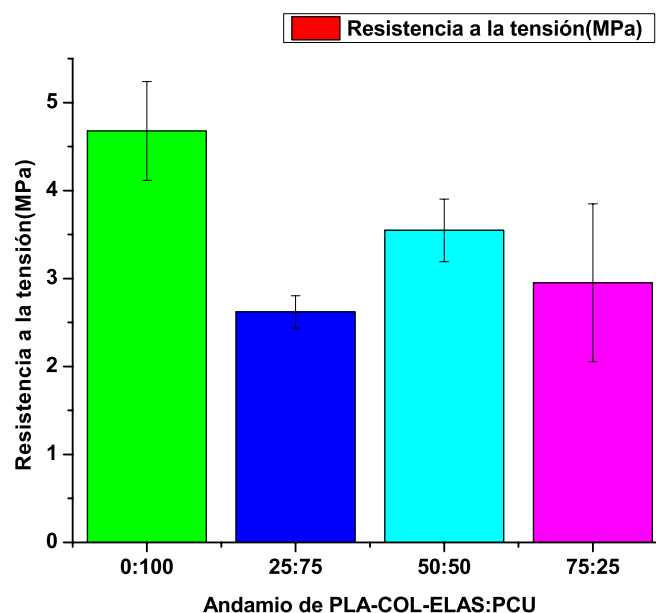


Figura 45. Resistencia a la tensión de los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes % de Vti.

5.6.7 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS EN LOS ANDAMIOS MEDIANTE EL ENSAYO DE MTT

Los andamios electrohilados en esta segunda etapa fueron evaluados mediante el ensayo de MTT para observar el comportamiento de las células musculares lisas con las propiedades de cada uno de los andamios, en este caso la concentración inicial de células fue de 12,500 células/pozo.

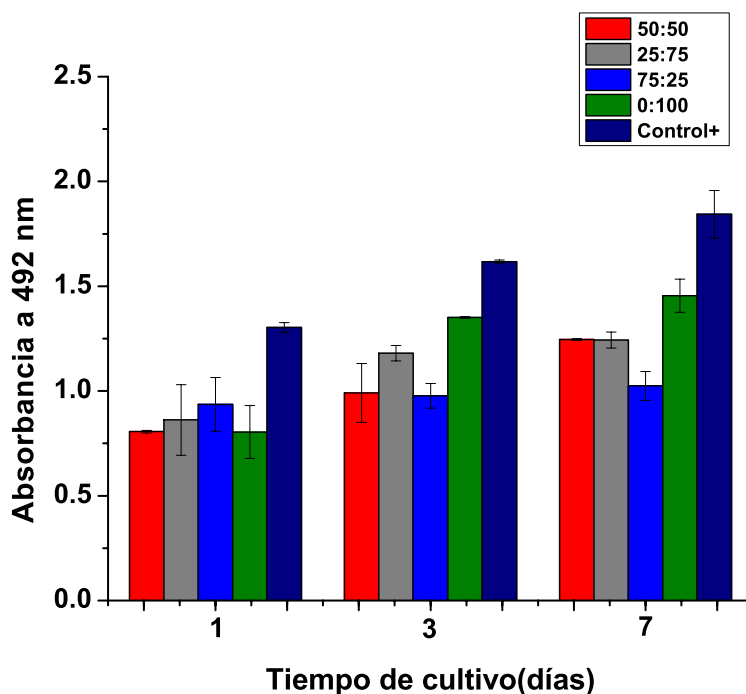


Figura 46. Viabilidad y proliferación de células musculares lisas en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) por medio del ensayo de MTT.

Tabla 16 Rapidez de proliferación celular en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU.

PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti)	$\Delta A/\Delta t$
50:50	0.0534
25:75	0.0361
75:25	0.0109
0:100	0.0665
Control +	0.0697

En la Figura 46 se presentan los resultados de los valores de absorbancia con respecto al tiempo para cada uno de los andamios evaluados. Como se menciono en la sección 5.5.1, de acuerdo al principio del ensayo de MTT, el valor de la absorbancia aumentara dentro de un cierto valor, por lo que la absorbancia será directamente proporcional al número de células vivas. Por lo tanto, graficando los datos de absorbancia para cada uno de los andamios, se ajustaron a una regresión lineal, obteniendo la pendiente de la recta, y dicha pendiente la podemos relacionar con la rapidez de proliferación celular($\Delta A/\Delta t$), la cual se lista en la Tabla 16 para cada uno de los andamios.

Al primer día de cultivo, observamos que el mayor valor de absorbancia es para el andamio de 75:25 y los otros por debajo de este con un poco diferencia. Por tanto vemos que todos los andamios tuvieron una buena viabilidad celular, demostrando que son materiales compatibles con las células musculares lisas. Al tercer día de cultivo, en los andamios de 50:50, 25:75 y 0:100 aumento la absorbancia y por tanto el número células se multiplico de acuerdo al día 1. Sin embargo en el andamio de 75:25, el crecimiento celular no fue tan notorio, como en los anteriores, indicando que las células pudieron entrar en una fase estacionaria o el andamio se saturó.

Al séptimo día de cultivo podemos ver que el andamio de PCU tuvo una rapidez de proliferación celular de 0.0665, semejante al control positivo. Por otro lado, la rapidez de proliferación del andamio de 50:50 fue de 0.0534 y la del andamio de 25:75 fue de 0.0361 y por último la del andamio de 25:75 de 0.0109. Este comportamiento sorpresivo del PCU, lo podemos relacionar tanto el diámetro promedio de las fibras del andamio que es el de mayor valor, comparado con los otros, brindando un mayor porcentaje de volumen libre en el andamio y también a su estructura química que también posee grupos amida reactivos que pueden activar la superficie del andamio, promoviendo el crecimiento de las células musculares lisas.

Por otra parte vemos que el andamio de 75:25, al primer día de cultivo presentó una excelente adhesión y viabilidad celular, gracias a la participación de la colágena y la elastina que en la etapa 1 pudimos ver que son moléculas que en conjunto promueven en gran proporción el crecimiento celular, sin embargo al transcurrir de los días el aumento en el número de células vivas, no aumento de una manera significativa, indicando que posiblemente el crecimiento fue demasiado exponencial, provocando inhibición por contacto y también de acuerdo a los resultados del porcentaje de hinchamiento, donde se

observó su baja estabilidad dimensional en el transcurso de los 7 días. Asimismo, en el andamio de 25:75 la rapidez de proliferación no fue muy alta a pesar de que en su mayor proporción se encontraba las fibras de PCU, lo cual se puede deber a que en si las fibras de PLA-COL-ELAS están en baja proporción, pero han cerrado los intersticios de las fibras gruesas del PCU, generando una superficie menos viable para las células, generando clusters de células, las cuales pueden morir por inhibición por contacto. En el andamio de 50:50, el crecimiento celular estuvo a una rapidez solo unos puntos por debajo del andamio de PCU, indicando que al combinar equitativamente las fibras de PLA-COL-ELAS y PCU se genera una superficie activa que promueve la adhesión y proliferación de las células musculares lisas, gracias a la participación de las propiedades de los dos tipos de soluciones poliméricas.

5.6.8 CARACTERIZACIÓN DE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS SEMBRADAS EN LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS

Los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes porcentajes de Vti, cultivados in vitro con células musculares lisas fueron caracterizados por medio de MEB para observar la morfología y el comportamiento de la adhesión de las células musculares lisas durante 7 días de cultivo, se tomaron micrografías al primer y séptimo día de cultivo.

En la Figura 47 se presentan las micrografías de la siembra de células musculares lisas en los andamios a un día de cultivo. Se observa que en cada uno de los andamios las células se adhirieron con una morfología poligonal bien extendida a lo largo de las fibras, presentando conexiones entre ellas. Lo anterior, nos permite inferir que los andamios son un buen ambiente para el crecimiento de las células musculares lisas, ya que no están cambiando su morfología debido a estos. En las micrografías de 2,500x, se aprecia como es el contacto íntimo de las células con las fibras de cada uno de los andamios, como expanden sus haces a través de las superficies del andamio y además, en el andamio de 50:50(Figura 47a y 47e) y en el de 0:100(Figura 47d y 47h), se observa el inicio de la penetración de algunas células a través de el volumen libre que genera el entramado de las fibras de los andamios. Por otra parte, vemos que en el andamio de 75:25 hay mayor cantidad de células adheridas, lo cual está de acuerdo al resultado del ensayo de MTT al primer día de cultivo, donde se puede ver que la presencia de colágena y elastina promueve la adhesión celular.

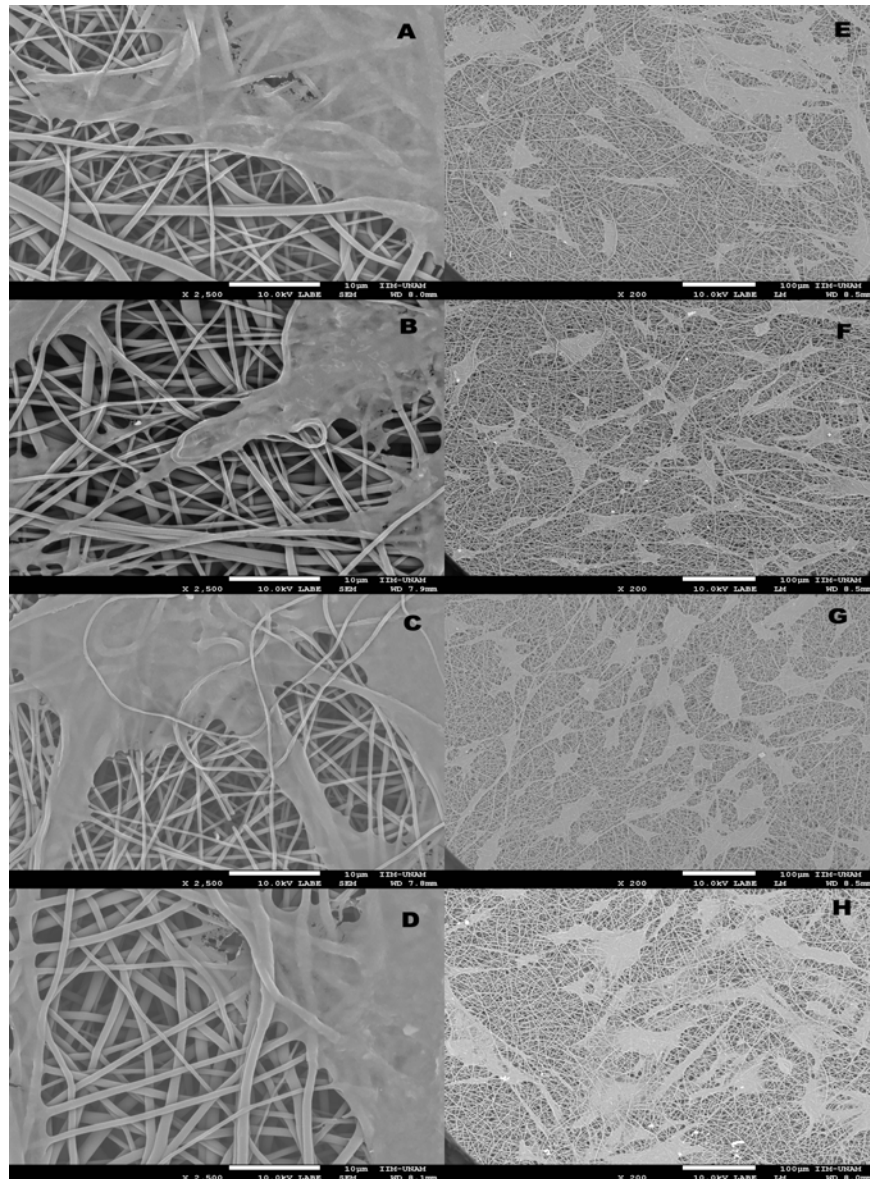


Figura 47. Micrografías de MEB a 2500x y 200x a 1 día de cultivo en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti): a),e) 50:50; b),f) 25:75; c),g) 75:25; y d),h) 0:100.

En la Figura 48 se presentan las micrografías obtenidas a los 7 días de cultivo. Se observa que en todos los andamios las células cubrieron un gran porcentaje de la superficie del andamio al avanzar el tiempo de cultivo. También, las células siguieron adheridas con una morfología poligonal extendida, lo cual nos indica que, con el transcurso del tiempo, el material no provocó ningún cambio morfológico en las células musculares lisas.

En las micrografías con aumento de 50x, vemos que en el andamio de 50:50 (Figura 48a) y en el de 0:100(Figura 48g) las células se adhirieron en el andamio cubriendo de una forma homogénea toda la superficie. Por el contrario, en el andamio de 25:75(Figura 48d) vemos una mayor proporción de células en el centro del andamio, y en el andamio de 75:25(Figura 48j) la mayoría de células se encuentran hacia un extremo de este. En las micrografías con aumento de 200x, se aprecia un ordenamiento de las células en el andamio de 0:100(Figura 48h) y las células mas alargadas. En el andamio de 25:75(Figura 48k) y en el de 75:25(Figura 48e) se observa la formación de una monocapa y aglomeración de células.

A un mayor aumento (2500x), se observa para el andamio de 50:50(Figura 48b) y el de 0:100(Figura 48i) la infiltración de las células hacia dentro de este, lo cual nos da idea de que se está generando un cultivo no solo en la parte superficial del andamio, sino que se está generando un entramado tridimensional. Asimismo, podemos ver como es el contacto íntimo de las células con las fibras de los andamios.

De acuerdo a estos resultados podemos inferir que todos los andamios favorecen la adhesión y crecimiento de las células musculares lisas. Sin embargo, los andamios de 50:50 y 0:100, promueven la adhesión de células musculares lisas de una manera más uniforme en la superficie del andamio, con crecimiento hacia dentro del andamio y por ende podemos pensar que es un crecimiento adecuado para la formación de un neo-tejido de musculo liso. Este comportamiento lo podemos relacionar con los resultados del ensayo de MTT y con la característica del andamio de 50:50 de tener fibras equitativas de dos tipos de soluciones poliméricas con naturalezas diferentes, lo cual permite una superficie con mayor actividad celular, de acuerdo al tipo de entramado que se generó. Sin embargo, es sorprendente el comportamiento del andamio de PCU, el cual se pensó en primera instancia que no poseía una superficie activa, por lo que podemos decir que la adhesión y crecimiento de las células musculares lisas esta también influenciado por el diámetro promedio de las fibras del andamio, la rugosidad de la superficie y que además el PCU también cuenta con grupos bastante activos que estimulan a las células musculares lisas.

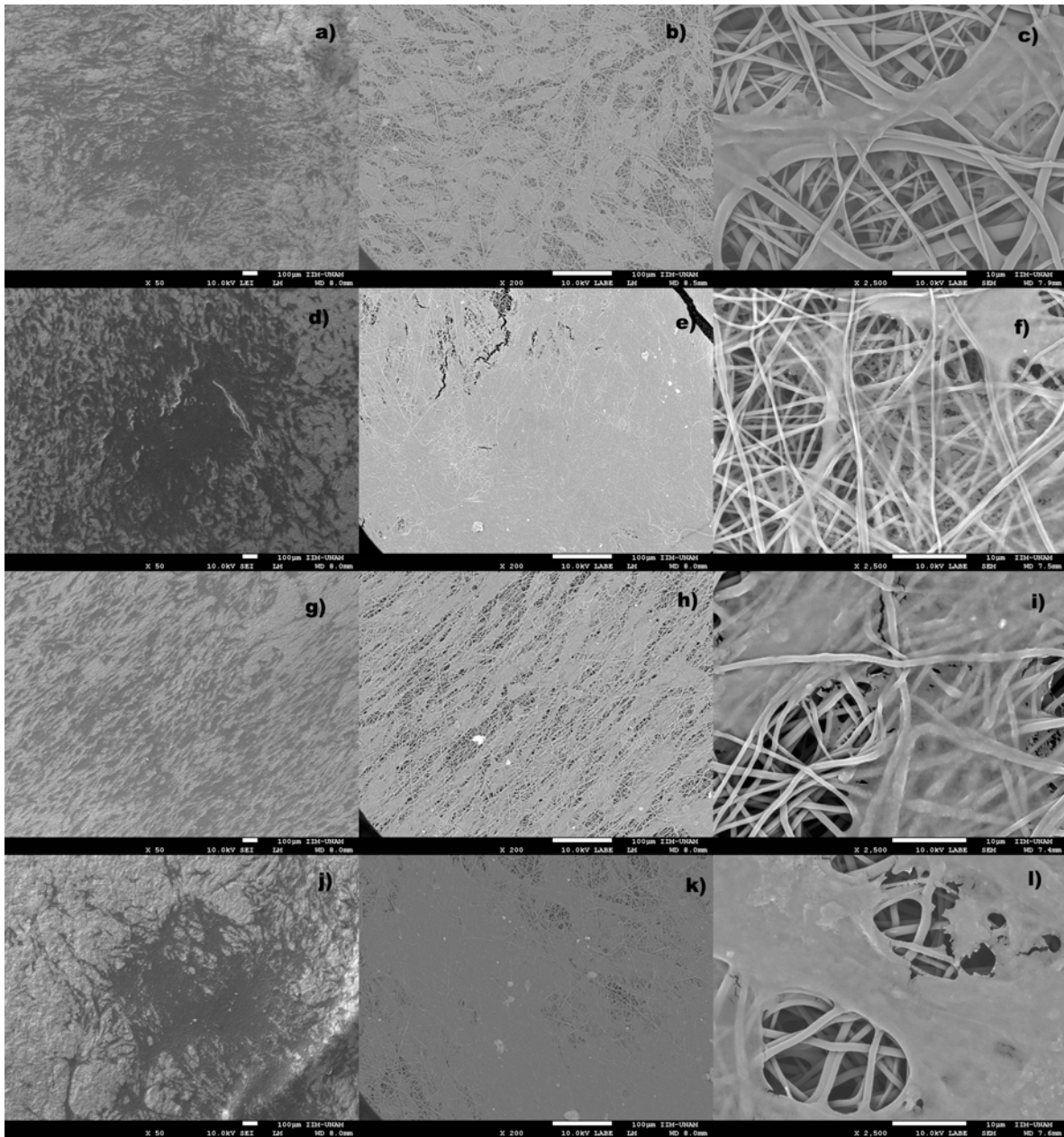


Figura 48. Micrografías de MEB a 50x,200x y 2500x a 7 días de cultivo en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti): a)-c) 50:50, d)-f)75:25, g)-i)0:100, y j)-l) 25:75.

5.6.9 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS CULTIVADOS IN VITRO POR MEDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA

A fin de analizar el fenotipo de las células musculares lisas en los andamios cultivados, se realizó la caracterización de estos por medio de inmunofluorescencia. Los marcadores

evaluados fueron F y α -actina. La actina es una de las proteínas más abundantes encontrada en el citoesqueleto de las células de sistemas mamíferos, y la cual es la encargada de la locomoción celular [75]. Puede encontrarse como monómero en forma libre, denominada actina G, o como parte de polímeros lineales denominados microfilamentos o actina F, que son esenciales para funciones celulares tan importantes como la movilidad y la contracción de la célula durante la división celular. Los filamentos de actina son estructuras polarizadas, con un extremo más y otro menos. La actina está presente en tres diferentes estructuras isomorfas denominadas alfa, beta y gama. De estas, la alfa actina es la estructura isomorfa más abundante en las células musculares lisas totalmente diferenciadas y juega un papel decisivo en el proceso de contracción de las células musculares lisas [76].

Por lo tanto, es uno de los marcadores fenotípicos más utilizados para estas células y por ende se utilizó para este trabajo. Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal Leica SP8, utilizando los fluorocromos Oregon green 488 asociado a faloidina para F-actina, el cual lo podemos ver en verde y Alexa fluor 594 para α -actina, el cual lo podemos ver en rojo. Asimismo, se tiñeron los núcleos con dapi, que se observan en color azul.

En la Figura 49 se presentan las imágenes obtenidas para las células de musculo liso cultivadas en los andamios al primer día de cultivo. Se puede observar que las células en todos los andamios fueron positivas para F y α -actina. Asimismo, se puede observar que hay diferentes conexiones de los filamentos de actina a través del andamio, lo cual nos demuestra que si hay una infiltración de las células a través del andamio. Por otra parte, en los andamios de 50:50(Figura 49a-c) y 0:100(Figura 49j-l) los filamentos de actina se expresan con mayor intensidad, en comparación con lo observado para los andamios de 25:75(Figura 49d-f) y 75:25(Figura 49g-i). De acuerdo a estos resultados, se demuestra que en todos los andamios, las células siguen manteniendo el fenotipo de musculo liso [77] y no hay cambio en este debido a la presencia de los andamios.

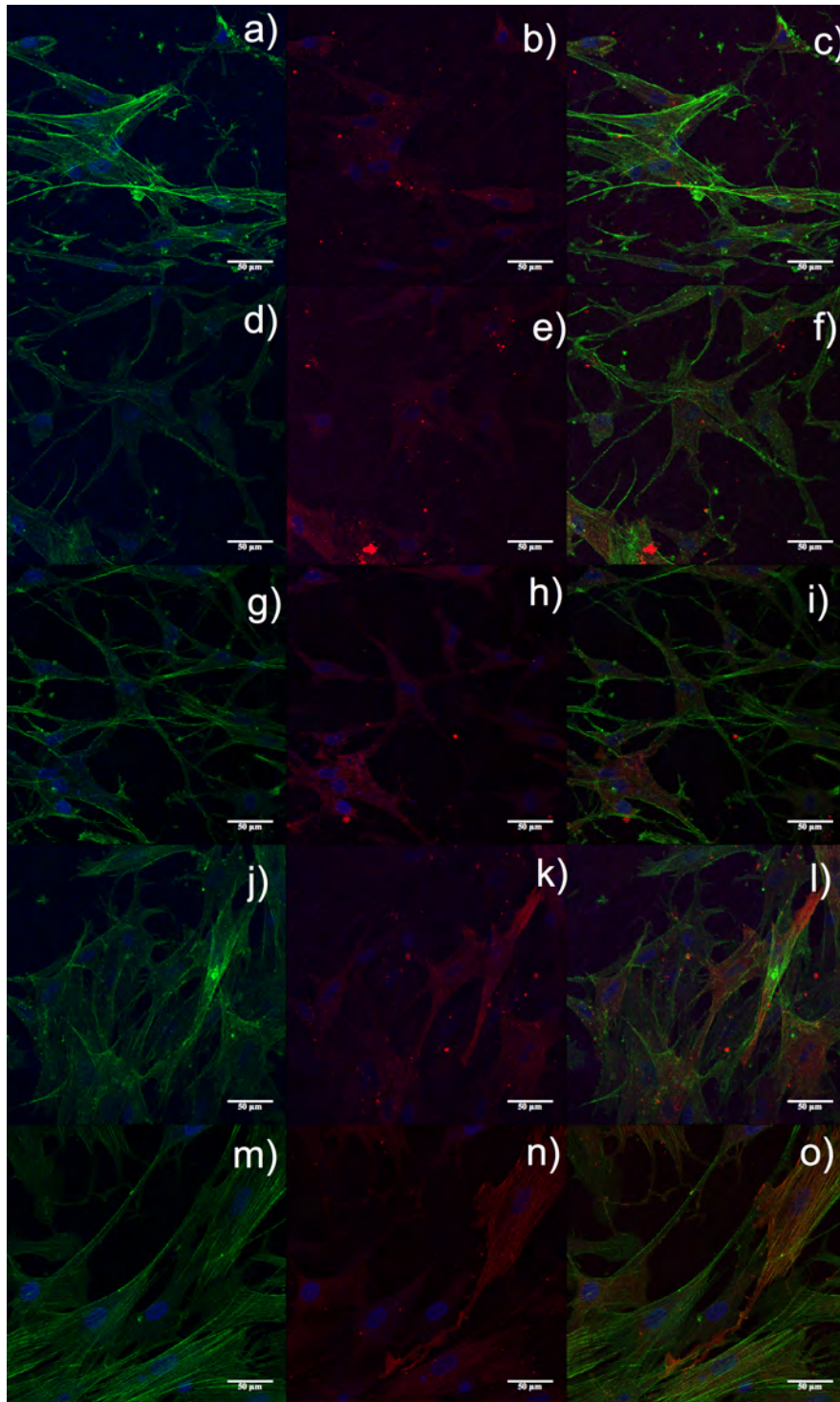


Figura 49. Marcaje para F y α -actina de células musculares lisas sembradas en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) con fibras al azar a 1 día de cultivo: a)-c) 50:50, d)-f)25:75, g)-i)75:25, j)-l) 0:100 y m)-o) Control sin andamio. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP8 a 40x.

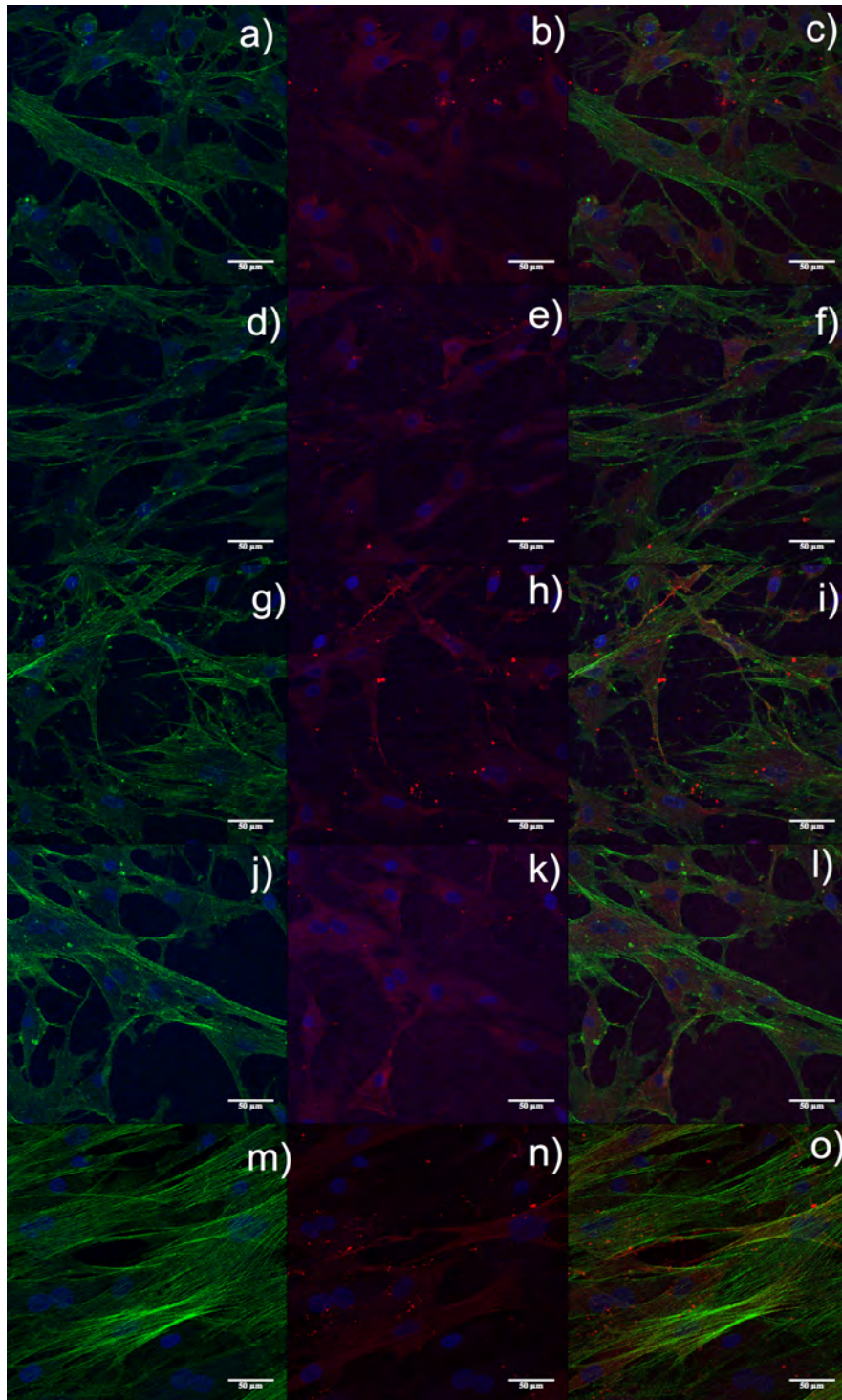


Figura 50. Marcaje para F y α -actina de células musculares lisas sembradas en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) con fibras al azar a 7 días de cultivo: a)-c) 50:50, d)-f)25:75, g)-i)75:25, j)-l) 0:100 y m)-o) Control sin andamio. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP8 a 40x.

En la Figura 50 se presentan las imágenes obtenidas para las células de músculo liso cultivadas en los andamios al séptimo día de cultivo. Se puede observar que las células siguen siendo positivas para F y α -actina en todos los andamios. Asimismo, se puede observar que hay un aumento en las diferentes conexiones de los filamentos de actina a través del andamio, por el aumento de días de cultivo y posiblemente por los diferentes planos que hay en cada uno de los andamios. De acuerdo a estos resultados, se demuestra que, en todos los andamios, las células siguen manteniendo el fenotipo de músculo liso y no hay cambio en este debido al aumento de los días de cultivo ni a la presencia de los andamios. En la Figura 51 se presenta la proyección de las imágenes de inmunofluorescencia para F-actina de la proyección en el plano Z, aquí se puede observar como las células se están infiltrando en cada uno de los andamios, sin embargo no se puede apreciar claramente en cual hay mayor o menor infiltración.

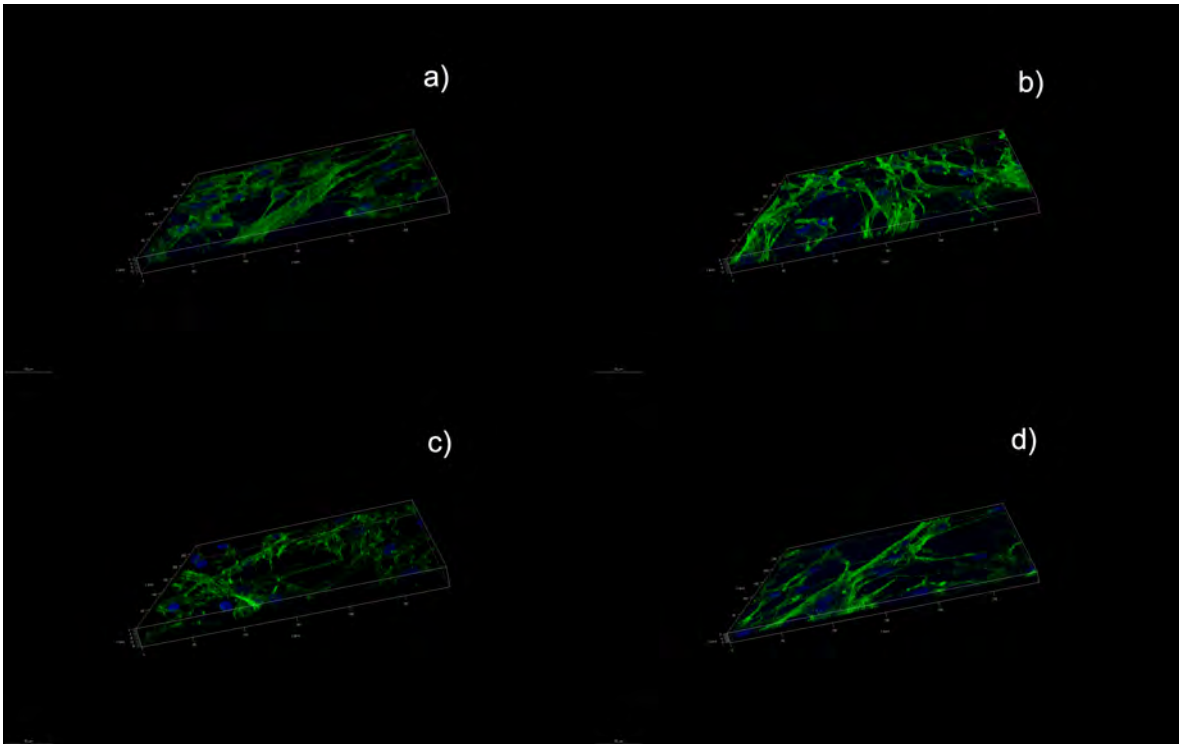


Figura 51. Proyección en Z del marcaje para F-actina en los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras al azar (Relación de %Vti) a 7 días de cultivo: a)50:50, b)25:75, c) 75:25 y d) 0:100.

5.7 FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS DE PCU Y PLA CON COLÁGENA Y ELASTINA CON FIBRAS ALINEADAS

En esta etapa se utilizó como colector un cilindro rotatorio, al cual se le vario la velocidad de rotación para encontrar el valor en el cual las fibras se alineaban. En primera instancia se hilo por separado la solución de PCU y la solución de PLA-COL-ELAS, para observar el comportamiento de la alineación de las fibras de manera individual utilizando un volumen inyectado menor a 1 mL. A continuación, se presentan los resultados encontrados:

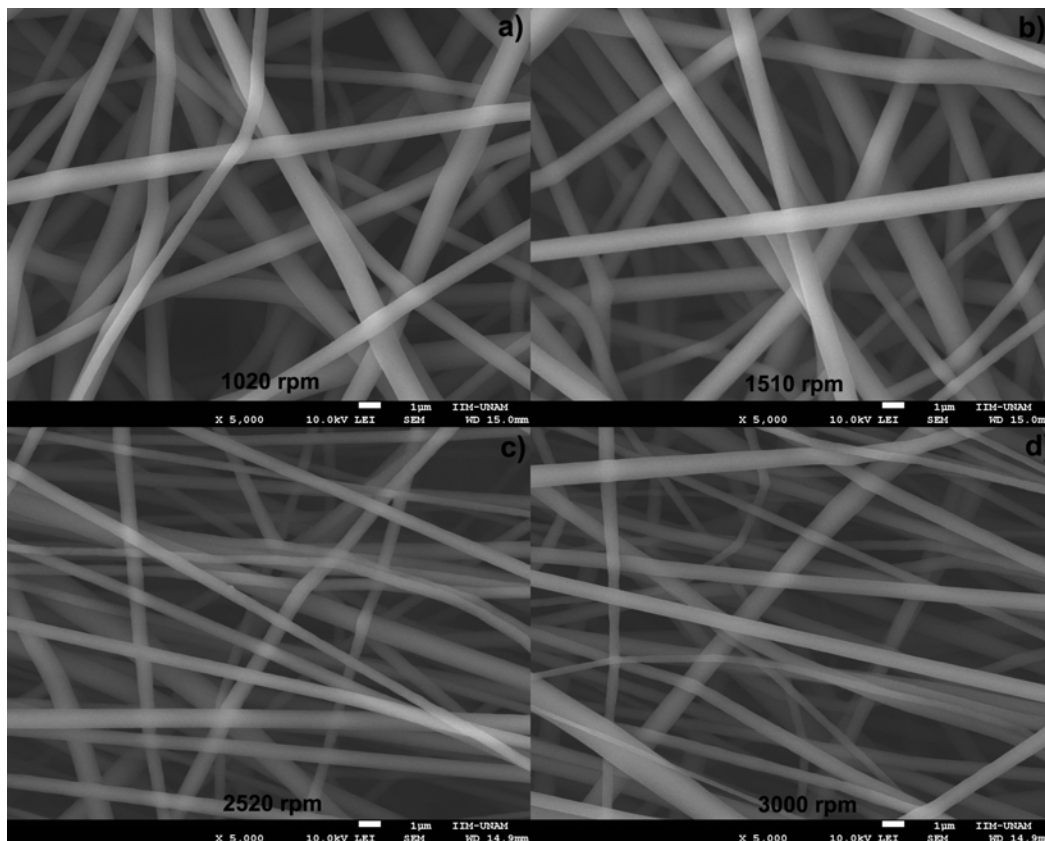


Figura 52. Micrografías de MEB(5000x) de andamios de PCU variando las revoluciones por minuto del colector rotacional: a) 1020 rpm, b)1510 rpm, c)2520 rpm y d) 3000 rpm.

En la Figura 52, se puede observar que a medida que se aumenta las revoluciones por minuto del colector rotacional, se van alineando poco a poco las fibras en los andamios de PCU. De 1020 a 1510 rpm no se observan fibras alineadas. Cuando se aumenta a 2,520

ya se presentan fibras alineadas en el andamio. De 2520 a 3000 rpm no se observa un cambio significativo en la cantidad de fibras alineadas de PCU en el andamio.

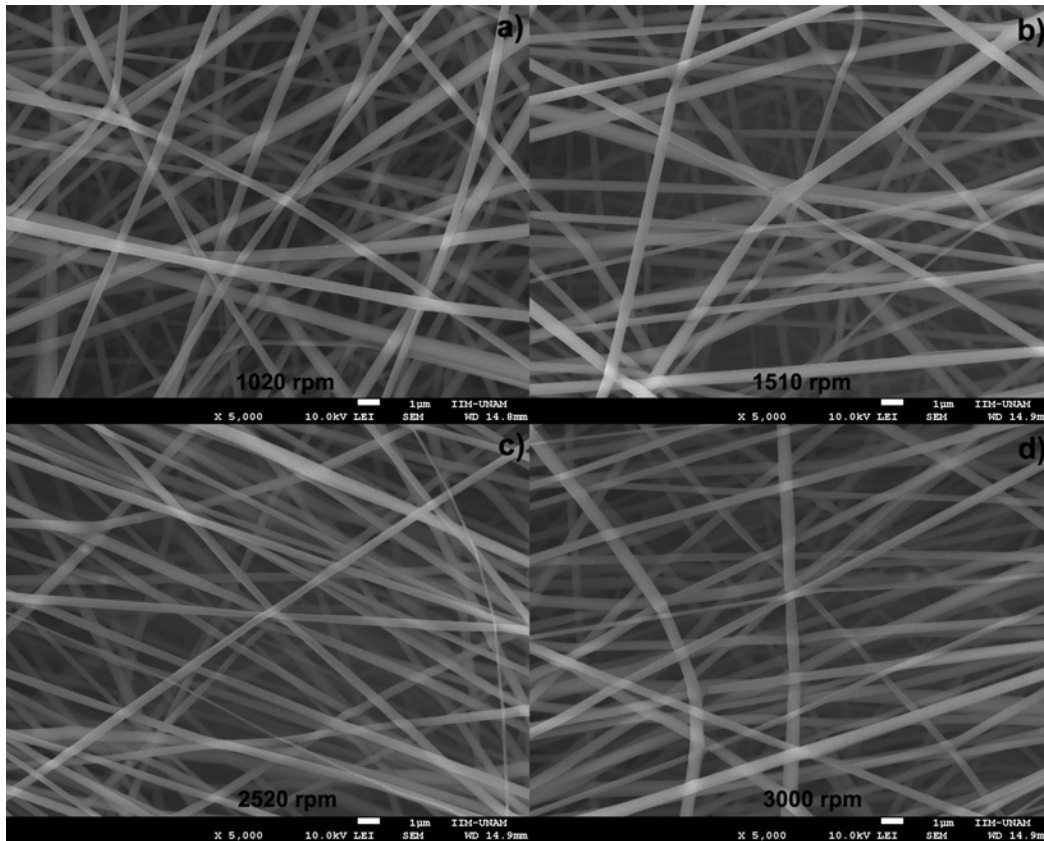


Figura 53. Micrografías de MEB(5000x) de andamios de PLA-COL-ELAS variando las revoluciones por minuto del colector rotacional: a) 1020 rpm, b)1510 rpm, c)2520 rpm y d) 3000 rpm.

En la Figura 53, se observa de manera similar el comportamiento de alineación de las fibras de PLA-COL-ELAS a las de PCU, de 1020 a 1510 rpm, no se observan fibras alineadas. A 2520 rpm ya aparecen fibras alineadas y a 3000 rpm no se observa un cambio significativo con respecto a 2520 rpm. Debido a esto se decidió hilar de manera simultanea las dos soluciones ya que presentaban un comportamiento similar a bajas rpm y por ende se podría ya estudiar el comportamiento a mayores rpm.

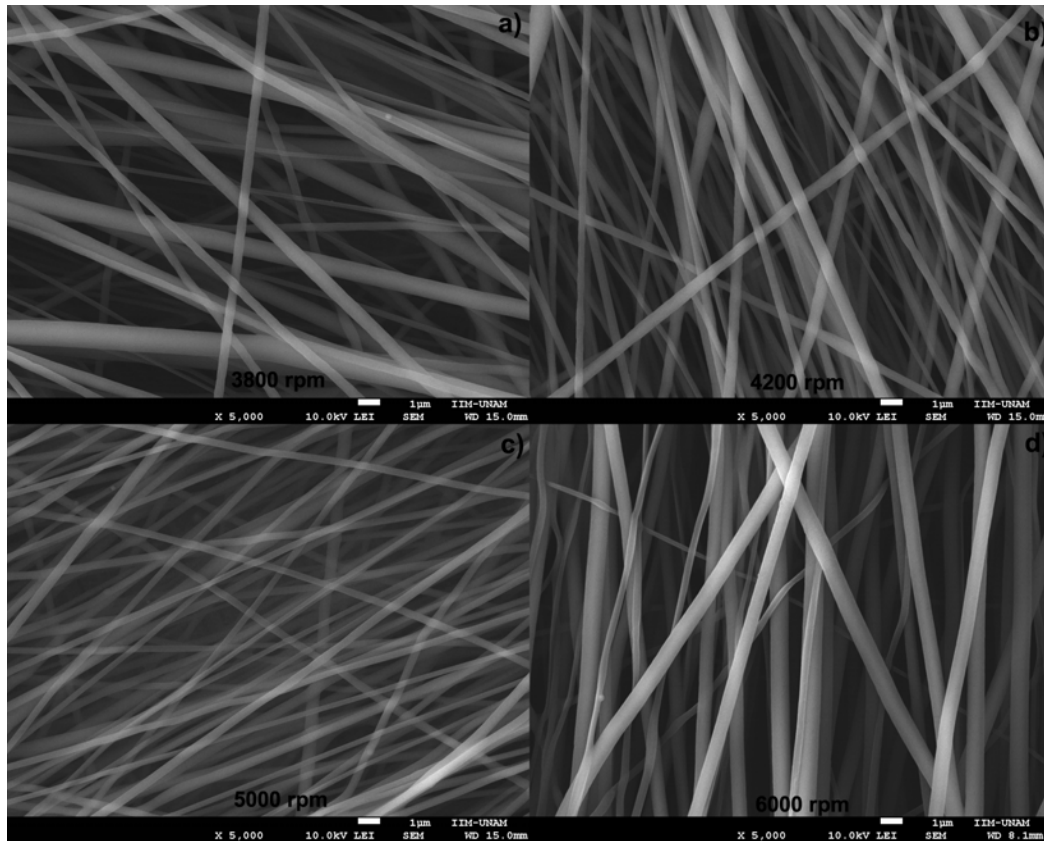


Figura 54. Micrografías de MEB(5000X) de electrohilado simultáneo de PLA-COL-ELAS:PCU(50:50 %Vti) variando las revoluciones por minuto del colector rotacional:a) 3800 rpm, b)4200 rpm, c)5000 rpm y d) 6000 rpm.

En la Figura 54 se observa ya el conjunto de fibras de PCU y PLA-COL-ELAS, y la variación en la alineación de las fibras al aumentar las rpm del colector. A 3800 rpm ya se observan mas fibras alineadas en comparación a los observado para las fibras a 3000 rpm. A 4200 rpm ya se observa una cantidad considerable de fibras alineadas. De 4200 rpm a 5000 rpm no se observa un cambio relevante en la cantidad de fibras alineadas. A 6000 rpm ya se observa que la mayoría de fibras se encuentran alineadas pero aun quedan por alinear, sin embargo 6000 rpm es lo máximo que nos brinda el motor, por lo tanto se selecciono esta velocidad de rotación del colector para fabricar los andamios de la siguiente etapa, con un mayor volumen de solución a inyectar.

5.7.1 MORFOLOGÍA POR MEB

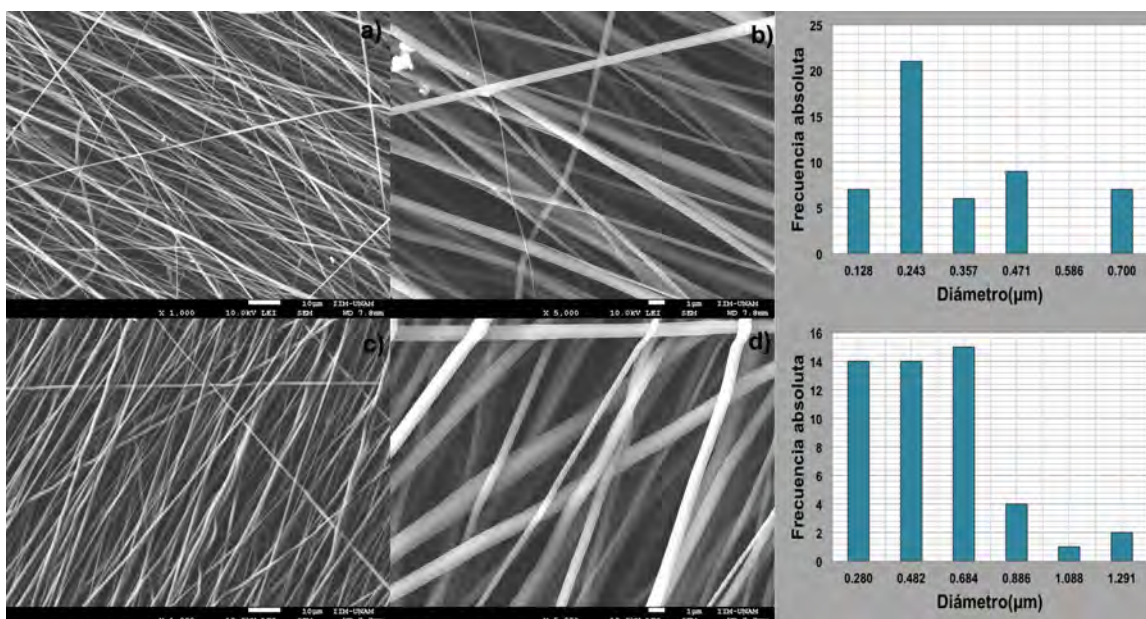


Figura 55. Micrografías de MEB(1000X y 5000x) de andamios con fibras alineadas de PLA-COL-ELAS:PCU a diferentes % de Vti: a-b) 50:50 y c-d) 0:100.

En la Figura 55 se observan los andamios con fibras en su mayoría alineadas, ya que a pesar de que se utilizó la máxima velocidad de rotación que el motor brindaba no se logró conseguir que el 100% de fibras se alinearan, esto debido a la inestabilidad de los jets en el electrohilado [78] y a la posible variación de la velocidad del motor durante la prueba. Por otra parte, se puede observar que el andamio de 50:50 presenta fibras de menor diámetro comparado con las fibras del andamio de 0:100. El diámetro promedio para el andamio de 50:50 fue de 342 ± 176 nm y para el de 0:100 fue de 579 ± 253 nm. Comparando estos resultados con los obtenidos para los andamios con igual composición, pero con fibras al azar, podemos ver que hay una gran reducción del diámetro promedio de las fibras debido a que se aumentó drásticamente la velocidad de rotación del colector y además se redujo la desviación estándar de los diámetros. Sin embargo las fibras de PLA-COL-ELAS tienen una capacidad de adelgazamiento mayor a las fibras de PCU, debido a las cargas eléctricas que posee tanto la colágena y la elastina que ayudan a adelgazar el jet en mayor proporción [17].

5.7.2 **ÁNGULO DE CONTACTO**

Se midió el ángulo de contacto con medio de cultivo DMEM de los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU(Relación %Vti) con fibras alineadas para determinar el carácter hidrofílico de estos. Además, para establecer la relación de este con la composición de fibras de cada uno de los andamios y la alineación de las fibras. En la Figura 56 se presentan los valores del ángulo de contacto encontrados. El ángulo de contacto encontrado para cada uno de los andamios sigue teniendo valores mayores a los 90°, esto nos indica que todos tienen un carácter hidrófobo, como se mencionó en secciones anteriores. Se observa que el valor del ángulo de contacto es mayor para el andamio de 0:100 en comparación con el de 50:50, por lo que siguen el mismo comportamiento encontrado para los andamios de fibras al azar. Sin embargo, comparando estos valores con los encontrados para los andamios con fibras al azar con la misma composición, se observa una disminución en el ángulo de contacto, por lo cual podemos decir que la alineación de las fibras en el andamio disminuye su carácter hidrofóbico.

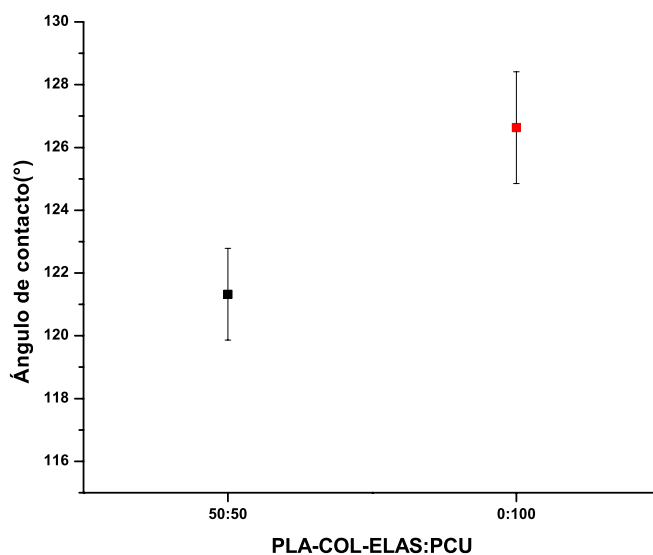


Figura 56. Ángulo de contacto de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación%Vti) con fibras alineadas.

5.7.3 **PROPIEDADES TÉRMICAS**

Los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación %Vti) fabricados con fibras alineadas fueron caracterizados por medio de las técnicas de calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico. Por medio de estos resultados se pudo obtener los valores de

las diferentes transiciones térmicas que ocurren en el andamio y asimismo evaluar la estabilidad térmica de estos, y además observar la diferencia de estos resultados con los encontrados para los andamios con fibras al azar de la misma composición.

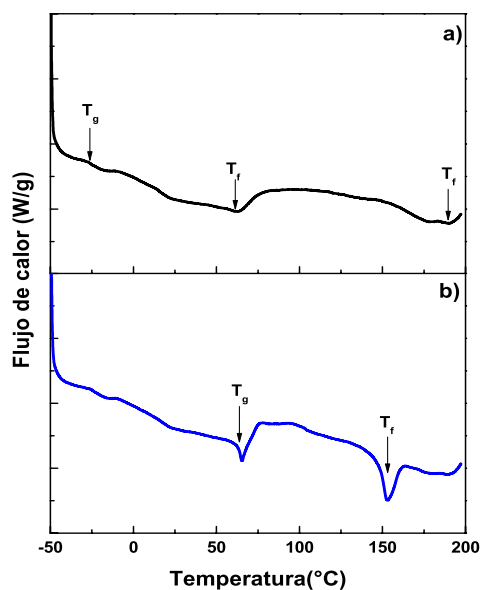


Figura 57. Termogramas de DSC de andamios con fibras alineadas de PLA-COL-ELAS:PCU(Relación%Vti) de: a) 0:100 y b)50:50

En la Figura 57 se presentan los termogramas de DSC para los andamios con fibras alineadas. En la Figura 57a se presenta el termograma para el andamio de PLA-COL-ELAS-PCU (0:100) o andamio de PCU con fibras alineadas. A -26.35°C se encuentra la temperatura de transición vítrea del segmento suave, la cual es un poco menor comparada con la del andamio de la misma composición, pero con fibras al azar, lo cual puede deberse a una mayor flexibilidad de las cadenas poliméricas en el segmento suave en el andamio con fibras alineadas. La temperatura de transición vítrea del segmento duro no se logró observar claramente. Seguidamente a 64.62°C se observa un pico endotérmico debido a la fusión del segmento suave, el cual también es un valor un poco menor al encontrado para el andamio con fibras al azar y corrobora que posiblemente la flexibilidad de las cadenas poliméricas del segmento suave aumento debido a la alineación de las fibras. A 190.57°C aparece otro pico endotérmico debido a la fusión del segmento duro, el cual es un valor mayor al encontrado para el andamio con fibras al azar, lo cual puede deberse a que la alineación de las fibras aumenta la formación de

fases cristalinas del segmento duro. En el termograma para el andamio de 50:50(Relación %Vti) con fibras alineadas (Figura 57b) se observa una temperatura de transición vítrea a -25°C correspondiente al segmento suave del PCU, en el andamio con fibras al azar de la misma composición no se logró observar. A 65.62°C aparece la temperatura de transición vítrea del PLA-COL-ELAS que se traslapa con el pico endotérmico de la fusión del segmento suave del PCU, el cual es un valor relativamente igual al encontrado para el andamio con fibras al azar. De igual forma a 152.5°C se encuentra un pico endotérmico correspondiente a la fusión de las fibras de PLA-COL-ELAS. Seguidamente no se observa claramente el pico de cristalización del PLA-COL-ELAS que si se observó en el andamio con fibras al azar, infiriendo que la alineación de las fibras disminuye la fase amorfa cristalizable de las fibras en el andamio. Finalmente, también se observa un pico endotérmico a 193.67°C correspondiente a la fusión del segmento duro del PCU, corroborando que la alineación de las fibras favorece la cristalización del segmento duro del polímero.

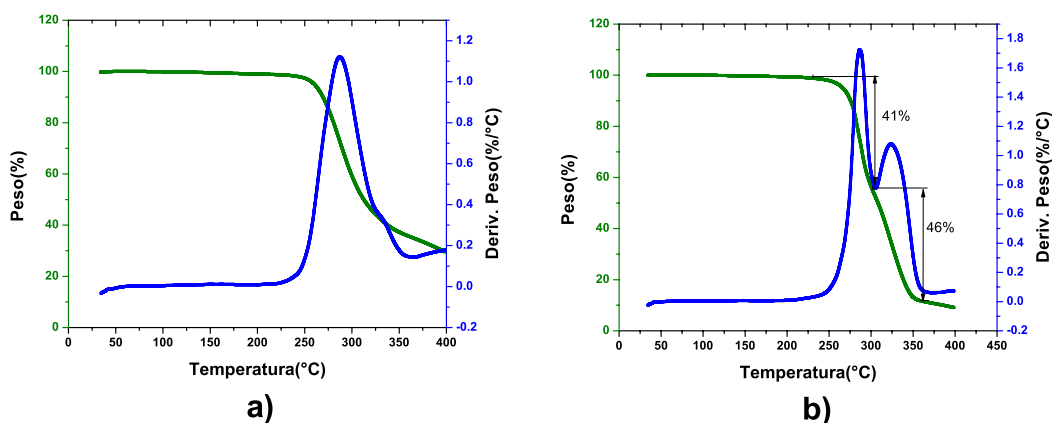


Figura 58 Termogramas de TGA de andamios con fibras alineadas de PLA-COL-ELAS:PCU(Relación%Vti) de: a) 0:100 y b)50:50

En cuanto al análisis termogravimétrico de las muestras de andamios con fibras alineadas, se observa el mismo comportamiento de los andamios con fibras al azar, excepto que para el andamio de PCU(Figura 58a) la Td es de 286.43°C , el cual es un valor menor al observado para el andamio de PCU con fibras al azar, esto se debe posiblemente al aumento de la cristalinidad en las fibras alineadas de PCU. En el termograma del andamio de 50:50(Relación %Vti) con fibras alineadas (Figura 58b), se observa dos cambios de peso, el primero correspondiente a la degradación de las fibras

de PCU ($T_d=286.43$, 41% de pérdida de peso) y el segundo a la degradación de las fibras de PLA-COL-ELAS($T_d=324.30$, 46% de pérdida de peso). Por lo tanto, podemos ver que las fibras de PLA-COL-ELAS presentan la mayor estabilidad térmica.

5.7.4 PROPIEDADES MECÁNICAS

En la Figura 59 se presentan los resultados obtenidos del módulo de elasticidad de los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas, se tiene para el andamio de 0:100 un módulo de 35.53 ± 5.18 MPa y para el de 50:50 de 41.98 ± 9.6 MPa, la diferencia en estos valores se debe a que el PLA y la colágena le brindan al andamio una mayor rigidez comparada con la del PCU. Por otra parte en la Figura 60, se presentan los resultados de la resistencia a la tensión siendo 38.50 ± 6.91 para el andamio de 0:100 y de 28.07 ± 5.46 MPa para el de 50:50, la disminución en la resistencia a la tensión en este andamio se debe a que el PCU es un material que presenta mayor capacidad para soportar carga antes de su ruptura en comparación con el PLA, la colágena o elastina, sin embargo lo que se estaba buscando al adicionar las fibras de PLA-COL-ELAS al andamio de PCU era modular tanto el módulo de elasticidad y la resistencia a la tensión, lo cual se ha logrado. Adicionalmente, podemos ver que estos valores son mayores en comparación a los encontrados en los andamios de la misma composición con fibras al azar, por lo cual, de acuerdo a los análisis de DSC y TGA, las fibras alineadas presentan una mayor cristalinidad, y por tanto mejores propiedades mecánicas.

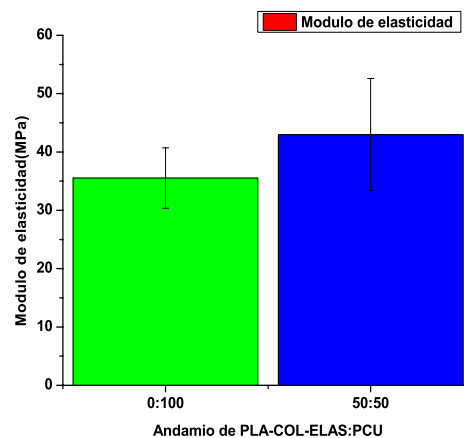


Figura 59 Modulo de elasticidad de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas.

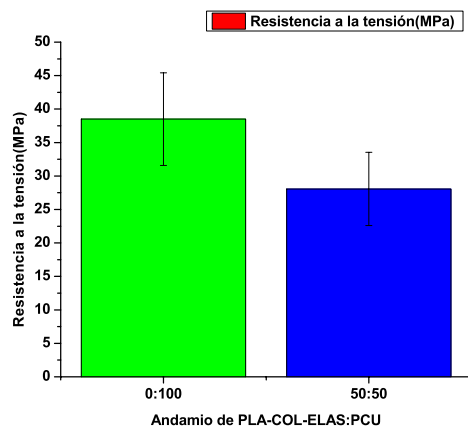


Figura 60 Resistencia a la tensión de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas.

5.7.5 COMPARACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN ANDAMIOS CON FIBRAS AL AZAR Y ALINEADAS

5.7.5.1 Ensayo de MTT

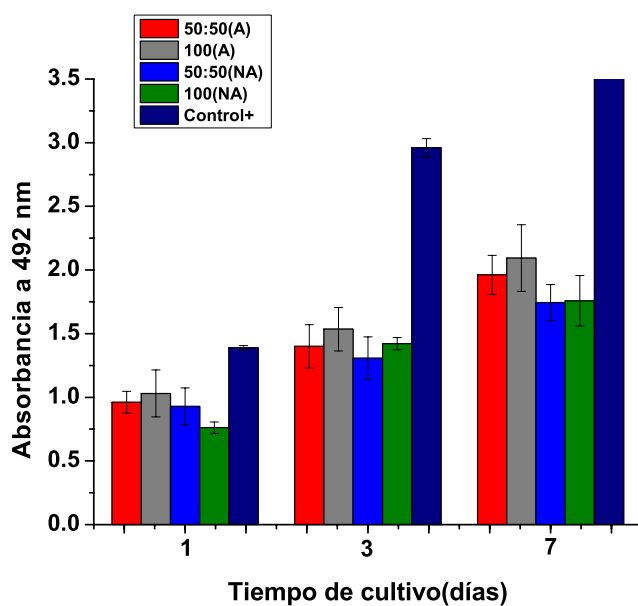


Figura 61 Viabilidad y proliferación de células musculares lisas en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) con fibras alineadas(A) y al azar (NA) por medio del ensayo de MTT.

De acuerdo a los resultados de absorbancia presentados en la Figura 61 se observa que todos los andamios presentan células viables, y que no hay disminución de la viabilidad en el transcurso del ensayo. Por otra parte se puede ver que hay una mayor viabilidad en los andamios con fibras alineadas en comparación con los andamios de fibras al azar. Esto nos permite inferir que debido al ordenamiento que tienen las células de musculo liso en los tejidos, este tipo de fibras le permiten conformarse de acuerdo a su naturaleza, lo cual les permite mantenerse en un ambiente idóneo para su crecimiento y proliferación, lo cual es lo que se busca para poder elegir el andamio más adecuado para la formación del neo-tejido de musculo liso que permita aplicarlo en la etapa in vivo para evaluar la capacidad de este en la regeneración de un esfínter dañado.

Tabla 17 Rapidez de proliferación celular en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas(A) y al azar (NA).

PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti)	$\Delta A/\Delta t$
50:50(A)	0.1629
0:100(A)	0.172
50:50(NA)	0.1322
0:100(NA)	0.1544
Control +	0.3351

En la Tabla 17 se presenta la rapidez de proliferación celular en los andamios. El mayor valor lo presenta el andamio de 0:100 con fibras alineadas seguido del andamio de 50:50 también con fibras alineadas, lo que nos corrobora lo dicho anteriormente. Los valores son muy parecidos, y esto nos da entender que el andamio de PCU por si solo es un buen candidato, esto debido a que también posee grupos funcionales bioactivos que hacen la superficie del andamio atractiva para las células. Por otra parte como vimos antes la presencia de COL y ELAS también promueve la adhesión celular y en este caso con la presencia de solo la mitad de fibras de PLA-COL-ELAS lo hacen también un andamio donde las células son viables y proliferan, y no promueve la apoptosis por un crecimiento exagerado como se vio en el de 75:25 con fibras al azar en la etapa anterior.

5.7.5.2 Ensayo de viabilidad mediante la reacción de la calceína acetoximetilada en andamios con fibras al azar y alineadas a siete días de cultivo.

En la Figura 62 se presentan las imágenes obtenidas del microscopio de epifluorescencia para el ensayo de viabilidad celular con calceína en los andamios con fibras al azar y alineadas a 7 días de cultivo. Podemos ver que en todos los andamios hay células viables, las cuales son las que dan fluorescencia en verde. También se puede ver claramente como hay un ordenamiento y alineación en las células cultivadas en los andamios con fibras alineadas en comparación con los andamios de fibras al azar, que no se observa ningún patrón. Finalmente, se observa que el mayor número de células viables lo presentan los andamios con fibras alineadas.

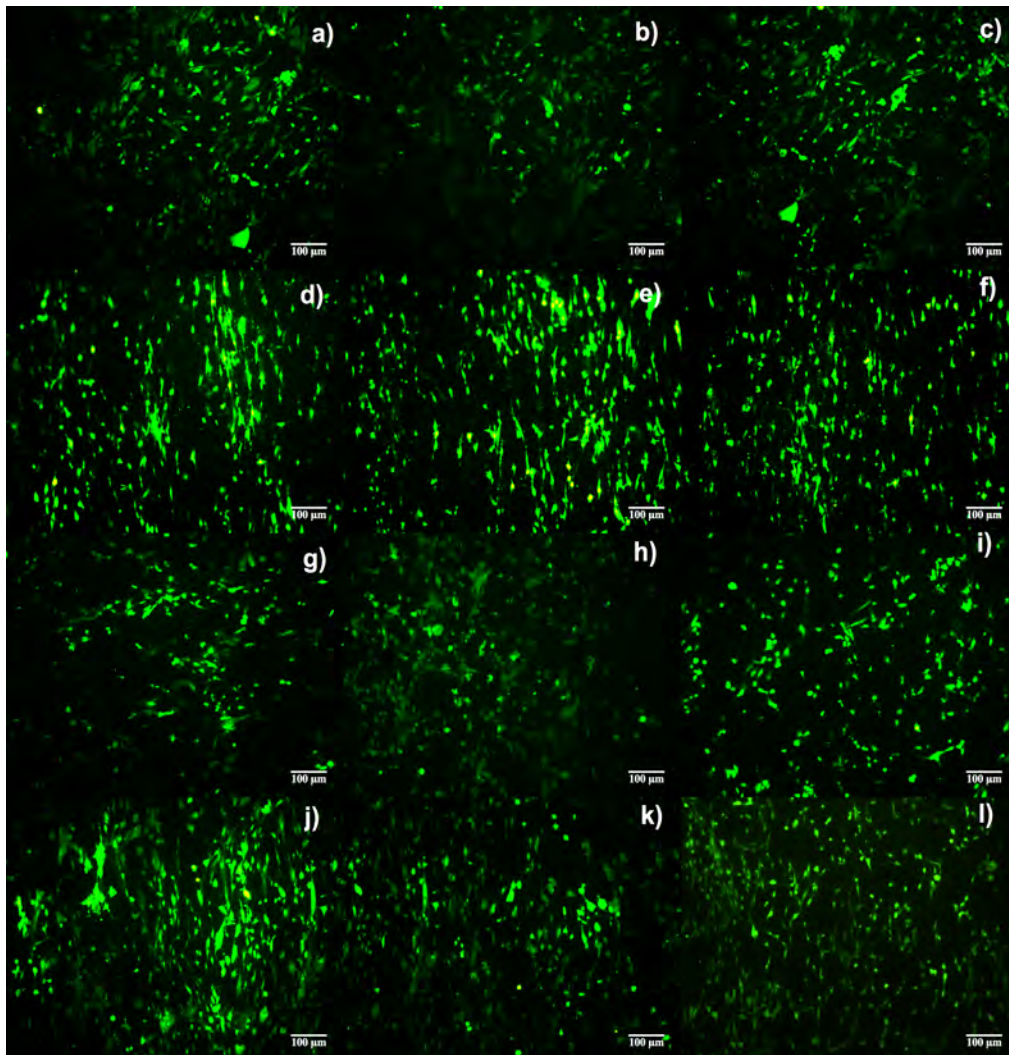


Figura 62. Viabilidad celular por medio de la reacción de la calceína acetoximetilada en los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) con fibras alineadas y al azar: a)-c) 50:50(NA), d)-f) 50:50(A), g)-i)0:100(NA) y j)-l) 0:100(A). Fotos tomadas a 10x en un microscopio de epifluorescencia Leica DMIRE2.

5.7.6 CARACTERIZACIÓN DE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS SEMBRADAS EN LOS ANDAMIOS CON FIBRAS ALINEADAS

En la Figura 63 se presentan las micrografías de la siembra de células musculares lisas en los andamios con fibras alineadas a 7 días de cultivo. Se observa al primer día de cultivo, células adheridas con una morfología fusiforme alargada con puntas bien aguzadas en la misma dirección de las fibras. Lo anterior, nos permite inferir que los andamios con fibras alineadas son un entorno más mimético para el crecimiento de las células musculares lisas, ya que desde el inicio del cultivo se están conformando como se observan en los tejidos nativos que contienen células musculares lisas[63]. Se observa un mayor número de células adheridas en el andamio de 50:50(Figura 63a-b) en comparación con el de PCU(Figura 63e-f), esto quizás debido a su carácter más hidrofóbico, como se observó en las mediciones del ángulo de contacto. A los 7 días de cultivo, en las micrografías de 2500x(Figura 63 c-d, g-h), se aprecia como es el contacto íntimo de las células con las fibras en cada uno de los andamios, como expanden sus haces a través de las superficie del andamio. Por otra parte, en las micrografías a 200x no se observa una diferencia clara en la cantidad de células adheridas en cada uno de los andamios, por lo cual se requiere de un estudio a mayor días de cultivo para saber si hay diferencia o no en la adhesión y proliferación de las células musculares lisas entre estos andamios.

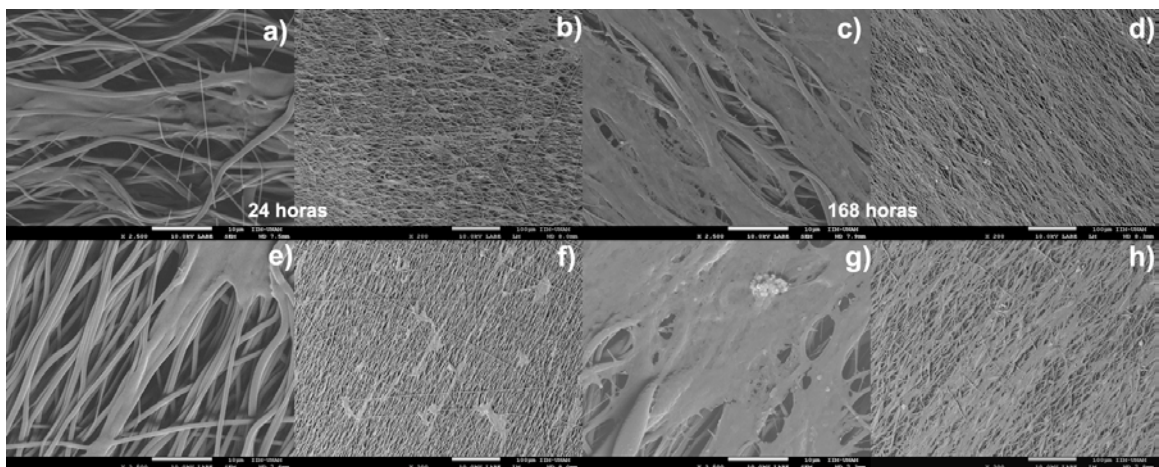


Figura 63. Micrografías de MEB a 2500x y 200x a 1 día y 7 días de cultivo en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas (Relación de %Vti): a)-d) 50:50 y e)-h) 0:100.

5.7.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS CON FIBRAS ALINEADAS CULTIVADOS IN VITRO DURANTE SIETE DÍAS POR MEDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA

A fin de analizar el fenotipo de las células musculares lisas en los andamios cultivados con fibras alineadas, se realizó la caracterización de estos por medio de inmunofluorescencia a siete días de cultivo. Los marcadores evaluados fueron F y α -actina.

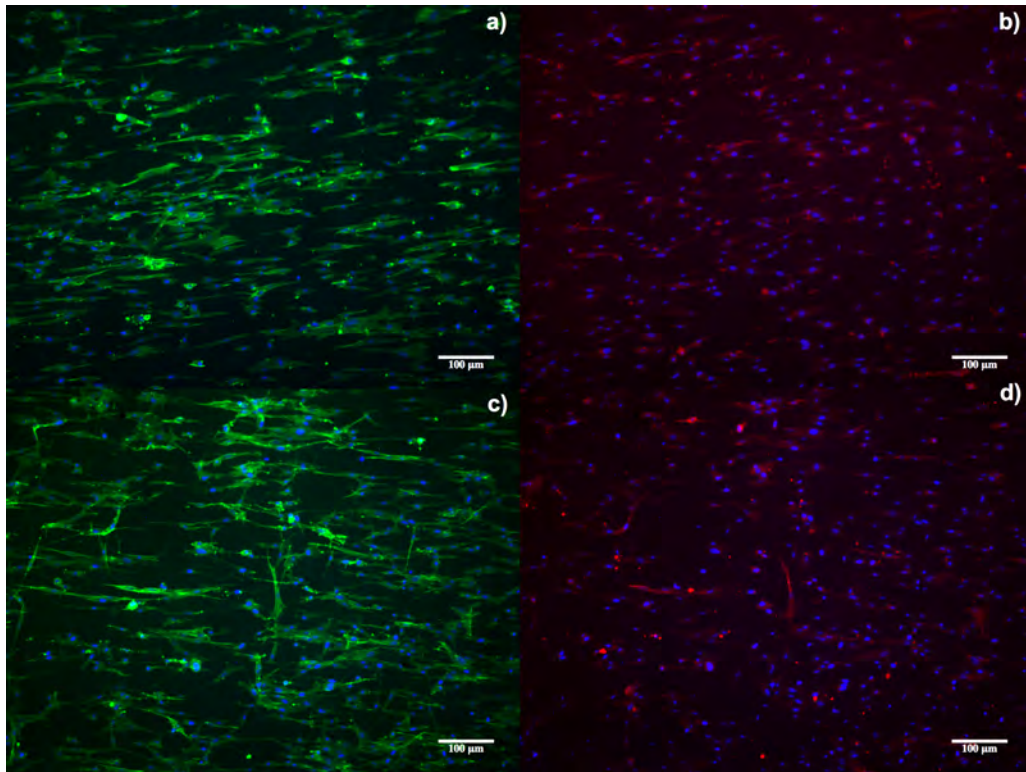


Figura 64. Micrografías de inmunofluorescencia a 10X de la expresión de F y α -actina en los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) con fibras alineadas a 7 días de cultivo: a)-b) 50:50 y c)-d) 0:100. Fotos tomadas a 10x en un microscopio de epifluorescencia Leica DMIRE2.

En la Figura 64 se presentan las micrografías obtenidas en un microscopio de epifluorescencia de las muestras de andamios con fibras alineadas con su respectivo marcaje. Se puede observar que las células en los dos tipos de andamios fueron positivas para F y α -actina. También se puede apreciar el ordenamiento y conexiones que hay en los filamentos de actina a través de cada uno de los andamios, debido a la alineación de las fibras de estos. Este comportamiento de las células, se puede correlacionar con lo encontrado cuando se cultivaron células musculares lisas en andamios de poli(caprolactona) con fibras alineadas [79] y a su ordenamiento en un tejido de músculo liso nativo [61], [62], [70].

Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados, demostramos que en los andamios electrohilados con fibras alineadas las células cultivadas mantienen el fenotipo de músculo liso, pero cambian su orientación de acuerdo a la alineación de las fibras en comparación con lo observado en los andamios con fibras al azar, brindando un ambiente

más similar al tejido nativo de las células musculares lisas y por ende una mejor organización de estas. Es por ello que podemos afirmar que en estos andamios la formación de un neo-tejido de músculo liso sería más idóneo en comparación con los andamios con fibras al azar.

5.7.8 ENSAYO DE VIABILIDAD MEDIANTE LA REACCIÓN DE LA CALCEINA ACETOXIMETILADA EN ANDAMIOS CON FIBRAS ALINEADAS A VEINTIÚN DÍAS DE CULTIVO.

Se realizó un experimento adicional para analizar la viabilidad de las células musculares lisas en las muestras de andamios con fibras alineadas a 21 días de cultivo, para determinar el comportamiento de los andamios cultivados en un periodo de tiempo más prolongado. Los resultados se presentan en las siguientes figuras, las mediciones se hicieron por triplicado.

En la Figura 65 podemos ver que a 14 días de cultivo, en el andamio de 50:50(Figura 65 a-c) se observan las células musculares lisas más alargadas en comparación a las células del andamio de 0:100(Figura 65 d-e), sin embargo en el número de células viables no se observa gran diferencia. A los 21 días de cultivo, en ambos andamios el número de células vivas aumentó razonablemente, y se observan las células más alargadas y aguzadas, por otra parte también ya se observan algunas fuera de plano, lo cual nos da indicio que hay una gran infiltración de células a través de los andamios. Por lo tanto, ambos andamios en un periodo de tiempo más prolongado siguen promoviendo el crecimiento y la proliferación de células musculares lisas y no se observan diferencias significativas entre ellos.

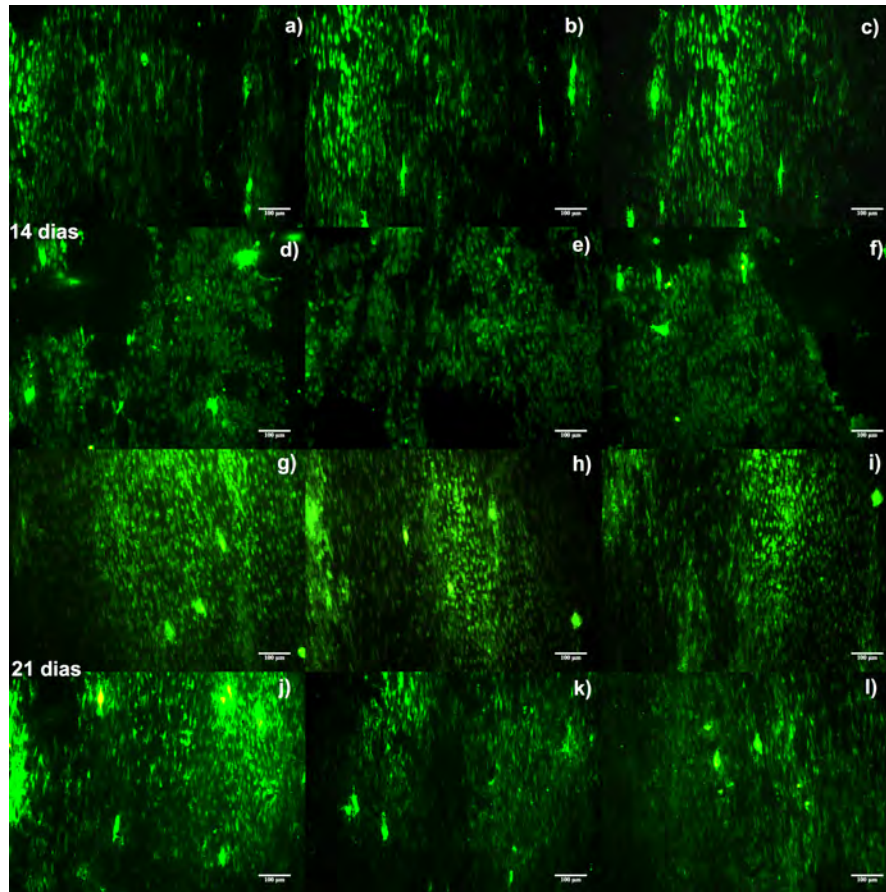


Figura 65. Viabilidad celular por medio de la reacción de la calceína acetoximetilada en los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación de %Vti) con fibras alineadas a 14 días de cultivo: a)-c) 50:50, d)-f) 0:100 y 21 días de cultivo: g)-i)50:50 y j)-l) 0:100. Fotos tomadas a 10x en un microscopio de epifluorescencia Leica DMIRE2.

5.7.9 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS CON FIBRAS ALINEADAS CULTIVADOS IN VITRO DURANTE VEINTIÚN DÍAS POR MEDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA

En esta sección se analizaron muestras de andamios cultivadas con células musculares lisas a 14 y 21 días para observar en un microscopio confocal, en este caso el marcaje fue solo para F-actina. Los resultados se presentan en las siguientes figuras.

En la Figura 65a y 66b se muestra el marcaje para F-actina a 14 días de cultivo en los andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas de 50:50 y 0:100. Observamos en ambas muestras claramente como se alinean las células musculares lisas en el andamio y

que siguen expresando los filamentos de F-actina. A 21 días de cultivo(Figura 66cyd), el número de células positivas para F-actina aumenta en cada uno de los andamios, corroborando lo encontrado en el ensayo de viabilidad celular de la sección anterior. Los filamentos de F-actina se observan mas estables y mas semejantes al control con solo células mostrado en secciones anteriores en comparación a lo visto para los andamios con fibras al azar de la misma composición.

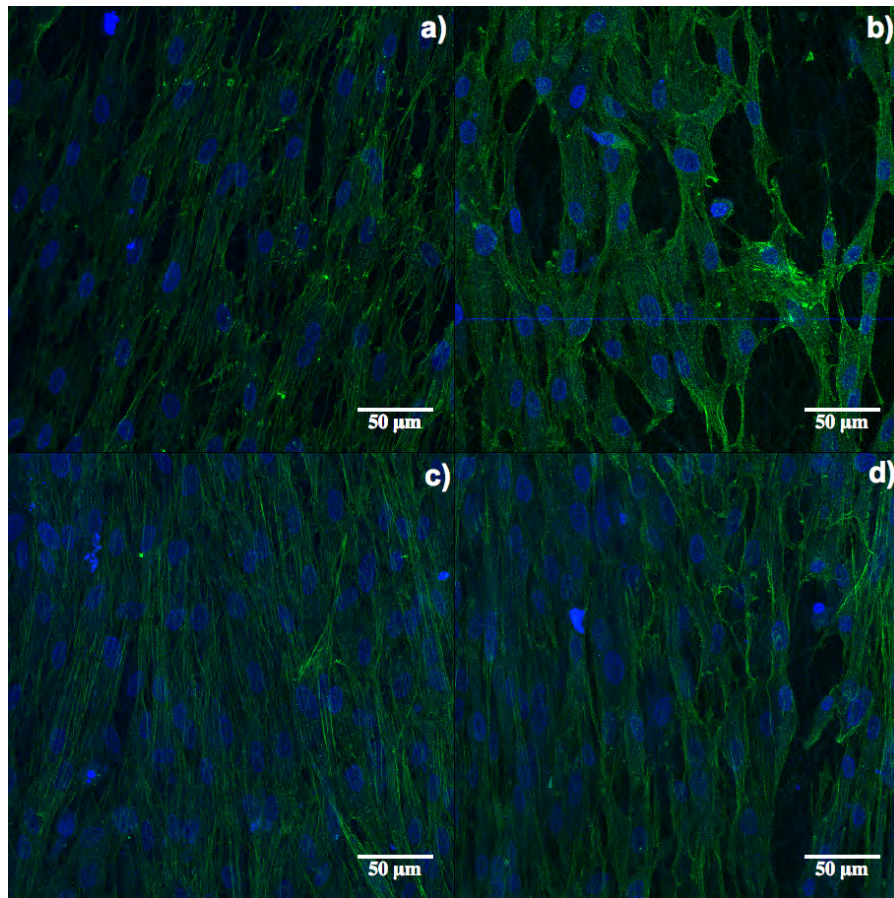


Figura 66. Marcaje para F-actina de células musculares lisas sembradas en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas (Relación de %Vti) a 14 días de cultivo: a)50:50, b)0:100 y 21 días de cultivo: c)50:50 y d) 0:100. Fotos tomadas en un microscopio confocal Leica SP8 a 40x.

Adicionalmente, En la Figura 67, se presentan las imágenes de la proyección en Z del marcaje para F-actina visto en la Figura 66, donde se puede apreciar claramente la alineación de las células a lo largo de las fibras de los andamios, además de como las células se han infiltrado a través del andamio de cada composición.

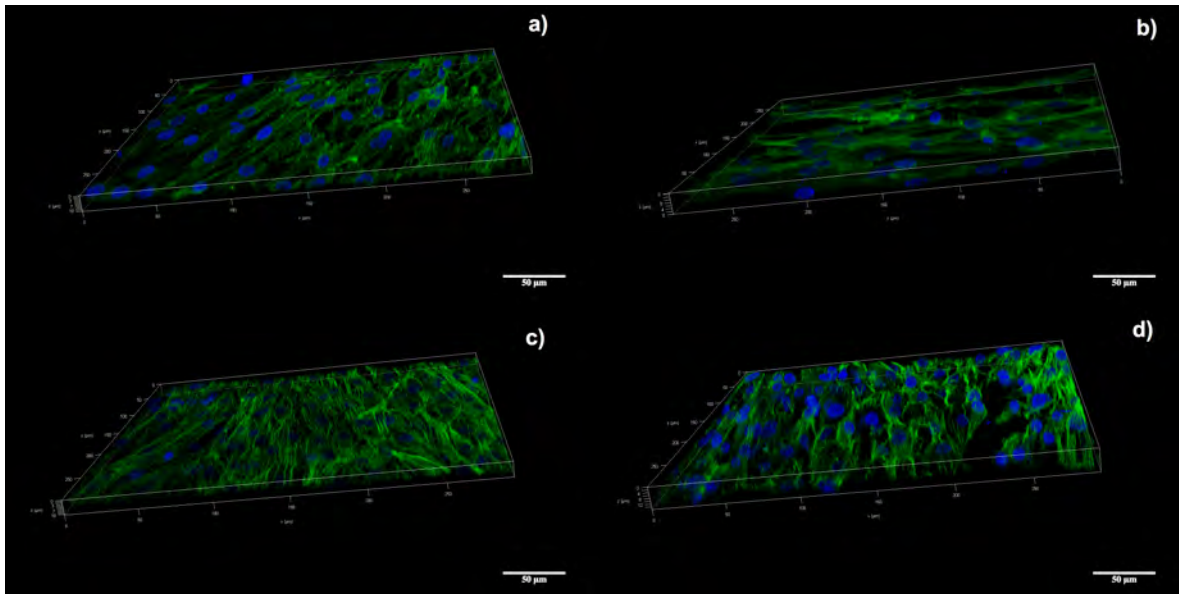


Figura 67. Proyección en Z para el marcaje de F-actina de células musculares lisas sembradas en andamios de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas (Relación de %Vti) a 14 días de cultivo: a)50:50, b)0:100 y 21 días de cultivo: c)50:50 y d) 0:100.

Con estos resultados, no se podría seleccionar cual sería el mejor candidato ya que ambos han presentado una buena citocompatibilidad, por lo tanto en la próxima sección se estudió la biocompatibilidad de estos, implantándolos en un modelo animal, para ver su comportamiento con el sistema inmune del modelo.

5.8 IMPLANTE SUBCUTÁNEO (Estudio Piloto)

De acuerdo a los resultados de las secciones anteriores, se seleccionaron los andamios con fibras alineadas de PLA-COL-ELAS:PCU (Relación %Vti) de 50:50 Y 0:100, para ser implantados en el conejo y evaluar su biocompatibilidad.

En la Figura 68 se presenta un esquema del procedimiento realizado para el implante de los andamios mediante unas fotografías. Podemos ver en la Figura 68a el momento en que se realizó la biopsia de una muestra de la vejiga del conejo para aislar las células musculares lisas y expandirlas (Figura 68b). Seguidamente, las células se sembraron en los andamios para formar un constructo autólogo (Figura 68c) y se mantuvieron durante siete días a condiciones de cultivo estándar. Finalmente, se implantaron en el conejo por medio de una sutura no absorbible, al lado izquierdo del conejo las muestras de los andamios de 50:50 y al lado derecho las muestras de los andamios de 0:100 (Figura 68d).

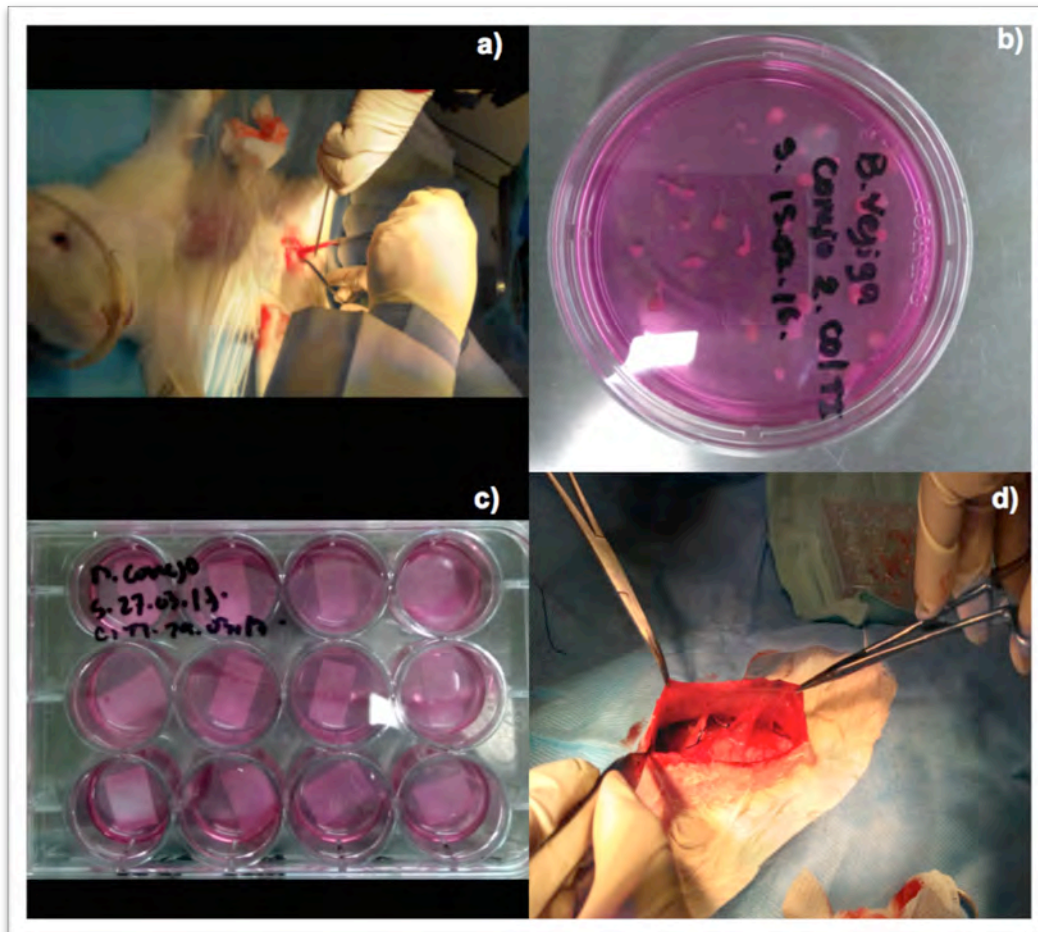


Figura 68. Esquema del procedimiento realizado para el implante de los andamios de de PLA-COL-ELAS:PCU con fibras alineadas (Relación de %Vti) 50:50 y 0:100 en el dorso de un conejo neozelandés: a) Biopsia de una parte de la vejiga del conejo, b) Aislamiento de las células musculares lisas, c) Siembra de las células musculares lisas en los andamios con fibras alineadas y d) Implante con suturas no absorbibles de los andamios a cada lado del conejo.



Figura 69. Evolución del cierre de la incisión que se realizó en el lugar del implante de los andamios: a) 0 días, b) 7 días y c) 30 días.

En la Figura 69, se presentan las fotografías que muestran la evolución del cierre de la incisión realizada para implantar los andamios. Se observa que a los 7 días (Figura 69b) no se presenta ninguna complicación, algunas suturas ya se han ido absorbiendo, la piel circundante no presenta ninguna anomalía y se encuentra en proceso de cicatrización. A los 30 días (Figura 69c), se observa la herida completamente cerrada, durante ese tiempo el individuo no presentó ningún padecimiento, y evolucionó satisfactoriamente a nivel externo.

Por otra parte, en la Figura 70 se presentan las imágenes obtenidas de los cortes histológicos de los implantes teñidos con hematoxilina y eosina para analizar la respuesta inflamatoria que presentaron a 30 días. En las Figuras 70a y 70b se presentan las imágenes para el andamio de 0:100, donde se observa la presencia de macrófagos o células epitelioideas cercado al andamio, células gigantes de Langhans y gran cantidad de linfocitos y capilares congestivos, por lo cual se infiere que este material a 30 días presentó una respuesta inflamatoria severa. En las Figuras 70c y 70d se muestran las imágenes del andamio de 50:50, allí podemos ver macrófagos rodeando el material, pocos linfocitos y células gigantes de Langhans, dando una respuesta inflamatoria mucho menor comparada con el andamio de 0:100, la cual es normal ya que siempre hay una reacción a cuerpo extraño en los implantes en general. Por lo tanto, se tiene que la presencia de fibras de PLA-COL-ELAS en el andamio de 50:50 reduce la respuesta inflamatoria a cuerpo extraño, aunque este también este compuesto en parte por fibras de PCU. Por lo que, podemos decir que, aunque los resultados de citotoxicidad sean excelentes para el andamio de 0:100, su respuesta inmunogénica a 30 días es de considerar, se requiere el control a 3 y 6 meses para concluir su respuesta. Por el contrario, el andamio de 50:50 presentó buenos resultados tanto en las evaluaciones de

citotoxicidad como de biocompatibilidad a 30 días, siendo por el momento el mejor candidato para ser utilizado para la formación de un neo-esfínter.

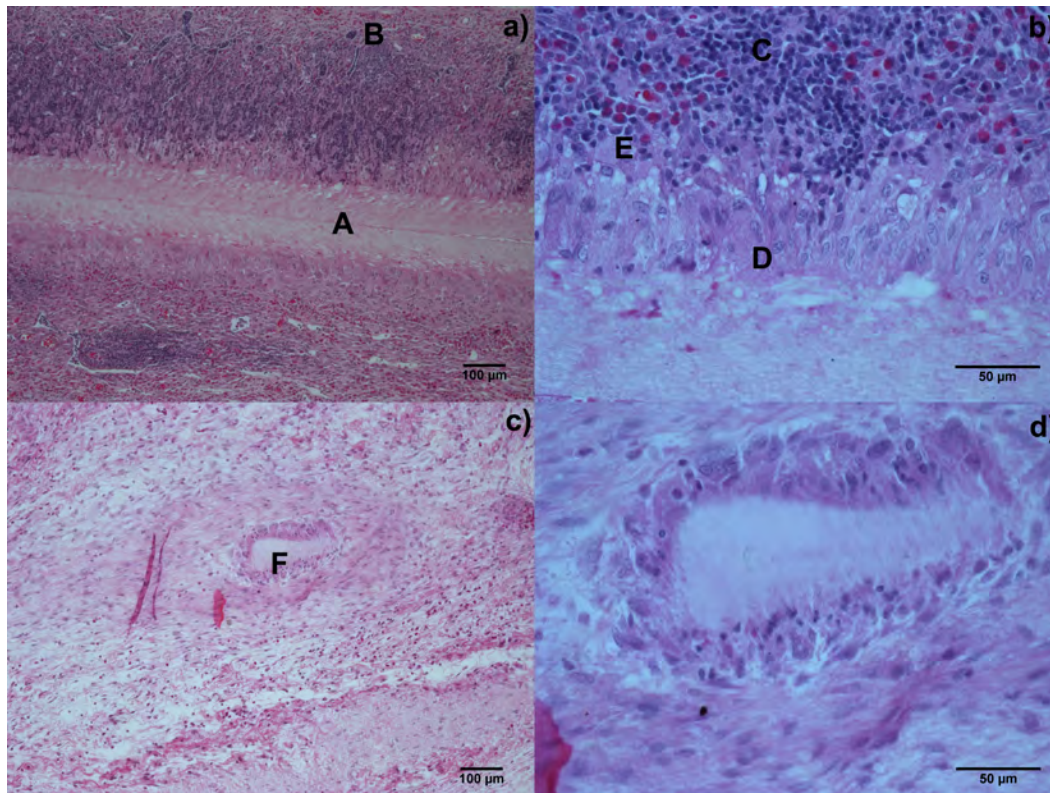


Figura 70. Tinciones de hematoxilina y eosina de las muestras post-implante de andamios de PLA-COL-ELAS:PCU: a-b)0:100(10x-40x) y c)-d)50:50(10x-40x). A: andamio(0:100), B: capilar congestivo, C: Linfocito, D: Macrófago, E: Célula gigante de Langhans y F: andamio(50:50).

6 CONCLUSIONES

En este estudio fue posible estudiar los parámetros del proceso de electrohilado para obtener andamios de poli(ácido láctico) con colágena y elastina con fibras libres de disolvente y utilizando un colector con movimientos en X y Y. El diámetro promedio de las fibras estuvo fuertemente influenciado por la presencia de colágena y elastina.

Se logró obtener un cultivo de células musculares lisas de la vejiga de conejo, las cuales presentaron el fenotipo característico de este tipo de células, el cual fue estudiado mediante ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

La caracterización fisicoquímica de los andamios de poli(ácido láctico) con colágena y elastina nos permitió entender la influencia de la estructura química y de la estabilidad mecánica de los andamios en los estudios *in vitro*. El andamio de PLA-COL-ELAS presentó la mayor rapidez de proliferación celular.

Se llevó a cabo con éxito la técnica de electrohilado con un sistema de inyección simultáneo con lados opuestos. Esta técnica brindó la posibilidad de obtener andamios con fibras al azar y alineadas de dos diferentes soluciones poliméricas, PLA-COL-ELAS y PCU, brindándoles excelentes propiedades en cuanto adhesión y proliferación celular.

Los andamios de PLA-COL-ELAS: PCU (Relación %Vti) con fibras al azar obtenidos por medio del electrohilado con inyección simultánea presentaron un buen comportamiento en los estudios *in vitro*, siendo los andamios de composición 50:50 y 0:100 los que mostraron una mayor rapidez de proliferación celular y estabilidad mecánica.

Los andamios de PLA-COL-ELAS: PCU (Relación %Vti) 50:50 y 0:100 con fibras alineadas obtenidos por medio del electrohilado con inyección simultánea, presentaron mejores propiedades mecánicas en comparación con los andamios con fibras al azar de la misma composición debido a la alineación de las fibras que aumenta la fase cristalina en estas. Además, presentaron un mejor comportamiento *in vitro*, siendo así una excelente alternativa para la formación de un neo-tejido de músculo liso que sirva para la regeneración de un esfínter dañado. Sin embargo, en el estudio de biocompatibilidad llevado a cabo en un modelo animal durante treinta días, el andamio de 0:100 presentó una respuesta inflamatoria severa en comparación con la del andamio de 50:50 que fue mucho menor, por lo cual se infiere que la presencia de colágena y elastina *in vivo* tiene una gran influencia en la respuesta inmunológica positiva de este andamio.

7 PERSPECTIVAS

Caracterizar el fenotipo de las células musculares lisas aisladas de la vejiga de conejo por medio de citometría de flujo.

Estudiar la degradación de los andamios electrohilados con fibras alineadas.

Evaluar las propiedades mecánicas de un esfínter anal nativo.

Determinar la biocompatibilidad de los constructos (andamios + células musculares lisas) formados *in vitro*, implantándolos subcutáneamente en un modelo animal *in vivo* a tres y seis meses.

Evaluar el cambio en las propiedades mecánicas de los constructos implantados subcutáneamente durante tres meses.

Evaluar la funcionalidad de los constructos (andamios + células musculares lisas) formados *in vitro* en un modelo animal de incontinencia fecal *in vivo*.

8 REFERENCIAS

- [1] H. Shin, S. Jo, and A. G. Mikos, "Biomimetic materials for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4353–4364, 2003.
- [2] J. Peterson and P. J. Pasricha, "Regenerative medicine and the gut.," *Gastroenterology*, vol. 141, no. 4, pp. 1162–6, 1166–2, Oct. 2011.
- [3] C. C. Barrias, K. B. Fonseca, S. C. Neves, D. B. Gomes, F. R. Maia, and S. J. Bidarra, "Engineering cell-matrix interactions," vol. 2, p. 7897, 2012.
- [4] G. Chen, T. Ushida, and T. Tateishi, "Scaffold design for tissue engineering," *Macromol. Biosci.*, vol. 2, no. 2, pp. 67–77, 2002.
- [5] X. Yang and H. Wang, "Electrospun Functional Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering," *Tissue Eng.*, pp. 159–178, 2005.
- [6] B. J. Papenburg, "Design strategies for tissue engineering scaffolds," *ProQuest Diss. Theses ProQuest Diss. Theses*, p. 208, 2009.
- [7] Y. Zhang, B. Su, J. Venugopal, S. Ramakrishna, and C. Lim, "Biomimetic and bioactive nanofibrous scaffolds from electrospun composite nanofibers," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 2, no. 4, pp. 623–638, 2007.
- [8] X. Liu and P. Ma, "Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 32, no. 3, pp. 477–486, 2004.
- [9] L. Fambri, C. Migliaresi, K. Kesenci, and E. Piskin, "Biodegradable Polymers," pp. 119–187, 2002.

- [10] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010.
- [11] D. H. Reneker, A. L. Yarin, E. Zussman, and H. Xu, "ELECTROSPINNING OF NANOFIBERS FROM POLYMER SOLUTIONS A.L.Yarin , E.Zussman," *Polymer (Guildf)*., 2007.
- [12] T. J. Sill and H. A. von Recum, "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, no. 13, pp. 1989–2006, 2008.
- [13] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T.-C. Lim, and Z. Ma, *An Introduction to electrospinning and nanofibers*, no. 1. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2005.
- [14] J. Stanger, N. Tucker, and M. Staiger, "Electrospinning," *J. Electrostat.*, vol. 75, no. 6, p. 218, 1995.
- [15] D. H. Reneker and A. L. Yarin, "Electrospinning jets and polymer nanofibers," *Polymer (Guildf)*., vol. 49, no. 10, pp. 2387–2425, 2008.
- [16] J. Lannutti, D. Reneker, T. Ma, D. Tomasko, and D. Farson, "Electrospinning for tissue engineering scaffolds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, no. 3, pp. 504–509, 2007.
- [17] B. Sundaray, V. Subramanian, T. S. Natarajan, R.-Z. Xiang, C.-C. Chang, and W.-S. Fann, "Electrospinning of continuous aligned polymer fibers," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 84, no. 7, p. 1222, 2004.
- [18] M. R. Badrossamay, H. A. McIlwee, J. a Goss, and K. K. Parker, "Nanofiber assembly by rotary jet-spinning.," *Nano Lett.*, vol. 10, no. 6, pp. 2257–61, Jun. 2010.

- [19] A. Anatomy, T. Contribution, and N. Technology, "Chapter 1 Anorectal Anatomy : The Contribution of New Technology," pp. 3–16.
- [20] R. Thakar and D. E. Fenner, "Anatomy of the Perineum and the Anal Sphincter," pp. 1–12.
- [21] J. Stoker and C. Wallner, "The Anatomy of the Pelvic Floor and Sphincters," pp. 1–29.
- [22] a M. Holschneider and N. V Freeman, "Anatomy and function of the normal rectum and anus.," *Birth Defects Orig. Artic. Ser.*, vol. 24, no. 4, pp. 125–54, Jan. 1988.
- [23] B. Enema, "Colon and Rectum," pp. 185–277.
- [24] T. Wedel, "Anatomy of the Colon, Rectum, Anus, and Pelvic Floor.," in *Coloproctology*, O. P. Herold A., Lehur PA., Matzel K., Ed. Berlin: Springer, 2017, pp. 7–22.
- [25] C. Di Lorenzo and M. a Benninga, "Pathophysiology of pediatric fecal incontinence.," *Gastroenterology*, vol. 126, no. 1 Suppl 1, pp. S33–S40, 2004.
- [26] A. a. Pare, "Anorectal Diseases," vol. 26, no. 2, pp. 367–376, Jun. 1997.
- [27] T. J. Zuber, "Diseases of the Rectum and Anus."
- [28] D. Constanza and C. D. L. Ríos, "Incontinencia fecal, una consulta cada vez más frecuente," *Ses. Intest. delgado y colon-Hospital 12 Oct.*, no. 6, pp. 30–37, 2012.

- [29] Y. Maestre Gonzalez, "Universitat Autònoma de Barcelona Facultat de Medicina Departament de Cirurgia Prevalencia de la incontinencia fecal en un sector de la ciudad de Barcelona y análisis de su impacto en la calidad de vida y la salud mental," Universitat Autònoma de Barcelona, 2013.
- [30] C. Wainstein, R. Quera, I. Quijada, P. Pelviano, and L. Condes, "Incontinencia Fecal en el adulto : Un desafío permanente," *Rev. Med. Clin. Condes*, vol. 24, no. 2, pp. 249–261, 2013.
- [31] A. Solana-Bueno, "Tratamiento de la incontinencia fecal grave," vol. 12, no. 3.
- [32] F. H. F. Galvão, V. E. Seid, R. M. Nunes dos Santos, M. Kitamura, R. de Castro Galvão, R. Ambar Pinto, R. Miyashiro Nunes dos Santos, V. E. S. R. M. Nunes, M. K. R. De Castro, G. R. Âmbar, and R. M. Nunes, "Anorectal transplantation.," *Tech. Coloproctol.*, vol. 13, no. 1, pp. 55–9, Mar. 2009.
- [33] S. Shawki and S. D. Wexner, "Newer Concepts in Fecal Incontinence: Injectables and Sacral Nerve Stimulation," *Semin. Colon Rectal Surg.*, vol. 21, no. 1, pp. 30–36, Mar. 2010.
- [34] N. J. Kenefick, C. J. Vaizey, a J. Malouf, C. S. Norton, M. Marshall, and M. a Kamm, "Injectable silicone biomaterial for faecal incontinence due to internal anal sphincter dysfunction.," *Gut*, vol. 51, no. 2, pp. 225–8, Aug. 2002.
- [35] Lirici, Ishida, Di Paola, Ponzano, and Hüscher, "Dynamic graciloplasty versus implant of artificial sphincter for continent perineal colostomy after Miles' procedure: Technique and early results.," *Minim. Invasive Ther. Allied Technol.*, vol. 13, no. 5, pp. 347–61, Dec. 2004.
- [36] P. Zan, G. Yan, and H. Liu, "Modeling of human colonic blood flow for a novel

artificial anal sphincter system.," *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, vol. 9, no. 9, pp. 734–8, Oct. 2008.

- [37] L. Borda, E. Kcam, and E. A. Blanco, "Treatment of severe fecal incontinence with artificial sphincter . Report of two cases," vol. 35, no. 3, 2015.
- [38] a Feki, D. L. Faltin, T. Lei, J.-B. Dubuisson, S. Jacob, and O. Irion, "Sphincter incontinence: is regenerative medicine the best alternative to restore urinary or anal sphincter function?," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, no. 4, pp. 678–84, Jan. 2007.
- [39] A. Frudinger, D. Kolle, W. Schwaiger, J. Pfeifer, J. Paede, and S. Halligan, "Muscle-derived cell injection to treat anal incontinence due to obstetric trauma: pilot study with 1 year follow-up," *Gut*, vol. 59, no. 1, pp. 55–61, 2010.
- [40] R. Inglin, L. Brügger, D. Candinas, and D. Eberli, "Bioengineering of Colo-Rectal Tissue," 2010.
- [41] E. A. Miyasaka, S. Raghavan, R. R. Gilmont, K. Mittal, S. Somara, K. N. Bitar, and D. H. Teitelbaum, "In vivo growth of a bioengineered internal anal sphincter: comparison of growth factors for optimization of growth and survival," *Pediatr. Surg. Int.*, vol. 27, no. 2, pp. 137–143, 2011.
- [42] S. Ghosh, V. Gutierrez, C. Fernández, M. a Rodriguez-Perez, J. C. Viana, R. L. Reis, and J. F. Mano, "Dynamic mechanical behavior of starch-based scaffolds in dry and physiologically simulated conditions: effect of porosity and pore size.," *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 4, pp. 950–9, 2008.
- [43] T. Mode and A. Force, "Polymers in Medicine: Methods for Surface Characterization • Tapping Mode Atomic Force Microscopy (TM-AFM) Ø Length

characteristics of polymer chains Ø Polyurethane surface topography for assessing wetting behavior Surface Characterization of Polymers.”

- [44] J. Tao, “Effects of Molecular Weight and Solution Concentration on Electrospinning of PVA,” 2003.
- [45] S. V. Fridrikh, J. H. Yu, M. P. Brenner, and G. C. Rutledge, “Controlling the Fiber Diameter during Electrospinning,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 90, no. 14, p. 144502, 2003.
- [46] H. Jiang, D. Fang, B. S. Hsiao, B. Chu, and W. Chen, “Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning,” *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 2, pp. 326–333, 2004.
- [47] Y. Feng, F. Meng, R. Xiao, H. Zhao, and J. Guo, “Electrospinning of polycarbonate urethane biomaterials,” *Front. Chem. Sci. Eng.*, vol. 5, no. 1, pp. 11–18, Jul. 2010.
- [48] B. Brodsky, J. A. Werkmeister, and J. A. M. Ramshaw, “Collagens and Gelatins,” pp. 119–128.
- [49] J. E. Oliveira, L. H. C. Mattoso, W. J. Orts, and E. S. Medeiros, “Structural and morphological characterization of micro and nanofibers produced by electrospinning and solution blow spinning: A comparative study,” *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2013, 2013.
- [50] G. S. Nyanhongo, R. D. Rodríguez, E. N. Prasetyo, C. Caparrós, C. Ribeiro, V. Sencadas, S. Lanceros-Mendez, E. H. Acero, and G. M. Guebitz, “Bioactive albumin functionalized polylactic acid membranes for improved biocompatibility,” *React. Funct. Polym.*, vol. 73, no. 10, pp. 1399–1404, Oct. 2013.

- [51] V. H. Orozco, W. Brostow, W. Chonkaew, and B. L. López, "Preparation and characterization of poly(Lactic Acid)- G-maleic anhydride + starch blends," *Macromol. Symp.*, vol. 277, no. 1, pp. 69–80, 2009.
- [52] C. P. S. Hsu, "Infrared Spectroscopy," *Handb. Instrum. Tech. Anal. Chem.*, pp. 247–284, 1997.
- [53] V. Y. Chakrapani, A. Gnanamani, V. R. Giridev, M. Madhusoothanan, and G. Sekaran, "Electrospinning of Type I Collagen and PCL Nanofibers Using Acetic Acid," 2012.
- [54] X. Li, L. Liu, P. Yang, P. Li, J. Xin, and R. Su, "Synthesis of collagen-modified polylactide and its application in drug delivery," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 129, no. 6, pp. 3290–3296, Sep. 2013.
- [55] M. Ahmad and S. Benjakul, "Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*)," *Food Chem.*, vol. 120, no. 3, pp. 817–824, 2010.
- [56] E. Y. Gómez-Pachón, F. M. Sánchez-Arévalo, F. J. Sabina, A. Maciel-Cerda, R. M. Campos, N. Batina, I. Morales-Reyes, and R. Vera-Graziano, "Characterisation and modelling of the elastic properties of poly(lactic acid) nanofibre scaffolds," *J. Mater. Sci.*, Aug. 2013.
- [57] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, and B. Chu, "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes," *Polymer (Guildf)*, vol. 43, no. 16, pp. 4403–4412, 2002.
- [58] E. Y. Gomez-Pachon, "ESTUDIO TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE LAS PROPIEDADES ELÁSTICAS DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS," UNIVERSIDAD

NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, 2013.

- [59] N. Wang, Y. Zhao, and L. Jiang, "Low-cost, thermoresponsive wettability of surfaces: Poly(N- isopropylacrylamide)/polystyrene composite films prepared by electrospinning," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 29, no. 6, pp. 485–489, 2008.
- [60] G. Manzo, "Drop motion on superhydrophobic fiber mats," University of Akron, 2011.
- [61] J. A. Beamish, P. He, K. Kottke-Marchant, and R. E. Marchant, "Molecular Regulation of Contractile Smooth Muscle Cell Phenotype: Implications for Vascular Tissue Engineering," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 16, no. 5, pp. 467–491, 2010.
- [62] M. H. Ross and W. Pawlina, *Histology - A Text and Atlas*. 2011.
- [63] J. J. Stankus, J. Guan, K. Fujimoto, and W. R. Wagner, "Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix.," *Biomaterials*, vol. 27, no. 5, pp. 735–44, Feb. 2006.
- [64] L. Wang, J. Zhang, W. Fu, D. Guo, J. Jiang, and Y. Wang, "Association of smooth muscle cell phenotypes with extracellular matrix disorders in thoracic aortic dissection," *J. Vasc. Surg.*, vol. 56, no. 6, p. 1698–1709.e1, 2012.
- [65] B. P. Kropp, Y. Zhang, J. J. Tomasek, R. Cowan, P. D. Furness, M. B. Vaughan, M. Parizi, and E. Y. Cheng, "Characterization of cultured bladder smooth muscle cells: assessment of in vitro contractility.," *J. Urol.*, vol. 162, no. 5, pp. 1779–84, 1999.
- [66] P. M. Tissue and W. Grove, "Immunofluorescence Detection of Alpha Smooth Muscle Actin in Reagent and Antibody Information," pp. 3–4.

- [67] T. Mossman, "MTT Mitogen Assay in Microtiter Plates," *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1983, pp. 55–63, 1983.
- [68] R. Qi, M. Shen, X. Cao, R. Guo, X. Tian, J. Yu, and X. Shi, "Exploring the dark side of MTT viability assay of cells cultured onto electrospun PLGA-based composite nanofibrous scaffolding materials.," *Analyst*, vol. 136, no. 14, pp. 2897–2903, 2011.
- [69] C. Alperin, P. W. Zandstra, and K. A. Woodhouse, "Polyurethane films seeded with embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for use in cardiac tissue engineering applications," *Biomaterials*, vol. 26, no. 35, pp. 7377–7386, 2005.
- [70] J. Nikolovski and D. J. Mooney, "Smooth muscle cell adhesion to tissue engineering scaffolds.," *Biomaterials*, vol. 21, no. 20, pp. 2025–32, Oct. 2000.
- [71] L. Liu and Y. Dzenis, "Simulation of electrospun nanofibre deposition on stationary and moving substrates," *Micro Nano Lett.*, vol. 6, no. 6, p. 408, 2011.
- [72] J. Shawon and C. Sung, "Electrospinning of polycarbonate nanofibers with solvent mixtures THF and DMF," *J. Mater. Sci.*, vol. 39, no. 14, pp. 4605–4613, 2004.
- [73] P. Gupta and G. Wilkes, "Simultaneous electrospinning of two polymer solutions in a side-by-side approach to produce bicomponent fibers," *Polymer (Guildf)*., vol. 44, no. Chapter 5, pp. 6353–6359, 2006.
- [74] L. Avila-Gutierrez, "Andamios tubulares de poli(carbonato-uretano) con fibronectina de plasma humano elaborados por la técnica de electrohilado," Universidad Nacional Autonoma de Mexico, 2014.
- [75] P. Kuppan, S. Sethuraman, and U. M. Krishnan, "Interaction of human smooth

muscle cells with nanofibrous scaffolds: Effect of fiber orientation on cell adhesion, proliferation, and functional gene expression.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 103, no. 7, pp. 2236–50, 2015.

- [76] S. N. Patel, "CHARACTERIZATION OF SMOOTH MUSCLE CELL PHENOPTYPE AND FUNCTIONALITY FOR POTENTIAL TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS," University of Pittsburgh, 2009.
- [77] S. Sharifpoor, C. a Simmons, R. S. Labow, and J. Paul Santerre, "Functional characterization of human coronary artery smooth muscle cells under cyclic mechanical strain in a degradable polyurethane scaffold.," *Biomaterials*, vol. 32, no. 21, pp. 4816–29, Jul. 2011.
- [78] Z. X. Meng, Y. S. Wang, C. Ma, W. Zheng, L. Li, and Y. F. Zheng, "Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 8, pp. 1204–1210, 2010.
- [79] A. Agrawal, B. H. Lee, S. A. Irvine, J. An, R. Bhuthalingam, V. Singh, K. Y. Low, C. K. Chua, S. S. Venkatraman, A. Agrawal, B. H. Lee, S. A. Irvine, J. An, R. Bhuthalingam, V. Singh, K. Y. Low, C. K. Chua, and S. S. Venkatraman, "Smooth Muscle Cell Alignment and Phenotype Control by Melt Spun Polycaprolactone Fibers for Seeding of Tissue Engineered Blood Vessels," *Int. J. Biomater.*, vol. 2015, pp. 1–8, 2015.